

# КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

ННЦ «Інститут біології та медицини»  
Кафедра Вірусології

Завідувач кафедри Будзанівська І. Г.

Протокол No \_\_\_\_ засідання кафедри

від “ \_\_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 20\_\_ р.

## Характеристика літичних бактеріофагів *Proteus mirabilis*

Кваліфікаційна робота магістра  
Студента денної форми навчання  
за спеціальністю Біологія  
Седоченка Єгора Олександровича  
Науковий керівник від кафедри  
к.б.н., доцент  
Харіна А. В.

Робота виконана у ТОВ “Неопробіокеар-Україна” під керівництвом к. б. н.  
Корнієнко Н. О.

Оцінка захисту роботи

---

Київ – 2024 р.

## ЗМІСТ

<b>Вступ</b> .....	4
<b>Розділ 1. Основи фаготерапії</b> .....	6
<b>Розділ 2. Характеристика бактерії та захворювання</b> .....	9
2.1 Характеристика <i>Proteus mirabilis</i> .....	9
2.2 Характеристика захворювання.....	9
2.3 Імунна відповідь при ураженні <i>P. mirabilis</i> .....	10
2.4 Механізм уникнення імунної відповіді <i>P. mirabilis</i> .....	12
2.5 <i>P. mirabilis</i> як збудник аутоімунних захворювань.....	12
2.6 Фактори вірулентності <i>P. mirabilis</i> .....	13
2.7 Біоплівка.....	16
<b>Розділ 3. Лікування та профілактика</b> .....	18
3.1 Використання антимікробних препаратів.....	18
3.2 Застосування речовин рослинного походження.....	19
3.3 Апітерапія.....	20
3.4 Перепрофільовані препарати.....	21
3.5 Фаготерапія.....	22
3.6 Застосування нанотехнологій.....	24
<b>Розділ 4. Матеріали та методи</b> .....	27
4.1 Характеристика бактерій.....	27
4.2 Виділення бактеріофагів.....	28
4.3 Визначення титру бактеріофагів.....	28
4.4 Отримання чистих ліній бактеріофагів.....	29
4.5 Накопичення бактеріофагів.....	30
4.6 Вивчення діапазону хазяїв.....	30
4.7 Вивчення впливу бактеріофагів на здатність <i>P. mirabilis</i> до роїння.....	31
4.8 Електронна мікроскопія.....	31
4.9 Виділення ДНК та секвенування геному.....	32
4.10 Статистична обробка даних.....	32

<b>Розділ 5. Результати та обговорення.....</b>	<b>33</b>
5.1 Первинна характеристика виділених бактеріофагів.....	33
5.2 Морфологія бактеріофагу Рm2.....	39
5.3 Сиквенування геному бактеріофага Рm2 та його характеристика.....	40
5.4 Вивчення впливу бактеріофагів на здатність <i>P. mirabilis</i> до роїння.....	43
<b>Висновки.....</b>	<b>46</b>
<b>Список використаних джерел.....</b>	<b>47</b>

## ВСТУП

Поява резистентності до антибіотиків стала проблемою у всьому світі. Тривале і несистемне застосування антибіотиків призвело до підвищення рівня стійкості до них. Протистояння антибіотикорезистентності вимагає розробки нових підходів до лікування інфекційних захворювань. Оскільки кількість досліджень нових антибіотиків зменшується через високу вартість, розробка нових і нетрадиційних альтернатив, таких як фаготерапія, стає критичною. Перевагами цього методу є специфічність господаря, простота ізоляції та виробництва. Літичні бактеріофаги, що уражують бактерії, представляють великий інтерес у контексті лікування мультирезистентних штамів бактерій, наприклад, *Proteus mirabilis*.

*Proteus* - грамнегативна бактерія, що належить до родини *Enterobacteriaceae*. Серед всіх видів *Proteus*, *Proteus mirabilis* є найпоширенішим патогеном і зустрічається в різних природних середовищах, таких як стічні води, фекалії та шлунково-кишковий тракт людей і тварин. У людей з ослабленою імунною системою *Proteus* може викликати низку захворювань, включаючи інфекції сечовивідних шляхів, ниркові камені, бактеріємію та ендокардит [1].

Бактерія *Proteus mirabilis* викликає близько 70% урологічних інфекцій, є важливим об'єктом для вивчення в цій області. Останні дослідження вказують на значний потенціал бактеріофагів як альтернативи антибіотикам, особливо в контексті лікування резистентних штамів бактерій *P. mirabilis* [2, 3].

Тому метою нашого дослідження було виділити та охарактеризувати бактеріофаги, специфічні до *Proteus mirabilis*.

Завдання роботи були такі:

1. Виділити літичні бактеріофаги.
2. Вивчити спектр літичної активності фагів та їх морфологічні характеристики.

3. Виділити ДНК та охарактеризувати геном найбільш перспективних бактеріофагів.

## РОЗДІЛ 1

### ОСНОВИ ФАГОТЕРАПІЇ

Фаги прості, але неймовірно різноманітні біологічні утворення, що складаються з ДНК або РНК укладеної в білковий капсид. Як бактеріальні паразити, фаги не здатні розмножуватися самостійно і в кінцевому рахунку залежать від бактеріального господаря для виживання. Фаги, зазвичай, зв'язуються зі специфічними рецепторами на поверхні клітин бактерій, вводять генетичний матеріал у клітину хазяїна, а потім або інтегрують цей матеріал в бактеріальний геном (так звані «помірні» фаги) і розмножуються вертикально від материнських до дочірніх клітин, або перепрограмовують бактеріальну машинерію для виробництва наступного покоління фагів і лізують клітину (так звані «літичні» фаги). Після досягнення критичної маси фагового потомства, що може бути від декількох до понад 1000 вірусних частинок, залежно від факторів навколишнього середовища, літичні білки активізуються і гідролізують клітинну стінку, відбувається вихід нових фагів для відновлення циклу. Більшість фагів заразні лише для бактерій, які несуть комплементарний рецептор, який і визначає діапазон господарів. Специфічність фагів може бути різною, деякі з них є специфічними для одного штаму, тоді як інші демонструють здатність уражувати декілька штамів.

Бактерії в процесі еволюції виробили численні механізми протистояння зараженню фагами, і фаги мають не менш вражаюче різноманіття механізмів подолання цього опору. Для бактерій, це може включати зміну або втрату рецепторів або CRISPR / Cas системи, тоді як для фага це може включати розпізнавання нових або змінених рецепторів та анти-CRISPR гени. Найпоширеніші літичні фаги, пов'язані з патогенами людини є фаги *Caudoviricetes*, які містять дволанцюговий геном ДНК, та *Microviridae*, які є безхвостими одноланцюговими ДНК-вірусами.

На відміну від літичних фагів, лізогенні фаги здатні інтегрувати свій генетичний матеріал в бактеріальну хромосому у вигляді профага (рідше фагова ДНК може залишатися відокремленою як плазміда, але все ще здатна стабільно передаватися до наступних поколінь). Потім бактеріальний лізоген поширюється з кожним поділом клітини. Екологічні фактори здатні викликати вихід лізогенного фагу із латентної форми, викликаючи перехід до літичного циклу і викид фагових нащадків у навколишнє середовище. Профагові гени можуть бути корисними для бактеріального господаря і можуть кодувати фактори вірулентності (наприклад, дифтерійний токсин або ботулотоксин), метаболічні гени та гени стійкості до антибіотиків (наприклад,  $\beta$ -лактамазу). Зараз біологи визнають, що життєві цикли фагів можуть бути змішаними або взагалі мати невизначений життєвий цикл. Фаготерапія, зазвичай, спирається на літичні фаги, які обов'язково вбивають свого бактеріального господаря. Для лікування літичні фаги комбінують у препарати, які називаються «фагові коктейлі», які складаються з багатьох фагів, які мають доведену ефективність *in vitro* щодо збудника.

Крім терапевтичного використання фагів для лікування бактеріальних інфекцій, фаготерапія має потенціал для лікування хронічних захворювань, у патогенезі яких беруть участь бактерії. Наприклад, мікробіом кишечника та печінки бере участь у запальних реакціях, пов'язаних з алкогольною та неалкогольною жирною хворобою печінки, неалкогольним стеатогепатитом, а також синдромом подразненого кишечника. Під час спалахів фаги можуть використовуватися як профілактичний засіб для запобігання інфекції серед пацієнтів, які заражаються високотрансмісивними бактеріальними патогенами, такими як *Vibrio cholerae*. Профілактика за допомогою фагів також може допомогти запобігти трансмісивним легенеvim патогенам, таким як *Mycobacterium tuberculosis*. Крім того, деякі фаги мають властивості, які дозволяють застосовувати їх у вигляді гідрогелю, який можна використовувати для запобігання біоплівкам, пов'язаних з імплантатами. Іншим застосуванням фагів може бути зміна за мікробіому кишечника шляхом активації профагів за

допомогою ліків або дієтичних добавок, таких як стевія. Цей підхід до модуляції бактеріального складу чи функції нещодавно назвали «фагова реабілітація» [62 - 66].

## РОЗДІЛ 2

### ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРІЇ ТА ЗАХВОРЮВАННЯ

#### 2.1 Характеристика *P. mirabilis*

*Proteus mirabilis*, грамнегативна паличкоподібна бактерія, добре відома своєю здатністю продукувати уреазу та характерним малюнком на чашках з агаром. *P. mirabilis* належить до класу *Gamma*proteobacteria і давно визнана членом порядку *Enterobacteriales* родини *Enterobacteriaceae*. Проте група науковців в 2016 році створила реконструйоване філогенетичне дерево на основі рибосомальних і мультилокусних білків, і запропонувала перекласифікувати порядок *Enterobacteriales*, помістивши *Proteus* в нову родину *Morganellaceae* [4].

*P. mirabilis* можна знайти в різноманітних середовищах, але найчастіше в шлунково-кишковому тракті людей і тварин. Бактерія здатна спричиняти різноманітні інфекції людини, включаючи інфекції ран, очей, шлунково-кишкового тракту та сечовивідних шляхів, проте, вона найбільш відома як збудник захворювань, відомих як катетер-асоційовані інфекції сечовивідних шляхів.

#### 2.2 Характеристика захворювання

Катетер-асоційовані інфекції сечовивідних шляхів є поширеними у пацієнтів, які тривалий час перебувають на катетері, наприклад, у тих, хто живе в будинках престарілих і можуть становити особливу небезпеку для пацієнтів із травмою спинного мозку. Інфекції сечовивідних шляхів, пов'язані з *P. mirabilis*, як правило, ускладнюються утворенням каменів у сечовому міхурі та нирках, ураженням нирок і можуть прогресувати до бактеріємії та сепсису. *P.*

*mirabilis* утворює біоплівку, яка швидко забруднює катетер. Поверхневі органели, такі як фімбрії та інші адгезини, можливо, відіграють значну роль у цьому процесі [67]. Сечовина, що присутня у високій концентрації в сечі, є субстратом уреазы та гідролізується до  $CO_2$  і  $NH_3$ . Вивільнений аміак підвищує рН сечі та ініціює осадження розчинних полівалентних аніонів і катіонів, результатом є сечокам'яна хвороба. Ці кристали можуть утворюватися на та в просвіті катетерів, блокуючи потік сечі та вимагаючи видалення та заміни катетера. Каміні також можуть утворюватися в ниркових каналцях або нирковій мисці, спричиняючи запалення та часто вимагаючи хірургічного видалення. Ця бактерія також здатна проникати в епітеліальні клітини сечового міхура та виробляти різноманітні цитотоксини, які пошкоджують епітелій, що призводить до значної гістопатології. Бактеріємія з участю *P. mirabilis* найчастіше виникає при інфекції сечовивідних шляхів, в свою чергу, бактеріємія та сепсис, спричинені *P. mirabilis*, мають високий рівень летальності. Вони часто є полімікробними, і *P. mirabilis* є тільки одним із мікроорганізмів, присутніх під час інфекції [5, 6].

### 2.3 Імунна відповідь при ураженні *P. mirabilis*

Нейтрофіли є однією з перших реакцій на інфекцію і рекрутуються шляхом сигналізації уроепітеліальних клітин хазяїна у відповідь на бактеріальні структури. Пептид CXCL1 є потужним хемоаттрактантом нейтрофілів, і лейкоцити часто виявляються в сечі під час ураження *P. mirabilis*. Позаклітинні пастки нейтрофілів (ППН) — це мережі деконденсованого хроматину та антимікробних білків, які вивільняються у відповідь на інфекцію, а нейтрофіли в зонах, суміжних з бактеріальними кластерами *P. mirabilis*, спостерігалися з екструдованою ДНК, яка локалізована

разом із позаклітинним H2A, що свідчить про розвиток ППН під час інфекції. Хоча опосередкований нейтрофілами фагоцитоз може бути ефективним механізмом знищення бактерій, цей спосіб може бути менш ефективним проти скупчень *P. mirabilis*. Нейтрофіли також реагують на бактеріємічні ІСШ, викликані *P. mirabilis*, а збільшення паличкоядерних нейтрофілів пов'язане з підвищеним ризиком бактеріємії *P. mirabilis* [7].

Інфламмасоми - комплекси, які утворюються у відповідь на різноманітні подразники та індукують запалення. Один конкретний тип - інфламмасома NLRP3, є специфічно пов'язаним з *P. mirabilis*. У цьому випадку активація NLRP3 залежить від індукованого гемолізином HrmA відтоку K<sup>+</sup>. Інфламмасоми NLRP3 також активуються кристалічним матеріалом, і, отже, активність уреазі може додатково посилити потужну запальну відповідь [8].

Уромодулін є найбільш поширеним білком у сечі людини. Миші з дефіцитом уромодуліну є більш сприйнятливими до ІСШ, а *P. mirabilis* також викликає більш серйозну інфекцію у мишей з дефіцитом уромодуліну. Флагеллін є ще однією структурою, яка розпізнається вродженою імунною відповіддю, зокрема toll-подібним рецептором 5, а рухливі джгутики є особливістю *P. mirabilis*. У кишечнику білок Lypd8 запобігає проникненню джгутикових бактерій, включаючи *P. mirabilis*, в епітелій товстої кишки та спричиненню запалення. Введення очищеного флагеліну у сечовий міхур викликає лейкоцитарну інфільтрацію, гістологічні зміни в тканині сечового міхура. Цікаво, що попередня обробка флагеліном не сприяла очищенню *P. mirabilis* під час подальшого зараження, а натомість призвела до посиленого відновлення кількості бактерій [9 - 11].

## 2.4 Механізми уникнення імунної відповіді *P. mirabilis*

*P. mirabilis* має кілька засобів для ухилення від імунної відповіді. Ці бактерії легко проникають у культивовані тканини. Однак, хоча інвазія спостерігалася під час експериментальних інфекцій, *P. mirabilis* зазвичай виявляється в просвіті сечового міхура. Сечові камені можуть забезпечити притулок від лейкоцитів або антимікробних білків. *P. mirabilis* відомий своєю загальною стійкістю до знищення антимікробними пептидами, зокрема поліміксинами. Двома компонентами цієї резистентності є Zap-протеаза, яка руйнує антимікробні пептиди, і модифікація ліпополісахариду для зміни поверхневого заряду. Різні типи O-антигену ліпополісахариду *P. mirabilis* викликають чіткі реакції прозапального цитокіну IL-8 з культивованих уротеліальних і ниркових клітин. Крім того, *P. mirabilis* виробляє інгібітор лізоциму під назвою PlіC. Нарешті, щонайменше два основних антигенних білка на поверхні бактерій, піддаються фазовим змінам. Таким чином, бактерії, що виробляють змінені флагелліни або фімбрії, можуть уникати як вроджених, так і адаптивних імунних відповідей [7, 12 - 14].

## 2.5 *P. mirabilis* як збудник аутоімунних захворювань

Ревматоїдний артрит є хронічним аутоімунним розладом, який уражає переважно суглоби. Існує кореляція між *P. mirabilis* і артритом, яка свідчить про те, що в деяких випадках інфекція може спричинити розвиток аутоантитіл. Зокрема, амінокислотні послідовності IRRET в UreC (компонент уреазу) і ESRRAL в HrmB (білок, який забезпечує секрецію гемолізину) можуть призвести до розвитку колагенових аутоантитіл. Кореляція між *P. mirabilis* і

ревматоїдним артритом спостерігалася в дослідженнях багатьох пацієнтів, однак, ця гіпотеза ще не має достатніх доказів. Важливо, що інші бактерії також були пов'язані з ревматоїдним артритом, і можливо, існує кілька збудників, що спричинюють захворювання в уразливих групах населення [15, 16].

*P. mirabilis* також пов'язаний із запальними захворюваннями кишечника, які також мають аутоімунне походження. У мишачій моделі, інфекції *P. mirabilis* і *Klebsiella pneumoniae* корелювали з колітом. Подібно до мишей, бактерії *P. mirabilis* спостерігалися в слизу товстої кишки, що прилягає до епітеліальних клітин у мишей з колітом, але не у мишей дикого типу. У той час як миші дикого типу були негативними на *P. mirabilis*, дитинчата дикого типу, вирощені в лабораторії, розвинули коліт і були позитивними на *P. mirabilis* і *K. pneumoniae*, крім того, введення штамів *P. mirabilis* і *K. pneumoniae* мишам дикого типу, вільним від специфічних патогенів, викликало коліт [17].

## 2.6 Фактори вірулентності *P. mirabilis*

*P. mirabilis* був модельним організмом, для якого вперше була окреслена генетика уреаз. Уреаза — нікелевий металофермент, синтез якого індукується наявністю його субстрату — сечовини. Уреаза є критичною для вірулентності *P. mirabilis*. Перша цільова мутація цього білка включала мутацію *ureC*, основної структурної субодиниці апоферменту. ID50 мутанта *ureC* приблизно на 3 log вище, ніж у вихідного штаму, що чітко вказує на вплив уреаз на тяжкість захворювання. У незалежному дослідженні, мутант *ureC* був аттенуований приблизно на 2 log у сечовому міхурі та нирках через 48 годин після інокуляції та до 6 log через 7 днів після інокуляції. Зараження мутантом *ureC* також призвело до значно меншої кількості патологій у сечовому міхурі

та нирках інфікованих мишей. Пізніше було показано, що мутант *ureR*, у якого відсутня індукція синтезу уреазы, також призводив до ослаблення інфекції. Внесок уреазы в патогенність також оцінювали на мишачій моделі інфекції сечовивідних шляхів порівняно з моделлю катетер-асоційованої інфекції сечовивідних шляхів, у якій сегмент катетера поміщали у сечовий міхур під час інокуляції. Ці дослідження показали, що уреазы сприяє виникненню циститу в обох моделях, але не відіграє такої істотної ролі в розвитку пієлонефриту в моделі з катетер-асоційованої інфекції. Однак у цьому дослідженні активність уреазы сильно корелювала з пошкодженням ниркових каналців і нефрозом в обох моделях [18, 19].

У одному дослідженні було виявлено, що 90–94% з 48 штамів *P. mirabilis* секретують протеолітичні ферменти, які виявляються при рН 8 з використанням желатину як субстрату. Усі ці протеази були чутливими до етилендіамінтетраоцтової кислоти металопротеїназами. Однак специфічні системи секреції, залучені до секреції цих протеаз, у цьому дослідженні не були визначені [20].

Класичні аутоотранспортери являють собою родину вірулентних білків у грамнегативних бактерій, які містять три домени: амінокінцевий лідерний пептид для експорту через внутрішню мембрану, поверхнево-локалізуючий домен та карбокси-кінцевий домен для транслокації через зовнішню мембрану. Один із трьох передбачуваних класичних аутоотранспортерів, кодованих *P. mirabilis* був детально вивчений. Білок Pta є протеазою, що має цитотоксичну дію на культивовані епітеліальні клітини сечового міхура та нирок. Білок також має аутоагрегаційні властивості, не пов'язані з протеолітичною активністю. При цьому, вірулентність мутантної протеази, як перевірено на мишачій моделі, була значно знижена [21].

Хоча повний аналіз геному *P. mirabilis* виявив численні потенційні токсини, лише три були добре охарактеризовані. Це гемолізін, вищезгаданий Pta і ZapA металопротеаза.

Пороутворюючі токсини є загальною ознакою патогенних бактерій. Зокрема, гемолізини — це пороутворюючі токсини, які проникають у клітинні мембрани еукаріотів, викликаючи відтік іонів натрію та пошкодження клітин. Два гемолізини були описані для представників роду *Proteus*, один кальцій-залежний, схожий на  $\alpha$ -гемолізин *E. coli* та кальцій-незалежний. Кальцій-незалежний гемолізин кодується двома генами: *hpmA*, який продукує секретований екзопротейн, і *hpmB*, який продукує транслоказу, необхідну як для активації, так і для секреції *HpmA*. *HpmA* опосередковує лізис широкого діапазону типів клітин і, очевидно, є основним фактором вірулентності *P. mirabilis*, що відповідає за цитотоксичність для епітеліальних клітин каналців нирок людини [22].

*P. mirabilis* продукує металопротеазу з широкою специфічністю, яку спочатку вважали протеазою IgA, але пізніше було встановлено, що вона здатна розщеплювати IgA, IgG, антимікробні пептиди hBD1 і LL-37, білок комплементу C1q і C3, фібронектин, актин, колаген, ламінін, казеїн і желатин. Ця протеаза була ідентифікована як металопротеаза родини серралізинів, кодована *zapA*. Внесок *ZapA* в патогенність досліджували як *in vitro*, так і *in vivo*. Інтактні IgG та IgA1 можуть взаємодіяти з рецепторами Fc на нейтрофілах, і цей процес значно зменшується, коли IgG розщеплюється металопротеазою. Подібним чином, розщеплення hBD1 і LL-37 *ZapA* знижує їх антимікробну активність [23, 24].

Фімбрії — це білкові структури, схожі на волосся, які простягаються від поверхні бактерій і зазвичай забезпечують приєднання до поверхні. *P. mirabilis* кодує 17 фімбріальних оперонів. Хоча функція більшості з них ще не визначена, транскрипцію було виявлено з усіх 17 оперонів. *P. mirabilis* може виробляти кілька типів фімбрій одночасно. Наприклад, принаймні дві фімбріальні морфології були виявлені на одній бактерії за допомогою трансмісійної електронної мікроскопії. Манозо-резистентні протей-подібні фімбрії (MR/P) - це найбільш досліджені фімбрії, кодовані *P. mirabilis*. Фімбрії MR/P спочатку були названі за їхню здатність аглютинувати еритроцити в

присутності манози, властивість, яка часто зустрічається в ізолятах *P. mirabilis*. На додаток до гемаглютинації фімбрії MR/P опосередковують утворення біоплівки [25 - 27].

## 2.7 Біоплівка

Біоплівки, які є адгезивними мікробними спільнотами, є суттєвою проблемою для катетерів, у тому числі сечових катетерів. Здатність *P. mirabilis* утворювати біоплівки на поверхні катетерів добре відома. Менш вивченим є потенційне утворення біоплівок у сечовивідних шляхах і те, якою мірою ці біоплівки сприяють захворюванню. Оскільки катетеризація є основним фактором ризику, тут розглядатимуться біоплівки в катетерах і тканині сечових шляхів.

*P. mirabilis* легко прилипає до різноманітних поверхонь, включаючи матеріали, такі як силікон, латекс, скло та полістирол. У присутності сечі мінерали струвіту та апатиту відкладаються, що призводить до утворення кристалічної біоплівки. У лабораторних моделях кристалічні біоплівки утворюються протягом 6 годин після інокуляції, аналогічно, а мінералізація була виявлена у експериментально інфікованих мишей після 24 годин [7, 28].

Вважається, що утворення кристалічної біоплівки підвищує ризик утворення каменів у сечовому міхурі, оскільки одне дослідження показало, що 62% пацієнтів з катетерами також мали камені в сечовому міхурі [29]. Інфекційні камені та кристалічні біоплівки є щільними, складними бактеріальними спільнотами, і принаймні два білки беруть участь в обох процесах: уреази та фімбрії MR/P. Під час експериментальної інфекції у мишей, *P. mirabilis* збирається у великі кластери в просвіті сечового міхура, де мінералізація починається протягом 24 годин. Мутація генів уреази або MR/P

призводить до втрати як кластеризації, так і мінералізації. Бактерії вбудовуються в камені, а також можуть бути вбудовані в позаклітинний матрикс, що утворюється під час росту біоплівки. В обох випадках бактерії є добре захищеними від імунних реакцій [7, 29].

## РОЗДІЛ 3

### ЛІКУВАННЯ ТА ПРОФІЛАКТИКА

#### 3.1 Використання антимікробних препаратів

Як і для інших біоплівкоутворюючих бактерій, утворення біоплівки *P. mirabilis* спричинює більшу стійкість до антимікробних агентів. Один з запропонованих методів протидії полягав в застосуванні антимікробного агента в циклічному режимі, в якому курс лікування переривається на деякий час, що дозволяє клітинам втратити толерантність до антимікробного агента. Однак для успішного очищення біоплівок за допомогою цього методу, час витримки повинен строго співвідноситись із часом, необхідним клітинам для відновлення своєї антимікробної чутливості. Це ускладнюється відсутністю повного розуміння точних механізмів, за допомогою яких досягається толерантність [30].

Було застосовано кілька стратегій для контролю утворення біоплівки в катетерах з використанням антимікробних агентів, серед них адсорбування антимікробних агентів на поверхнях катетерів і використання модифікованого матеріалу покриття, таким чином зменшуючи адгезію бактерій. Клінічно випробувані на даний момент є тільки катетери зі сріблом і антибіотиками. Покриття сріблом і силіконові катетери з нітрофуразоном покриттям показали значний ефект на профілактику бактеріурії, пов'язаної з катетером, під час короткочасної катетеризації госпіталізованих пацієнтів. Однак кристалічні біоплівки все ще можуть утворюватися на катетерах Фоля з гідрогелевим/срібним покриттям, особливо якщо антимікробне покриття не дифундує в просвіт катетера. З іншого боку, виявлено, що введення ципрофлоксацину в біорозкладаний водорозчинний поліуретан посилює інгібуючу дію ципрофлоксацину на утворення біоплівки *P. mirabilis in vitro* [31, 32].

### 3.2 Застосування речовин рослинного походження

Історично рослини вважалися багатим джерелом широкого спектру біоактивних сполук, відомих як фітохімічні речовини. Серед різноманітних застосувань фітохімічні речовини викликають особливий інтерес завдяки своїй антибіоплівковій активності. Ця активність пояснюється їх здатністю пригнічувати фактори вірулентності, включаючи: адгезію до поверхонь, активність уреази та виробництво екзополісахаридів.

Інгібування адгезії до поверхонь зменшує загальну здатність мікроорганізмів утворювати біоплівки. Відповідно, інгібування виробництва уреази може бути важливим кроком для запобігання утворенню біоплівки. Фітохімічна сполука, яка спрямована проти виробництва уреази в *P. mirabilis*, - це аліцин, що міститься в часнику. В концентраціях нижче від мінімальної інгібуючої концентрації він може зменшити утворення біомінералізованої біоплівки до 35%. Також було повідомлено про повне знищення існуючих біоплівок при більш високих концентраціях аліцину. Унікальною властивістю аліцину, серед кількох інших сполук, є його здатність проникати через мембрану бактеріальної клітини та інгібувати фермент уреазу внутрішньоклітинно. Однак клінічне застосування аліцину ускладнюється його нестабільністю в біологічних рідинах [33].

Було виявлено, що фітохімічна сполука, пірроло [1,2-а] піразин-1,4-діон, гексагідро-3-(2-метилпропіл), екстрагована з ендofітного актиноміцету *Nocardiosis sp.*, пригнічує адгезію і утворення біоплівки. Дослідницька група довела інгібуючу дію цієї сполуки на визначення кворуму за допомогою біосенсора *QS Chromobacterium violaceum* [34].

*Capparidaceae spinose* — спеція, яка, як повідомляється, має низку потенційно корисних лікувальних властивостей, включаючи антиоксидантну, протигрибкову, протизапальну та антидіабетичну дію. В одному дослідженні було продемонстровано антикворумну активність екстракту *C. spinose*. Під

дією екстракту за допомогою конфокальної лазерної скануючої мікроскопії було виявлено чіткі зміни в архітектурі біоплівки *P. mirabilis*. Це було пов'язано з пригніченням утворення біоплівки та виробництва екзополісахариду на 70 і 67% відповідно. Одним із біоактивних метаболітів *S. spinose*, якому приписують негативний вплив на утворення біоплівки, є ванільна кислота [35].

Ліналоол — це монотерпеновий спирт, який міститься в ефірних оліях багатьох квіткових ароматичних і пряних рослин. Інгібуюча дія ліналоолу на фактори вірулентності *P. mirabilis* була предметом нещодавнього дослідження. До 75% інгібування утворення кристалічної біоплівки було досягнуто ліналоолом у концентрації 0,4 мг/мл. Аналіз транскриптомів показав зниження регуляції генів *flhD*, *flhB*, *speA*, *rsbA*, *ureR*, *hpmB* і *hpmA*. У свою чергу, згадані гени впливають на вірулентні властивості *P. mirabilis*, такі як рухливість, утворення біоплівки, активність уреазы та продукція гемолізину [36].

### 3.3 Апітерапія

Однією з природних альтернатив антибіотикам для боротьби з біоплівками є апітерапія, практика, під час якої продукти бджільництва, такі як мед, пилок і прополіс, використовуються для профілактики або лікування захворювань.

Мед — це природна сполука, чия антибіоплівкова активність була предметом багатьох досліджень. В одному з досліджень було оцінено інгібуючу дію кількох типів меду різного ботанічного походження на біоплівки *P. mirabilis*. Усі зразки меду були здатні значно пригнічувати адгезію клітин *P. mirabilis* до пластикових поверхонь. Крім того, при вищій концентрації було досягнуто часткове відшарування попередньо сформованих біоплівок. Серед

протестованих сортів меду найсильніші властивості проти біоплівки продемонстрував мед манука, виготовлений з нектару дерева манука. Цей тип може повністю знищити всі вбудовані в біоплівку клітини *P. mirabilis*. Вважається, що метилглюкозаль, основний антибактеріальний компонент меду манука, легко дифундує через встановлену матрицю біоплівки *P. mirabilis* і вбиває бактеріальні клітини [37].

Іншим продуктом бджільництва, який, як відомо, є одним із найбагатших джерел активних речовин, таких як флавоноїди та фенольні сполуки, є етаноловий екстракт прополісу. В одному з досліджень було оцінено вплив екстракту на формування біоплівок *P. mirabilis*, а також його вплив на попередньо сформовані біоплівки. Інгібування утворення біоплівки спостерігалось в діапазоні концентрації 2,5–100 мг/мл, тоді як більш високі концентрації можуть успішно зменшувати попередньо сформовані біоплівки. Тим часом утворення біоплівки *P. mirabilis* посилювалося шляхом обробки низькою концентрацією (1,5 мг/мл) екстракту. Це можна пояснити пригніченням рухливості бактерій при нижчій концентрації екстракту, що покращує адгезію клітин до поверхонь [38, 39].

### 3.4 Перепрофільовані препарати

Перепрофільовання або репозиціонування ліків — це використання схвалених препаратів для лікування захворювань, відмінних від тих, для яких вони спочатку були створені. Це забезпечує економію часу та коштів завдяки пропуску деяких фаз клінічних випробувань, необхідних для схвалення нових ліків.

Амброксол є муколітичним і відхаркувальним засобом, який зазвичай застосовують у хворих на астму та хронічний бронхіт. Повідомлялося, що він

перешкоджає утворенню біоплівки в результаті його здатності пригнічувати адгезію і виробництво матриці біоплівки. Є повідомлення, що амброксол пригнічував утворення біоплівки та видаляв попередньо сформовані біоплівки залежно від дози. Інгібування біоплівки та знищення попередньо сформованої біоплівки *P. mirabilis* досягли при 80% і 76% концентрації відповідно [40].

Інші препарати з потенційною антибіоплівковою активністю включають флуоксетин і тіоридазин, які створені для лікування депресії та психозу відповідно. Було виявлено, що обидва значно зменшують швидкість утворення кристалічної біоплівки *P. mirabilis* на моделі катетера та збільшують час, необхідний для блокування катетера. Значне зниження рухливості *P. mirabilis* також було помітним після лікування флуоксетином і тіоридазином [41].

### 3.5 Фаготерапія

Фаготерапія стає одним із нових альтернативних методів боротьби з бактеріями за допомогою природного хижака, який вбиває бактерії. Протягом останніх двох десятиліть спостерігається збільшення інтересу до терапевтичного використання фагів. Це було зумовлено високою поширеністю мультирезистентних бактерій разом із невеликою кількістю нових антибіотиків.

Бактеріофаги повсюдно поширені в навколишньому середовищі. Їх також багато в травному тракті людей і тварин. Кілька досліджень було проведено для виділення бактеріофагів для боротьби з біоплівками *P. mirabilis*. У таких дослідженнях використовувалися методи збагачення, в яких клінічні штами *P. mirabilis* використовувалися для виділення бактеріофагів із зразків стічних вод та фекалій людини. За допомогою трансмісійного електронного мікроскопа було виявлено, що бактеріофаги, активні проти біоплівок *P. mirabilis*, належали

до порядку *Caudovirales* (за старою класифікацією), який включає хвостаті бактеріофаги. Деякі з них належали до родини *Siphoviridae* (фаги з довгим, гнучким хвостом, що не скорочується), а інші належали до родини *Podoviridae* (фаги з коротким хвостом) та групи *Myoviridae* (фаги зі скорочувальним хвостом). Усі вони належали до літичного типу, який реплікувався в клітинах-господарях, зрештою викликаючи їх лізис, вивільняючи потомство [42 - 46].

Кілька досліджень показали, що фаги можуть більш ефективно запобігати утворенню біоплівки *P. mirabilis*, ніж руйнувати вже сформовану. Це пов'язано з поганою проникливістю фагів у старих шарах біоплівки. Ефективний лізис бактеріофагів був недостатнім через низьку концентрацію активно проліферуючих клітин. Це пов'язано з низькою метаболічною активністю у внутрішніх шарах біоплівок. Відповідно, було продемонстровано, що при введенні на ранній стадії бактеріальної колонізації бактеріофаги запобігають блокуванню катетерів біоплівкою *P. mirabilis* протягом 8 днів. З іншого боку, інфекції, пов'язані з біоплівкою, які вже були або на пізній стадії, були більш стійкими до лікування бактеріофагами [47, 48].

Що стосується використання бактеріофагів для боротьби з кристалічними біоплівками *P. mirabilis*, було виявлено, що кілька факторів впливають на адсорбцію фагів клітинами-господарями. До таких факторів належать хімічне середовище та рН. Було виявлено, що  $\text{CaCl}_2$  і  $\text{MgCl}_2$ , у сечі підвищують інфекційність фагів у результаті більшої концентрації фагів на поверхні бактеріальної клітини та змін в рецепторах. В результаті прискорюється доступ фагів до рецепторів або транслокація нуклеїнових кислот фагів. З іншого боку, було виявлено, що кристали, що утворюються в сечі під час утворення біоплівки, пригнічують адсорбцію фагів на клітинах-мішенях [44].

На даний момент у кількох дослідженнях було досягнуто 90% зменшення утворення біоплівки в моделях катетерів *in vitro* з фаговим покриттям. Було встановлено, що ця стратегія сповільнює колонізацію та затримує закупорку катетера. Інше дослідження показало суперечливі висновки, які показали більшу адгезію бактеріальних клітин до ділянок катетера, попередньо

оброблених фагом. Можливим поясненням є утворення плівки з лізованих бактеріальних клітин, яка маскує дію фагів і забезпечує липку поверхню для адгезії [44, 49, 50].

Більш успішним підходом до використання бактеріофагів для боротьби з біоплівками є використання комбінації фаг-антибіотик. Провал цього підходу в обробці біоплівки є малоімовірним, оскільки бактеріальні клітини, які виявляють стійкість до одного агента, скоріш за все, будуть сприйнятливі до іншого. Крім того, проходячи через шари біоплівки, бактеріофаги сприятимуть дифузії антибіотика через шари біоплівки [44, 51, 52].

### **3.6 Застосування нанотехнологій**

Нанорозмірні матеріали сьогодні широко використовуються завдяки їхній високій здатності націлюватися на тканини. Зменшення розміру може змінити властивості матеріалів, наприклад, їх хімічні, механічні, електричні, структурні, морфологічні та оптичні властивості.

Катіонні дендримерні пептиди являють новий клас молекул з антимікробним потенціалом. Вважається, що позитивний заряд на поверхні таких пептидів взаємодіє з негативно зарядженими молекулами на поверхні бактеріальних клітин, такими як фосфатні групи ліпополісахаридів. Крім того, їх розгалужена природа пропонує хімічно реактивні групи, до яких можна приєднати інші молекули, що надає додаткового терапевтичного потенціалу. Як антибіоплівкові агенти дендримери мають кілька перспективних характеристик. Завдяки невеликому розміру частинок вони можуть легко проникати в матрицю, виявляючи певну бактеріостатичну активність. Також було виявлено, що дендримери пригнічують утворення матриці шляхом індукції мутацій нуклеїнових кислот. Вони також здатні пригнічувати синтез

білка. Іншим можливим механізмом, за допомогою якого можуть діяти катіонні дендримерні пептиди, є їх детергентний ефект. Вони взаємодіють з аніонними компонентами бактеріальних мембран і матрицею біоплівки, що призводить до втрати мембранного потенціалу. Було продемонстровано здатність дендронів зменшувати попередньо сформовані біоплівки *P. mirabilis* до 83,5%. Таким чином, вони забезпечують клінічно вигідну альтернативу антибіотикам для знищення попередньо сформованих біоплівок [53 - 56].

Селен є мікроелементом металоїдом. Він є структурною частиною кількох груп ферментів, таких як: глутатіонпероксидази, йодтироніндейодинази та тіоредоксинредуктази, які беруть участь у антиоксидантному захисті, детоксикації та метаболізмі відповідно. Вплив біологічно синтезованих наночастинок селену на біоплівки *P. mirabilis* ще не є достатньо вивченим. Проте, наявні дослідження показують, що він пригнічував утворення біоплівки на 53,4%. Згідно з результатами експериментів *in vitro* та *in vivo*, біогенні наночастки селену мають меншу токсичність, ніж селеніт або селенат. Також, у якості перспективних антибіоплівкових агентів можуть бути використані існуючі антибактеріальні препарати, нанесені на поверхню наночасток [57].

Було виявлено, що низькі концентрації наночасток оксиду цинку та оксиду магнію впливають на розвиток біоплівки *P. mirabilis*, кількості бактерій і позаклітинного матриксу. Це було пов'язано з запобіганням бактерії від колонізації поверхонь і утворення зрілих біоплівок. Було також виявлено, що наночастки впливають на виробництво позаклітинного матриксу, важливого компонента біоплівки, яка захищає бактерії від стресу навколишнього середовища. Зменшення кількості бактерій у біоплівках також можна пояснити антибактеріальною активністю наночасток. Наночастинки ZnO показали значну антибактеріальну активність проти *P. mirabilis*. Основними механізмами, за допомогою яких наночастинки ZnO можуть проявляти свою антибактеріальну активність, є зміна цілісності клітинної мембрани та утворення активних форм кисню. Синергічної активності також можна досягти за допомогою наночастинок MgO, які також продемонстрували велику

антибактеріальну активність проти грамнегативних і грампозитивних бактерій [58 - 61].

Під час огляду літератури про інфекцію *P. mirabilis* можна відзначити значний прогрес у визначенні факторів вірулентності та механізмів патогенезу цього уропатогену. Очевидно, що катетеризовані сечовивідні шляхи є основним середовищем для *P. mirabilis*, і часто бактерія співіснує з кількома іншими членами мікробної спільноти. Однак, для ідентифікації та характеристики вірулентності, яка включає уреазу, фімбрії, секретовані цитолетальні та цитолітичні токсини та протеази, джгутики та численні системи секреції, найчастіше використовується моноінфекція. Ми тільки починаємо використовувати відносно нові інструменти, щоб досліджувати механізми патогенезу на моделях полімікробної інфекції. Цей додатковий рівень складності врешті-решт відкриє двері для розробки нових стратегій лікування. Основною проблемою є формування біоплівки – це багатоступінчастий процес, який починається з оборотної адгезії бактеріальних клітин до біотичних або абіотичних поверхонь з наступним незворотним прикріпленням, утворенням мікроколоній і, нарешті, розвитком зрілої біоплівки. Деякі фактори вірулентності були пов'язані зі здатністю *P. mirabilis* утворювати кристалічні біоплівки. Усі методи лікування, згадані в цьому огляді, слід розглядати як методи контролю за біоплівками *P. mirabilis*. Кожен із них використовує унікальні механізми дії, що дозволяє використовувати комбінувати їх для кращих результатів. Проте необхідні додаткові дослідження, щоб перевірити деякі з цих речовин на їх ефект *in vivo* та переконатися в відсутності токсичності.

## РОЗДІЛ 4

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

#### 4.1 Характеристика бактерій

В дослідженні були використані 13 клінічних штамів *P. mirabilis* та 2 типові штами. Клінічні штами включали в себе 7 штамів, отриманих із бактеріологічної лабораторії Інституту урології ім. академіка О.Ф. Возіанова НАМН України (*P. mirabilis*: 1233, 7747, 780, 9121, 1392, 675-7, 1221), 4 штами, отримані з бактеріологічної лабораторії Інституту травматології та ортопедії НАМН України (*P. mirabilis*: 527, 926/23, 656, 337), 2 штами, отримані з медичної лабораторії (*P. mirabilis*: 390, 8512). Типові штами: *P. mirabilis* DSM 6674 та *P. mirabilis* ATCC.

Для культивування бактерій використовувались 2 типи поживних середовищ.

Середовище 1: Триптозно – соєвий агар

Склад:

1. Панкреатичний гідролізат казеїну - 15 г/л
2. Папаїновий гідролізат соєвих бобів - 5 г/л
3. Хлорид натрію - 5 г/л
4. Агар-агар - 15 г/л

Середовище 2: Триптозно – соєвий бульйон

Склад:

1. Пептон із соєвих продуктів – 3 г/л
2. D(+)-глюкоза – 2,5 г/л
3. Хлорид натрію – 5 г/л
4. Пептон із казеїну – 17 г/л
5. ди-Калій гідрофосфат - 2,5 г/л

Культивування проводилось в аеробних умовах при 37 °С.

#### 4.2 Виділення бактеріофагів

Бактеріофаги виділяли зі стічних вод. Зразки центрифугували (800 g протягом 5 хв) для осадження твердих часток, а супернатанти фільтрували через 0,2 мкм фільтри з ацетату целюлози. Фільтрат в об'ємі 500 мкл вносили у 5 мл розплавленого 0,7% триптозно - соєвого агару, який попередньо засіяний 100 мкл нічною культурою бактерій *P. mirabilis*. Розплавлене середовище виливали на чашки Петрі з твердим 1,4% триптозно - соєвим агаром. Через 24 год інкубації при температурі 37 °С на чашках, в яких були присутні бактеріофаги спостерігалися негативні колонії різних морфотипів. Як контроль використовували культуру бактерій без бактеріофагу. Якщо в матеріалі не був присутній бактеріофаг, на середовищі не спостерігалися негативні колонії.

#### 4.3 Визначення титру бактеріофагів

Для визначення титру бактеріофагів використовувався метод краплинного тесту. На чашки Петрі з твердим 1,4% триптозно - соєвим агаром виливали 3 мл розтопленого 0,7%-го триптозно – соєвого агару, в який попередньо додали 100 мкл нічної культури *P. mirabilis*. Фаговмісний матеріал серійно розводили 1:10, таким чином щоб отримати концентрації до  $10^{-9}$ . Після затвердіння верхнього шару чашку розділили на 9 секторів і на кожен сектор нанесли 10 мкл бактеріофагу.

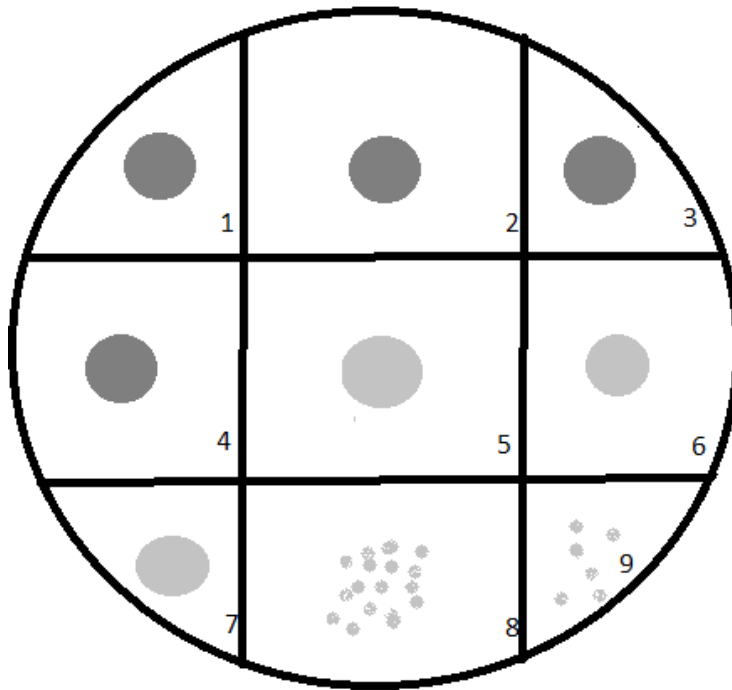


Рис. 4.1. Схема проведення аналізу титру бактеріофагів методом краплинного тесту

За титр сприймали те найбільше розведення, за якого ще спостерігалися зони лізису (Рис. 4.1.).

#### 4.4 Отримання чистих ліній бактеріофагів

Після утворення негативних колоній на подвійному шарі агару було обрано чітку негативну колонію певного морфотипу при максимальному розведенні фагового лізату, зона була відколота з агару та поміщена в 5 мл стерильного триптозно – соєвого бульйону, після інкубації протягом 2 год при 37 °С, знову було проведено титрування на двошаровому агаризованому середовищі. Згодом новоутворені негативні колонії були відібрані в максимальному розведенні, і чітка зона лізису того самого морфотипу була відібрана з агару для повторного посіву, дотримуючись вищеописаного методу.

Цей повний цикл повторювали щонайменше 3 рази до отримання негативних колоній лише одного морфотипу.

#### 4.5 Накопичення бактеріофагів

Накопичення бактеріофагів проводили за допомогою методу зливного лізису. На чашки Петрі з твердим 1,4% триптозно - соєвим агаром виливали 3 мл розтопленого 0,7% триптозно – соєвого агару, в який попередньо додали 100 мкл нічної культури *P. mirabilis* та 500 мкл бактеріофагу в концентрації  $10^{-2}$ . Після інкубування протягом 12 год при 37 °С на чашках спостерігався суцільний лізис, їх заливали фізіологічним розчином та залишали на 1 год. Фізіологічний розчин відбирали та центрифугували при 5000 об/хв протягом 15 хвилин і фільтрували за допомогою бактеріальних фільтрів з ацетату целюлози. Після цього висівали на газон *P. mirabilis* для підтвердження наявності бактеріофага.

#### 4.6 Вивчення діапазону хазяїв

Діапазони хазяїв визначали шляхом культивування ізольованих бактеріофагів з різними штамами *P. mirabilis* в чашках Петрі. Культивування проводили протягом 12 год при 37 °С, як описано вище і після цього досліджували на наявність зон лізису. Кожен експеримент повторювали 3 рази.

#### 4.7 Вивчення впливу бактеріофагів на здатність *P. mirabilis* до роїння

В 10 мл триптозно – соєвого бульйону було висіяно нічну культуру *P. mirabilis* і інкубовано протягом 3 год при 37 °С, після інкубації частину рідкого середовища було висіяно на триптозно – соєвий агар, до іншої частини було додано 1 мл бактеріофагу та інкубовано протягом 20 хв для адсорбції фагу. Після інкубації зразки були висіяні на тверде середовище та інкубовані протягом ночі.

#### 4.8 Електронна мікроскопія

Для концентрування бактеріофагів було проведене дифференційне центрифугування при 80 000 g протягом 6 годин. Для приготування плівко-підкладок був застосований 0,1 - 0,2% розчин формвара (полівінілформальдегіду). Розчинником виступав хлороформ. Розчин був приготовлений за добу до застосування. Знежирене предметне скло швидко занурювали у розчин формвару, через 5-10 секунд скло виймали та просушували. Отримана плівка була знята на воду, скло занурювали у воду під кутом 45 °С. На плівку виклали сітки і зняли їх за допомогою фільтрувального паперу. Сітки з плівкою були висушені та зберігались у чашці Петрі. Для виготовлення електронно-мікроскопічних препаратів вірусів на сітку з формваровою плівкою-підкладкою було нанесено краплю вірусомісного матеріалу, їх витримали 2-3 хв, потім, надлишок видалили фільтрувальним папером. Контрастування було здійснено шляхом додавання 5 мкл фосфорновольфрамової кислоти.

#### 4.9 Виділення ДНК та сиквенування геному

Виділення ДНК бактеріофагу Рm2 проводилось за допомогою Phage DNA Isolation Kit (Norgen Biotek, Канада) згідно з інструкцією виробника. Сиквенування ДНК проводили у Research and Development Center, Regional Specialist Hospital in Wrocław (Вроцлав, Польща), методом Ion Torrent, за допомогою сиквенатора Ion GeneStudio™ S5 System (ThermoFisher Scientific). Отримані короткі прочитування розміром біля 350 п.н. було піддано збірці за допомогою інструменту SPADES на онлайн-платформі GALAXY (Galaxy Version 3.15.4+galaxy1). Анотацію генома проводили за допомогою інструменту GeneMarks, призначення функцій для білок-кодуючих послідовностей встановлювали за допомогою пошуку гомологів (blastp). Пошук генів тРНК здійснювали за допомогою tRNAscan-SE 2.0. GC склад визначали за допомогою онлайн-калькулятора GC Content Calculator (Biologics International Corp). Пошук консервативних доменів білків здійснювали у CD-Search. Спорідненість з іншими бактеріофагами визначали за допомогою інструменту Viridic. Також була проведена статистична обробка даних.

#### 4.10 Статистична обробка даних

Результати статистичного аналізу були представлені як середнє  $\pm$  стандартне відхилення. Статистичний аналіз проводили за допомогою програмного забезпечення Microsoft Excel, і значення  $p$  менше 0,05 ( $P < 0,05$ ) вважалось статистично значущим.

## РОЗДІЛ 5

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

#### 5.1 Первинна характеристика виділених бактеріофагів

У всіх 3 зразках стічних вод відібраних з Бортницької станції аерації, було виявлено агенти, що спричинює лізис як тест-культури так і клінічних штамів. Після первинного висіву, зразка №1 було отримано негативні колонії діаметром 1 та 2 мм, ці фаги назвали Рм1 та Рм3 відповідно. В результаті первинного висіву зразка ХХХ було отримано негативні колонії 2 та 5 мм в діаметрі - фаги було названо Рм4 та Рм5 відповідно. Після первинного висіву зразка №3 було отримано негативні колонії 4 та 3 мм в діаметрі, фаги, що їх спричинюють було названо Рм2 та Рм6 відповідно. (Рис. 5.1, Рис. 5.2, Рис. 5.3).

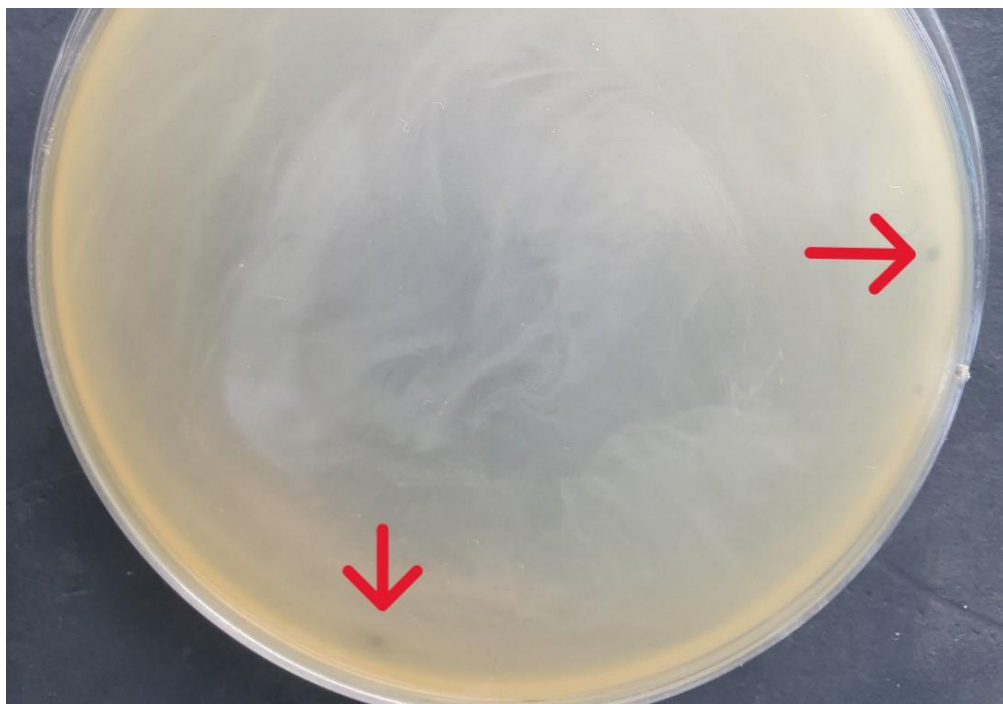


Рис. 5.1. Негативні колоній, отримані в результаті первинного висіву зразку №1



Рис. 5.2. Негативні колоній, отримані в результаті первинного висіву зразку №3



Рис. 5.3. Негативні колоній, отримані в результаті первинного висіву зразку XXX

Для усіх фагів була виділена чиста лінія методом відколювання негативних колоній та пасирування зразків протягом п'яти пасажів. Далі було здійснено накопичення для отримання високих титрів бактеріофагу. Літичну активність та спектр господарів було визначено за допомогою спот-тесту та методу подвійних агарових шарів (Рис. 5.4 – Рис. 5.9).

