

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»
Кафедра вірусології

Завідувач кафедри професор Ірина БУДЗАНІВСