

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»
Кафедра вірусології

Завідувач кафедри проф., д.б.н. Будзанівська І. Г.

Протокол № ____ засідання кафедри
від “ ____ ” _____ 20 ____ р.

**ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРІОФАГІВ, ЩО УРАЖУЮТЬ БАКТЕРІЇ
ВИДУ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA***

Випускна кваліфікаційна робота
студента 2 року магістратури
денної форми навчання
за спеціальністю біологія
Бондаренко Олександрі Олексіївни

Науковий керівник від кафедри
доцент, кандидат біологічних наук
Харіна А.В.

Робота виконана на базі ТОВ «НЕОПРОБІОКЕАР-УКРАЇНА»
під керівництвом доцента, к.б.н. Харіної А.В.

Оцінка захисту роботи

Київ – 2024 р.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

КАІСШ	CAUTI	–	Катетер-асоційовані інфекції сечовидільної системи (catheter-associated urinary tract infection)
МАР	MDR	–	Мульти-антибіотикорезистентність (multiple drug resistance)
ССТЗ	T3SS	–	Система секреції типу 3 (type 3 secretion system)
КС	QS	–	Відчуття кворуму, кворум сенсінг (quorum sensing)
ІСШ	UTI's	–	Інфекції сечовивідних шляхів (urinary tract infections)
КАІСШ	CAUTI's	–	Катетер-асоційовані інфекції сечовивідних шляхів (catheter-associated urinary tract infections)
АБР	AMR	–	Антибіотикорезистентність (antimicrobial resistance)
МАБР	MDR	–	Мультирезистентність (multidrug resistance)
ЕАБР	XDR	–	Екстенсивна резистентність (extensively drug-resistant)
ПАБР	PDR	–	Панрезистентність (pan drug resistance)
ТСА	TSA	–	Трипто-соєвий агар (Tryptic soy agar)

ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1. Загальна характеристика <i>Pseudomonas aeruginosa</i> та бактеріофагів, що інфікують вищезазначену бактерію.....	7
1.1. Загальна характеристика <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7
1.1.1. Морфологічні та культуральні властивості <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7
1.1.2. Біохімічні особливості <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9
1.1.3 Фактори вірулентності та токсини <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
1.2 Інфекції викликані <i>Pseudomonas aeruginosa</i> та їх вплив на організм людини.....	13
1.2.1 Інфекції викликані <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
1.2.2 Антибіотикорезистентність <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15
1.3. Бактеріофаги, що уражують <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , фаготерапія, її переваги та недоліки.....	19
1.3.1. Характеристика бактеріофагів та їхні життєві цикли.....	19
1.3.2. Загальні аспекти фаготерапії, її переваги та недоліки.....	20
1.3.3. Бактеріофаги, що ефективні проти <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	25
2.1. Культивування мікроорганізмів та бактеріофаги.....	25
2.2. Виділення бактеріофагів із довкілля.....	25
2.3. Визначення інфекційного титру бактеріофагів.....	26
2.4. Накопичення та очищення бактеріофагів.....	27
2.5. Виділення окремих ізолятів бактеріофагів.....	27
2.6. Визначення спектру чутливості.....	28
2.7. Концентрування бактеріофагів шляхом високошвидкісного центрифугування.....	29
2.8. Трансмисійна електронна мікроскопія.....	29

2.9. Концентрування бактеріофагів з використанням фільтру-прототипу.....	29
2.10. Визначення антибіотико- та фагорезистентності тест-бактерій.....	31
2.11. Визначення збереження активності бактеріофагів супозиторіях.....	32
2.12. Статистичний аналіз даних.....	35
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ.....	36
3.1. Поліморфність ізоляту <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1664.....	36
3.2. Бактеріофаги, виділені із довкілля.....	37
3.3. Накопичення бактеріофагів методом збагачення.....	39
3.4. Спектри чутливості різних типів поліморфної <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1664 до різних зразків бактеріофагів.....	41
3.5. Ефективність концентрування бактеріофагів за допомогою фільтра-прототипа.....	42
3.6. Ізоляти досліджуваних бактеріофагів, їх інфекційні титри та спектри активності	47
3.7. Морфологія ізолятів бактеріофагів 1/1 та 5/2.....	49
3.8. Фаго- та антибіотикорезистентність ізолятів фагів 1/1 та 5/2.....	49
3.9. Активність бактеріофагів 1/1 та 5/2 супозиторіях.....	53
ВИСНОВКИ.....	60
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	61

ВСТУП

На сьогоднішній день існує велике різноманіття потенційно небезпечних мікроорганізмів, що викликають інфекції в організмі людини. Зокрема, одним з найбільш загрозливих патогенів бактеріальної природи є *Pseudomonas aeruginosa* – грам-негативні мікроорганізми роду *Pseudomonas*, які викликають підвищений інтерес наукового співтовариства через свою широку поширеність у природі та потенційну небезпеку для здоров'я людини [1]. Так, даний мікроорганізм включений до списку «бактерій, що потребують пошуку нових антибіотиків», ВООЗ. При цьому *Pseudomonas aeruginosa* займає одне з перших місць у даному списку, маючи критичний пріоритет [2]. *Pseudomonas aeruginosa* має високу патогенність та здатна викликати інфекційний процес у різних системах органів людини. Так, синьогнійна паличка викликає інфекції шкірних покривів та слизових оболонок (синдром зеленого нігтя [3, 4], інфекція перетинок пальців ніг [5, 6], синдром діабетичної стопи [7]), інфекцію верхніх та нижніх дихальних шляхів [8, 9, 10] та шлунково-кишкового тракту [11, 12, 13], часто виявляють ураження сечовивідних шляхів, зокрема так звані катетер-асоційовані інфекції сечовидільної системи (КАІСШ) [14, 15, 16].

Pseudomonas aeruginosa, так само як і ряд інших мікроорганізмів здатна викликати первинну та вторинну бактеріємії, що за відсутності лікування або унеможливлення останнього може призводити до таких станів як: сепсис [17], септичний шок [18], бактеріальний ендокардит [19], остеомієліт [20, 21] та поява вторинних вогнищ інфекції. Необхідно відмітити, що інфекції, спричинені синьогнійною паличкою викликають занепокоєння спеціалістів медичної та наукової сфер не лише через широку розповсюдженість, а і через почастищення появи штамів, резистентних до дії антибіотиків [2]. Так, мультирезистентні (МАБР) штами *Pseudomonas aeruginosa* не виявляють чутливості до β -лактамних антибіотиків, включаючи карбапенеми, що є антибіотиками останньої інстанції для лікування бактеріальних інфекцій [22, 23]. Варто зазначити, що синьогнійна паличка здатна до формування біоплівки,

що також ускладнює використання антибіотиків для лікування інфекцій, спричинених даним патогеном [24].

Розповсюдженість, здатність викликати широкий спектр інфекцій, антибіотикорезистентність та можливість утворення біоплівки роблять *Pseudomonas aeruginosa* небезпечним нозокоміальним патогеном [25, 26, 27]. Боротьба з АБР штамами *Pseudomonas aeruginosa* набуває особливої актуальності в умовах війни з росією. Велика кількість поранених, як серед військових, так і серед цивільного населення України призводить до переповнення медичних закладів, так воєнна агресія росії призводить, в тому числі до розповсюдження бактеріальних патогенів, включаючи *Pseudomonas aeruginosa*.

У зв'язку із вищезазначеними небезпеками даного мікроорганізму наукова спільнота знаходиться в пошуку нових підходів для боротьби із інфекціями, викликаними *Pseudomonas aeruginosa*. Одним із найбільш багатообіцяючих підходів є використання бактеріофагів – вірусів, які високоспецифічно уражують бактеріальні клітини [28]. Фаги вважаються відносно безпечними для організму людини, в порівнянні з антибіотиками [29, 30], а також впливають виключно на цільовий бактеріальний патоген, не уражуючи мікрофлору [31]. Фаготерапія може стати ефективним інструментом у боротьбі з інфекціями, особливо там, де антибіотики виявляються неефективними, зокрема фаги, на відміну від антибіотиків здатні руйнувати біоплівку [32]. Наукові дослідження свідчать про потужний потенціал фагів у лікуванні інфекцій, включаючи ті, що спричинені *Pseudomonas aeruginosa*. Інтеграція фаготерапії в клінічну практику може відкрити нові перспективи у лікуванні бактеріальних інфекцій та покращити результати лікування пацієнтів [32, 33, 34, 35, 36].

Саме тому метою нашої роботи було виділити, охарактеризувати та дослідити терапевтичний потенціал бактеріофагів, що уражують бактерії виду *Pseudomonas aeruginosa*.

РОЗДІЛ 1

Загальна характеристика *Pseudomonas aeruginosa* та бактеріофагів, що інфікують вищезазначену бактерію

1.1. Загальна характеристика *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa належить до роду *Pseudomonas*, родини *Pseudomonadaceae*, порядку *Pseudomonadales* [37]. Цей умовно-патогенний мікроорганізм не формує спор та має негативне фарбування за методом Грама [38]. Це факультативний аероб, який росте за допомогою аеробного дихання та анаеробного дихання з нітратом, як кінцевим акцептором електронів. Даний мікроорганізм може використовувати понад 100 органічних молекул як джерело вуглецю та/або енергії [38, 40].

1.1.1. Морфологічні та культуральні властивості *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa – рухливий, поліморфний паличкоподібний мікроорганізм із заокругленими кінцями, розмір складає близько 1,0-5,0 мкм в довжину та 0,5-1,0 мкм в ширину [38]. У мазках клітини *Pseudomonas aeruginosa* зазвичай розташовується поодинокі, у парах або у коротких ланцюжках. За розташуванням джгутиків – монотрих, іноді має два або декілька полярно розташовані джгутики та пілі [39].

Pseudomonas aeruginosa належить до групи психрофілів, добре росте при 37 °С, але може підтримувати життєдіяльність широкому діапазоні температури (від 4–42 °С), що може вважатися диференційно-діагностичною ознакою [38, 40].

Бактерії *Pseudomonas aeruginosa* ефективно ростуть та розмножуються як на простих поживних середовищах: м'ясо-пептонний бульйон (МПБ), м'ясо-пептонний агар (МПА), пептонна вода, триптон-соевий бульйон (ТСБ),

триптон-соєвий агар (ТСА); так і на диференційно-діагностичних середовищах: середовища Ендо, Плоскірева, Кінг А, Кінг В (зазвичай комбінують з тестом із хлорофілом), кров'яний агар, цетримід-агар та середовище МакКонкі [40].

При посіві у рідке поживне середовище, однією із найбільш типових культуральних ознак даних бактерій є утворення слизу та пігменту, через що бульйонні культури набувають характерної в'язкості. Часто на рідких поживних середовищах спостерігають сріблясто-сіру плівку, при старінні бульйонної культури вона випадає на дно у вигляді слизового осаду, який важко розбивається [40].

На простих щільних поживних середовищах (МПА, ТСА) через 24 години після посіву *Pseudomonas aeruginosa* формує досить крупні, слизуваті колонії, з рівними краями. Колонії напівпрозорі, перламутрові, із синьо-зеленим або жовтуватим відтінком, через деякий час агаризоване поживне середовище набуває такого самого забарвлення. Специфічним є і запах культур *Pseudomonas aeruginosa*, що нагадує запах жасміну або фіалок, за рахунок продукції 2-аміноацетофенону [40, 41].

При посіві на середовище Ендо утворюються дрібні рожеві пласкі або складчасті колонії, що на відміну від колоній *E. coli* не мають характерного металевого блиску. На середовищі Плоскірева колонії *Pseudomonas aeruginosa* набувають інтенсивного жовтого забарвлення, яке через 48 годин змінюється на коричневе, при цьому колонії в'язкі, важко знімаються бактеріологічною петлею [40].

Цетримід-агар посилює продукцію пігментів, що синтезує *Pseudomonas aeruginosa*, що надають селективному середовищу синьо-зеленого або жовто-зеленого кольору. Середовища Кінг А та Кінг В також сприяють синтезу піоціаніну та піовердину відповідно. На середовищі МакКонкі колонії *Pseudomonas aeruginosa* круглі та пласкі, безбарвні, флуоресціюють під УФ-випромінюванням. На кров'яному агарі колонії слизуваті, з характерним металевим блиском, спостерігається β -гемоліз [40].

Також необхідно зазначити, що при посіві на щільні поживні середовища деяких штамів *Pseudomonas aeruginosa* можна спостерігати феномен райдужного лізису – у відбитому світлі колонії виглядають різнобарвними, як плівки окисів на поверхні кольорових металів. Даний феномен формується під впливом спонтанного бактеріофага та може розглядатись як таксономічна ознака, у зв'язку з тим, що він утворюється лише у *Pseudomonas aeruginosa* [40, 42].

1.1.2. Біохімічні особливості *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa ідентифікується як за вищезазначеними культуральними властивостями, так і за біохімічними ознаками. Так, як було вказано вище, більшість штамів *Pseudomonas aeruginosa* продукують пігменти, зокрема піоціанін, який має синій колір у нейтральному та лужному середовищах та змінюється на червоний у кислому. Так, для виявлення піоціаніну використовують тест з хлороформом: в нічну бульйонну культуру (рН 8) додають хлороформ та струшують, поява синього забарвлення свідчить про наявність піоціаніну [40, 44].

Серед інших пігментів, що утворюють штами *Pseudomonas aeruginosa* – піорубін (червоний), піомеланін (брунатно-червоний), піовердин або флуоресцин (жовто-зелений). Важливо зазначити, що діагностичним критерієм є саме продукція піоціаніну, у зв'язку з тим, що інші види роду *Pseudomonas*, такі як *Pseudomonas fluorescens* та *Pseudomonas putida* продукують деякі з вищезазначених пігментів. Зустрічаються також апігментні штами *Pseudomonas aeruginosa* [40, 44].

Дана бактерія має універсальну пластичну активність, метаболізуючи речовини від простих цукрів до деяких бактерицидних препаратів. *Pseudomonas aeruginosa* має порівняно слабку цукролітичну активність. Так, синьогнійна паличка розкладає: глюкозу, фруктозу, гліцерол, малонат, мальтозу, рибозу та саліцин. При цьому, дана бактерія має вищу протеолітичну дію: відновлює нітрати до нітритів, виділяють оксидазу, ліпазу,

цитрат та каталазу, розщеплює желатин, розріджує сироватку крові, гідролізує казеїн, утилізує ацетат [40]. Дає позитивний результат при постановці цетримідного тесту. *Pseudomonas aeruginosa* не продукує індол, газ, ДНКазу, уреазу, коагулазу та сірководень; дає негативну реакцію Фогеса-Проскауера [43, 44].

1.1.3. Фактори вірулентності та токсини *Pseudomonas aeruginosa*

Вірулентність бактерій, в тому числі *Pseudomonas aeruginosa*, передбачає їх здатність інфікувати макроорганізм та викликати відповідні симптоми через фактори вірулентності, які сприяють процесам адгезії, колонізації, пригнічення або уникнення імунного нагляду, виснаження пулу поживних речовин [45]. Фактори вірулентності можуть бути класифіковані за їх функцією, локалізацією у клітині або іншими показниками. Так, фактори вірулентності *Pseudomonas aeruginosa* можуть поділятися на такі категорії як: поверхневі структури мікроорганізму, продукти секреції та фактори, що забезпечують взаємодію між бактеріальними клітинами [45].

До групи поверхневих структур належать пілі та джгутики. *Pseudomonas aeruginosa* має пілі IV типу, що складаються з білка піліну та поділяються на 3 підтипи – IVa, IVb та IVb-Tad [46]. Пілі пов'язані з рухливістю бактерій та їх адгезією до поверхонь, формування біоплівки та стійкістю до антибіотиків [47, 48]. Джгутики *Pseudomonas aeruginosa* сформовані з білку флагеліну, забезпечують рухливість та хемотаксис бактерії. Крім того, як і пілі, сприяють утворенню біоплівки та адгезії [49, 50].

Системи секреції *Pseudomonas aeruginosa* також відносяться до поверхневих структур, що є факторами вірулентності. Синьогнійна паличка має 5 систем секреції (T1-6SS) [51]: T1SS – одна з найпростіших систем секреції Грам-негативних бактерій, яка відіграє активну роль під час фази запалення, включена в процеси секреції протеаз та утилізації заліза [52]; T2SS виділяє різноманітні літичні ензими, включаючи екзотоксини, еластазу А та В,

протеазу, фосфоліпазу та ліпазу, а також низькомолекулярні лужні фосфатази [52]; T3SS пов'язують з тяжкістю клінічних проявів та патогенністю, є одним із ключових факторів вірулентності, за рахунок введення ефекторів у клітину хазяїна [52]; T5SS впливає на процеси адгезії та формування біоплівки [52]; T6SS пов'язана з транслокацією ефекторів, транспортом токсинів до сусідніх клітин та утворенням біоплівки [52].

Серед продуктів секреції *Pseudomonas aeruginosa*, що є факторами вірулентності можна виділити сидерофори, протеази, екзополісахариди та токсини.

Процес поглинання заліза є ключовим елементом патогенезу *Pseudomonas aeruginosa*, і дана бактерія здійснює цей процес за рахунок виробництва сидерофорів – хелаторів іонів Fe^{2+} , які поглинають та транспортують іони з позаклітинного середовища, використовуючи специфічні білкові рецептори на зовнішній мембрані [53, 54]. Серед сидерофорів (металофорів) можна виділити: піовердин [53, 54], піохелін [54, 55], псевдопалін [54, 56]. Останній специфічний до великої кількості іонів металів, окрім заліза [54, 56].

Серед протеаз *Pseudomonas aeruginosa* факторами вірулентності вважають лужну протеазу, що протидіє імунному захисту макроорганізму, руйнуючи систему комплементу [57, 58]; вищезазначені еластази А та В руйнують еластин, що є компонентом тканини легень та кровоносних судин [59, 60, 61]; протеазу IV [62], що деградує фібриноген, лактоферин, еластин та трансферин [63].

Екзополісахариди *Pseudomonas aeruginosa* впливають на формування біоплівки, зокрема наразі відомо про три такі полімери: альгінат [64, 65], Psl та Pel [65]. Було продемонстровано, що мутантні форми *Pseudomonas aeruginosa* дефіцитні у продукуванні одного або декількох із вищезазначених полісахаридів мають дефекти утвореної біоплівки або повністю втрачають здатність до її утворення [64].

Pseudomonas aeruginosa виділяють широкий спектр токсинів, що продукуються різними системами секреції. Так, ExoS, ExoU, ExoY та ExoT – чотири ефектори, що виділяються T3SS [66]. Ці ефектори порушують цілісність цитоскелету, індують апоптоз та/або некротичні зміни клітин хазяїна, перешкоджають міжклітинній адгезії [66, 67]. Цікаво також і те, що штами *Pseudomonas aeruginosa*, які експресують ExoU частіше набувають резистентності до антибіотиків [68].

Також, *Pseudomonas aeruginosa* виділяє: екзолізін – токсин, що має перфоруючу активність, утворюючи пори на мембранах клітини хазяїна, продукується штамми, у яких відсутні гени T3SS [69, 70] та часто пов'язаний із агресивною формою геморагічної пневмонії [70]; екстоксин А виділяється T2SS, пригнічує синтез білка, індукує апоптоз [71, 72]; ліпаза А також секретується T2SS, дестабілізує мембрани клітин хазяїна, викликаючи некротичні зміни [73]; фосфоліпаза С має дві форми – негемолітична та гемолітична, остання грає роль в індукції апоптозу, збільшує експресію інтерлейкіну-8, індукує проникність судин, сприяє виживанню бактерії у багатому на нейтрофіли середовищі [74, 75, 76]; ліпоксигеназа перешкоджає ліпідному сигналінгу [77], пригнічує експресію основних хемокінів [78, 79]. Необхідно також зазначити, що одним із вторинних метаболітів *Pseudomonas aeruginosa* є синильна кислота [80], що синтезується шляхом окисного декарбоксилювання гліцину гідрогенціанідсинтазою, і пов'язана з загальною інтоксикацією організму та сприяє запальним процесам при хронічних інфекціях дихальної системи, викликаних даною бактерією [81].

Як зазначено вище, однією із категорій факторів вірулентності є взаємодія між бактеріальними клітинами – відчуття кворуму (кворум сенсінг, QS) та формування біоплівки. QS – це система міжклітинних взаємодій між бактеріями, що контролюються малими сигнальними молекулами (аутіндуктори), які координують експресію багатьох генів (які кодують інші фактори вірулентності), рухливість бактеріальних клітин та формування біоплівки [82, 83]. Біоплівка – складний за будовою агрегат бактеріальних

клітин, одна з ключових стратегій виживання бактерій, що дає можливість протистояти змінам умов навколишнього середовища, таких як коливання температури та нестача поживних речовин [24, 84]. Крім цього бактерії, що сформували біоплівку мають вищу резистентність до дії антимікробних препаратів та уникають імунної відповіді господаря [64, 84].

1.2. Інфекції викликані *Pseudomonas aeruginosa*, їх вплив на організм людини та антибіотикорезистентність

1.2.1. Інфекції викликані *Pseudomonas aeruginosa*

У зв'язку з тим, що *Pseudomonas aeruginosa* – умовно-патогенний збудник, інфекційний процес, в більшості випадків, пов'язаний з імуносупресією інфікованої особи. Саме тому *Pseudomonas aeruginosa* найчастіше асоціюють із нозокоміальними (внутрішньолікарняними) інфекціями [1, 25, 26, 27, 85]. Штучна вентиляція легень [86], катетеризація [16, 87], дренажування [88] та діаліз [89] суттєво підвищують ризик інфекції, тому природньо, що даний мікроорганізм часто виявляють у пацієнтів відділень інтенсивної терапії та реанімації.

Іншими факторами ризику бактеріальної інфекції, викликаній *Pseudomonas aeruginosa* є: вроджені патології, травми (зокрема відкриті рани та опіки), хірургічні втручання, хіміо-, радіо- та променева терапії, а також первинні та вторинні імунodefіцити [90, 91]. *Pseudomonas aeruginosa* викликає гнійно-запальні процеси у більшості органів та тканин, спричинюючи як локальні, так і генералізовані інфекції [85].

Шкірні прояви інфекції *Pseudomonas aeruginosa* коливаються від поверхневих до глибоких і можуть виникати як у імунокомпетентних, так і у імуноскомпроментованих осіб, однак у випадку інфікування останніх показники захворюваності та смертності є вищими [92, 93]. Серед найменш агресивних форм можна виділити: синдром зеленого нігтя або хлороніхія [3,

4, 92], інфекцію міжпальцевих проміжків [5, 6, 92, 93] та фолікуліти [92, 93, 94, 95]. Вищеперераховані хвороби зазвичай легко піддаються лікуванню.

Проте найчастіше *Pseudomonas aeruginosa* уражує шкірні покриви за наявності великих за площею або глибоких ран, зокрема опіків та діабетичних виразок стопи [96, 97]. Так, у різних лікарняних закладах у пацієнтів із синдромом діабетичної стопи *Pseudomonas aeruginosa* виділяли у 10% (з яких 4.4% мали діабетичний остеомиєліт) [98], 14.3% [99], 29.8% [100], 43.0% [101] випадків, тоді як у пацієнтів з опіками синьогнійну паличку виявляли у 14.23% [102], 18.46% [103] 49.9% [104], 57% [105] випадків.

Інфекції дихальної системи, спричинені *Pseudomonas aeruginosa* частіше виникають у імунокомпроментованих осіб або у пацієнтів із супутніми захворюваннями респіраторного тракту, такими як астма, хронічний обструктивний бронхіт, бронхоектатична хвороба та муковісцидоз [8, 9, 10, 106, 107, 108]. Колонізація синьогнійною паличкою дихальних шляхів у вищезазначених індивідів призводить до рекурентної бактеріальної пневмонії, що в свою чергу веде до почастищення госпіталізацій таких пацієнтів [106]. Окремо необхідно зазначити ШВЛ-асоційовану інфекцію *Pseudomonas aeruginosa*, що є найпоширенішою у відділеннях інтенсивної терапії, супроводжується високими показниками захворюваності та смертності, навіть з урахуванням проведення антибіотикотерапії [109, 110].

Pseudomonas aeruginosa часто викликає інфекції сечовивідних шляхів (ІСШ). Існують різні фактори, які впливають на прояв ІСШ, зокрема стать, статева активність та метаболічні захворювання, проте найпоширенішим фактором, що сприяє розвитку ІСШ є катетеризація сечовивідних шляхів [111, 112]. При цьому, КАІСШ зазвичай не відповідають на лікування з використанням протимікробних препаратів, у зв'язку з набуттям штамми *Pseudomonas aeruginosa* антибіотикорезистентності, а також через формування біоплівки на поверхні катетерів [14, 15, 16, 87, 111, 112].

ІСШ викликані синьогнійною паличкою, в тому числі катетер-асоційовані, можуть призводити до нефролітіазу, циститу, нефриту, гострого

піело- та гломерулонефриту [113], а також мають вплив на статеву систему, в окремих випадках викликаючи простатит [114, 115, 116], епідидиморхіт [117, 118, 119], вагіноз [120], абсцеси фаллопієвих труб та яєчників [121, 122], гнійний ендометрит (піометра) [123]. Цікавим також є потенційний зв'язок між ІСШ, викликану *Pseudomonas aeruginosa* та геморагічним васкулітом (васкуліт Шенлейна-Геноха). Вважається, що дане захворювання має імунний генез, тим не менш, декілька досліджень показали, що у пацієнтів з геморагічним васкулітом не спостерігали позитивного результату лікування до терапії супутньої ІСШ, спричиненої синьогнійною паличкою [124, 125].

Ураження ШКТ *Pseudomonas aeruginosa* зазвичай проявляється типовими симптомами бактеріальної інфекції ШКТ, наприклад діарея або ентероколіт, і проявляється частіше у пацієнтів із супутніми захворюваннями та дітей [11, 12, 126]. Хоча синьогнійна паличка нечасто викликає інфекції ШКТ у здорових осіб, однією із найбільш небезпечних форм такої інфекції є «шанхайська лихоманка» – спорадична позалікарняна хвороба імунокомпетентних немовлят до 1 року, що проявляється як сепсис, пов'язаний із інфікуванням ШКТ *Pseudomonas aeruginosa*, смерть, в основному, настає у зв'язку з некрозом кишківника [127, 128]. Наразі описаний лише один випадок «шанхайської лихоманки» у дорослого пацієнта з нейтропенією [129].

1.2.2. Антибіотикорезистентність *Pseudomonas aeruginosa*

Інфекції (як позалікарняні, так і нозокоміальні), викликані *Pseudomonas aeruginosa*, представляють істотну терапевтичну проблему, оскільки критичним етапом для отримання позитивного клінічного результату є вибір відповідних антибіотиків. *Pseudomonas aeruginosa* здатна розвивати резистентність до багатьох класів протимікробних засобів, при цьому стійкість до останніх може формуватися вже в процесі лікування [2, 22, 23, 130].

Інфекції, що спричинені резистентними штамми *Pseudomonas aeruginosa* пов'язують із високими показниками захворюваності та смертності, підвищенням потреби у хірургічних втручаннях, збільшенням часу тривалості лікування та, відповідно, перебування пацієнта у стаціонарі. Навіть більш проблематичними є випадки набуття резистентності даною бактерією вже в процесі антибіотикотерапії [23, 130]. *Pseudomonas aeruginosa* формує антибіотикорезистентність (АБР) за рахунок отримання відповідних генів від мобільних генетичних елементів, таких як плазміди або завдяки мутаціям, що змінюють експресію та/або функцію певних генів [130, 131].

Відповідно до визначення ВООЗ, патоген вважається резистентним, якщо його біологічні характеристики змінюються таким чином, що ліки, які зазвичай використовуються в медичній практиці для лікування інфекції, спричиненої даним патогеном, втрачають свою ефективність [132]. Бактерії різних родів, можуть мати різні ключові антимікробні препарати, що використовуються для терапії інфекцій та, відповідно, різні профілі резистентності [133, 134], тому згідно з об'єднаною ініціативою Європейського центру з профілактики та контролю захворюваності (ЕЦКЗ, ECDC) та Центрів контролю та профілактики захворюваності у США (ЦКЗ, CDC) було сформовано ряд визначень, що стосуються основних антибіотиків та АБР різних видів мікроорганізмів [133].

Експертами вищезазначених установ було виділено такі групи АБР: мультирезистентність (МАБР або MDR), екстенсивна резистентність (ЕАБР або XDR) та панрезистентність (ПАБР або PDR) [133, 134]. Для *Pseudomonas aeruginosa* було визначено ряд антибіотиків, що є ключовими для визначення АБР конкретного ізоляту: гентаміцин, тобраміцин, амікацин, нетилміцин (аміноглікозиди), іміпенем, меропенем, доріпенем (антипсевдомонадальні карбапенеми), цефтазидим, цефепім (антипсевдомонадальні цефалоспорини), ципрофлоксацин, левофлоксацин (антипсевдомонадальні флуорокінолони), тікарцилін та клавуланова кислота, піперацилін та тазобактам (антипсевдомонадальні пеніциліни в комбінації з інгібіторами β -лактамази),

азтреонам (монобактами), фосфоміцин (фосфонати), колістин, поліміксин В (поліміксини) [133].

Для категоризації *Pseudomonas aeruginosa*, як МАБР – ізолят має бути нечутливим до одного з трьох або більше груп вищезазначених антибіотиків, як ЕАБР – ізолят чутливий хоча б до однієї групи вищеперерахованих антибіотиків та резистентний до інших, як ПАБР – ізолят не виявляє чутливості до жодного із зазначених антибіотиків [133, 134].

За даними ЕЦКЗ у 2021 році серед усіх зареєстрованих випадків інфекційних захворювань, ті що спричинені *Pseudomonas aeruginosa* складали 6.1%, до того ж кількість випадків інфікування даною бактерією зросла на 8.1% в порівнянні з 2020 роком [135]. У 2022 році у країнах ЄС (за виключенням Великобританії) найвищі показники комбінованої резистентності (МАБР) були зафіксовані на територіях: Чехії (17.7%), Словаччини (27.2%), Кіпру (31.7%), Латвії (37.5%), Болгарії (45.5%), Греції (45.5%) та Румунії (47.7%) [136].

За даними ретроспективного дослідження, у регіоні MENA (Middle East and North Africa) спостерігали регіональні та міжрегіональні варіації поширеності МАБР *Pseudomonas aeruginosa* з найвищою поширеністю в Єгипті (75,6%), Лівані (64,5%), Йорданії (52,5%), Ізраїлі (30%) та помірною поширеністю на територіях Аравії (7,3%) і Катару (8,1%) [137].

В Україні, за даними 2011-2015 року, із загальної кількості 279 620 клінічних ізолятів *Pseudomonas aeruginosa*, виділених у хірургічних стаціонарах медичних установ, АБР до різних протимікробних препаратів були: 35.6% (аміноглікозиди), 39.5% (β-лактами), 41.4% (фторхінолони), 44.5% (глікопептиди), 45.4% (лінкозаміди), 52.2% (тетрацикліни), 55.7% (макроліди), 58.4% (рифампіцини) [138]. Проте у вищезазначеному дослідженні, на жаль, не визначався відсоток МАБР та ПАБР ізолятів. В іншому дослідженні від 2019 року, зразки відбирали у відділенні гнійно-септичної хірургії і було визначено що 45.2% ізолятів *Pseudomonas aeruginosa*

були ПАБР, при цьому загальна вибірка синьогнійної палички складала 42 ізоляти [139].

У зв'язку з початком повномасштабного вторгнення росії на територію України 24 лютого 2022 року, населення України зіткнулось з раптовим загостренням надзвичайної ситуації в гуманітарному, медичному та екологічному планах. Це призвело до найшвидшого примусового переміщення населення в Європі з часів Другої світової війни [140]. Руйнування об'єктів критичної інфраструктури, включаючи лікарні, системи водопостачання та діагностичні лабораторії, переповнення медичних установ, нестача медичного обладнання та препаратів, непридатні умови гігієни, масові поховання вбитих, знищення греблі Каховської ГЕС та інші воєнні злочини скоєні росією ставлять під загрозу життя та здоров'я українців в тому числі через загрозу розповсюдження патогенів бактеріальної природи [141].

Наразі було проведено декілька досліджень, пов'язаних із детекцією АБР ізолятів синьогнійної палички в українських військових та біженців з України. Так, в Іспанії два штами NDM-*Pseudomonas aeruginosa* були виділені у двох біженців з України. Перший штам виділений у пацієнта з попередньо проведеною стрептомією, другий – у пацієнта з піднижньощелепним абсцесом [142]. Два штами АБР NDM-*Pseudomonas aeruginosa* також було виявлені у Німеччині в двох українських військових, з переломами, пов'язаними з вибухами [143]. У Нідерландах, із 62 зразків, виділених від українських біженців, 12 виявилися карбапенем-резистентними ізолятами *Pseudomonas aeruginosa* [144]. У Німеччині у трьох обстежуваних українських військових було виявлено різні штами МАБР *Pseudomonas aeruginosa*, при цьому в одного з них було виділено 3 ізоляти синьогнійної палички з різних уражених ділянок тіла (ШКТ, рани внаслідок вибуху, уретральний катетер) [145]. В цьому самому дослідженні МАБР *Pseudomonas aeruginosa* було виявлено також у біженки з України, що проходить процедуру діалізу [145]. Також в українського військового, у воєнному госпіталі США в Німеччині було виявлено 6 ізолятів АБР бактерій, три з яких виявились різними штамами

Pseudomonas aeruginosa, що мали високі показники мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) до 20 з 23 протестованих антибіотиків і, таким чином, дані ізоляти вважаються ЕАБР [146].

1.3. Бактеріофаги, що уражують *Pseudomonas aeruginosa*, фаготерапія, її переваги та недоліки

Фаготерапія – використання бактеріофагів у медичній сфері для боротьби з інфекціями бактеріального генезу. Історія бактеріофагів почалась більш ніж 100 років тому з роботами Ернеста Генкіна, Миколи Гамалія, Вільяма Творта та Фелікса Д'Ереля. Останній висунув ідею використання фагів у медицині та ветеринарії на початку 20 сторіччя, тим не менш, запропонований ним метод не знайшов широкого використання, в першу чергу через відкриття пеніциліну Александром Флемінгом у 1928 році. Наразі фаготерапія, раніше затьмарена використанням антибіотиків, знову викликає інтерес наукової та медичної спільнот [147].

1.3.1. Характеристика бактеріофагів та їх життєві цикли

Фаги (віруси бактерій) мають загальну характеристику вірусів: уражують клітину-хазяїна та використовують її механізми для власної реплікації, мають високу специфічність та відносно невеликі за розміром геноми. Бактеріофаги можуть бути різні за розміром та морфологією: овоподібні, лимоноподібні, паличкоподібні, плеоморфні, ниткоподібні, ізометричні, хвостаті (із скоротливим чи нескоротливим хвостом) [148, 149].

Найбільш вивченим вважається бактеріофаг Т4, що уражує *Escherichia coli*. Так, даний вірус належить до нетаксономічної групи Міовірусів (раніше родина *Myoviridae*), що включає хвостаті бактеріофаги, і його складна структура може бути розділена на три основних компоненти: головка, хвіст та хвостові фібрили. Головка містить длДНК, а на кінці хвоста, оточеного

скоротливою оболонкою, знаходиться базальна пластинка, до її периферії прикріплені хвостові волокна, що розпізнають клітину-господаря та залучені в процес адгезії [150].

До фаз життєвого циклу фагів входять: вищезазначений процес адгезії (фіксація на поверхні бактеріальної клітини), введення ДНК/РНК, експресія та реплікація введеного фагового геному з використанням метаболічних систем клітини-хазяїна, збірка бактеріофагів із білкових фрагментів, вихід дочірніх віріонів [151, 152, 153]. Відомо про два типи життєвих циклів бактеріофагів – літичний та лізогенний. Літичний цикл включає в себе всі вищеперераховані процеси, в той час як лізогенний цикл, властивий помірним фагам має суттєві відмінності [151, 152, 153].

Лізогенний цикл не призводить до негайного лізису клітини. Помірні фаги після фаз адгезії та введення нуклеїнової кислоти, інтегрують свій генетичний матеріал у геном клітини-господаря, таким чином забезпечуючи постійну реплікацію у вигляді ендogenous бактеріофага (профага) без елімінації бактеріальної клітини [151, 152, 153]. Вірус залишається у стані спокою доки умови навколишнього середовища не погіршаться (виснаження поживних речовин, дія хімічних сполук, вплив УФ-випромінення). Після цього ініціюється вихід профага та, відповідно, розпочинається літичний цикл, що завершиться лізисом клітини-хазяїна [151, 152, 153].

1.3.2. Загальні аспекти фаготерапії, її переваги та недоліки

Бактеріофаги, як терапевтичні агенти, можуть стати однією з ланок у боротьбі з інфекціями, викликаними АБР мікроорганізмами. Звісно, неможливо уникнути порівняння фаго- та антибіотикотерапії, оскільки обидва методи лікування спрямовані на елімінацію патогенних бактерій та мають ряд переваг та недоліків [151, 152, 153]. Фаги, як і інші віруси, хоч і знаходяться на межі «живе-неживе», відіграють важливу роль у підтриманні динаміки екосистем, популяцій, власне організму, лізуючи бактеріальні клітини, в той

час як антибіотики – хімічні речовини, що здатні лише вибірково порушувати певні фізіологічні процеси бактерій, наприклад, синтез білка або клітинної стінки [151, 152, 153].

Антибіотики зазвичай мають широкий спектр дії [154] (за виключенням окремих препаратів вузькоспрямованої дії таких як ванкоміцин та фідаксоміцин [155]) і можуть бути використані для емпіричного лікування, проте уражують як патогенну, так і резидентну мікрофлору, в той час як бактеріофаги активні проти певних штамів мікроорганізмів, не впливають на нормальну мікрофлору макроорганізму, хоча і вимагають індивідуалізованого підбору [154].

Фармакологічні властивості антибіотиків добре вивчені і, незважаючи на позитивні аспекти антибіотикотерапії, остання, через порівняно високий рівень токсичності, часто супроводжується рядом побічних ефектів, від локальних проявів алергічної реакції до пошкодження нирок. Фаги, зазвичай рідко викликають алергічні реакції і тому є відносно безпечними. Також необхідно зазначити, що фаги здатні уражувати бактерії незважаючи на формування біоплівки, в той час як антибіотики в даному аспекті не вважаються дієвими [147, 151, 152, 153, 154].

Звісно є ряд умов для успішної фаготерапії, зокрема власне процес вибору бактеріофага. Обраний фаг має бути виключно літичним, у зв'язку з тим, що лізогенні фаги, через інтеграцію у геном господаря не лізують клітину до появи несприятливих умов, а також можуть містити гени АБР чи токсинів. Серед інших умов можна зазначити: високий рівень очистки фагового препарату, стабільність фагів до певних рівнів температури та рН (оптимальні показники залежать від терапевтичної мети), використання фагових коктейлей (суміші фагів, що діють на один вид мікроорганізмів, або ж на різні види) для уникнення появи фагорезистентних бактерій та/або розширення спектру дії [147, 151, 152, 153, 154].

В процесі фаготерапії бактеріофаги, в залежності від локалізації інфекційного процесу, можуть бути введені в організм різними шляхами, з

використанням різноманітних лікарських форм [156]. Серед більш консервативних шляхів введення фагів: топічне [157, 158, 159], внутрішньом'язове [160, 161], інтравенозне [160, 161, 162], пероральне [163, 164], трансназальне [156], інстиляційне [156], трансректальне [165]. В рідкісних випадках фаги можуть вводитись інтраперитонеально [166, 167], під час бронхоальвеолярного лаважу [156], інтраопераційно (під час оперативного втручання) [168], з використанням уретрального катетеру, торакального дренажу та нефростоми [156, 169].

В багатьох з вищезазначених шляхів введення фаги використовуються у рідкій лікарській формі, проте можливе застосування у вигляді кремів, мазей, очних або назальних крапель, супозиторіїв, порошків [156].

1.3.3. Бактеріофаги, що ефективні проти *Pseudomonas aeruginosa*

Бактеріофаги, активні проти *Pseudomonas aeruginosa* були описані ще на початку 20 сторіччя. Станом на 2015 рік у відкритих базах даних було наявно близько 66 секвенованих геномів літичних бактеріофагів, що уражують дану бактерію, 27 з яких належали до родини *Myoviridae*, 25 – *Podoviridae*, 13 – *Siphoviridae* та 1 некласифікований бактеріофаг [170]. Проте на даний момент класифікація бактеріофагів була змінена Міжнародним комітетом з таксономії вірусів (ICTV) і кількість фагів *Pseudomonas aeruginosa*, що класифіковані даною організацією складає 1026 [171].

Хоча, на сьогоднішній день, застосування фагів для боротьби з інфекціями – не новітній підхід, останніми роками дослідження в даній галузі почастишали. Звісно у зв'язку з тим, що *Pseudomonas aeruginosa* – небезпечний нозокоміальний патоген, що часто набуває АБР, дослідження, спрямовані на оцінку ефективності фагів, що уражують *Pseudomonas aeruginosa* проводяться все частіше і включають клінічні дослідження, експерименти *in vitro* та *in vivo*.

Так, у дослідженні 2019 року, при вивченні впливу комбінації чотирьох бактеріофагів на інфіковані *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 ембріони *Danio*

erio було зафіксовано зниження летальності та загального рівня бактеріального навантаження серед модельних об'єктів, що лікували з використанням фагів, в порівнянні з контролем [172].

Інше дослідження *in vitro*, *in silico* та *in vivo*, вивчало дію бактеріофагів ВФ-R656 і ВФ-R1836 на ЕАБР-штами *Pseudomonas aeruginosa*. Обидва досліджувані фаги виявили інгібіторну активність та ефективно лізували резистентні клінічні штами синьогнійної палички, крім того результати показали, що ВФ-R656 і ВФ-R1836 ліквідували штами *Pseudomonas aeruginosa* в моделях личинок *Galleria mellonella* та мишей з гострою пневмонією. Дослідники також визначили, що дані бактеріофаги ефективно інгібують утворення біоплівки [173].

У дослідженні проведеному Alemayehu D. та колегами було продемонстровано, що бактеріофаги ФMR299-2 і ФNH-4 лізують клінічні немуроїдні та мукоїдні (продукуючі біоплівку) штами, якими уражували лінію клітин CFBE41o. Крім того, дані фаги у формі коктейлю ефективно знищують *Pseudomonas aeruginosa* в легенях мишей через 6 годин після початку введення фагів [174].

В іншому дослідженні, під час якого використовували мишей, як модельні організми, було виявлено, що бактеріофаг PELP20 ефективно знищує біоплівку утворену *Pseudomonas aeruginosa* та лізує різні штами даного мікроорганізму [175].

Також у дослідженні, проведеному у 2018 році було досліджено вплив фагового коктейлю, що складався з шести різних бактеріофагів - E215, E217, PAK_P1, PAK_P4, DEV та PYO2. Було виявлено, що даний коктейль бактеріофагів ефективно знищують біоплівку, утворену *Pseudomonas aeruginosa* на моделі гострої респіраторної інфекції у мишей, а також знижують бактеріальне навантаження уражених личинок *Galleria mellonella*. Крім цього, фаги лізують *Pseudomonas aeruginosa* як у формі біоплівки, так і у формі планктону. Було визначено, що утворений фаговий коктейль проявляв ефективність проти МАБР синьогнійної палички [176].

Випадки використання антипсевдомонадних бактеріофагів у клінічній практиці також було описано. Так, у 2019 році, пацієнтці 77 років з інфекцією, спричиненою АБР *Pseudomonas aeruginosa*, що виникла після видалення аденокарциноми легені, протягом 7 діб внутрішньовенно вводили коктейль бактеріофагів в комбінації з антибіотиками. Протягом усієї тривалості лікування не було виявлено побічних ефектів, колонізація *Pseudomonas aeruginosa* була успішно ерадикована, при цьому автори вважають, що позитивний результат лікування без використання бактеріофагів був би малоімовірним [177].

Також, Aslam S. у 2020 році описав серію клінічних випадків використання бактеріофагів, а саме для терапії інфекцій трансплантатів. Зокрема, було описано три випадки інфекцій, викликаних МАБР *Pseudomonas aeruginosa*, після трансплантації легені. В двох з вищезазначених випадків пацієнтів лікували внутрішньовенним введенням антибіотиків та коктейлю з 4 фагів. Третій випадок описує успішне лікування двох епізодів пневмонії у реципієнта після трансплантації, в обох випадках лікування проводили з використанням одного бактеріофагу та антибіотикотерапії. Цікаво також те, що після успішної терапії другого епізоду пневмонії, пацієнт проходив профілактичне лікування антипсевдомонадним фагом протягом 2 місяців (інтравенозне та інгаляційне введення) без будь-яких побічних ефектів [178].

Також у статті за авторством Gupta P. та колег описано результати лікування 20 пацієнтів з хронічними ранами із використанням фагових коктейлів, 9 із вищезазначених пацієнтів виявились інфіковані *Pseudomonas aeruginosa*. Лікування тривало протягом 13 діб, рани п'яти із дев'яти інфікованих пацієнтів виявились стерильними на 9 добу, *Pseudomonas aeruginosa* у ранах інших пацієнтів була ерадикована на 13 день фаготерапії [179].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Культивування мікроорганізмів та бактеріофаги

Тест-культура *Pseudomonas aeruginosa* 1664 була надана спеціалістами ДУ Інституту травматології та ортопедії НАМН України. Даний ізолят на ряду з іншими клінічними ізолятами, культивувався протягом 12 годин при 37°C на агаризованому (вміст мікробіологічного агару 1,4%) або у рідкому ТСБ (Liofilchem). Тест-бактерії були надані бактеріологічними лабораторіями ДУ Інституту травматології та ортопедії НАМН України та ДУ Інституту урології ім. акад. О.Ф. Возіанова НАМН України.

Бактеріофаги, що уражують представників виду *Pseudomonas aeruginosa* були надані лабораторією компанії ТОВ "НПБК-УКРАЇНА" та використовувались для визначення чутливості тест-культур бактерій.

2.2. Виділення бактеріофагів із довкілля

Стічні води для подальшого виділення бактеріофагів були надані спеціалістами хірургічного відділення ДУ Інституту травматології та ортопедії НАМН України. Для виділення бактеріофагів до ізоляту *Pseudomonas aeruginosa* 1664 стічні води в об'ємі 50 мл центрифугували при 4000 об/хв протягом 40 хвилин. Після центрифугування стічні води фільтрували за допомогою бактеріального фільтра (0,25 μm).

Виділення бактеріофагів проводили методом подвійних агарових шарів. Так, до поживного середовища TSA (5 мл), що містить 0,7% агару, додавали 100 μл бактеріальної тест-культури *Pseudomonas aeruginosa* 1664 та 500 μл профільтрованих стічних вод. Отриману суміш наносили на заздалегідь

підготовлені чашки Петрі із поживним середовищем ТСА, що містить 1,4% агару та інкубували протягом 12 годин при 37°C.

Наявні на бактеріальному газоні ізольовані негативні колонії відбирали за допомогою стерильної препарувальної голки та вносили у мікропробірку типу Еппендорф із 1 мл стерильного фізіологічного розчину.

2.3. Визначення інфекційного титру бактеріофагів

Інфекційні титри бактеріофагів оцінювали на різних стадіях експерименту з використанням двох класичних методик: титрування за Грація та спот-тест. Для обох вищезазначених методів проводили серійні розведення бактеріофагів. Так, для титрування за Грація у мікропробірки типу Еппендорф вносили 900 μ л фізіологічного розчину. В першу пробірку вносили 100 μ л обраного фагу, піпетували та переносили 100 μ л суміші у другу мікропробірку і так далі, при цьому з останньої також мікропробірки відбирали 100 μ л.

Для титрування за Грація на чашки Петрі із агаризованим поживним середовищем ТСА (1,4% агару) у якості нижнього шару, вносили суміш відповідного розведення фагу в об'ємі 500 μ л, розплавленого поживного середовища ТСА (5 мл), що містить 0,7% агару та 100 μ л бактеріальної тест-культури. Чашки, після повного застигання агару, інкубували при 37°C протягом 12 годин. Для оцінки результату, обирали розведення при якому спостерігались ізольовані негативні колонії та визначалась їх кількість на 1 мл фаговмісного матеріалу.

Для спот-тесту серійні розведення тест-фагу проводили з використанням 96-лункового стерильного планшету за схемою зазначеною вище, проте співвідношення фізіологічного розчину до внесеного фагу складало 180/20. На чашки Петрі з нижнім (щільнішим) агаром наносили менш щільний агар в якості верхнього шару із додаванням 100 μ л нічної бактеріальної культури. Після застигання агару, чашку Петрі ділили на сектори в кожен з яких наносили 1 краплю (5 μ л) відповідного розведення та

інкубували протягом 12 годин при 37 °С. Титр визначали як останнє розведення при якому спостерігали утворення зон лізису.

2.4. Накопичення та очищення бактеріофагів

Для збільшення титру виділених бактеріофагів проводили накопичення за допомогою двох методів: накопичення у рідкому поживному середовищі та накопичення методом зливного лізису.

Так, для першого методу у рідке поживне середовище (ТСБ) вносили нічну культуру тест-бактерії в об'ємі 100 μл та інкубували протягом 40 хвилин при 37°C. Згодом вносили 500 μл обраного бактеріофагу. Суміш продовжували інкубувати при 37°C протягом 12 годин. Після цього центрифугували при 4000 об/хв протягом 40 хвилин. Відбирали супернатант та фільтрували з використанням бактеріального фільтра (0,25 μм). Отриманий фаголізат зберігали в холодильній камері при температурі 4°C.

Для накопичення методом зливного лізису попередньо проводили титрування за Грація, обирали результат при якому спостерігались ізольовані негативні колонії. В обрану чашку Петрі вносили 10 мл стерильного фізіологічного розчину та інкубували протягом 2 годин при кімнатній температурі (близько 20°C) для дифундування фагів із агару в буферний розчин. Після рідину ретельно піпетували, відбирали у стерильні пробірки типу Фалькон (об'єм 50 мл) та центрифугували протягом 40 хвилин, 4000 об/хв. Супернатант так само фільтрували за допомогою бактеріального фільтра (0,25 μм) та після зберігали при 4°C.

2.5. Виділення окремих ізолятів бактеріофагів

Виділення окремих ізолятів бактеріофагів після накопичення проводили шляхом серійних пасажів. Так, за допомогою методу подвійних агарових шарів (титрування за Грація) отримували ізольовані негативні

колонії. Зони лізису з різною морфологією відбирали у мікропробірки типу Еппендорф, що містили 1 мл фізіологічного розчину за допомогою стерильної препарувальної голки та інкубували протягом 12 годин при 4°C. Наступним етапом проводили титрування за Грація, знову обирали результат із ізольованими зонами лізису та повторювали вищезазначену процедуру відбору зразка. Серійні пасажі проводили 5 разів та обирали негативні колонії, морфологія яких відповідала зоні лізису відібраній під час першого пасажу. Отримані ізоляти бактеріофагів накопичували, очищали та зберігали вищезазначеними методами.

2.6. Визначення спектру чутливості

Визначення спектру чутливості бактерій до виділених ізолятів фагів проводили за допомогою спот-тесту. При цьому титрування фаголізатів не проводили. Тест проводився за вищеприписаною методикою спот-тесту, за виключенням серійних розведень (Рис. 2.1).

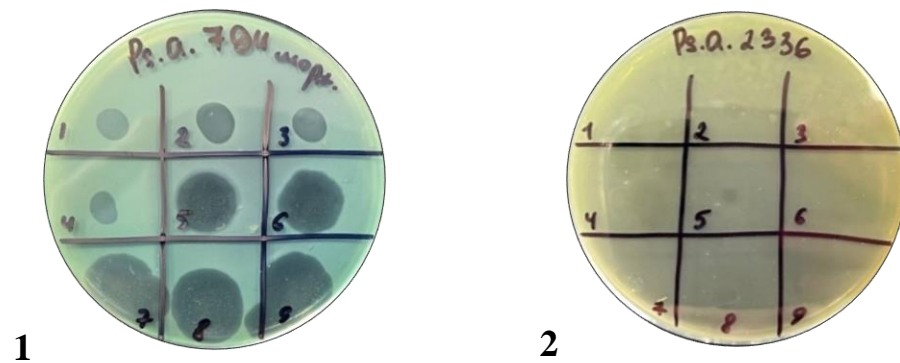


Рис. 2.1 Приклади результатів спот-тесту для визначення спектру активності бактеріофагів, де **1** – чутлива до фагів культура, **2** – фагорезистентна

Для визначення спектру чутливості підготували пул нічних культур бактерій виду *Pseudomonas aeruginosa*, які вносили у розплавлене поживне середовище TSA, що містило 0,7% мікробіологічного агару та наносили на

підготовлений нижній шар агару. Чашку Петрі було розділено на сектори, на які наносили 1 краплю (5 μ л) відповідного ізоляту фага. Результат оцінювали за наявністю зон лізису.

2.7. Концентрування бактеріофагів шляхом високошвидкісного центрифугування

Концентрування бактеріофагів проводили за допомогою високошвидкісного центрифугування протягом 6 годин при 50000 об/хв (80000 \times g). Після концентрування було проведено електронну мікроскопію для визначення морфології двох досліджуваних ізолятів бактеріофагів.

2.8. Трансмійна електронна мікроскопія

Зразки для електронної мікроскопії підготували таким чином: на мідну сітку з формваровою підложкою наносили концентрований бактеріофаг в об'ємі 10 μ л, витримували 2 хвилини та прибирали залишок за допомогою фільтрувального паперу. Після цього наносили 10 μ л 2% розчину фосфорновольфрамової кислоти для контрастування, також витримували 2 хвилини та видаляли надлишок фільтрувальним папером.

2.9. Концентрування бактеріофагів з використанням фільтру-прототипу

Для концентрування бактеріофагів, в якості альтернативи високошвидкісному центрифугуванню також був використаний фільтр-прототип. Під час дослідження зразок одного з виділених фагів був протестований з використанням фільтру-прототипу за протоколом.

Першим етапом був приготований 50% поліетиленгліколь (ПЕГ), що розводили у 60 мл бідистильованої води. Підготовлений розчин ПЕГ додавали

до обраного фаголізату до кінцевої концентрації 10%. До отриманої суміші вносили 300 мМ NaCl та осаджували протягом 4 годин, при 4°C на магнітній мішалці.

Після осадження провели центрифугування суміші в режимі 5000 об/хв протягом 40 хвилин. Відбирали супернатант для подальшого спот-тесту на визначення титру фагу, що не був осаджений. Осад ресуспендували у 5 мл буферного розчину (фізіологічний розчин) та відібрали аліквоту для подальшого спот-тесту (Рис. 2.2).

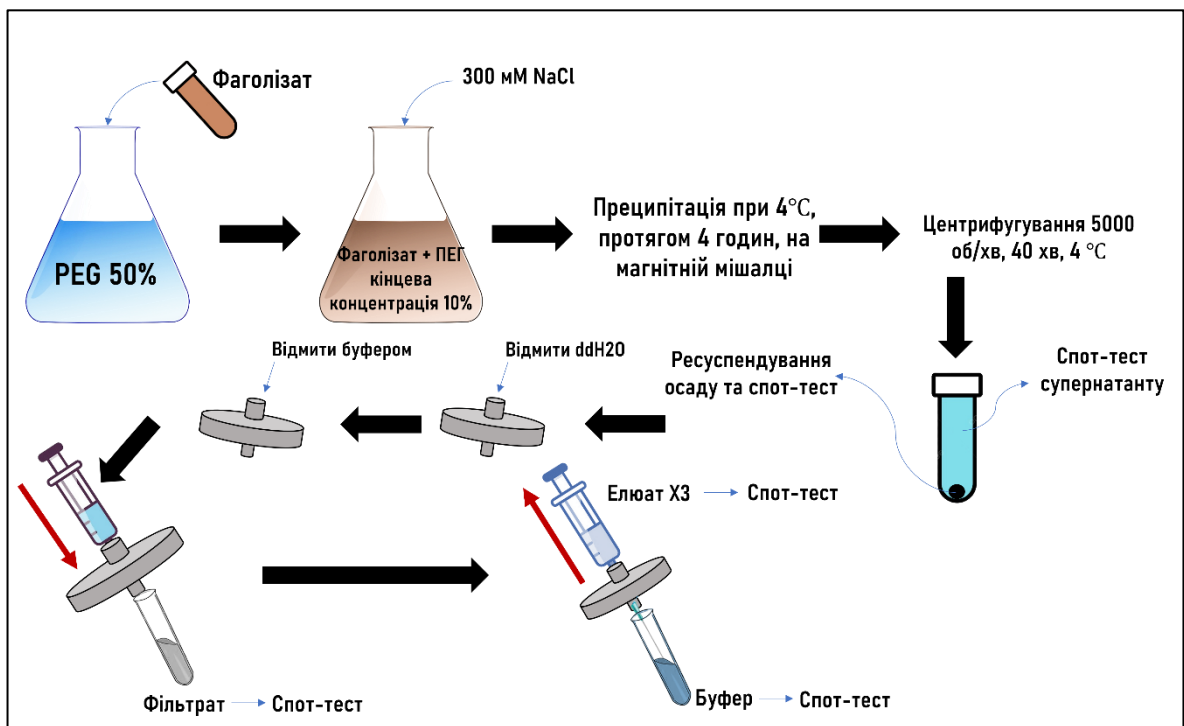


Рис 2.2 Схема проведення експерименту з використанням фільтру-прототипу

Мембрану фільтру-прототипу промивали 20 мл бідистильованої води, а потім 20 мл фізіологічного розчину. Ресуспендований осад пропустили через фільтр-прототип за допомогою стерильного шприца luer lock та отримали фільтрат, який також в подальшому перевірявся на інфекційний титр (Рис. 2.2).

Елюцію проводили 3 рази шляхом «змивання» фагів із мембрани фізіологічним розчином (5 мл для кожного етапу елюції) та проводили спот-тест кожного елюату.

2.10. Визначення антибіотико- та фагорезистентності тест-бактерій

Для визначення АБР тестових бактеріальних культур проводили визначення чутливості бактерій до антибіотиків з використанням диско-дифузійного методу. Так, нічну культуру бактерій висівали на агаризоване (1,4%) поживне середовище Мюллера-Хінтона та наносили паперові диски просочені антибіотиками. Оптична щільність нанесеної бактерії визначалась за допомогою стандарту МакФарланда та мала показник 0,5. Статус бактерії (чутлива, умовно-чутлива, резистентна) визначали відповідно до діаметру зони пригнічення росту для кожного антибіотика (Рис. 2.3).



Рис 2.3 Приклад постановки тесту на визначення чутливості до антибіотиків диско-дифузійним методом

Для визначення фагорезистентності деяких бактерій, в тому числі бактерій вторинного росту було використано пул бактеріофагів, що уражують *Pseudomonas aeruginosa* та проведено спот-тест, як описано вище.

2.11. Визначення збереження активності бактеріофагів супозиторіях

У зв'язку з тим, що основний компонент супозиторіїв – жирова основа, в першу чергу визначали об'єм рідини, що може вмістити один супозиторій. Було проведено серію експериментів, де до розплавленої жирової основи додавали різні об'єми дистильованої води та визначали чи супозиторій зберігає форму після застигання.

Наступним етапом було проведення тестів із бактеріофагами. Для експерименту було обрано найбільш активні бактеріофаги, з найбільшим спектром дії. Експеримент проводили у стерильних умовах: твердий жир після зважування поміщали у стерильну скляну колбу та додатково стерилізували з використанням бактерицидних ламп (УФ) протягом години, форму для супозиторіїв, а також весь необхідний інструментарій обробляли 70% розчином етилового спирту та стерилізували з використанням УФ-ламп протягом години.

Жир у скляній колбі розплавляли у мікрохвильовій печі при 100вт (Рис. 2.4, Рис. 2.5). Бактеріофаг з відомим титром вносили у розплавлений жир та ретельно перемішували для емульгації (Рис. 2.7, Рис. 2.8), при цьому перевіряли різні об'єми фаголізату.

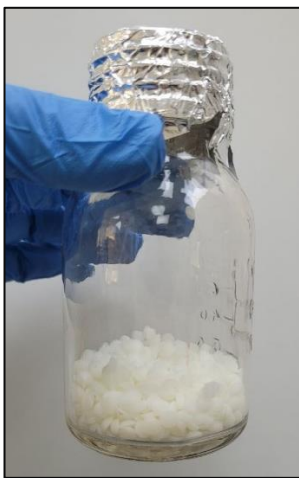


Рис 2.4 Нерозплавлена наважка
твердого жиру



Рис 2.5 Розплавлена жирова основа

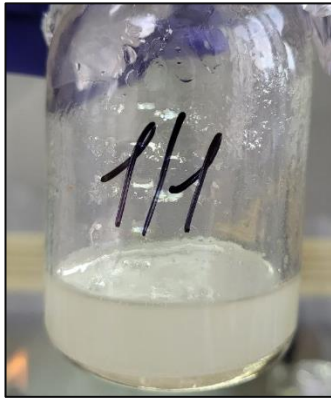


Рис 2.6 Жирова емульсія після додавання фагу 1/1

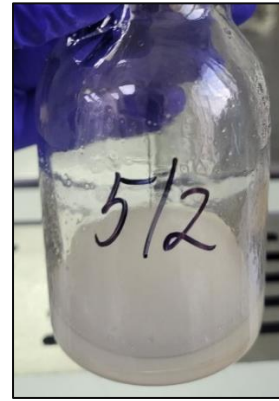


Рис 2.7 Жирова емульсія після додавання фагу 5/2

Емульсію вносили у стерильну форму для супозиторіїв (Рис. 2.8) та залишали застигати протягом 15 хвилин у холодильній камері при 4°C (Рис. 2.9). Після застигання (Рис. 2.10) кожен супозиторій зберігався в окремій одноразовій чашці Петрі при 4°C.



Рис 2.8 Форма для супозиторіїв із внесеною емульсією



Рис 2.9 Форма для супозиторіїв після застигання жиру



Рис 2.10 Супозиторії, що містять фаголізат, після застигання

Для визначення збереження життєдіяльності бактеріофагів через тиждень після формування супозиторіїв проводили наступний тест: підготували чашки Петрі із поживним середовищем ТСА (1,4% агару) у вигляді нижнього шару, на його поверхню наносили менш щільне поживне середовище ТСА (0,7% агару) із 100 мкл тест-бактерії (Рис. 2.11).

Після застигання верхнього шару агару на його поверхню наносили фрагмент супозиторію, вагою близько 0,2 г та поміщали у термостат при 37°C на 12 годин (Рис. 2.11). Позитивним результатом вважали наявність зон лізису.

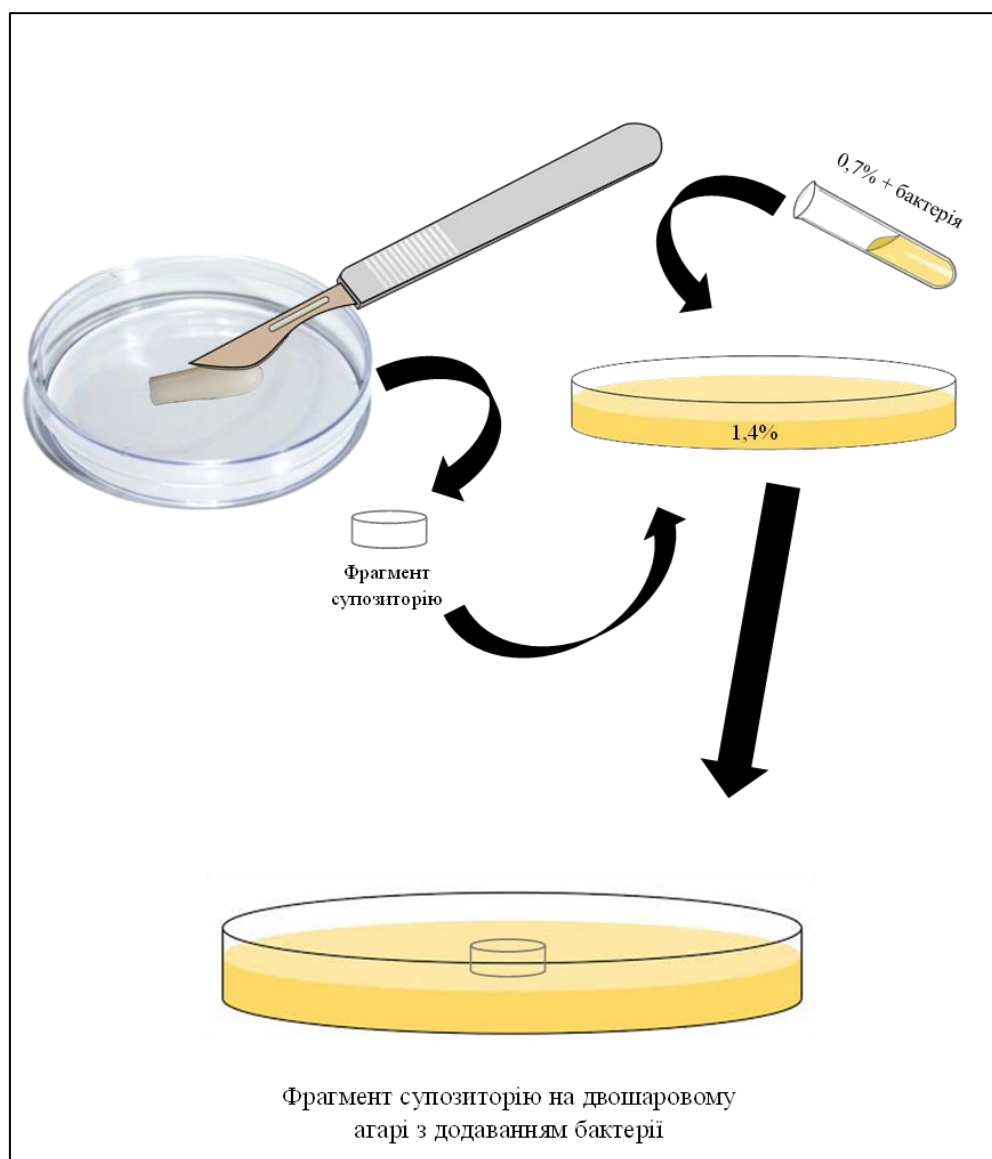


Рис 2.11 Схема проведення тесту для визначення життєдіяльності фагів у супозиторіях

Після підтвердження, що фаги зберігають активність у сформованих супозиторіях при різних об'ємах доданого фаголізату, було проведено спот-тест для визначення інфекційного титру.

Для проведення спот-тесту супозиторії поміщали у стерильні пробірки та плавили на водяній бані при температурі 40°C. При цьому фіксували час, що необхідний для розплавлення. Після розплавлення проводили серійні розведення та визначали інфекційний титр фагів у супозиторіях шляхом спот-тесту.

Окрім визначення інфекційного титру шляхом спот-тесту чотири варіанти супозиторіїв додатково перевіряли на стерильність. Супозиторії, розплавлені у стерильних чашках Петрі при 40°C наносили одноразовою бактеріологічною петлею на підготовлені чашки із поживними середовищами для визначення стерильності.

2.11. Статистичний аналіз даних

Експерименти проводились у трьох біологічних повторах, результати яких згодом об'єднували в один пул даних для статистичної обробки. Власне статистичну обробку даних та побудову графіків проводили у програмах GraphPad Prism 8.0. та Microsoft Excel 2010. Проводили двофакторний дисперсійний аналіз (two-way ANOVA), із визначенням середніх значень, SM та SD, також проводили множинне порівняння (Dunnett's test).

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Бактеріальна культура *Pseudomonas aeruginosa*

Для виділення бактеріофагів із стічних вод було обрано культуру бактерії *Pseudomonas aeruginosa* 1664, що була надана спеціалістами ДУ Інституту травматології та ортопедії НАМН України. Ізолят даної культури культивувався на ТСА, як описано вище.

Необхідно зазначити, що при серійних пересівах *Pseudomonas aeruginosa* 1664 на агаровмісне поживне середовище для отримання ізольованих колоній було виявлено, що даний ізолят представляє собою суміш 2 різних типів колоній, тобто є поліморфним (Рис. 3.1).

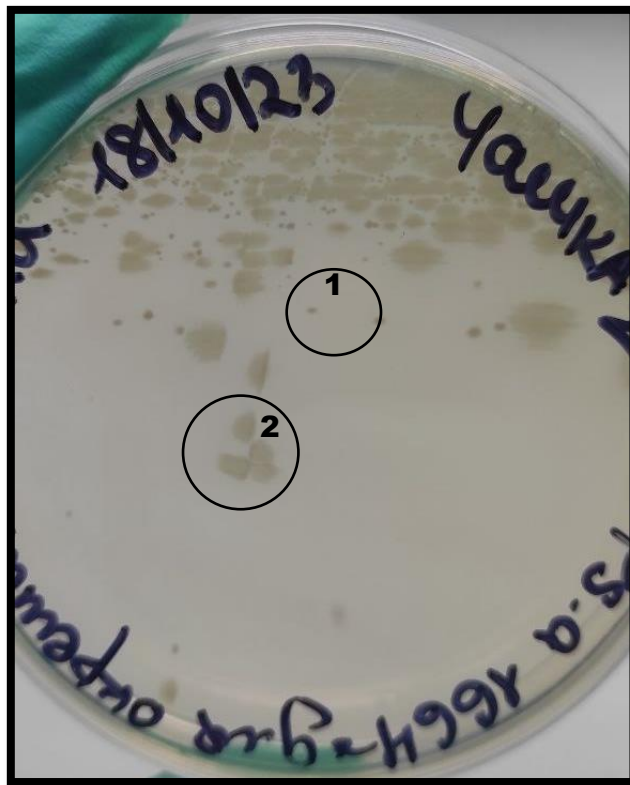


Рис. 3.1 Поліморфні колонії *Pseudomonas aeruginosa* 1664, де 1 позначає колонії малого розміру (до 1 мм), а 2 позначає колонії більшого розміру (близько 4 мм)

Так в подальшому, колонії даної бактерії більшого типу позначатимуться як *Pseudomonas aeruginosa* 1664В, колонії меншого типу – *Pseudomonas aeruginosa* 1664М, а нерозділена суміш колоній як *Pseudomonas aeruginosa* 1664Н.

3.2. Бактеріофаги, виділені із доквілля

Для виділення бактеріофагів із зразків навколишнього середовища, а саме стічних вод, використовували *Pseudomonas aeruginosa* 1664Н, у зв'язку з тим, що поліморфність даної культури не була виявлена на початковому етапі експерименту. Так, за допомогою методу подвійних агарових шарів було виявлено 5 зон лізису (Рис. 3.2).

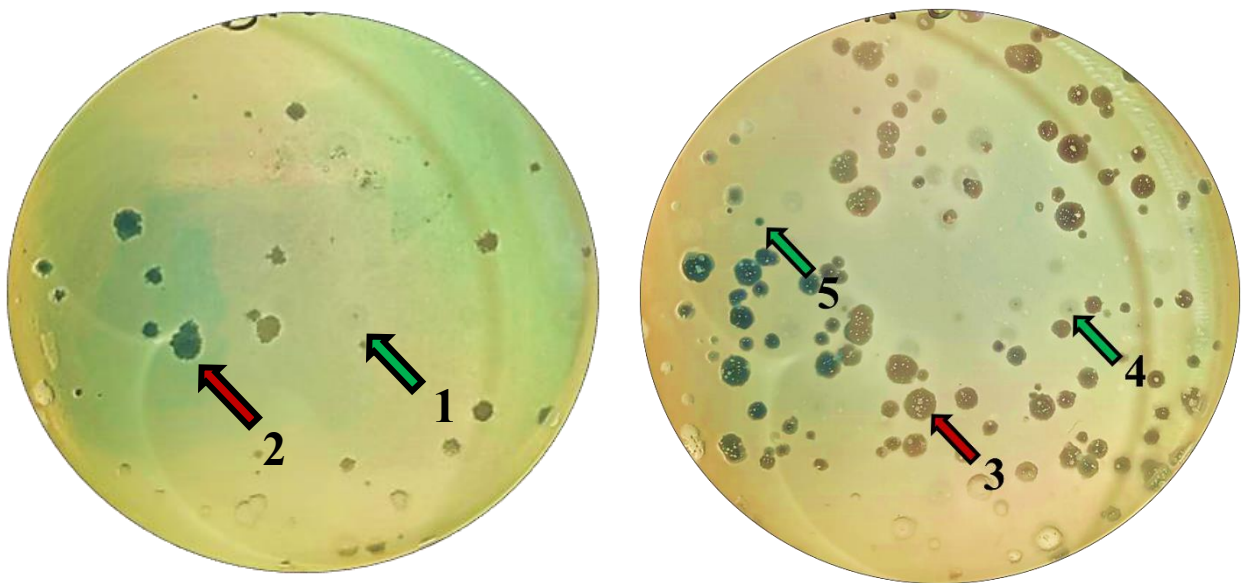


Рис. 3.2 Негативні колонії, виділені в результаті первинного скринінгу бактеріофагів, де червоні стрілки позначають негативні колонії, що не формували зон лізису при наступних пасажах, а зелені стрілки – негативні колонії, що формували зони лізису при наступних пасажах

Отримані зони лізису відділяли препарувальною голкою та ресуспендували в 1 мл фізіологічного розчину, як описано вище. Наступним етапом перевіряли наявність бактеріофагів у отриманих суспензіях та їх

інфекційний титр за допомогою спот-тесту. Було визначено, що активні бактеріофаги наявні у зразках №1, №4 та №5, в той час як у зразках №2 та №3 бактеріофагів не було виявлено.

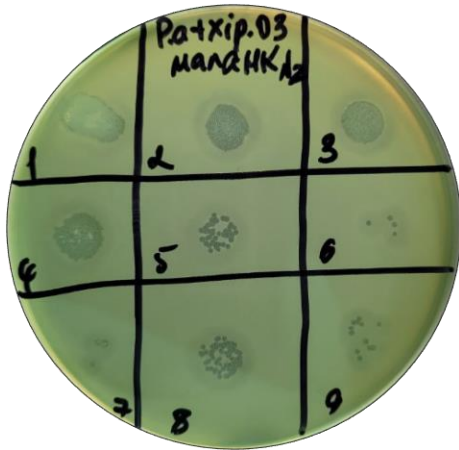


Рис 3.3 Результат спот-тесту фагу виділеного із стічних вод хірургічного відділення (зразок №1)

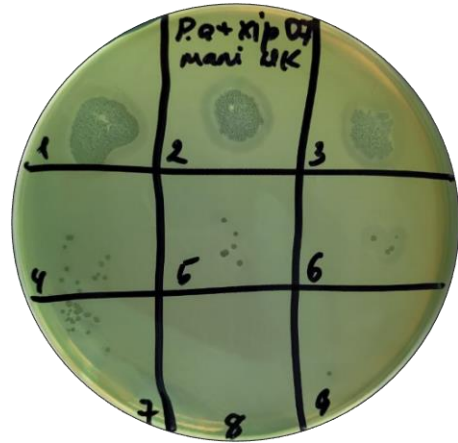


Рис 3.4 Результат спот-тесту фагу виділеного із стічних вод хірургічного відділення (зразок №4)

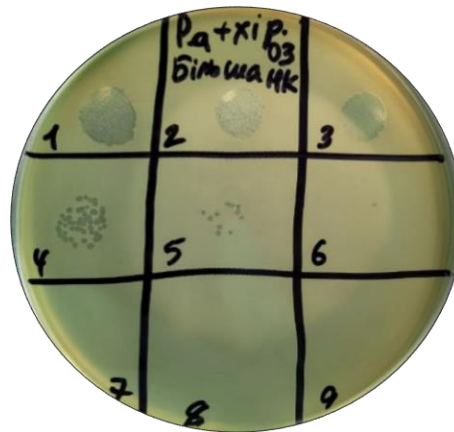


Рис 3.5 Результат спот-тесту фагу виділеного із стічних вод хірургічного відділення (зразок №5)

Після проведення спот-тесту було визначено, що інфекційний титр зразку №1 складає 10^{-10} (Рис. 3.3), №4 – 10^{-7} (Рис. 3.4), а титр зразку №5 – 10^{-5} (Рис. 3.5). В подальшому ізоляти фагів №1, №4 та №5 будуть іменуватись як Psa1, Psa4 та Psa5.

3.3. Накопичення бактеріофагів методом збагачення

Для отримання більшого об'єму фаголізату та проведення подальших досліджень три отримані типи бактеріофагів були накопичені у рідкому поживному середовищі з додаванням культури бактерії *Pseudomonas aeruginosa* 1664Н.

Через 4 години після інкубації фагів у рідкому середовищі з бактерією фаголізат набув прозорого кольору і з кожного фаголізату було відібрано аліквоту в об'ємі 50 мл.

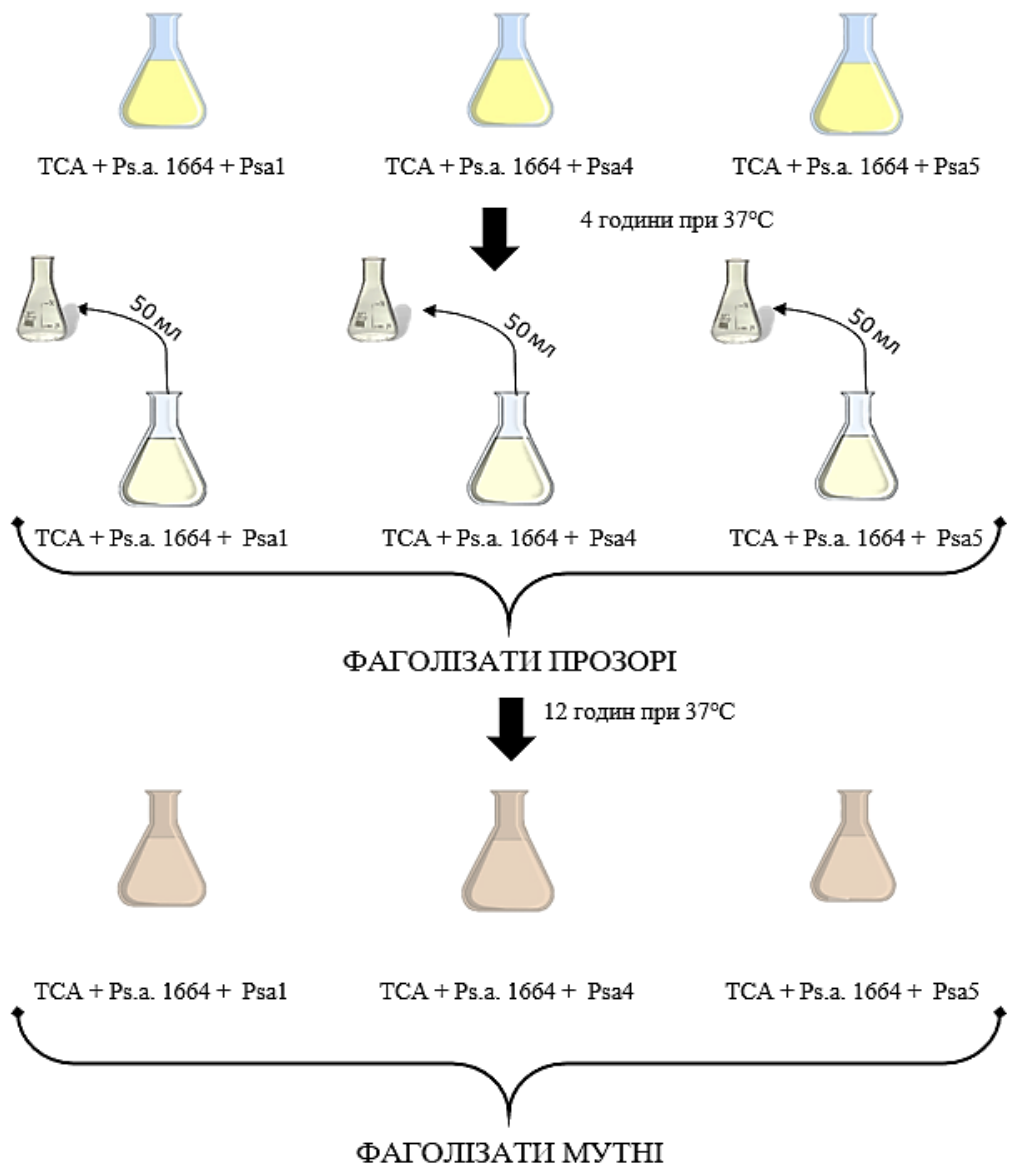


Рис 3.6 Схема накопичення зразків бактеріофагів Psa1, Psa4 та Psa5 у рідкому поживному середовищі

В свою чергу зразки, що залишались в термостаті протягом 12 годин почали повторно ставати мутними. Отже, було отримано по 2 зразки для кожного зразка фагів – 3 прозорих та 3 мутних (Рис. 3.6). Це пов'язано з активним ростом бактерії *Pseudomonas aeruginosa* 1664Н та можливим розвитком резистентності.

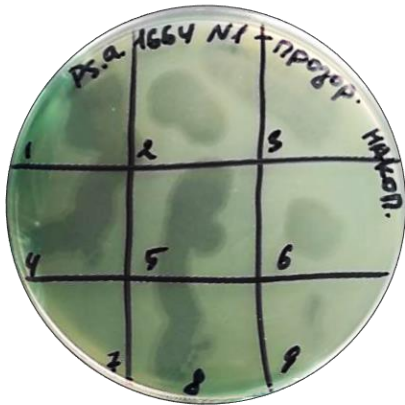


Рис 3.7 Результат спот-тесту фагу Psa1 після накопичення у рідкому поживному середовищі (прозорий зразок)

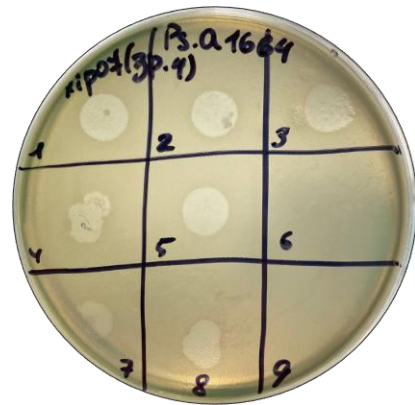


Рис 3.8 Результат спот-тесту фагу Psa4 після накопичення у рідкому поживному середовищі (прозорий зразок)

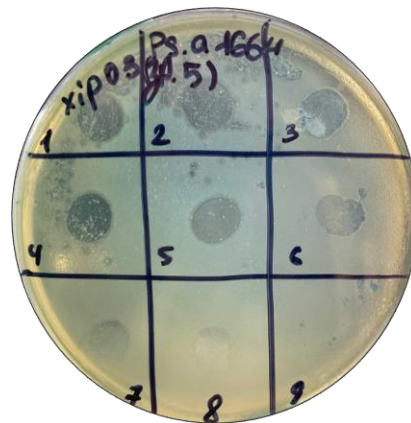


Рис 3.9 Результат спот-тесту фагу Psa5 після накопичення у рідкому поживному середовищі (прозорий зразок)

Так, вищезазначені прозорі зразки фагів після накопичення, центрифугування та фільтрування (0.22 мкм) мали інфекційні титри 10^{-9} для Psa1 (Рис. 3.7), 10^{-8} – для Psa4 (Рис. 3.8) та 10^{-8} для Psa5 (Рис. 3.9). Титр мутних

зразків був меншим на 2-3 ступені. Через відмінність у титрах було вирішено проводити подальшу роботу із прозорими зразками.

3.4. Спектри чутливості різних типів поліморфної *Pseudomonas aeruginosa* 1664 до різних зразків бактеріофагів

Як зазначалось вище, в процесі проведення дослідження було визначено, що тест культура *Pseudomonas aeruginosa* 1664 представляє собою поліморфний ізолят з двома різними, за морфологічними ознаками, типами колоній. Так, колонії морфотипів *Pseudomonas aeruginosa* 1664М та *Pseudomonas aeruginosa* 1664В були перевірені на співпадіння спектрів чутливості до бактеріофагів, наданих лабораторією компанії ТОВ "НПБК-УКРАЇНА", а також виділених бактеріофагів Psa1, Psa4, Psa5 за допомогою спот-тесту.

Було визначено, що морфотип *Pseudomonas aeruginosa* 1664М чутлива лише до одного з шести протестованих бактеріофагів наданих лабораторією компанії ТОВ "НПБК-УКРАЇНА", а саме PaDSM (Таблиця 3.1).

При цьому виділені бактеріофаги Psa1 та Psa5 не виявляли активності проти даної культури, але *Pseudomonas aeruginosa* 1664М була чутливою до Psa4 . В той час як *Pseudomonas aeruginosa* 1664В виявилась чутливою до дії виділених бактеріофагів Psa1, Psa4 та Psa5, а також до трьох з шести наданих тест-фагів (Таблиця 3.1). Таким чином було визначено, що чутливість двох морфотипів досліджуваної бактерії має суттєві відмінності.

Таблиця 3.1

Порівняння чутливості морфотипів *Pseudomonas aeruginosa* 1664М та *Pseudomonas aeruginosa* 1664В до тест-бактеріофагів, що уражують представників виду *Pseudomonas aeruginosa*

Бактеріофаг	<i>Ps.a</i> 1664М	<i>Ps.a</i> 1664В
Psa1	-	+
Psa4	+	+
Psa5	-	+
PaDSM	+	+
PaM	-	+
PaPoly	-	+
Pa458	-	-
PaA	-	-
Pa14	-	-

3.5. Ефективність концентрування бактеріофагів за допомогою фільтра-прототипа

Процес накопичення та концентрування бактеріофагів може бути довготривалим та вимагати великої кількості матеріалів. При цьому на даний момент не існує загальноприйнятого стандартизованого протоколу для накопичення або збагачення фагів. Результатом цього є наявність у кожній дослідницької групи методів накопичення, яким вони віддають перевагу в процесі роботи.

Більшість з цих методів включають вивільнення вірусних часток із зразка навколишнього середовища у буферний розчин, включно з подальшим центрифугуванням та фільтрацією для видалення бактеріального дебрису та

сторонніх часток. Наступним кроком є концентрація бактеріофагів шляхом зменшення об'єму буферу, і це необхідний процес для подальшого проведення електронної мікроскопії та/або секвенування геному.

Саме на етапі концентрування фагів спостерігаються найбільші відмінності в контексті методики. Можуть бути використані системи фільтрації тангенціального потоку (TFF), осадження вірусних часток з використанням ПЕГ, центрифугування в градієнті щільності, ультрацентрифугування, метод флокуляції заліза, ультрафільтрації або ж різноманітні комбінації вищеперерахованих методик [180].

Наразі існує багато дискусій відносно переваг та недоліків вищезазначених методів, включно з тим, що вибір методу концентрування бактеріофагів прямо впливає на життєдіяльність та активність концентрованих вірусних часток.

Центрифугування в градієнті щільності може призвести до втрати фагових часток, при цьому іноді фаги інактивуються під впливом хлориду цезію [181]. Ультрафільтрація, хоч і є швидким процесом, в деяких випадках призводить до зниження активності T4-подібних бактеріофагів [182], а преципітація на основі ПЕГ, як показано, також знижує інфекційність деяких вірусів [183].

Ультрафільтрація базується на використанні пор молекулярного масштабу для концентрації вірусів, шляхом фільтрації великого об'єму зразка через мембрану, одночасно з позбавленням дрібніших речовин, що забруднюють зразок. Власне пристрої для ультрафільтрації бувають двох типів. При роботі із ультрафільтром стандартного типу зразок фільтрується через мембрану у камеру елюції, таким чином нагадуючи роботу типового бактеріального фільтра. Інший тип ультрафільтру – зворотній, при роботі з ним зразок знаходиться у нижній камері та витісняється через фільтр нагору в камеру елюції. Зворотня ультрафільтрація вимагає використання центрифуги [180, 182].

Для проведення дослідження нам було надано фільтр-прототип, включно з протоколом використання. Особливість фільтра-прототипа полягає у тому, що при проходженні зразка через мембрану за стандартним типом, вірусні частинки затримуються на мембрані та концентруються. Після цього фаги елюються із мембрани у менший об'єм буферного розчину шляхом використання потоку буфера у зворотному напрямку (Рис. 3.10).

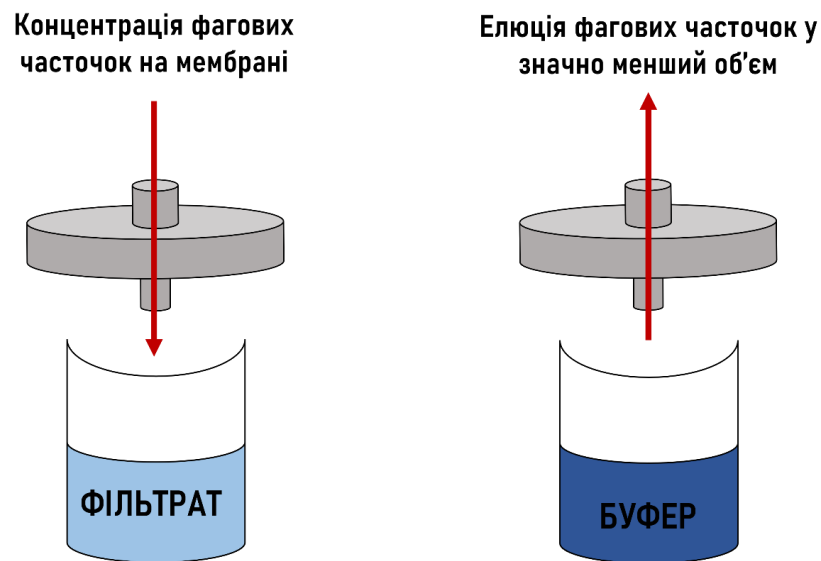


Рис 3.10 Схема роботи фільтра-прототипа

Таким чином, теоретично даний фільтр дозволяє отримати високу концентрацію вірусних часток у малому об'ємі без використання центрифуги, та з низькою витратою матеріалів.

Отже, для тестування ефективності роботи фільтра у контексті концентрування бактеріофагів було обрано фаг Psa4, у зв'язку з тим, що даний вірус здатний уражувати обидва морфотипи тестової бактеріальної культури *Pseudomonas aeruginosa* 1664М та *Pseudomonas aeruginosa* 1664В. В процесі роботи інфекційний титр бактеріофагу Psa4 тестували на початку проведення експерименту (вихідний титр), після центрифугування було протестовано титр фагу як у супернатанті, так і у ресуспендованому осаді. Інфекційний титр перевіряли також після фільтрування (фільтрат) для визначення ефективності

мембрани у «затримуванні» вірусних часточок. Елюцію проводили тричі та тестували кожен елюат.

Вихідний титр фагу Psa4, при тестуванні на *Pseudomonas aeruginosa* 1664М складав 10^6 , після центрифугування було проведено перевірку інфекційного титру як супернатанту, так і ресуспендованого осаду. Очікувано, титр супернатанту був нижчим від осаду і складав 10^5 , в той час як титр осаду – 10^7 (Рис. 3.11). Після використання фільтру-прототипу для концентрації титр фільтрату складав 10^6 , для трьох послідовних елюатів даний показник складав 10^4 , 10^5 та 10^4 відповідно (Рис. 3.11).

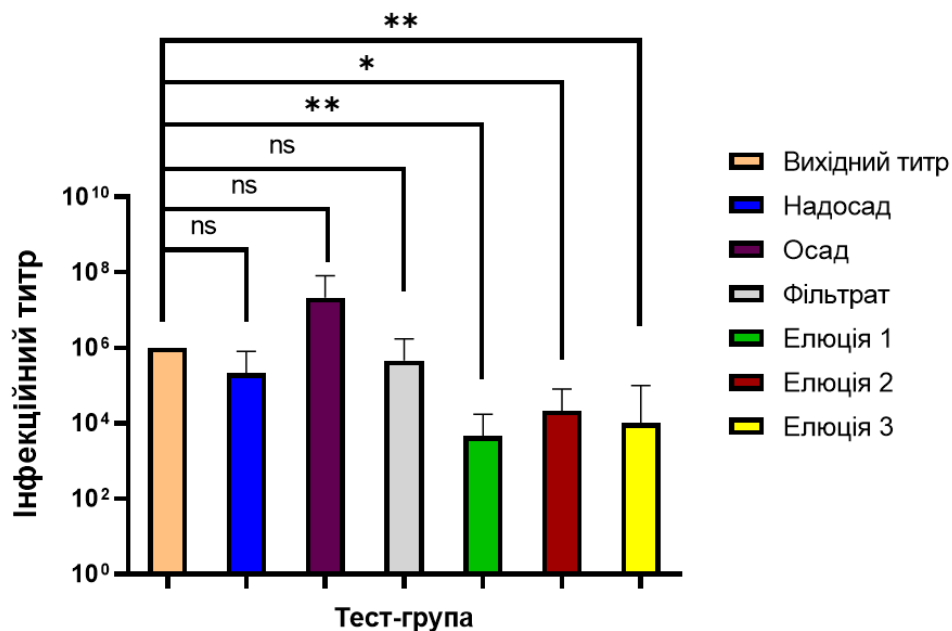


Рис 3.11 Інфекційний титр бактеріофага Psa4 для *Pseudomonas aeruginosa* 1664М на різних стадіях експерименту з фільтром-прототипом. Результати трьох біологічних повторів, * - $p \leq 0.05$, ** - $p \leq 0.01$, ns – різниця статистично недостовірною, двофакторний дисперсійний аналіз, множинне порівняння (Dunnett's test).

Так само, визначення вихідного титру фагу Psa4, при тестуванні на *Pseudomonas aeruginosa* 1664В показало, що титр складає 10^6 (Рис. 3.12). За допомогою спот-тесту визначили, що титр надосаду та осаду після

центрифугування був однаковим і складав 10^{-8} (Рис. 3.12). Після використання фільтру, було визначено, що інфекційний титр досліджуваного фага у фільтраті – 10^{-5} , у елюаті 1 – 10^{-6} , у елюаті 2 – 10^{-5} та у елюаті 3 – 10^{-6} (Рис. 3.12).

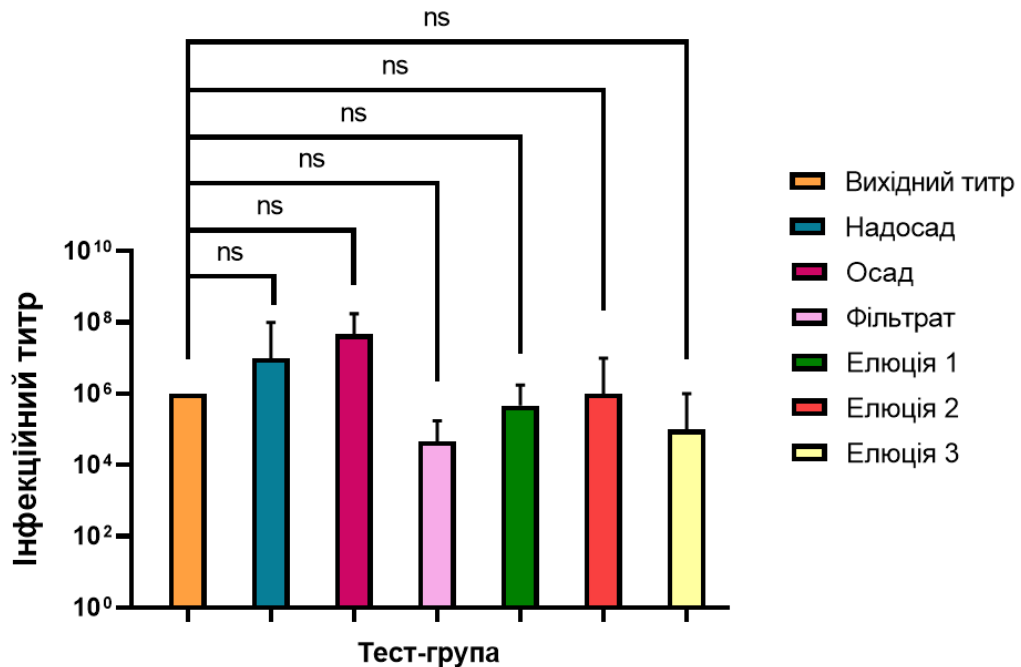


Рис 3.12 Інфекційний титр бактеріофага Psa4 для *Pseudomonas aeruginosa* 1664В на різних стадіях експерименту з фільтром-прототипом. Результати трьох біологічних повторів, ns – різниця статистично недостовірна, двофакторний дисперсійний аналіз, множинне порівняння (Dunnett's test).

При тестуванні на *Pseudomonas aeruginosa* 1664М, було визначено, що інфекційний титр бактеріофагу Psa4 у фільтраті вищий ніж у кожному з трьох елюатів. Більш того, елюати, що мають містити концентрат досліджуваного бактеріофагу показали інфекційні титри нижчі за вихідні при перевірці на обох варіантах тест-бактерії.

Таким чином було визначено, що використання фільтру прототипу для концентрування бактеріофагів не є ефективним для накопичення виділеного бактеріофагу Psa4, тим не менш необхідні подальше вивчення

ефективності, із застосуванням додаткових тест-вірусів фільтру для накопичення інших бактеріофагів.

3.6. Ізоляти досліджуваних бактеріофагів, їх інфекційні титри та спектри активності

Відносно зразків бактеріофагів Psa1, Psa4 та Psa5 було проведено повторну оцінку інфекційного титру, після визначення ефективності фільтру-прототипу для концентрування, та встановлено, що титр Psa4 знижується більш активно, в порівнянні з Psa1 та Psa5. Тому було вирішено проводити виділення ізоляти бактеріофагів із використанням зразків Psa1 та Psa5, в той час як Psa4 було вилучено з дослідження.

Було проведено титрування за Грація для повторного визначення титру (зразки Psa1 та Psa5). А також за результатами, було виділено ізоляти бактеріофагів. Так, із зразка Psa 1 було виділено два ізоляти 1/1 та 1/2, шляхом серійних пасажів. Для зразку Psa 5 також було виділено два ізоляти – 5/1 та 5/2. Для отримання точного результату відносно інфекційного титру ізолятів було проведено титрування даних зразків за Грація. Для подальшої роботи, отримані ізоляти було накопичено методом зливного лізису, як описано вище. Так, після накопичення титри ізолятів складали: 1/1 – 10^9 (Рис. 3.13), 1/2 – 10^7 (Рис. 3.14), 5/1 – 10^9 (Рис. 3.15), 5/2 – 10^9 (Рис. 3.16).

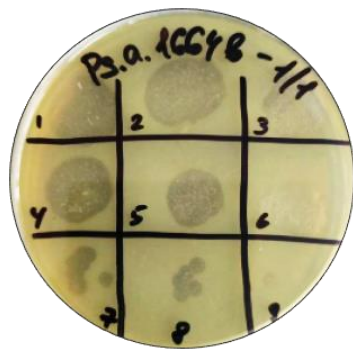


Рис 3.13 Інфекційний титр фагу 1/1 після накопичення методом зливного лізису

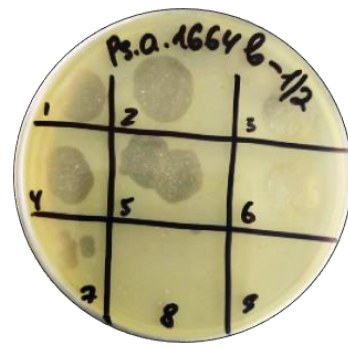


Рис 3.14 Інфекційний титр фагу 1/2 після накопичення методом зливного лізису

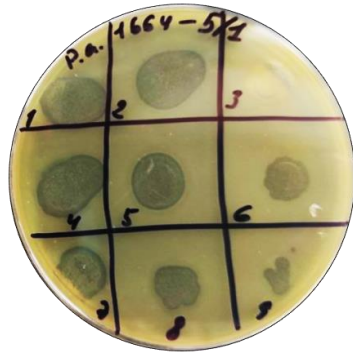


Рис 3.15 Інфекційний титр фагу 5/1 після накопичення методом зливного лізису

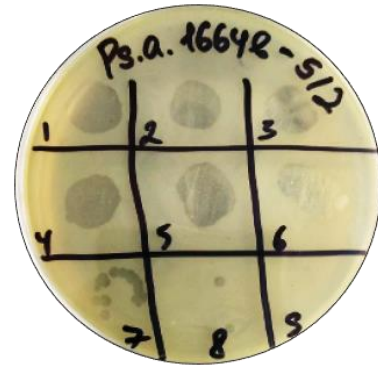


Рис 3.16 Інфекційний титр фагу 5/2 після накопичення методом зливного лізису

Спектри активності для кожного ізоляту фага визначали за допомогою спот-тесту, перевіряючи активність бактеріофагів на 75 тестових культурах мікроорганізмів, що належать до виду *Pseudomonas aeruginosa*. Кожна тест-культура – клінічний ізолят, отриманий від пацієнтів медичних установ (ДУ Інституту травматології та ортопедії НАМН України та ДУ Інституту урології ім. акад. О.Ф. Возіанова НАМН України) та ідентифікований до виду бактеріологічними лабораторіями вищезазначених медичних закладів.

Було визначено, що ізолят фагу 1/1 був ефективний проти 24 клінічних ізолятів бактерії, ізолят фагу 1/2 проти 17 ізолятів бактерії, ізолят фагу 5/1 проти 16 ізолятів бактерії, а ізолят фагу 5/2 виявляли літичну активність відносно 22 ізолятів бактерії. Також необхідно зазначити, що 10 тест-культур виявились чутливими до кожного виділеного фага, в той час як 49 – були резистентними до дії будь-якого з них.

Отже, ізоляти фагів 1/2 та 5/1 виявились менш ефективними, в той час як бактеріофаги ізоляти фагів 1/1 та 5/2 проявляли найбільшу літичну активність, саме тому подальші етапи роботи проводились із бактеріофагами 1/1 та 5/2.

3.7. Морфологічні характеристики ізолятів бактеріофагів 1/1 та 5/2

Для визначення морфології ізолятів фагів 1/1 та 5/2 було проведено трансмісійну електронну мікроскопію. Обидва досліджувані фаги мають ікосаедричну головку діаметром 65 ± 2 нм для фагу 1/1 (Рис. 3.17) та 70 ± 3 нм для бактеріофагу 5/2 (Рис. 3.18).

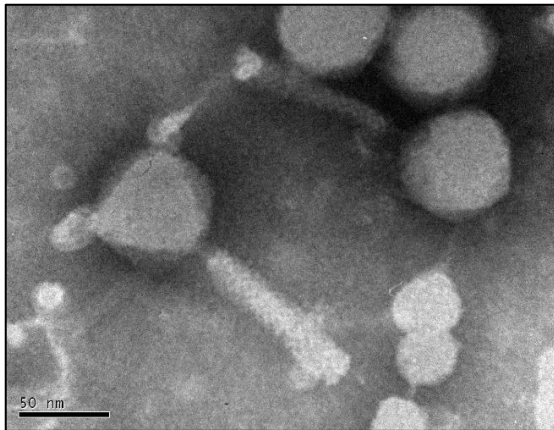


Рис 3.17 Мікрофотографія бактеріофагу 1/1, отримана за допомогою трансмісійної електронної мікроскопії

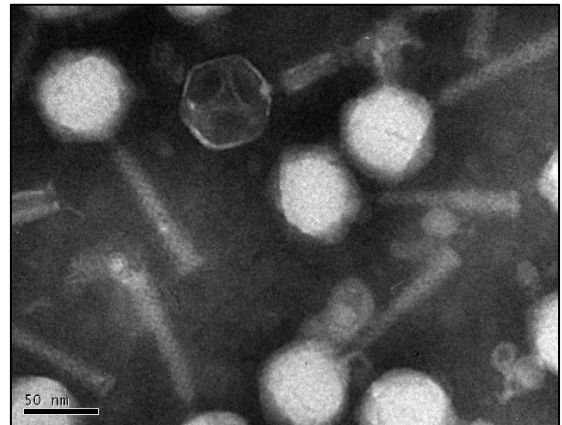


Рис 3.18 Мікрофотографія бактеріофагу 5/2, отримана за допомогою трансмісійної електронної мікроскопії

Обидва досліджувані фаги мають скоротливі хвостові відростки. Довжина та діаметр хвостового відростка фагу 1/1 складає 90 ± 5 нм та 20 ± 2 нм відповідно (Рис. 3.17). В той час як розміри хвостового відростка фагу 5/2 складають 100 ± 5 нм у довжину та близько 15 ± 2 нм в діаметрі (Рис. 3.18). Так, визначено, що морфологічні характеристики досліджуваних ізолятів бактеріофагів відповідають морфотипу А [184].

3.8. Фаго- та антибіотикорезистентність фагів 1/1 та 5/2

Під час визначення титру фагів після накопичення шляхом зливного лізису було виявлено наявність вторинного росту бактерії на зонах лізису,

при цьому характер вторинного росту відрізнявся у різних зразках (Рис. 3.19, Рис. 3.20). Зразки бактерій, що обумовили вторинний ріст (1/1 РЕЗ та 5/2 РЕЗ) були відібрані для /подальших досліджень подальших досліджень.

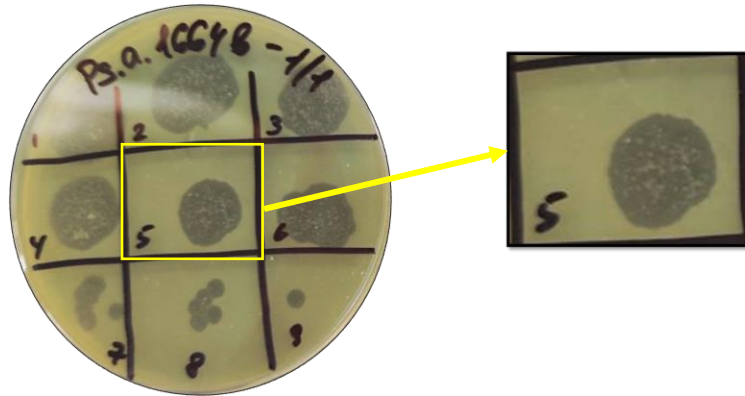


Рис 3.19 Характер вторинного росту на первинних зонах лізису при визначенні інфекційного титру фагу 1/1 методом спот-тесту

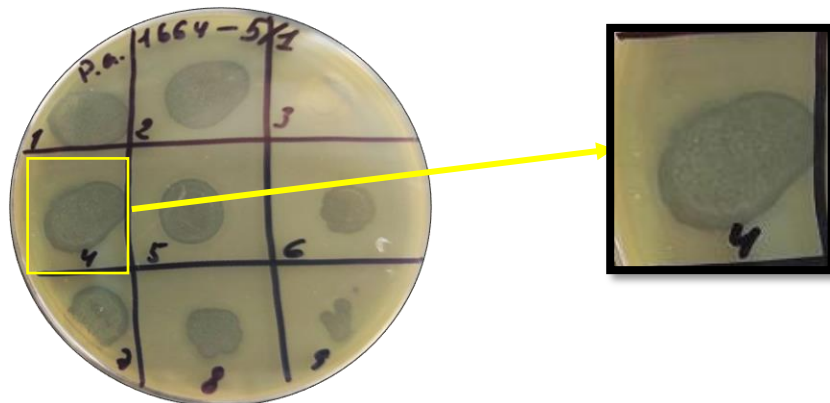


Рис 3.20 Характер вторинного росту на первинних зонах лізису при визначенні інфекційного титру фагу 5/2 методом спот-тесту

Бактерії вторинного росту були протестовані на ряді бактеріофагів наданих лабораторією компанії ТОВ "НПБК-УКРАЇНА", що раніше були використані для визначення чутливості морфотипів тест-бактерії *Pseudomonas aeruginosa* 1664, а саме PaDSM, PaM, PaPoly, Pa458, PaA, Pa14. Крім того, були повторно протестовані фаги 1/1, 1/2, 5/1 та 5/2 для визначення фагорезистентності культур вторинного росту.

Після проведення спот-тесту було визначено, що виділені культури вторинного росту (1/1 РЕЗ та 5/2 РЕЗ) виявились резистентними як до усіх чотирьох виділених зразків бактеріофагів (Рис. 3.21, Рис. 3.22), так і до тест-бактеріофагів наданих лабораторією компанії ТОВ "НПБК-УКРАЇНА" (Рис. 3.21, Рис. 3.22).

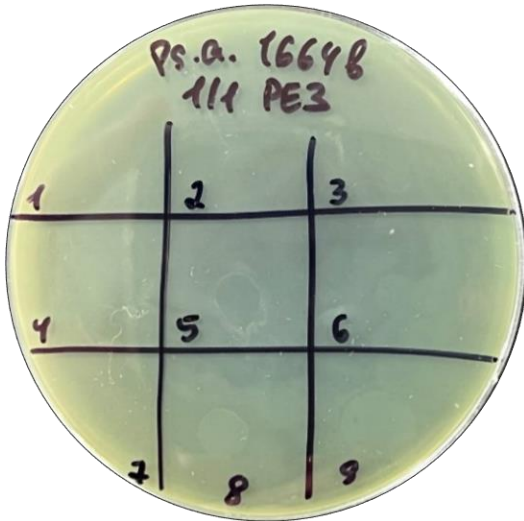


Рис 3.21 Результат спот-тесту фагів на культурі 1/1 РЕЗ

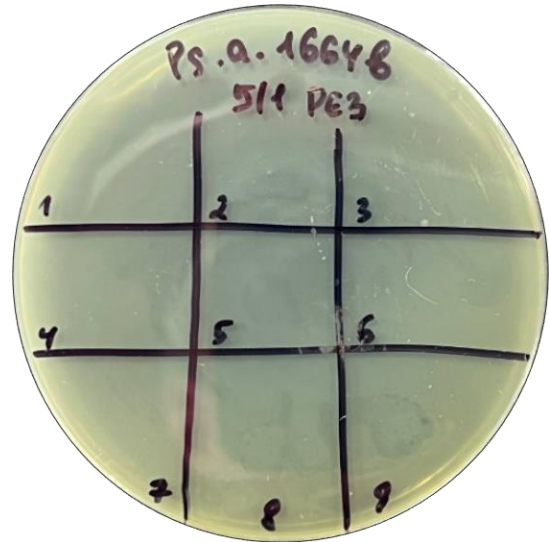


Рис 3.22 Результат спот-тесту фагів на культурі 5/2 РЕЗ

Отримані результати можуть свідчити про формування фагорезистентності культури *Pseudomonas aeruginosa* 1664В. Тим не менш необхідно зазначити, що один із морфотипів тестового ізоляту, а саме *Pseudomonas aeruginosa* 1664М не був чутливим до бактеріофагів Psa1 та Psa5 під час дослідження резистентності морфотипів до наявних бактеріофагів, при цьому саме ці зразки були використані для виділення ізолятів бактеріофагів. Тож, можливо саме *Pseudomonas aeruginosa* 1664М є морфотипом, що викликав вторинний ріст.

Наступним етапом було проведено диско-дифузійний тест для визначення наявності антибіотикорезистентності усіх варіантів тест-бактерії, а саме *Pseudomonas aeruginosa* 1664Н, *Pseudomonas aeruginosa* 1664В, *Pseudomonas aeruginosa* 1664М, культура вторинного росту 1/1, культура вторинного росту 5/1. Так, було виявлено, що *Pseudomonas aeruginosa* 1664М

резистентна до усіх протестованих антибіотиків, тоді як *Pseudomonas aeruginosa* 1664В чутлива до амікацину, спектр чутливості вихідної культури *Pseudomonas aeruginosa* 1664Н відповідав *Pseudomonas aeruginosa* 1664В. Відносно бактерій вторинного росту – культура 1/1 умовно-чутлива (або помірно-чутлива) до амікацину та нечутлива до інших антибіотиків, а культура 5/1 – чутлива до амікацину та єдина з бактерій, що умовно-чутлива до дії доксицикліну гідрохлориду (Таблиця 3.2).

Таблиця 3.2

Чутливість варіантів тест-бактерії до антибіотиків, визначена за допомогою диско-дифузійного методу, мм

Бактерія	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1664Н	0	0	0	11	0	16	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1664В	0	0	0	12	0	15	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1664М	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0
1/1 РЕЗ	0	0	0	11	0	13	0	0	0	8-9
5/1 РЕЗ	0	0	0	12	13	16	0	0	0	0

1 – Ципрофлоксацин, 2 – Гентаміцин, 3 – Норфлоксацин, 4 – Хлорамфенікол, 5 – Доксицикліну гідрохлорид, 6 – Амікацин, 7 – Цефазолін, 8 – Цефелім, 9 – Цефтріаксон, 10 – Цефтріаксим

Розрахунки чутливості мікроорганізмів до антибіотиків, шляхом постановки антибіотикограми проводились відповідно до Наказу №167 від 05.04.2007 Міністерства Охорони Здоров'я України Про затвердження методичних вказівок «Визначення чутливості мікроорганізмів до

антибактеріальних препаратів», а саме – Таблиця 4. Критерії інтерпретації результатів визначення чутливості *P.Aeruginosa*, *Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter spp.* та інших НФБ1: граничні значення діаметрів зон пригнічення росту (мм) і МІК (мг/л) АБП.

3.9. Активність бактеріофагів 1/1 та 5/2 у формі супозиторіїв

Супозиторії – це лікарська форма препаратів у вигляді твердих або м'яких конусоподібних або циліндричних форм, які призначені для введення у ректум, вагіну або інші порожнини тіла з терапевтичною метою. Дана лікарська форма характерна тим, що зберігає твердий стан при кімнатній температурі, а при введенні в порожнину тіла розчиняється або плавиться [185]. Супозиторії можуть складатися з гідрофобних або гідрофільних речовин, що також впливає на час їх плавлення. Зокрема, серед найбільш часто використовуваних гідрофобних основ можна зазначити твердий жир типів А та Б та масло какао, а серед гідрофільних – желатин та гліцерин [185].

За метою використання супозиторії поділяються на ректальні, вагінальні, уретральні, при цьому останні можуть бути використані для введення у патологічні порожнини тіла, такі як рани, в тому числі хірургічні. Супозиторії забезпечують не лише місцеву дію, а й генералізовану, за рахунок надходження лікарської речовини у велике коло кровообігу, абсорбуючись печінкою лише частково, на відміну від перорального прийому препарату. Крім того, швидкість всмоктування діючої речовини у формі супозиторіїв, в деяких випадках, може перевищувати швидкість надходження препарату шляхом внутрішньом'язових ін'єкцій [185].

Використання бактеріофагів у формі супозиторіїв – перспективний, хоч і не досліджений напрямок. Так, у дослідженні Teagan L. Brown, продемонстрував збереження активності бактеріофагів у формі супозиторіїв протягом 90 діб [186]. В іншому дослідженні, Teagan L. Brown, визначив, що деякі із досліджуваних ним бактеріофагів, підтримують високий інфекційний

титр [187]. Також Arurva Virmani Johgi описала випадок лікування пацієнта з МАБР бактеріальним ураженням передміхурової залози та успішне лікування з використанням бактеріофагів у формі супозиторіїв [188].

Для визначення збереження активності фагів у формі супозиторіїв, для початку провели серію дослідів, в яких до розплавленого твердого жиру вносили різні об'єми ddH₂O, для визначення збереження цілісності форми супозиторіїв після застигання. Так, в процесі дослідження вносили такі об'єми води на 2,5 г твердого жиру (вага одного супозиторія): 40 мкл, 80 мкл, 160 мкл та 320 мкл. Було визначено, що супозиторії зберігають форму при додаванні 40, 80 (Рис. 3.23) та 160 мкл (Рис. 3.24) води на 2,5 г жиру, в той час як при додаванні 320 мкл супозиторії стають пористими, більш крижкими та не утримують рідину.

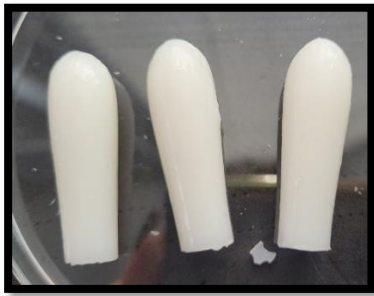


Рис 3.23 Сформовані супозиторії, що містять ddH₂O у співвідношенні 80 мкл/2,5г 80 мкл/2,5г



Рис 3.24 Сформовані супозиторії, що містять ddH₂O у співвідношенні 160 мкл/2,5г 160 мкл/2,5г

Отже для подальших експериментів було обрано співвідношення 80 мкл ріднини/ 2,5 г жиру та 160 мкл ріднини/ 2,5 г жиру. Для проведення дослідження із визначення активності бактеріофагів у формі супозиторіїв було обрано фаги 1/1 та 5/2 у зв'язку з їх вищою літичною активністю. Вищезазначені бактеріофаги вносили в об'ємах 80 та 160 мкл на 2,5 г жирової основи у розплавлений жир, температура якого складала не вище 40°C та емульгували, ретельно перемішуючи.

Отриману емульсію вносили у форми для підготування супозиторіїв та охолоджували протягом 15 хвили у холодильній камері при 4°C. Таким чином було підготовано чотири зразка супозиторіїв: 1/1 – 80 мкл, 1/1 – 160 мкл, 5/2 – 80 мкл та 5/2 -160 мкл. Спершу визначали збереження життєдіяльності бактеріофагів у твердому жирі, для цього фрагмент супозиторію наносили на двошаровий агар, верхній шар якого містив 100 мкл *Pseudomonas aeruginosa* 1664В та оцінювали збереження життєдіяльності досліджуваних бактеріофагів за наявністю зон лізису. Було визначено, що бактеріофаги 1/1 та 5/2 зберігають свою активність у супозиторіях, утворюючи зони лізису на газоні тест-бактерії *Pseudomonas aeruginosa* 1664В як через 7 діб (Рис 3.25) після формування супозиторіїв, так і через 60 діб після формування супозиторіїв (Рис 3.26) та зберігання при 4°C.

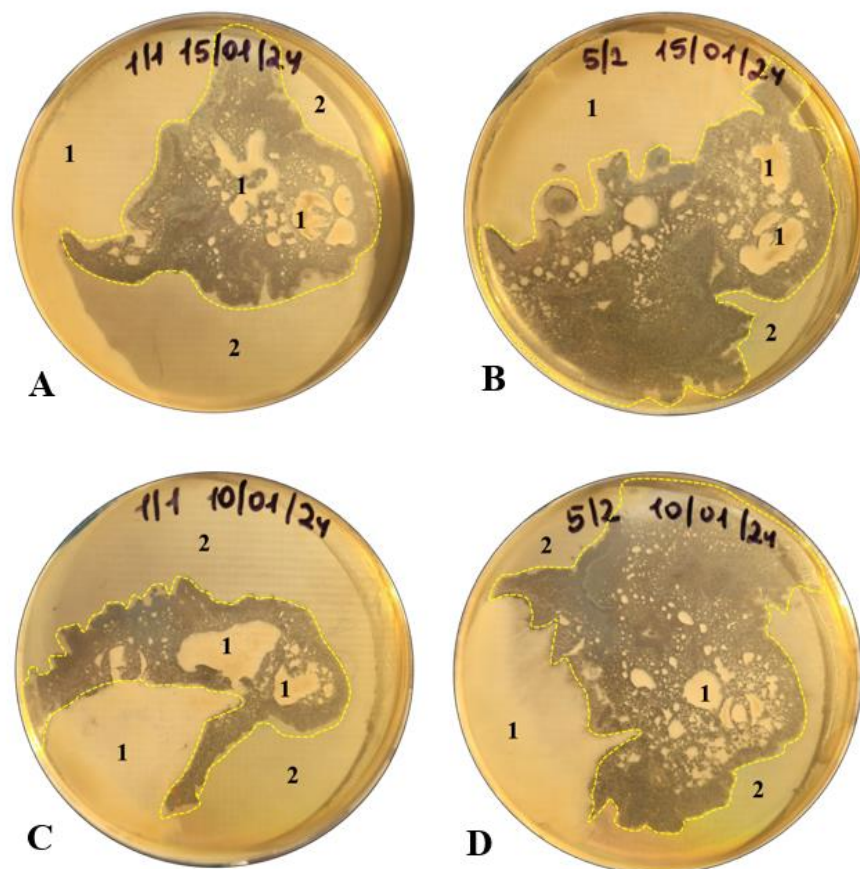


Рис 3.25 Зони лізису на *Pseudomonas aeruginosa* 1664В після проведення тесту на визначення збереження життєдіяльності супозиторіїв на 7 добу

після формування. **A** – 80 мкл фаголізату 1/1, **B** – 80 мкл фаголізату 5/2, **C** – 160 мкл фаголізату 1/1, **D** – 160 мкл фаголізату 5/2, де **1** – застиглий жир, **2** – газон бактеріальної культури, жовті штрихи – зона лізису

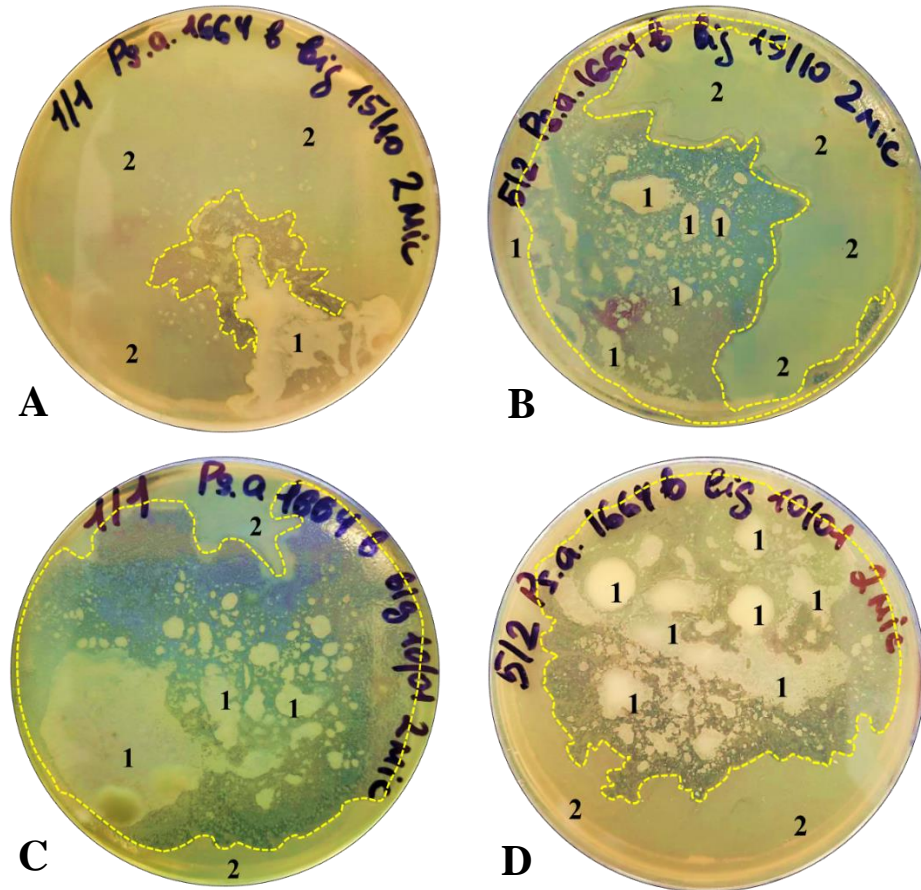


Рис 3.26 Зони лізису на *Pseudomonas aeruginosa* 1664В після проведення тесту на визначення збереження життєдіяльності супозиторіїв на 60 добу після формування. **A** – 80 мкл фаголізату 1/1, **B** – 80 мкл фаголізату 5/2, **C** – 160 мкл фаголізату 1/1, **D** – 160 мкл фаголізату 5/2, де **1** – застиглий жир, **2** – газон бактеріальної культури, жовті штрихи – зона лізису

Після підтвердження, що фаги 1/1 та 5/2 зберігають активність у сформованих супозиторіях при різних об'ємах доданого фаголізату, було проведено спот-тест для визначення інфекційного титру. Для проведення спот-тесту супозиторії розтоплювали на водяній бані при температурі 40°C. При цьому фіксували час, що необхідний для розплавлення. Так, середній час для усіх супозиторіїв складав 12 хвилин.

Після розплавлення проводили серійні розведення та визначали інфекційний титр фагів у супозиторіях шляхом титрування за Грація. Було визначено, що через 7 діб після формування у супозиторіях, до яких додавали 80 мкл фаголізату на 2,5г твердого жиру титр обох фагів складає 10^9 (Рис. 3.27).

Через 14 діб титр фагу 1/1 (80 мкл/2,5г) складав 10^9 , тоді як титр фагу 5/2 (80 мкл/2,5г) також складав 10^9 (Рис. 3.27). Через 30 діб зберігання супозиторіїв було визначено, що інфекційний титр фагів 1/1 (80 мкл/2,5г) та 5/2 (80 мкл/2,5г) був однаковим та складав 10^8 (Рис. 3.27). Через 60 діб зберігання титр бактеріофагу 5/2 (80 мкл/2,5г) не змінився та складав 10^8 (Рис. 3.27), в той час як для бактеріофагу 1/1 (80 мкл/2,5г) спостерігали різке зниження інфекційного титру до 10^3 (Рис. 3.27).

Відносно супозиторіїв до яких додавали 160 мкл фаголізату на 2,5 г твердого жиру було визначено, що через 7 діб після формування титр обох фагів складав 10^9 (Рис. 3.28).

Через 14 діб титр фагу 1/1 складав 10^9 , тоді як титр фагу 5/2 складав $>10^9$ (Рис. 3.28). При перевірці титру через 30 діб, визначили, що останній складає 10^9 для бактеріофагу 1/1 (160 мкл/2,5г), при цьому титр фагу 5/2 складав 10^9 (Рис. 3.28).

При визначенні титру фагів через 60 діб зберігання, було виявлено, що бактеріофаг 5/2 (160 мкл/2,5г) мав стабільно високий титр 10^9 (Рис. 3.28), як і при попередніх тестах, на визначення титру. Відносно бактеріофагу 1/1 (160 мкл/2,5г), так само як і при додаванні 80 мкл фаголізату на 2,5г жиру, виявили зниження титру до показника 10^4 (Рис. 3.28).

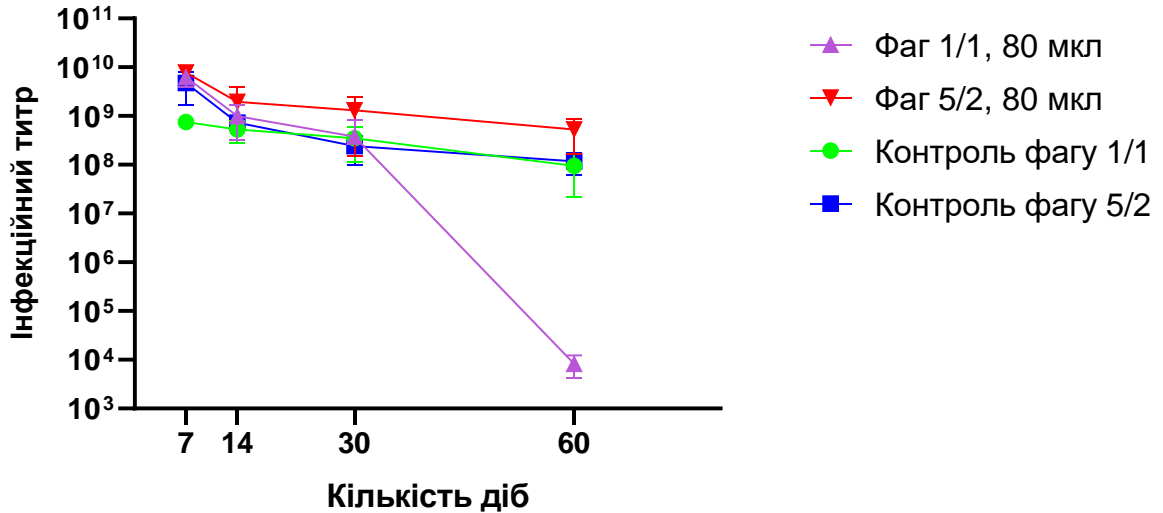


Рис 3.27 Порівняння зміни показників інфекційного титру бактеріофагів 1/1 (80 мкл/2,5г) та 5/2 (80 мкл/2,5г) у формі супозиторіїв, протягом 7, 14, 30 та 60 днів. Результати трьох біологічних повторів, де однакові літери позначають відсутність статистичної відмінності даних, а різні - $p \leq 0.05$, двофакторний дисперсійний аналіз, множинне порівняння (Dunnett's test).

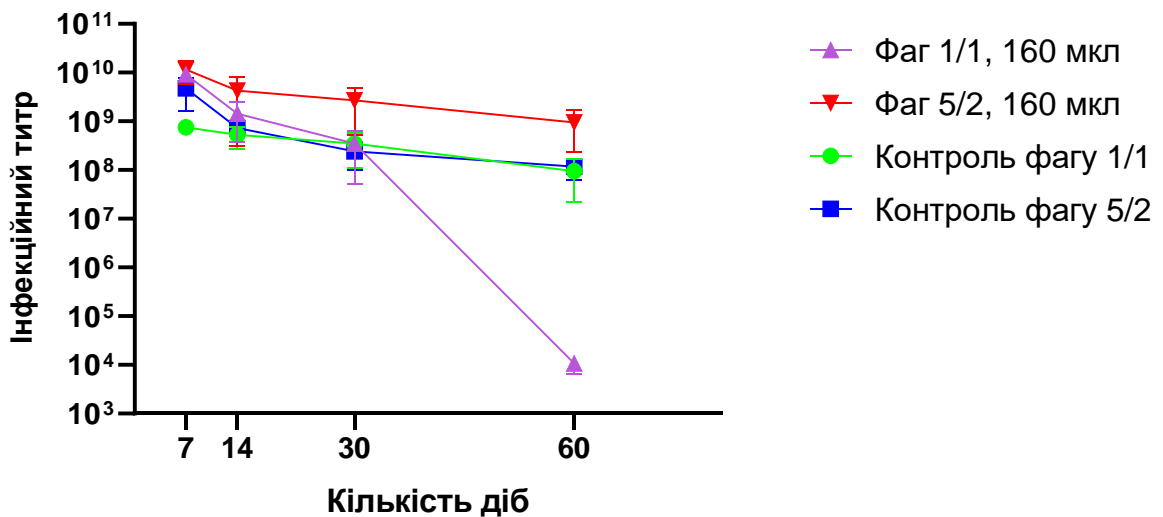


Рис. 3.28 Порівняння зміни показників інфекційного титру бактеріофагів 1/1 (160 мкл/2,5г) та 5/2 (160 мкл/2,5г) у формі супозиторіїв, протягом 7, 14, 30 та 60 днів. Результати трьох біологічних повторів, де однакові літери позначають відсутність статистичної

відмінності даних, а різні - $p \leq 0.05$, двофакторний дисперсійний аналіз, множинне порівняння (Dunnett's test).

Окрім визначення інфекційного титру шляхом спот-тесту чотири варіанти супозиторії додатково перевіряли на стерильність. Супозиторії, розплавлені при 40°C наносили одноразовою бактеріологічною петлею на підготовлені чашки із поживними середовищами для визначення стерильності. Було визначено, що усі протестовані супозиторії не містять сторонніх бактерій чи грибів.

Крім того, проводили порівняння інфекційного титру стоку бактеріофагів 1/1 та 5/2 та титру у супозиторіях. Було визначено, що титр стокових фаголізатів залишався незмінним впродовж 60 діб і складала 10^8 для обох досліджуваних бактеріофагів (1/1 та 5/2).

Отже, було визначено, що бактеріофаг 5/2 зберігає активність протягом 60 діб у формі супозиторіїв, як при вмісті фаголізату 80 мкл/2,5г, так і 160 мкл/2,5г та складав 10^8 та 10^9 відповідно, в той час як для бактеріофагу 1/1 в обох вищезазначених об'ємах спостерігали стабільність інфекційного титру на 30 день зберігання, проте на 60 день титр виявився значно меншим (10^3 для 80 мкл/2,5г та 10^4 для 160 мкл/2,5г). Дані результати свідчать про можливість використання бактеріофагу 5/2 для лікування бактеріальних інфекцій, викликаних *Pseudomonas aeruginosa* 1664В.

ВИСНОВКИ

1. Виділені ізоляти бактеріофагів (Psa 1/1, Psa 1/2, Psa 5/1 та Psa 5/2) активні проти клінічних ізолятів виду *Pseudomonas aeruginosa*, демонструють відмінні спектри літичної активності та потенційно можуть бути використані у клінічній практиці.
2. За морфологічними характеристиками фаги 1/1 та 5/2 відповідають морфотипу A1. Фаги обох ізолятів мають ікосаедричну головку діаметром 65 ± 2 нм для фагу Psa 1/1 та 70 ± 3 нм для бактеріофагу Psa 5/2. Довжина та діаметр хвостового відростка фагу Psa 1/1 складає 95 ± 5 нм та 20 ± 2 нм, відповідно. В той час як розміри хвостового відростка фагу Psa 5/2 складають 100 ± 5 нм у довжину та близько 15 ± 2 нм в діаметрі.
3. Бактеріофаг Psa 1/1 виявляє літичну активність проти 32% клінічних ізолятів, в той час як фаг Psa 5/2 лізує 29,3 % бактеріальних ізолятів.
4. Бактеріофаг Psa 1/1 виявляє стабільність інфекційного титру у формі супозиторіїв, станом на 30 добу після формування останніх, проте станом на 60 добу зберігання спостерігається зниження показників інфекційного титру на $5 \log$.
5. Бактеріофаг Psa 5/2 зберігає високі показники інфекційного титру станом на 60 добу зберігання у формі супозиторіїв та може мати потенціал до використання в медичній практиці в даній лікарській формі для боротьби з інфекціями викликаними *Pseudomonas aeruginosa*.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Diggle S.P. Microbe Profile: Pseudomonas aeruginosa: opportunistic pathogen and lab rat / S.P. Diggle, M. Whiteley // Microbiology (Reading). – 2020. – Vol.166(1). P. 30-33.
2. Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis. [Електронний ресурс] // Geneva: World Health Organization. – 2017.
3. Green nail syndrome treated with the application of tobramycin eye drop / Y. Bae [et al.] // Ann Dermatol. – 2014. – Vol.26(4). – P. 514-516.
4. Chloronychia: green nail syndrome caused by Pseudomonas aeruginosa in elderly persons / A. Chiriac [et al.] // Clin Interv Aging. – 2015. – Vol. 10. – P. 265-267.
5. Gram-negative bacterial toe web infection - a systematic review / T. Weidner [et al.] // J Eur Acad Dermatol Venereol. – 2018. – Vol. 32(1). – P. 39-47.
6. Pseudomonas toe web infection and autosensitisation dermatitis: Diagnostic and therapeutic challenge / J. W. Park [et al.] // Int Wound J. – 2020. – Vol. 17(5). – P. 1543-1544.
7. Tyler L. Coye. Prevalence of Pseudomonas aeruginosa in diabetic foot infections in the United States: A systematic review and meta-analysis / L. C. Tyler, F. Courtney, P. Stasko // Foot & Ankle Surgery: Techniques. – 2022.
8. The independent contribution of Pseudomonas aeruginosa infection to long-term clinical outcomes in bronchiectasis / D. Araújo [et al.] // European Respiratory Journal/ – 2018. – Vol. 51.
9. Mendes O.R. The challenge of pulmonary Pseudomonas aeruginosa infection: How to bridge research and clinical pathology / Viral, Parasitic, Bacterial, and Fungal Infections, Academic Press. – 2023. – P. 591-608.

10. Faure E. *Pseudomonas aeruginosa* in Chronic Lung Infections: How to Adapt Within the Host? / E. Faure, K. Kwong, D. Nguyen // *Front Immunol.* – 2018. – Vol. 9:2416.
11. Markou P. Pathogenesis of intestinal *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cancer / P. Markou, Y. Apidianakis // *Front Cell Infect Microbiol.* – 2014. – Vol. 3. – P. 115.
12. *Pseudomonas aeruginosa*-associated Diarrheal Diseases in Children. / C. H. Chuang [et al.] // *The Pediatric Infectious Disease Journal.* – 2017. – Vol. 36. – P. 1119-1123.
13. Ryan T. H. *Pseudomonas aeruginosa*: An Uncommon Cause of Antibiotic-Associated Diarrhea in an Immunocompetent Ambulatory Adult / Ryan T. Hoff, Ami Patel, Alan Shapiro // *Case Reports in Gastrointestinal Medicine* – 2020.
14. Newman J. N. Invasion and diversity in *Pseudomonas aeruginosa* urinary tract infections / J. N. Newman, R.V. Floyd, J.L. Fothergill // *J Med Microbiol.* – 2022. – Vol. 71(3).
15. Catheter-associated urinary tract infection by *Pseudomonas aeruginosa* progresses through acute and chronic phases of infection / S. A. Mekonnen [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2022. – Vol. 119(50).
16. Characterization of the Entner-Doudoroff Pathway in *Pseudomonas aeruginosa* Catheter-associated Urinary Tract Infections / N.E. Hussein [et al.] // *J Bacteriol.* – 2023.
17. Monomicrobial Necrotizing Fasciitis and Sepsis Caused by *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescens*: a Series of Ten Cases / J. L. Chen [et al.] // *Jpn J Infect Dis.* – 2022. – Vol. 75(6). – P. 554-559.
18. Pathogenesis of septic shock in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia / K. Kurahashi [et al.] // *J Clin Invest.* – 1999. – Vol. 104(6) – 743-750.

19. Walczak A. A contemporary case series of *Pseudomonas aeruginosa* infective endocarditis / A. Walczak, K. McCarthy, D. L. Paterson // *Medicine (Baltimore)*. – 2023. – Vol. 102(13).
20. Combination of phage therapy and cefiderocol to successfully treat *Pseudomonas aeruginosa* cranial osteomyelitis / P. J. Simner [et al.] // *JAC Antimicrob Resist.* – 2022. – Vol. 4(3).
21. Osteomyelitis pubis caused by *Pseudomonas aeruginosa* secondary to surgical site infections subsequent to vulvar cancer surgeries: A case report / M. Omi [et al.] // *Gynecol Oncol Rep.* – 2023. Vol. 50.
22. CDC [Електронний ресурс]: англійська версія / Antibiotic Resistance Threats in the United Statesю – 2019. – Режим доступу: <http://dx.doi.org/10.15620/cdc:82532>
23. Therapeutic Strategies for Emerging Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* / A. J. Kunz Coyne [et al.] // *Infect Dis Ther.* – 2022. – Vol. 11(2). – P. 661-682.
24. Thi M. T. T. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms / M. T. T. Thi, D. Wibowo, B. H. A. Rehm // *Int J Mol Sci.* – 2020. – Vol. 21(22).
25. Epidemiology, Treatment, and Prevention of Nosocomial Bacterial Pneumonia / S. S. Jean [et al.] // *J Clin Med.* – 2020. - Vol. 9(1). – P. 275.
26. *Pseudomonas aeruginosa* nosocomial meningitis following spinal anesthesia - still a significant treatment dilemma / E. Kolovani [et al.] // *Surg Neurol Int.* – 2022. – Vol. 13. – P. 400.
27. Prevalence and Etiology of Community-acquired Pneumonia in Immunocompromised Patients / M. F. Di Pasquale [et al.] // *Clin Infect Dis.* – 2019. – Vol. 68(9). – P.1482-1493.
28. Considerations for the Use of Phage Therapy in Clinical Practice / G. A. Suh [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2022. – Vol. 66(3). – P. e0207121.

29. The Safety and Toxicity of Phage Therapy: A Review of Animal and Clinical Studies / D. Liu [et al.] // *Viruses*. – 2021. – Vol. 13(7). – P. 1268.
30. Nale J. Y. Preclinical data and safety assessment of phage therapy in humans / J. Y. Nale, M. R. Clokie // *Curr Opin Biotechnol*. – 2021. – Vol. 68. – P. 310-317.
31. The Role of Bacteriophages in the Gut Microbiota: Implications for Human Health / S. C. Emencheta [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2023. – Vol. 15(10). – P. 2416.
32. Bacteriophage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: a review / Z. Chegini [et al.] // *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. – 2020. – Vol. 19(1). – P. 45.
33. The Efficacy of Phage Therapy in a Murine Model of *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia and Sepsis / X. Yang [et al.] // *Front. Microbiol*. – 2021. Vol. 12.
34. Phage therapy as a revolutionary treatment for multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections: A narrative review / N. Aneela [et al.] // *The Microbe*. – 2024. – Vol. 2.
35. The History and Applications of Phage Therapy in *Pseudomonas aeruginosa* / C. Silva [et al.] // *Microbiology Research*. – 2022. – Vol. 13(1). – P. 14-37.
36. Bacteriophage as a potential therapy to control antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection through topical application onto a full-thickness wound in a rat model / N. Rezk [et al.] // *J Genet Eng Biotechnol*. – 2022. – Vol. 20(1). – P. 133.
37. NCBI [Електронний ресурс]: англійська версія / Режим доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=287>
38. Kerr K. G. *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary / K. G. Kerr, A. M. Snelling // *J Hosp Infect*. – 2009. Vol. 73(4). – P. 338-344.

39. NCBI (NIH) [Електронний ресурс]: англійська версія / Режим доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557831/#>
40. Практична мікробіологія : навчальний посібник / С. І. Климнюк, І. О. Ситник, В. П. Ширококов ; за заг. ред.: В. П. Ширококова, С. І. Климнюка. – Вінниця : Нова Книга, 2018. – 576 с.
41. Cox C.D. Use of 2-aminoacetophenone production in identification of *Pseudomonas aeruginosa* / C.D. Cox, J. Parker / *J Clin Microbiol.* – 1979. Vol. 9(4). – P. 479-484.
42. Gilardi G. L. Characterization of *Pseudomonas* species isolated from clinical specimens / G. L. Gilardi // *Appl Microbiol.* – 1971. – Vol. 21(3). – P. 414-419.
43. Marwa A. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* FROM BABYLON PROVINCE / A. Marwa, E. Mohammed / *Biochem. Cell. Arch.* – 2019. – Vol. 19. – P. 203-209.
44. Midhat M.S. Isolation and identification of pathogenic species of the genus *Pseudomonas* and study of antibiotic resistance / M.S. Midhat, S.M. Abed // *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences* – 2023. – Vol. 23(01). – P. 087-098.
45. Rasko D. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease / D. Rasko, V. Sperandio // *Nat Rev Drug Discov.* – 2010. – Vol. 9. – P. 117–128.
46. Burrows L. L. *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility: type IV pili in action / L. L. Burrows // *Annu Rev Microbiol.* – 2012 – Vol. 66. – P. 493-520.
47. Type IV pili mechanochemically regulate virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*/ A. Persat [et al.] // *PNAS.* – 2015. – Vol. 112(24). – P. 7563-7568.

48. Type IV pilus assembly in *Pseudomonas aeruginosa* over a broad range of cyclic di-GMP concentrations / R. Jain [et al.] // *J Bacteriol.* – 2012. Vol. 194(16). – P. 4285-4294.
49. Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection / M. Feldman [et al.] // *Infect Immun.* – 1998. – Vol. 66(1). – P. 43-51.
50. *Pseudomonas* Flagella: Generalities and Specificities / M. Bouteiller [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2021. – Vol. 22(7). – P. 3337.
51. Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: A wealth of pathogenic weapons / S. Bleves [et al.] // *Int J Med Microbiol.* – 2010. – Vol. 300(8). – P. 534-43.
52. Filloux A. Protein Secretion Systems in *Pseudomonas aeruginosa*: An Essay on Diversity, Evolution, and Function / A. Filloux // *Front Microbiol.* – 2011. Vol. 2. – P. 155.
53. Bonneau A. Iron acquisition in *Pseudomonas aeruginosa* by the siderophore pyoverdine: an intricate interacting network including periplasmic and membrane proteins / A. Bonneau, B. Roche, I. J. Schalk // *Sci Rep.* – 2020. Vol. 10(1). – P. 120.
54. Ghssein G. A Review of *Pseudomonas aeruginosa* Metallophores: Pyoverdine, Pyochelin and Pseudopaline / G. Ghssein, Z. Ezzeddine // *Biology (Basel).* – 2022. – Vol. 11(12). – P. 1711.
55. The *Pseudomonas aeruginosa* product pyochelin interferes with *Trypanosoma cruzi* infection and multiplication in vitro / G. Sass [et al.] // *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* – 2020. – Vol. 114 (7). – P. 492–498.
56. De novo synthesis, structural assignment and biological evaluation of pseudopaline, a metallophore produced by *Pseudomonas aeruginosa* / J. Zhang [et al.] // *Chem Sci.* – 2019. – Vol. 10(27). – P. 6635-6641.
57. Molecular Analysis of the Contribution of Alkaline Protease A and Elastase B to the Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* Bloodstream

- Infections / M. Mateu-Borrás [et al.] // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* – 2020. – Vol. 11. – P. 816356.
58. *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease blocks complement activation via the classical and lectin pathways / A. J. Laarman [et al.] // *J Immunol.* – 2012. – Vol. 188(1). – P. 386-393.
59. Wretling B., Pavlovskis O. R. *Pseudomonas aeruginosa* elastase and its role in *pseudomonas* infections / B. Wretling, O. R. Pavlovskis // *Rev Infect Dis.* – 1983 – Vol. 5. – P. 998-1004.
60. *Pseudomonas aeruginosa* elastase cleaves a C-terminal peptide from human thrombin that inhibits host inflammatory responses / van der Plas [et al.] // *Nat Commun.* – 2016. – Vol. 7. – P. 11567.
61. *Pseudomonas aeruginosa* Elastase Contributes to the Establishment of Chronic Lung Colonization and Modulates the Immune Response in a Murine Model / C. Cigana [et al.] // *Front. Microbiol.* – 2021. – Vol. 11. – P. 620819.
62. Protease IV, a unique extracellular protease and virulence factor from *Pseudomonas aeruginosa* / L. S. Engel [et al.] // *J Biol Chem.* – 1998. – Vol. 273(27). – P. 16792-16797.
63. *Pseudomonas aeruginosa* Keratitis: Protease IV and PASP as Corneal Virulence Mediators / R. O'Callaghan [et al.] // *Microorganisms.* – 2019. – Vol. 7(9). – P. 281.
64. Ghafoor A. Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture / A. Ghafoor, I. D. Hay, B. H. Rehm // *Appl Environ Microbiol.* – 2011. – Vol. 77(15). – P. 5238-5246.
65. Contribution of *Pseudomonas aeruginosa* Exopolysaccharides Pel and Psl to Wound Infections / D. Fleming [et al.] // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* – 2022. – Vol. 12. – P. 835754.
66. *Pseudomonas aeruginosa* Toxin ExoU as a Therapeutic Target in the Treatment of Bacterial Infections / D. M. Foulkes [et al.] // *Microorganisms.* – 2019. – Vol. 7(12). – P. 707.

67. Presence of *exoY*, *exoS*, *exoU* and *exoT* genes, antibiotic resistance and biofilm production among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Northwest Iran. / S. Azimi [et al.] // *GMS Hyg Infect Control*. – 2016. – Vol 11. – Doc. 04.
68. Presence of T3SS (*exoS*, *exoT*, *exoU* and *exoY*), susceptibility pattern and MIC of MDR-*Pseudomonas aeruginosa* from burn wounds / R. Ullah [et al.] // *J Infect Dev Ctries*. – 2023. – Vol. 17(8). P. 1130-1137.
69. Huber P. ExlA: A New Contributor to *Pseudomonas aeruginosa* Virulence / P. Huber // *Front. Cell. Infect. Microbiol*. – 2022. – Vol. 12. – P. 929150.
70. Exolysin (ExlA) from *Pseudomonas aeruginosa* Punctures Holes into Target Membranes Using a Molten Globule Domain / Q. Bertrand [et al.] // *Journal of Molecular Biology* – 2020. – Vol. 432(16). – P. 4466-4480.
71. Michalska M. *Pseudomonas* Exotoxin A: optimized by evolution for effective killing / M. Michalska, P. Wolf // *Front Microbiol*. – 2015. – Vol. 6. – P. 963.
72. Iwański B. *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A induces apoptosis in *Galleria mellonella* hemocytes // B. Iwański, M. Mizerska-Kowalska, M. Andrejko // *Journal of Invertebrate Pathology* – 2023. – Vol. 197. – P. 107884.
73. Role of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in inflammatory mediator release from human inflammatory effector cells (platelets, granulocytes, and monocytes) / B. König [et al.] // *Infect Immun*. – 1996. – Vol. 64(8). – P. 3252-3258.
74. Elleboudy N. S. Phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus cereus*; characterization of catalytic activity / N. S. Elleboudy, M. M. Aboulwafa, N. A. Hassouna // *Asian Pac J Trop Med*. – 2014. – Vol. 7(11). – P. 860-866.
75. König B. Role of hemolytic and nonhemolytic phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa* for inflammatory mediator release from human

- granulocytes / B. König, M. L. Vasil, W. König // *Int Arch Allergy Immunol.* – 1997. – Vol. 112(2). – P. 115-124.
76. *Pseudomonas aeruginosa* hemolytic phospholipase C suppresses neutrophil respiratory burst activity / L. S. Terada [et al.] // *Infect Immun.* – 1999. – Vol. 67(5). – P. 2371-2376.
77. *Pseudomonas aeruginosa* Lipoxygenase LoxA Contributes to Lung Infection by Altering the Host Immune Lipid Signaling / E. Morello [et al.] // *Front Microbiol.* – 2019. – Vol. 10. – P. 1826.
78. The crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* lipoxygenase Ala420Gly mutant explains the improved oxygen affinity and the altered reaction specificity / J. Kalms [et al.] // *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* – 2017. – Vol. 1862(5). – P. 463-473.
79. Specific oxygenation of plasma membrane phospholipids by *Pseudomonas aeruginosa* lipoxygenase induces structural and functional alterations in mammalian cells / M. Aldrovandi [et al.] // *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* – 2018. – Vol. 1863(2). – P. 152-164.
80. Castric P. A. Hydrogen cyanide, a secondary metabolite of *Pseudomonas aeruginosa* / P. A. Castric // *Can J Microbiol.* – 1975. – Vol. 21(5). – P. 613-18.
81. Lenney W. *Pseudomonas aeruginosa* and cyanide production / W. Lenney, F. J. Gilchrist // *European Respiratory Journal.* – 2011. – Vol. 37 (3). – P. 482-483.
82. The biology and future prospects of antivirulence therapies / L. Cegelski [et al.] // *Nat Rev Microbiol.* – 2008. – Vol. 6(1). – P. 17-27.
83. *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing / S. W. Miranda [et al.] // *Adv Exp Med Biol.* – 2022. – Vol. 1386. – P. 95-115.
84. Pathogenesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm: A Review / F. F. Tuon [et al.] // *Pathogens* – 2022. – Vol. 11(3). – P. 300.