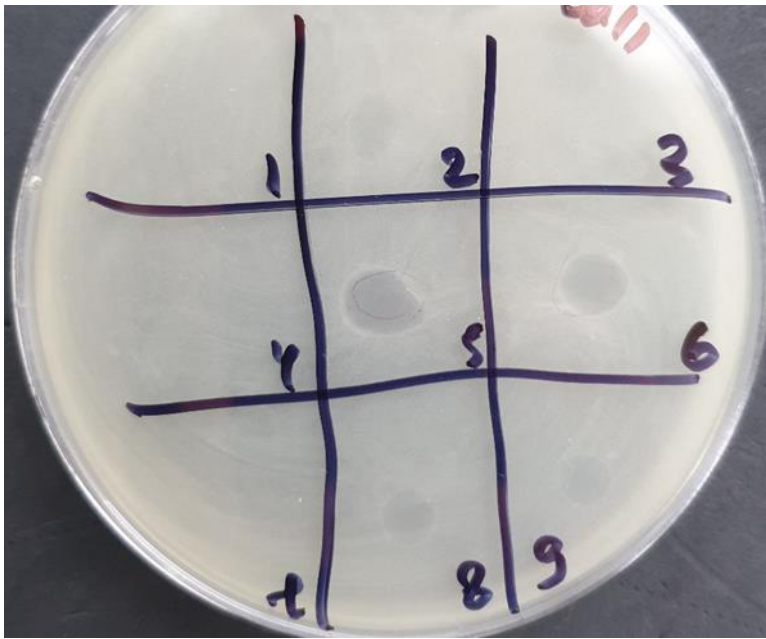


Рис. 5.4. Результати дослідження титрів бактеріофагу Рm1

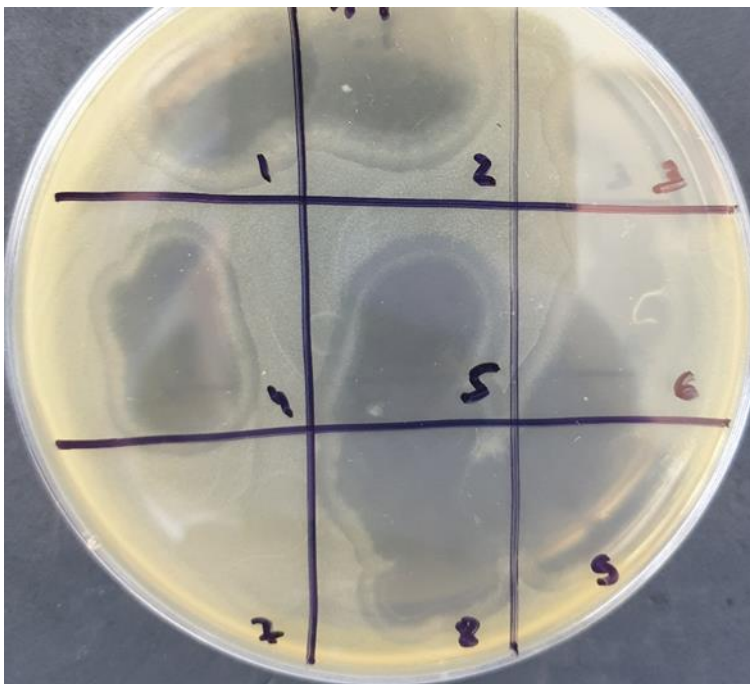


Рис. 5.5. Результати дослідження титрів бактеріофагу Рm2

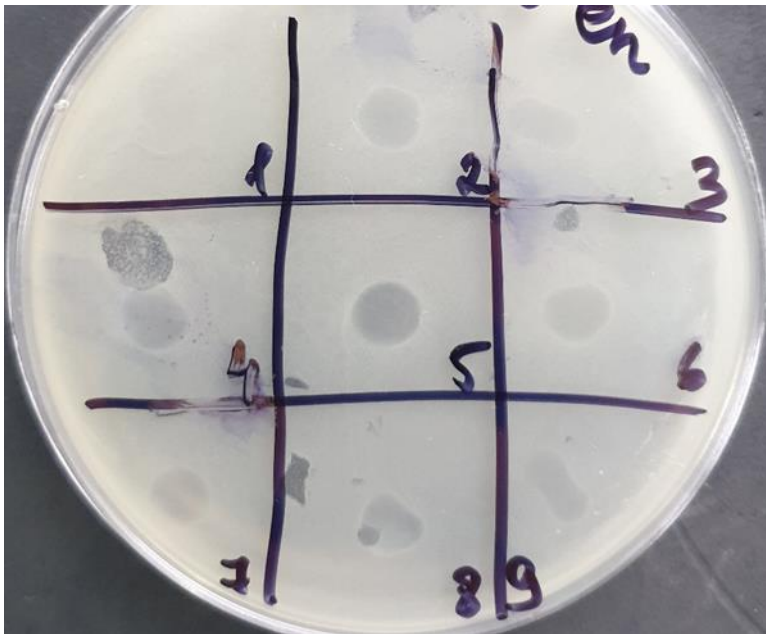


Рис. 5.6. Результати дослідження титрів бактеріофагу Рm3

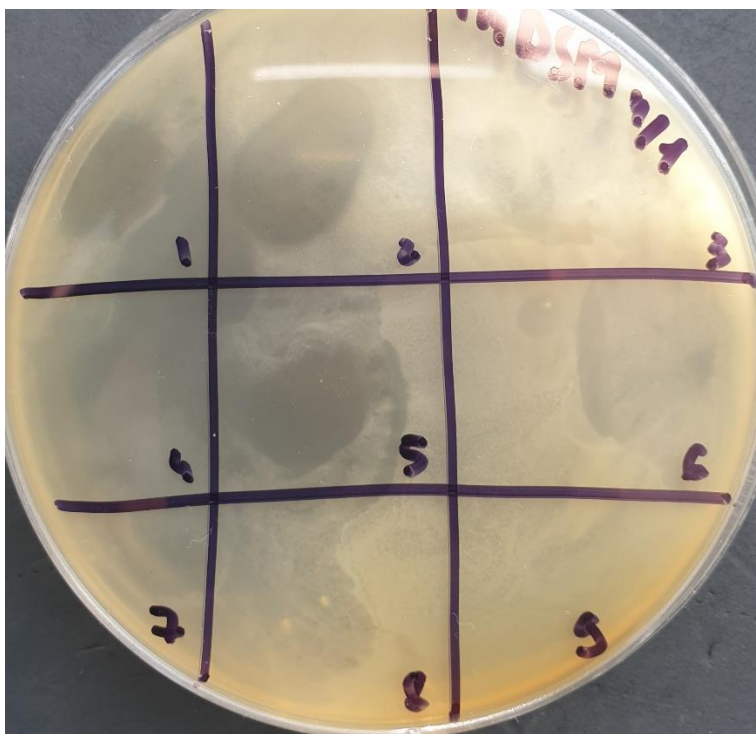


Рис. 5.7. Результати дослідження титрів бактеріофагу Рm4

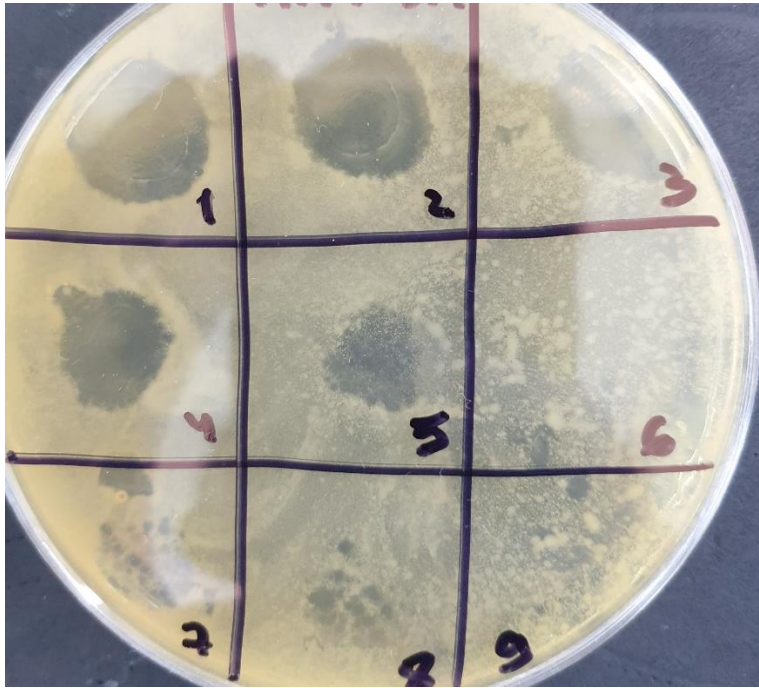


Рис. 5.8. Результати дослідження титрів бактеріофагу Рm5

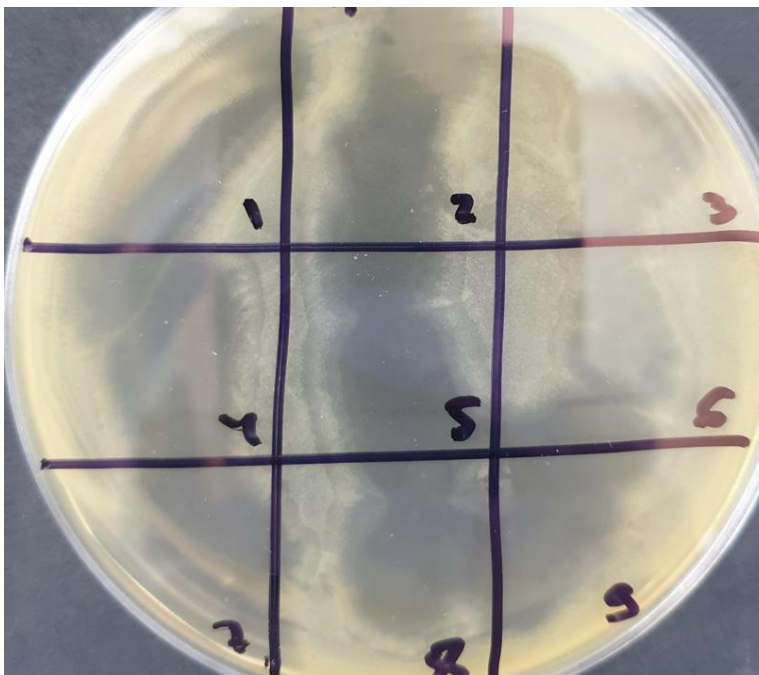


Рис. 5.9. Результати дослідження титрів бактеріофагу Рm6

Таблиця 5.1

## Спектр господарів ізолятів бактеріофагів Рм1 – Рм6

Бактеріальна культура <i>P. mirabilis</i>	Ізолят бактеріофагу					
	Рм1	Рм2	Рм3	Рм4	Рм5	Рм6
1233	+	-	-	+	-	+
527	+	+	+	-	-	-
DSM 6674	+	-	-	+	+	-
7747	+	+	-	-	-	+
926/23	+	-	-	-	-	-
390	-	-	-	-	-	+
8512	-	-	-	-	-	+
780	+	-	-	-	-	+
9121	-	+	+	-	-	+
1392	-	+	-	-	-	-
675-7	+	-	+	+	+	-
656	+	+	+	-	-	+
337	-	-	-	-	-	+
ATCC	-	+	-	+	+	+
1221	+	-	-	-	-	-

Виділені фаги можуть уражувати клінічні ізоляти *P. mirabilis* (Таблиця 5.1). Фаги Рм1 та Рм6 проявляють найширший спектр активності в межах виду і здатні уражувати 9 штамів з 15, що дорівнює 60%, проте не здатні накопичуватись у високих титрах. Бактеріофаг Рм2 уражує 6 штамів з 15 (40%), фаги Рм3 та Рм4 уражують 4 штами з 15 (26,6%). Найменш ефективним є фаг Рм5, що здатен уражувати тільки 3 з 15 штамів *P. mirabilis* (20%). Незважаючи на меншу ефективність, бактеріофаги Рм2, Рм3, Рм4 та Рм5 здатні

накопичуватись у високих титрах ( $10^8 - 10^9$ ). Враховуючи отримані результати, найбільш перспективним був визнаний фаг Рm2 і в подальшому вся увага була сконцентрована саме на ньому.

## 5.2 Морфологія бактеріофагу Рm2

Для вивчення морфологічних характеристик бактеріофагу, зразок Рm2 був вивчений за допомогою трансмісійної електронної мікроскопії.

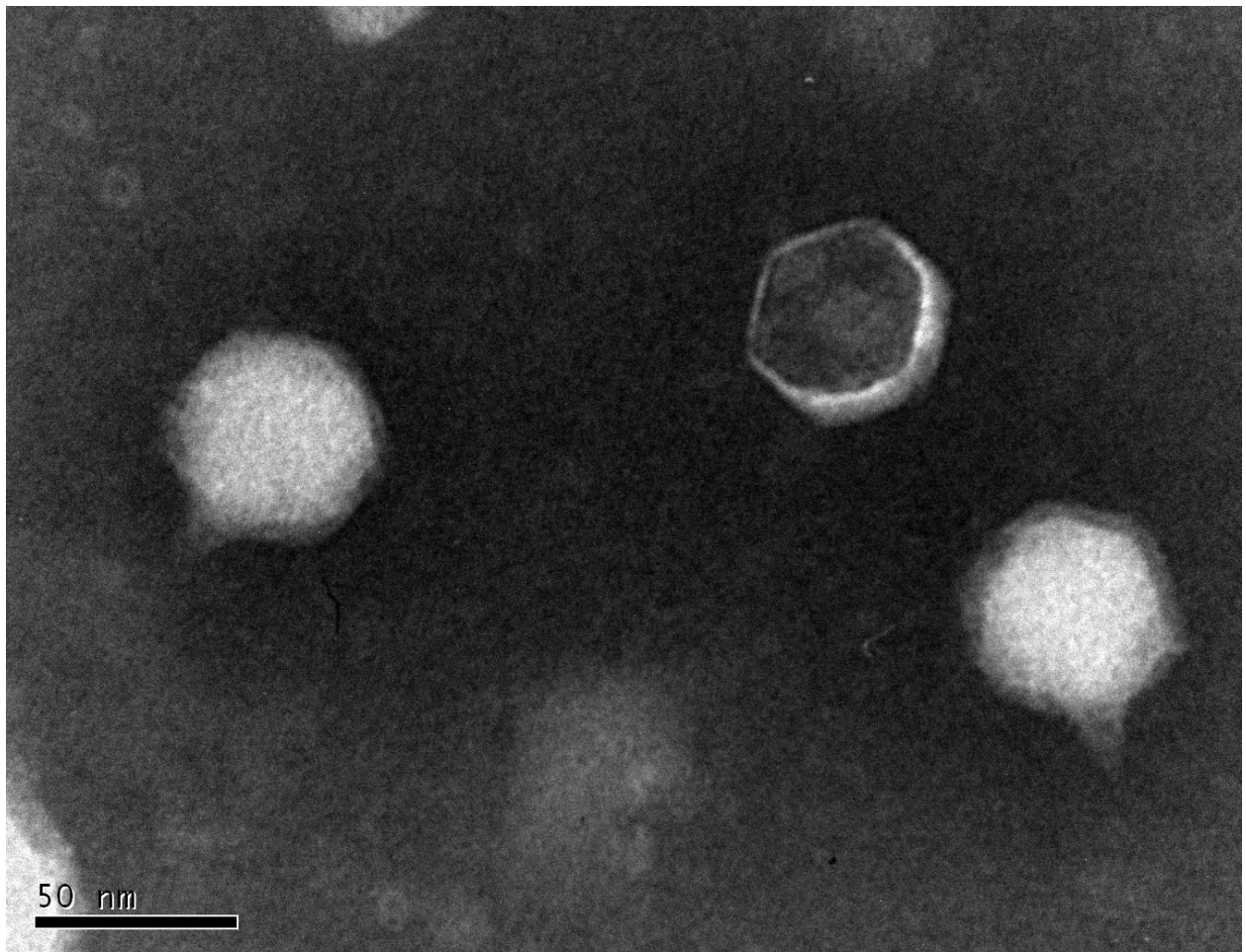


Рис. 5.10. Електронномікроскопічне зображення бактеріофагу Рm2

За результатами дослідження було з'ясовано, що бактеріофаг Рm2 складається із голівки розміром  $\sim 70 \text{ nm} \pm 6 \text{ nm}$  та хвостового відростку розміром

~30 нм ±2 нм. Дані морфологічні характеристики роблять цей фаг подібним до фагу T7, що дозволяє віднести його до T7 супергрупи. Таким чином, можна припустити, що він відноситься до порядку *Caudovirales*, можливі родини: *Autographiviridae*, *Siphoviridae* (за старою класифікацією). Нещодавно низка дослідників повідомили про виділення літичних бактеріофагів до *P. mirabilis*, що мають схожу морфологію до Рm2. За їхніми даними бактеріофаги відносяться до родин *Demerecviridae* та *Autographiviridae* [69, 70]

### 5.3 Сиквенування геному бактеріофага Рm2 та його характеристика

Аналіз геному показав, що бактеріофаг відноситься до роду *Panjvirus* в родині *Autographiviridae*. Геном фагу Рm2 складається з лінійної дволанцюгової ДНК (длДНК), має 41002 пар основ і 42 відкриті рамки зчитування, що фланкуються прямими термінальними повторами з 127 пар основ. Вміст ГЦ пар – 39,56%. Аналіз відкритих рамок зчитування фагу за допомогою BLAST показав, що 22 рамки відповідають білкам з відомою функцією, інші – відповідають гіпотетичним вірусним білкам (Рис. 5.11).

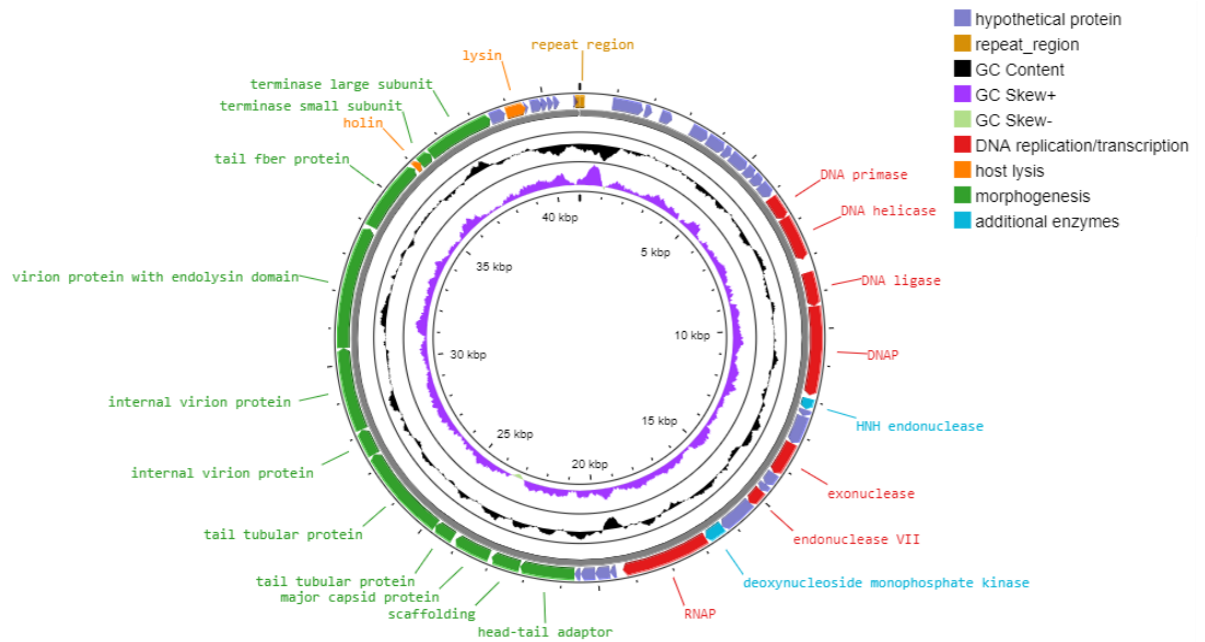


Рис. 5.11. Карта геному фага Pm2

Як і в більшості фагів *Autographiviridae*, рання геномна область Pm2 кодує набір гіпотетичних білків, які, ймовірно, беруть участь у процесі прикріплення до господаря. Кінець ранньої геномної області кодує РНК-полімераза. Ця полімераза, можливо, є схожою з добре вивченою РНК – полімеразою бактеріофагу T7. Середні та пізні гени, які транскрибуються фаговою РНК-полімеразою з їхніх родинних фагових промоторів, головним чином відповідають за метаболізм ДНК фага та морфогенез віріону відповідно. Pm2 має механізм реплікації, подібний до T7, включаючи, ендонуклеазу, ДНК-полімераза, ДНК-праймазу/геліказу та екзонуклеазу. Нарешті, пізня геномна область Pm2 в основному кодує білки, що беруть участь у структурі віріону, збірці, упаковці ДНК і лізисі клітини-господаря. Структурна область Pm2 включає гени, що кодують головний капсидний білок, білок хвостового волокна, хвостові трубчасті білки, внутрішні білки віріону, а також малу та велику субодиниці термінази. Наприкінці інфекційного циклу новосинтезоване потомство фага вивільняється шляхом лізису клітини-господаря. Загалом, шлях лізису T7-подібних фагів значною мірою опосередковується трьома елементами — лізоцимом, холіном і спанінами —

усі вони націлені на різні шари оболонки бактеріальної клітини. Рm2 кодує лізин та холін, що виступають регуляторами лізису клітини – господаря, і хоча вони активно транскрибуються під час інфекції, після скринінгу відкритих рамок зчитування фага ніяких аналогів генів спанінів виявлено не було. Вважається, що за певних умов відсутність спанінів може перешкоджати опосередкованому фагом лізису та подальшому вивільненню потомства з грамнегативних бактерій [68]. Проте, в лабораторних умовах Рm2 успішно долав клітинні бар'єри свого господаря.

Далі геном Рm2 був проаналізований за допомогою інструменту VIRIDIC, що вирівнює геноми та об'єднує в один рід при  $\geq 75\%$  схожості та вид при  $\geq 95\%$ .

Після аналізу подібності геномів за допомогою інструменту VIRIDIC було з'ясовано, що бактеріофаг Рm2 є на 87,7% подібним до бактеріофагу vB\_SpuP\_Spp16, що уражує *Salmonella enterica*, що може свідчити про їх спорідненість (Рис. 5.12.). На 19,3% подібний до фагу Cronobacter\_phage\_Dev-CD-13823. На 17,8% подібний до Pectobacterium\_phage\_MA13. На 16% подібний до Yersinia\_phage\_phiR8-01, що вказує на можливі еволюційні зв'язки або спільне походження. Найменшу спорідненість фаг Рm2 демонструє до бактеріофагів Serratia\_phage\_vB\_SmaP-Kaonashi, Klebsiella\_phage\_6937 та Aeromonas\_phage\_Ahp1 – 15,2%, 13,4% та 8% відповідно. що може свідчити про більшу віддаленість цих фагів від Рm2 у філогенетичному відношенні. Жоден з бактеріофагів, окрім Рm2 та Spp16 не продемонстрував рівня подібності 75% або вище, що не дає підґрунтя для їх об'єднання в один рід.

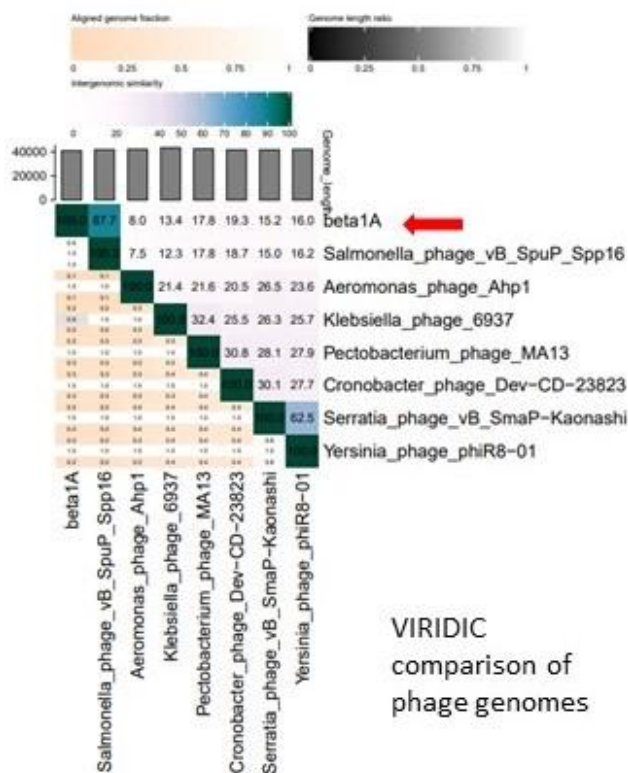


Рис. 5.12. Результат аналізу подібності геномів

За результатами аналізу можна сказати, що фаг Рм2 є абсолютно новим фагом в родині *Autographiviridae* і належить до одного роду разом з vB\_SpuP\_Spp16 в під родині *Melnykvirinae*.

#### 5.4 Вивчення впливу бактеріофага Рм2 на здатність *P. mirabilis* до роїння

В минулому деякі науковці повідомляли про вплив помірних фагів на здатність бактерій до роїння [69]. Було продемонстровано, що фаги можуть вбудовуватись в геноми своїх господарів та змінювати рівні експресії генів. В цій роботі фаг Рм2 класифікований як літичний фаг, ґрунтуючись на аналізі

будови свого геному. Незважаючи на це, фаг здатен значно сповільнювати темпи росту бактерій та пригнічувати здатність *P. mirabilis* до роїння (Рис. 5.13, Рис. 5.14.).



Рис. 5.13. Колонії *P. mirabilis* після обробки бактеріофагом Рm2



Рис. 5.14. Колонії *P. mirabilis* без обробки бактеріофагом

В лабораторних умовах цей ефект зберігався протягом 2 пасажів. Повторна інфекція Рm2 не призвела до ще більшого ефекту, що може

пояснюватись відсутністю специфічних рецепторів на поверхні резистентних клітин. Незважаючи на численні дослідження, точний внесок роїння в патогенність *P. mirabilis* залишається невизначеним, однак зрозуміло, роїння є важливим фактором початкової колонізації сечового міхура у катетеризованих осіб.

## ВИСНОВКИ

1. Усі виділені фаги здатні активно лізувати штами *P. mirabilis*. З 6 зразків фагів, фаги Рм1 і Рм6 мають найширший спектр активності та здатні уражувати 9 із 15 штамів бактерій, проте не здатні накопичуватись у високих титрах.
2. Бактеріофаг Рм2 складається з голівки розміром 70 нм  $\pm$ 6 нм та хвостового відростку довжиною 30 нм  $\pm$ 2 нм.
3. Бактеріофаг Рм2 відноситься до родини *Autographiviridae*, як і інші представники цієї родини фаг Рм2 кодує власну РНК – полімеразу.
4. Фаг Рм2 є абсолютно новим представником в родині *Autographiviridae* і має подібність лише до фагу vB\_SpuP\_Spp16.
5. В геномі бактеріофагу Рм2 не було виявлено генів, які кодують фактори вірулентності або резистентності до антибіотиків, в свою чергу Рм2 здатен значно сповільнювати ріст бактерій та пригнічувати роїння, що є ще одним свідченням про перспективність даного фагу в якості терапевтичного засобу.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Ait-Mimoune N, Hassaine H, Boulanoir M. (2022). Bacteriological profile of urinary tract infections and antibiotic susceptibility of *Escherichia coli* in Algeria. *Iran J Microbiol.* 14:156–60
2. Prywer J, Olszynski M. (2017). Bacterially induced formation of infectious urinary stones: recent developments and future challenges. *Curr Med Chem* 24:292–311.
3. Zalewska-Piątek B, Piątek R. (2020). Phage therapy as a novel strategy in the treatment of urinary tract infections caused by *E. coli*. *Antibiotics.* 9:304.
4. Adeolu M, Alnajar S, Naushad S, Gupta SR. (2016). Genome-based phylogeny and taxonomy of the ‘Enterobacteriales’: proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 66:5575–5599.
5. Hung EW, Darouiche RO, Trautner BW. (2007). *Proteus* bacteriuria is associated with significant morbidity in spinal cord injury. *Spinal Cord.* 45:616–620
6. Hooton TM, Bradley SF, Cardenas DD, Colgan R, Geerlings SE, Rice JC, Saint S, Schaeffer AJ, Tambayh PA, Tenke P, Nicolle LE. (2010). Diagnosis, Prevention, and Treatment of Catheter-Associated Urinary Tract Infection in Adults: 2009 International Clinical Practice Guidelines from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases.* 50:625–663.
7. Schaffer JN, Norsworthy AN, Sun T-T, Pearson MM. (2016). *Proteus mirabilis* fimbriae- and urease-dependent clusters assemble in an extracellular niche to initiate bladder stone formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 113:4494–4499.

8. Seo SU, Kamada N, Munoz-Planillo R, Kim YG, Kim D, Koizumi Y, Hasegawa M, Himpfl SD, Browne HP, Lawley TD, Mobley HL, Inohara N, Nunez G. (2015). Distinct Commensals Induce Interleukin-1beta via NLRP3 Inflammasome in Inflammatory Monocytes to Promote Intestinal Inflammation in Response to Injury. *Immunity*. 42:744–755.
9. Raffi HS, Bates JM, Jr, Laszik Z, Kumar S. (2009). Tamm-horsfall protein protects against urinary tract infection by proteus mirabilis. *J Urol*. 181:2332–2338.
10. Okumura R, Kurakawa T, Nakano T, Kayama H, Kinoshita M, Motooka D, Gotoh K, Kimura T, Kamiyama N, Kusu T, Ueda Y, Wu H, Iijima H, Barman S, Osawa H, Matsuno H, Nishimura J, Ohba Y, Nakamura S, Iida T, Yamamoto M, Umemoto E, Sano K, Takeda K. (2016). Lypd8 promotes the segregation of flagellated microbiota and colonic epithelia. *Nature*. 532:117–121.
11. Umpiérrez A, Scavone P, Romanin D, Marqués JM, Chabalgoity JA, Rumbo M, Zunino P. 2013. Innate immune responses to Proteus mirabilis flagellin in the urinary tract. *Microbes and Infection*. 15:688–696.
12. Schaffer JN, Pearson MM. (2015). Proteus mirabilis and Urinary Tract Infections. *Microbiol Spectr*. 3.
13. Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. (2014). Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol*. 5:643.
14. Callewaert L, Vanderkelen L, Deckers D, Aertsen A, Robben J, Michiels CW. (2008). Detection of a lysozyme inhibitor in Proteus mirabilis by a new reverse zymogram method. *Appl Environ Microbiol*. 74:4978–4981.
15. Rashid T, Ebringer A, Wilson C. (2017). The link between Proteus mirabilis, environmental factors and autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*.
16. Pretorius E, Akeredolu OO, Soma P, Kell DB. (2017). Major involvement of bacterial components in rheumatoid arthritis and its accompanying oxidative

- stress, systemic inflammation and hypercoagulability. *Exp Biol Med* (Maywood) 242:355–373.
17. Garrett WS, Gallini CA, Yatsunenkov T, Michaud M, DuBois A, Delaney ML, Punit S, Karlsson M, Bry L, Glickman JN, Gordon JI, Onderdonk AB, Glimcher LH. (2010). Enterobacteriaceae act in concert with the gut microbiota to induce spontaneous and maternally transmitted colitis. *Cell Host Microbe*. 8:292–300.
  18. Jones BD, Lockatell CV, Johnson DE, Warren JW, Mobley HL. 1990. Construction of a urease-negative mutant of *Proteus mirabilis*: analysis of virulence in a mouse model of ascending urinary tract infection. *Infect Immun*. 58:1120–1123.
  19. Armbruster CE, Smith SN, Johnson AO, DeOrnellas V, Eaton KA, Yep A, Mody L, Wu W, Mobley HLT. (2017). The Pathogenic Potential of *Proteus mirabilis* is Enhanced by Other Uropathogens During Polymicrobial Urinary Tract Infection. *Infection and Immunity*. 85:e00808–00816.
  20. Senior BW. (1999). Investigation of the types and characteristics of the proteolytic enzymes formed by diverse strains of *Proteus* species. *J Med Microbiol*. 48:623–628.
  21. Nielubowicz GR, Smith SN, Mobley HLT. (2008). Outer Membrane Antigens of the Uropathogen *Proteus mirabilis* Recognized by the Humoral Response during Experimental Murine Urinary Tract Infection. *Infect Immun*. 76:4222–4231.
  22. Chippendale GR, Warren JW, Trifillis AL, Mobley HL. (1994). Internalization of *Proteus mirabilis* by human renal epithelial cells. *Infect Immun*. 62:3115–3121.
  23. Almogren A, Senior BW, Loomes LM, Kerr MA. (2003). Structural and functional consequences of cleavage of human secretory and human serum immunoglobulin A1 by proteinases from *Proteus mirabilis* and *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun*. 71:3349–3356.