85. Spagnolo A. M. *Pseudomonas aeruginosa* in the healthcare facility setting / A. M. Spagnolo, M. Sartini, M. L. Cristina / *Reviews in Medical Microbiology* – 2021. – Vol. 32(3). – P. 169-175.
86. Koenig S. M. Ventilator-associated pneumonia: diagnosis, treatment, and prevention / S. M. Koenig, J. D. Truitt // *Clin Microbiol Rev.* – 2006. – Vol. 19(4). – P. 637-657.
87. Cole S. J. Catheter-associated urinary tract infection by *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by exopolysaccharide-independent biofilms / S. J. Cole [et al.] // *Infect Immun.* – 2014. – Vol. 82(5). – P. 2048-2058.
88. Prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* in post-operative wound infection in a referral hospital in Haryana, India / K. P. Ranjan [et al.] // *J Lab Physicians* – 2010. – Vol. 2(2). – P. 74-77.
89. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in a dialysis unit. 1. Recognition of cases, epidemiologic studies and attempts at control / S. J. Uman [et al.] // *Am J Med.* – 1977. – Vol. 62(5). – P. 667-671.
90. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: resistance to antibiotics, risk factors, and patient mortality / A. Vitkauskienė [et al.] // *Medicina (Kaunas)* – 2010. – Vol. 46(7). – P. 490-495.
91. Risk factors and clinical significance of bacteremia caused by *Pseudomonas aeruginosa* resistant only to carbapenems / C. H. Lee [et al.] // *J Microbiol Immunol Infect.* – 2017/ - Vol. 50(5). – P. 677-683.
92. *Pseudomonas* skin infection: clinical features, epidemiology, and management / D. C. Wu [et al.] // *Am J Clin Dermatol.* – 2011. – Vol. 12(3). – P. 157-169.
93. Spornovasilis N. Skin manifestations of *Pseudomonas aeruginosa* infections / N. Spornovasilis, M. Psychogiou, G. Poulakou // *Curr Opin Infect Dis.* – 2021. – Vol. 34(2). – P. 72-79.
94. Jacob J. S. Hot Tub-Associated *Pseudomonas* Folliculitis: A Case Report and Review of Host Risk Factors / J. S. Jacob, J. Tschen // *Cureus.* – 2020. – Vol. 12(9). – P. e10623.

95. Errichetti E. Dermoscopy: a useful tool for assisting the diagnosis of Pseudomonas folliculitis / E. Errichetti, G. Stinco // *An Bras Dermatol.* - 2016. – Vol. 91(6). – P. 835-836.
96. Multiple bacterial species reside in chronic wounds: a longitudinal study / K. Gjødsbøl [et al.] // *Int Wound J.* – 2006. – Vol. 3(3). – P. 225-231.
97. Raizman R. Rapid Diagnosis of Pseudomonas aeruginosa in Wounds with Point-Of-Care Fluorescence / R. Raizman, W. Little, A. C. Smith // *Imaging. Diagnostics (Basel)* – 2021. – Vol. 11(2). – P. 280.
98. Pseudomonal Diabetic Foot Infections: Vive la Différence? / I. Uçkay [et al.] // *Mayo Clin Proc Innov Qual Outcomes* – 2022. – Vol. 6(3). P. 250-256.
99. Sivanmaliappan T. S. Antimicrobial Susceptibility Patterns of Pseudomonas aeruginosa from Diabetes Patients with Foot Ulcers / T. S. Sivanmaliappan, M. Sevanan // *Int J Microbiol.* – 2011. – Vol. 2011. – P. 605195.
100. Bacterial etiology of diabetic foot infections in South India / E. M. Shankar Eur. [et al.] // *J. Intern. Med.* – 2005. – Vol. 16. – P. 567–570.
101. Yakout M. A. Diabetic Foot Ulcer Infections and Pseudomonas aeruginosa Biofilm Production During the COVID-19 Pandemic / M. A. Yakout, I. A. Abdelwahab // *Journal of Pure and Applied Microbiology* – 2022. – Vol. 16(1). – P. 138-146.
102. Distribution and drug resistance of pathogens in burn patients in China from 2006 to 2019 / H. Chen [et al.] // *World J Clin Cases.* – 2021. – Vol. 9(10). – P. 2228-2237.
103. Epidemiology of burn wound bacterial infections at a Meknes hospital, Morocco / N. El Hamzaoui [et al.] // *New Microbes New Infect.* – 2020. – Vol. 38. – P. 100764.
104. Three Year Study of Infection Profile and Antimicrobial Resistance Pattern from Burn Patients in Southwest Iran / Emami A. [et al.] // *Infect Drug Resist.* – 2020. – Vol. 13. – P. 1499-1506.

105. Estahbanati H. K. Frequency of *Pseudomonas aeruginosa* serotypes in burn wound infections and their resistance to antibiotics / H. K. Estahbanati, P. P. Kashani, F. Ghanaatpisheh // *Burns* – 2002. – Vol. 28(4). – P. 340-348.
106. Recurrent *Pseudomonas aeruginosa* Infection in Chronic Lung Diseases: Relapse or Reinfection? / H. K. Yum [et al.] // *Tuberc Respir Dis (Seoul)*. – 2014. – Vol. 77(4). – P. 172-177.
107. Healthcare-associated pneumonia in acute care hospitals in European Union/European Economic Area countries: an analysis of data from a point prevalence survey, 2011 to 2012 / J. Walter [et al.] // *Euro Surveill.* – 2018. – Vol. 23(32). – P. 1700843.
108. Hauser A. R. *Pseudomonas aeruginosa* virulence and antimicrobial resistance: two sides of the same coin? / A. R. Hauser // *Crit Care Med.* – 2014. – Vol. 42(1). – P. 201-202.
109. Ramírez-Estrada S. *Pseudomonas aeruginosa* ventilator-associated pneumonia management / S. Ramírez-Estrada, B. Borgatta, J. Rello // *Infect Drug Resist.* – 2016. – Vol. 9. – P. 7-18.
110. *Pseudomonas aeruginosa* Ventilator-Associated Pneumonia Induces Lung Injury through TNF- α /c-Jun NH2-Terminal Kinase Pathways / Y. W. Yang [et al.] // *PLoS One.* – 2017. – Vol. 12(1). – P. e0169267.
111. *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria [Pseudomonas aeruginosa: Pathogenicity and antimicrobial resistance in urinary tract infection] / V. M. Paz-Zarza [et al.] // *Rev Chilena Infectol.* – 2019. – Vol. 36(2). – P. 180-189.
112. Risk factors and prognosis of complicated urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* in hospitalized patients: a retrospective multicenter cohort study / A. Gomila [et al.] // *Infect Drug Resist.* – 2018. – Vol. 11. – P. 2571-2581.

113. Contribution of exotoxin A of *Pseudomonas aeruginosa* in acute and chronic experimental renal infection / S. Sharma [et al.] // *Jpn J Infect Dis.* – 2004. – Vol. 57(3). – P. 119-20.
114. Bacterial prostatitis / F. M. Wagenlehner [et al.] // *World J Urol.* – 2013. – Vol. 31(4). – P. 711-716.
115. Coker T. J. Acute Bacterial Prostatitis: Diagnosis and Management / T. J. Coker, D. M. Dierfeldt // *Am Fam Physician.* – 2016. – Vol. 93(2). – P. 114-120.
116. *Pseudomonas aeruginosa* acute prostatitis and urosepsis after sexual relations in a hot tub / L. M. Dulabon [et al.] // *J Clin Microbiol.* – 2009. – Vol. 47(5). – P. 1607-1608.
117. Neonatal epididymo-orchitis caused by *Pseudomonas aeruginosa*: a case report / M. Kabiri [et al.] // *Cases J.* – 2010. – Vol. 3. – P. 44.
118. Acute epididymo-orchitis with abscess formation due to *Pseudomonas aeruginosa*: report of 3 cases / B. Kashiwagi [et al.] // *Hinyokika Kiyo* – 2000. – Vol. 46(12). – P. 915-918.
119. A case of acute epididymo-orchitis due to *Pseudomonas aeruginosa* presenting as ARDS in an immunocompetent host / S. Singhal [et al.] // *Asian Pac J Trop Biomed.* – 2011. – Vol. 1(1). – P. 83-84.
120. Common causes of vaginal infections and antibiotic susceptibility of aerobic bacterial isolates in women of reproductive age attending at Felegehiwot Referral Hospital, Ethiopia: a cross sectional study / W. Mulu [et al.] // *BMC Womens Health.* – 2015. – Vol. 15. – P. 42.
121. *Pseudomonas aeruginosa*-infected IUD associated with pelvic inflammatory disease. A case report / J. A. King [et al.] // *J Reprod Med.* – 2002. – Vol. 47(12). – P. 1035-1037.
122. Postmenopausal tubo-ovarian abscess due to *Pseudomonas aeruginosa* in a renal transplant patient: a case report and review of the literature / J. El Khoury [et al.] // *Transplantation.* – 2001. – Vol. 72(7). – P. 1241-1244.

123. McLeod N. Pyometra due to *Pseudomonas aeruginosa* / N. McLeod, A. Lastinger // IDCases. – 2019. – Vol. 17. – P. e00554.
124. Relapsing Henoch-Schönlein purpura associated with *Pseudomonas aeruginosa* pyelonephritis / C. A. Egan [et al.] // J Am Acad Dermatol. – 2000. – Vol. 42. – P. 381-383.
125. Kawasaki's syndrome and urinary tract infection by *Pseudomonas aeruginosa*, coincidence or causality? / Martinez-Pajares [et al.] // Acta pediátrica Española – 2012. – Vol. 70. – P. 346.
126. Involvement of *Pseudomonas aeruginosa* in the occurrence of community and hospital acquired diarrhea, and its virulence diversity among the stool and the environmental samples / P. Fakhkhari [et al.] // Int J Environ Health Res. – 2022. – Vol. 32(1). – P. 61-71.
127. Shanghai fever: a distinct *Pseudomonas aeruginosa* enteric disease / C. H. Chuang [et al.] // Gut. – 2014. – Vol. 63(5). – P. 736-743.
128. Shanghai Fever: Not Only an Asian Disease / C. Colomba [et al.] // Pathogens. – 2022. – Vol. 11(11). – P. 1306.
129. Shanghai fever, a fatal enteric illness, in an adult patient with neutropenia caused by treatment-related myelodysplastic syndrome: a case report / T. Horino [et al.] // Surg Case Rep. – 2022. – Vol. 8(1). – P. 69.
130. Lister P. D. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms / P. D. Lister, D. J. Wolter, N. D. Hanson // Clin Microbiol Rev. – 2009. – Vol. 22(4). – P. 582-610.
131. Botelho J. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* – Mechanisms, epidemiology and evolution / J. Botelho, F. Grosso, L. Peixe // Drug Resistance Updates – 2019. – Vol. 44. – P. 100640.
132. WHO [Електронний ресурс]: англійська версія / Режим доступу: [https://www.who.int/india/health-topics/antimicrobial-resistance#:~:text=Antimicrobial%20resistance%20\(AMR\)%2C%20also,the%20infections%20they%20cause%20ineffective.](https://www.who.int/india/health-topics/antimicrobial-resistance#:~:text=Antimicrobial%20resistance%20(AMR)%2C%20also,the%20infections%20they%20cause%20ineffective.)

133. Basak S. Multidrug Resistant and Extensively Drug Resistant Bacteria: A Study / S. Basak, P. Singh, M. Rajurkar // J Pathog. – 2016. – Vol. 2016. – P. 4065603.
134. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance / A. P. Magiorakos [et al.] // Clin Microbiol Infect. – 2012. – Vol. 18(3). – P. 268-281.
135. European Centre for Disease Prevention and Control [Електронний ресурс]: англійська версія / Режим доступу: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-resistance-europe-2021>
136. Surveillance Atlas of Infectious Diseases [Електронний ресурс]: англійська версія / Режим доступу: <https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx>
137. Epidemiology of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the Middle East and North Africa Region / M. Al-Orphaly [et al.] // mSphere. – 2021. – Vol. 6(3). – P. e00202-21.
138. Салманов А. Г. Антибіотикорезистентність нозокоміальних штамів *Pseudomonas aeruginosa* в хірургічних стаціонарах України: результати багатоцентрового дослідження (2011—2015 рр.) / А. Г. Салманов, О. М. Вернер // Міжнародний журнал антибіотики та пробіотики. – 2017. – № 1 (1). – С. 49-63.
139. Інфекції, спричинені ізолятами *pseudomonas aeruginosa* у хворих відділення гнійно-септичної хірургії / О. М. Беседін [та ін.] // Сучасні медичні технології. – № 2 (ч. 1). – С. 56-60.
140. The impact of war on the environment and health: implications for readiness, response, and recovery in Ukraine / F. Racioppi [et al.] // Lancet. – 2022. – Vol. 400(10356). – P. 871-873.

141. Petrosillo N. Ukraine war and antimicrobial resistance / N. Petrosillo, E. Petersen, S. Antoniak // *Lancet Infect Dis.* – 2023. – Vol. 23(6). – P. 653-654.
142. First detection in Spain of NDM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* in two patients transferred from Ukraine to a university hospital / M. Hernández-García [et al.] // *J Glob Antimicrob Resist.* – 2023. – Vol. 36. – P. 105-111.
143. Occurrence, resistance patterns, and management of carbapenemase-producing bacteria in war-wounded refugees from Ukraine / F. K. Berger [et al.] // *Int J Infect Dis.* – 2023. – Vol. 132. – P. 89-92.
144. Multidrug-resistant organisms in patients from Ukraine in the Netherlands, March to August 2022 / R. D. Zwitterink [et al.] // *Euro Surveill.* – 2022. – Vol. 27(50). – P. 2200896.
145. Multidrug-resistant isolates from Ukrainian patients in a German health facility: a genomic surveillance study focusing on antimicrobial resistance and bacterial relatedness / Stein C. [et al.] // *Infection.* – 2023. – Vol. 51(6). – P. 1731-1738.
146. Six Extensively Drug-Resistant Bacteria in an Injured Soldier, Ukraine / Mc Gann P. T. [et al.] // *Emerg Infect Dis.* – 2023. – Vol. 29(8). – P. 1692-1695.
147. Phage Therapy in the Era of Multidrug Resistance in Bacteria: A Systematic Review / C. Aranaga [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2022. – Vol. 23(9). – P. 4577.
148. Biodiversity of bacteriophages: morphological and biological properties of a large group of phages isolated from urban sewage / A. Jurczak-Kurek [et al.] // *Sci. Rep.* – 2016. – Vol. 6. – P. 34338.
149. Phages in nature / M. R. Clokie [et al.] // *Bacteriophage.* – 2011. – Vol. 1(1). – P. 31-45.
150. Yap M. L. Structure and function of bacteriophage T4 / M. L. Yap M. G. Rossmann // *Future Microbiol.* – 2014. – Vol. 9(12). – P. 1319-1327.

151. Phage Therapy: A Renewed Approach to Combat Antibiotic-Resistant Bacteria / K. E. Kortright [et al.] // *Cell Host Microbe*. – 2019. – Vol. 25(2). – P. 219-232.
152. Phage therapy: From biological mechanisms to future directions / S. A. Strathdee [et al.] // *Cell*. – 2023. – Vol. 186(1). – P. 17-31.
153. Gordillo Altamirano F. L. Phage Therapy in the Postantibiotic Era / F. L. Gordillo Altamirano, J. J. Barr // *Clin Microbiol Rev*. – 2019. – Vol. 32(2). – P. e00066-18.
154. Semler D. D. The promise of bacteriophage therapy for Burkholderia cepacia complex respiratory infections / D. D. Semler, K. H. Lynch, J. J. Dennis // *Front Cell Infect Microbiol*. – 2012. – Vol. 1. – P. 27.
155. Melander R. J. Narrow-Spectrum Antibacterial Agents / R. J. Melander, D. V. Zurawski, C. Melander // *Medchemcomm*. – 2018. - Vol. 9(1)/ - P. 12-21.
156. Górski, A. Phage Therapy: A Practical Approach / A. Górski, R. Międzybrodzki, J. Borysowski. – Springer, 2019. – 385 p.
157. Topical application of bacteriophages for treatment of wound infections / R. Y. K. Chang [et al.] // *Transl Res*. – 2020. – Vol. 220. – P. 153-166.
158. Topical phage therapy in a mouse model of Cutibacterium acnes-induced acne-like lesion / A. Rimon [et al.] // *Nat Commun*. – 2023. – Vol. 14. – P. 1005.
159. Long-Term Safety of Topical Bacteriophage Application to the Frontal Sinus Region / A. J. Drilling [et al.] // *Front. Cell. Infect. Microbiol*. – 2017. – Vol. 7. – P. 49.
160. Durr H. A. Advancements in bacteriophage therapies and delivery for bacterial infection / H. A. Durr, N. D. Leipzig // *Mater Adv*. – 2023. – Vol. 4(5). – P. 1249-1257.
161. Bacteriophage therapy for human musculoskeletal and skin/soft tissue infections / W. J. Metsemakers [et al.] // *Clin Microbiol Infect*. – 2023. – Vol. 29(6). – P. 695-701.

162. Evaluation of the impact of repeated intravenous phage doses on mammalian host-phage interactions / X. Tan [et al.] // *J Virol.* – 2024. – Vol. 98(1). – P. e0135923.
163. Oral Phage Therapy of Acute Bacterial Diarrhea With Two Coliphage Preparations: A Randomized Trial in Children From Bangladesh / S. A. Sarker [et al.] // *EBioMedicine.* – 2016. – Vol. 4. – Vol. 124-137.
164. Oral T4-like phage cocktail application to healthy adult volunteers from Bangladesh / S. A. Sarker [et al.] // *Virology.* – 2012. – Vol. 434(2). – P. 222-232.
165. Eradication of *Enterococcus faecalis* by phage therapy in chronic bacterial prostatitis--case report / S. Letkiewicz [et al.] // *Folia Microbiol (Praha).* – 2009. – Vol. 54(5). – P. 457-461.
166. The applications of animal models in phage therapy: An update / F. Mehmood Khan [et al.] // *Hum Vaccin Immunother.* – 2023. – Vol. 19(1). – P. 2175519.
167. Repetitive Exposure to Bacteriophage Cocktails against *Pseudomonas aeruginosa* or *Escherichia coli* Provokes Marginal Humoral Immunity in Naïve Mice / C. Weissfuss [et al.] // *Viruses.* – 2023. – Vol. 15(2). – P. 387.
168. Potential Use of Adjuvant Bacteriophage Therapy With Debridement, Antibiotics, and Implant Retention Surgery to Treat Chronic Prosthetic Joint Infections / J. B. Doub [et al.] // *Open Forum Infect Dis.* – 2021. – Vol. 8(6). – P. ofab277.
169. Heterogeneous *Klebsiella pneumoniae* Co-infections Complicate Personalized Bacteriophage Therapy / J. Qin [et al.] // *Front Cell Infect Microbiol.* – 2021. – Vol. 10. – P. 608402.
170. Phage Therapy: a Step Forward in the Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections / D. P. Pires [et al.] // *J Virol.* – 2015. 89(15). – P. 7449-7456.

171. International Committee on Taxonomy of Viruses: ICTV [Електронний ресурс]: англійська версія / Режим доступу: <https://ictv.global/taxonomy>
172. Phage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* infections in a cystic fibrosis zebrafish model / Cafora, M. [et al.] // *Sci Rep.* – 2019. – Vol. 9. – P. 1527.
173. Jeon J. Two Novel Bacteriophages Improve Survival in *Galleria mellonella* Infection and Mouse Acute Pneumonia Models Infected with Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* / J. Jeon, D. Yong // *Appl Environ Microbiol.* – 2019. – Vol. 85(9). – P. e02900-18.
174. Bacteriophages ϕ MR299-2 and ϕ NH-4 can eliminate *Pseudomonas aeruginosa* in the murine lung and on cystic fibrosis lung airway cells / D. Alemayehu [et al.] // *mBio.* – 2012. – Vol. 3(2). – P. e00029-12.
175. Phage therapy is highly effective against chronic lung infections with *Pseudomonas aeruginosa* / E. M. Waters [et al.] // *Thorax.* – 2017. – Vol. 72(7). – P. 666-667.
176. Design of a Broad-Range Bacteriophage Cocktail That Reduces *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms and Treats Acute Infections in Two Animal Models / F. Forti [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2018. – Vol. 62(6). – P. e02573-17.
177. Bacteriophage Therapy of Ventilator-associated Pneumonia and Empyema Caused by *Pseudomonas aeruginosa* / S. Maddocks [et al.] // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2019. – Vol. 200(9). – P. 1179-1181.
178. Aslam S. Bacteriophage therapy as a treatment option for transplant infections / S. Aslam // *Curr Opin Infect Dis.* – 2020. – Vol. 33(4). – P. 298-303.
179. Bacteriophage Therapy of Chronic Nonhealing Wound: Clinical Study / P. Gupta [et al.] // *Int J Low Extrem Wounds.* – 2019. – Vol. 18(2). – P. 171-175.

180. Choice of Ultrafilter Affects Recovery Rate of Bacteriophages / F. Larsen [et al.] // *Viruses*. – 2023. – Vol. 15(10). – P. 2051.
181. Kleiner M. Evaluation of methods to purify virus-like particles for metagenomic sequencing of intestinal viromes / M. Kleiner, L. V. Hooper, B. A. Duerkop // *BMC Genom.* – 2015. – Vol. 16. – P. 7.
182. Amplification and Purification of T4-Like Escherichia coli Phages for Phage Therapy: From Laboratory to Pilot Scale / G. Bourdin [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2014. – Vol. 80. – P. 1469–1476.
183. Standard Bacteriophage Purification Procedures Cause Loss in Numbers and Activity / A. Carroll-Portillo [et al.] // *Viruses*. – 2021. – Vol. 13. – P. 328.
184. Bradley D. E. Ultrastructure of bacteriophage and bacteriocins / D. E. Bradley // *Bacteriol Rev.* – 1967. – Vol. 31(4). – P. 230-314.
185. Kumar A. Modern Aspects of Suppositories: A Review / A. Kumar, A. Kolay, H. Ujwal // *European Journal of Pharmaceutical Research*. – 2023. – Vol. 3. – P. 23-29.
186. Semi-Solid and Solid Dosage Forms for the Delivery of Phage Therapy to Epithelia / T. L. Brown [et al.] // *Pharmaceuticals (Basel)*. – 2018. – Vol. 11(1). – P. 26.
187. Bacteriophage formulated into a range of semisolid and solid dosage forms maintain lytic capacity against isolated cutaneous and opportunistic oral bacteria / T. L. Brown [et al.] // *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. – 2017. – Vol. 69 (3). – P. 244–253.
188. Case Report: Chronic Bacterial Prostatitis Treated With Phage Therapy After Multiple Failed Antibiotic Treatments / A. V. Johri [et al.] // *Front Pharmacol.* – 2021. – Vol. 12. – P. 692614.