24. Belas R, Manos J, Suvanasuthi R. (2004). *Proteus mirabilis* ZapA Metalloprotease Degrades a Broad Spectrum of Substrates, Including Antimicrobial Peptides. *Infect Immun.* 72:5159–5167.
25. Pearson MM, Sebahia M, Churcher C, Quail MA, Seshasayee AS, Luscombe NM, Abdellah Z, Arrosmith C, Atkin B, Chillingworth T, Hauser H, Jagels K, Moule S, Mungall K, Norbertczak H, Rabbinowitsch E, Walker D, Whithead S, Thomson NR, Rather PN, Parkhill J, Mobley HLT. (2008). Complete Genome Sequence of Uropathogenic *Proteus mirabilis*, a Master of both Adherence and Motility. *J Bacteriol.* 190:4027–4037.
26. Adegbola RA, Old DC, Senior BW. (1983). The adhesins and fimbriae of *Proteus mirabilis* strains associated with high and low affinity for the urinary tract. *J Med Microbiol.* 16:427–431.
27. Scavone P, Iribarnegaray V, Caetano AL, Schlapp G, Hartel S, Zunino P. (2016). Fimbriae have distinguishable roles in *Proteus mirabilis* biofilm formation. *Pathog Dis.* 74
28. Stickler D, Young R, Jones G, Sabbuba N, Morris N. (2003). Why are Foley catheters so vulnerable to encrustation and blockage by crystalline bacterial biofilm? *Urol Res.* 31:306–311.
29. Sabbuba NA, Stickler DJ, Mahenthiralingam E, Painter DJ, Parkin J, Feneley RC. (2004). Genotyping demonstrates that the strains of *Proteus mirabilis* from bladder stones and catheter encrustations of patients undergoing long-term bladder catheterization are identical. *J Urol.* 171:1925–1928.
30. Lewis K. (2001). Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 999–1007. 10.1128/AAC.45.4.999-1007.
31. Singha P., Locklin J., Handa H. (2016). A review of the recent advances in antimicrobial coatings for urinary catheters. *Acta Biomater.* 50, 20–40. 10.1016/j.actbio.2016.11.070.
32. Xu Y., Wang J., Hao Z., Wang S., Liang C. (2019). Biodegradable ciprofloxacin-incorporated waterborne polyurethane polymers prevent

- bacterial biofilm formation in vitro. *Exp. Therap. Med.* 17, 1831–1836. 10.3892/etm.2018.7113.
33. Ranjbar-Omid M., Arzanlou M., Amani M., Shokri Al-Hashem S. K., Amir Mozafari N., Peeri Doghaheh H. (2015). Allicin from garlic inhibits the biofilm formation and urease activity of *Proteus mirabilis* in vitro. *FEMS Microbiol. Lett.* 362:fnv049. 10.1093/femsle/fnv049.
34. Rajivgandhi G., Vijayan R., Maruthupandy M., Vasecharan B., Manoharan N. (2018). Antibiofilm effect of *Nocardiosis* sp. GRG 1 (KT235640) compound against biofilm forming Gram negative bacteria on UTIs. *Microb. Pathog.* 118, 190–198. 10.1016/j.micpath.2018.03.011.
35. Issac Abraham S. V., Palani A., Ramaswamy B. R., Shunmugiah K. P., Arumugam V. R. (2011). Antiquorum sensing and antibiofilm potential of *Capparis spinosa*. *Arch. Med. Res.* 42, 658–668. 10.1016/j.arcmed.2011.12.002.
36. Durgadevi R., Veera Ravi A., Alexpandi R., Krishnan Swetha T., Abirami G., Vishnu S., et al. (2019). Virulence targeted inhibitory effect of linalool against the exclusive uropathogen *Proteus mirabilis*. *Biofouling* 35, 508–525. 10.1080/08927014.2019.1619704.
37. Majtan J., Bohova J., Horniackova M., Klaudiny J., Majtan V. (2014). Antibiofilm effects of honey against wound pathogens *Proteus mirabilis* and *Enterobacter cloacae*. *Phytother. Res.* 28, 69–75. 10.1002/ptr.4
38. Kwiecinska-Pirog J., Skowron K., Sniegowska A., Przekwas J., Balcerek M., Zaluski D., et al. (2019). The impact of ethanol extract of propolis on biofilm forming by *Proteus mirabilis* strains isolated from chronic wounds infections. *Nat. Prod. Res.* 33, 3293–3297. 10.1080/14786419.2018.1470513
39. De Marco S., Piccioni M., Pagiotti R., Pietrella D. (2017). Antibiofilm and antioxidant activity of propolis and bud poplar resins versus *Pseudomonas aeruginosa*. *Evid. Based Complem. Altern. Med.* 2017:5163575. 10.1155/2017/5163575.

40. Abbas H. A. (2013). Ambroxol blocks swarming and swimming motilities and inhibits biofilm formation by *Proteus mirabilis* isolated from diabetic foot infection. *Asian J. Pharmacy Technol.* 3, 109–116.
41. Nzakizwanayo J., Scavone P., Jamshidi S., Hawthorne J. A., Pelling H., Dedi C., et al. (2017). Fluoxetine and thioridazine inhibit efflux and attenuate crystalline biofilm formation by *Proteus mirabilis*. *Sci. Rep.* 7:12222. 10.1038/s41598-017-12445-w.
42. Melo L. D., Veiga P., Cerca N., Kropinski A. M., Almeida C., Azeredo J., et al. (2016). Development of a phage cocktail to control *Proteus mirabilis* catheter-associated urinary tract infections. *Front. Microbiol.* 7:1024 10.3389/fmicb.2016.01024.
43. Morozova V., Kozlova Y., Shedko E., Kurilshikov A., Babkin I., Tupikin A., et al. (2016). Lytic bacteriophage PM16 specific for *Proteus mirabilis*: a novel member of the genus Phikmvvirus. *Arch. Virol.* 161, 2457–2472. 10.1007/s00705-016-2944-2.
44. Yazdi M., Bouzari M., Ghaemi E.A. (2018). Isolation and characterization of a lytic bacteriophage (vB\_PmiS-TH) and its application in combination with ampicillin against planktonic and biofilm forms of *Proteus mirabilis* isolated from urinary tract infection. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 28, 37–46. 10.1159/000487137.
45. Melo L. D., Veiga P., Cerca N., Kropinski A. M., Almeida C., Azeredo J., et al. (2016). Development of a phage cocktail to control *Proteus mirabilis* catheter-associated urinary tract infections. *Front. Microbiol.* 7:1024 10.3389/fmicb.2016.01024.
46. Alves D. R., Nzakizwanayo J., Dedi C., Olympiou C., Hanin A., Kot W., et al. (2019). Genomic and ecogenomic characterization of *Proteus mirabilis* bacteriophages. *Front. Microbiol.* 10:1783. 10.3389/fmicb.2019.01783.
47. Lehman S. M., Donlan R. M. (2015). Bacteriophage-mediated control of a two-species biofilm formed by microorganisms causing catheter-associated

- urinary tract infections in an in vitro urinary catheter model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 1127–1137. 10.1128/AAC.03786-14.
48. Aniejurengo O. U. V. (2016). Dendron -Based Synthetic Bacteriophages for the Treatment of *Porteus mirabilis* Infections. Doctoral Thesis, University of Brighton.
49. Thompson R.W. (2018). The Isolation and Characterisation of *Proteus Mirabilis* Bacteriophages and their Effect on the Colonisation and Blockage of Urinary CatheterS. Doctor of Philosophy, University of the West of England.
50. Fernandez L., Gonzalez S., Campelo A. B., Martinez B., Rodriguez A., Garcia P. (2017). Low-level predation by lytic phage phiIPLA-RODI promotes biofilm formation and triggers the stringent response in *Staphylococcus aureus*. *Sci Rep* 7:40965. 10.1038/srep40965.
51. Chhibber S., Nag D., Bansal S. (2013). Inhibiting biofilm formation by *Klebsiella pneumoniae* B5055 using an iron antagonizing molecule and a bacteriophage. *BMC Microbiol.* 13:174. 10.1186/1471-2180-13-174.
52. Harper D. R., Parracho H. M. R. T., Walker J., Sharp R., Hughes G., Werthén M., et al. (2014). Bacteriophages and biofilms. *Antibiotics* 3, 270–284. 10.3390/antibiotics3030270.
53. Weidenmaier C., Peschel A. (2008). Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in Gram-positive physiology and host interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 276–287. 10.1038/nrmicro1861.
54. Limoli D. H., Rockel A. B., Host K. M., Jha A., Kopp B. T., Hollis T., et al. (2014). Cationic antimicrobial peptides promote microbial mutagenesis and pathoadaptation in chronic infections. *PLoS Pathog.* 10:e1004083. 10.1371/journal.ppat.1004083.
55. Aniejurengo O. U. V. (2016). Dendron -Based Synthetic Bacteriophages for the Treatment of *Porteus mirabilis* Infections. Doctoral Thesis, University of Brighton.

56. Wu H., Moser C., Wang H.-Z., Høiby N., Song Z.-J. (2015). Strategies for combating bacterial biofilm infections. *Int. J. Oral Sci.* 7, 1–7. 10.1038/ijos.2014.65.
57. Shakibaie M., Forootanfar H., Golkari Y., Mohammadi-Khorsand T., Shakibaie M.R. (2015). Anti-biofilm activity of biogenic selenium nanoparticles and selenium dioxide against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Proteus mirabilis*. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 29, 235–241. 10.1016/j.jtemb.2014.07.020.
58. Iribarnegaray V., Navarro N., Robino L., Zunino P., Morales J., Scavone P. (2019). Magnesium-doped zinc oxide nanoparticles alter biofilm formation of *Proteus mirabilis*. *Nanomedicine (Lond)* 14, 1551–1564. 10.2217/nmm-2018-0420.
59. Gunalan S., Sivaraj R., Rajendran V. (2012). Green synthesized ZnO nanoparticles against bacterial and fungal pathogens. *Progr. Nat. Sci. Mater. Int.* 22, 693–700. 10.1016/j.pnsc.2012.11.015.
60. Pradeev Raj K., Sadaiyandi K., Kennedy A., Sagadevan S., Chowdhury Z. Z., Johan M. R. B., et al. (2018). Influence of Mg doping on ZnO nanoparticles for enhanced photocatalytic evaluation and antibacterial analysis. *Nanoscale Res. Lett.* 13:229. 10.1186/s11671-018-2643-x.
61. Hayat S., Muzammil S., Rasool M. H., Nisar Z., Hussain S. Z., Sabri A.N., et al. (2018). In vitro antibiofilm and anti-adhesion effects of magnesium oxide nanoparticles against antibiotic resistant bacteria. *Microbiol. Immunol.* 62, 211–220. 10.1111/1348-0421.12580.
62. Kolodziejczyk AA, Zheng D, Shibolet O, and Elinav E. (2019). The role of the microbiome in NAFLD and NASH. *EMBO Molecular Medicine* 11, e9302. 10.15252/emmm.201809302.
63. Bhandare S, Colom J, Baig A, Ritchie JM, Bukhari H, Shah MA, Sarkar BL, Su J, Wren B, Barrow P, and Atterbury RJ. (2019). Reviving Phage Therapy for the Treatment of Cholera. *J Infect Dis* 219, 786–794. 10.1093/infdis/jiy563.

64. Hatfull GF. (2014). Mycobacteriophages: windows into tuberculosis. *PLoS Pathog* 10, e1003953. [10.1371/journal.ppat.1003953](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003953).
65. Jackson K, Peivandi A, Fogal M, Tian L, and Hosseini Z. (2021). Filamentous Phages as Building Blocks for Bioactive Hydrogels. *ACS Appl Bio Mater* 4, 2262–2273. [10.1021/acsabm.0c01557](https://doi.org/10.1021/acsabm.0c01557).
66. Sutcliffe SG, Shamash M, Hynes AP, and Maurice CF. (2021). Common Oral Medications Lead to Prophage Induction in Bacterial Isolates from the Human Gut. *Viruses* 13. [10.3390/v13030455](https://doi.org/10.3390/v13030455).
67. Norsworthy AN, Pearson MM. (2016). From Catheter to Kidney Stone: The Uropathogenic Lifestyle of *Proteus mirabilis*. *Trends Microbiol.* doi: [10.1016/j.tim.2016.11.015](https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.11.015).
68. Fernandes S, São-José C. (2018). Enzymes and mechanisms employed by tailed bacteriophages to breach the bacterial cell barriers. *Viruses* 10:396. doi: [10.3390/v10080396](https://doi.org/10.3390/v10080396).
69. Joshua Aaron, Leonardo J. van Zyl, and Leon M. T. Dicks. (2022). Isolation and Characterization of Lytic *Proteus* Virus 309. *Viruses* 14(6): 1309. doi: [10.3390/v14061309](https://doi.org/10.3390/v14061309)
70. Jéssica Duarte da Silva, Lene Bens, Adriele J. do Carmo Santos, Rob Lavigne, José Soares, Luís D. R. Melo, Marta Vallino, Roberto Sousa Dias, Zuzanna Drulis-Kawa, Sérgio Oliveira de Paula, and Jeroen Wagemans. (2023). Isolation and Characterization of the Acadevirus Members BigMira and MidiMira Infecting a Highly Pathogenic *Proteus mirabilis* Strain. *Microorganisms*. 11(9): 2141. doi: [10.3390/microorganisms11092141](https://doi.org/10.3390/microorganisms11092141).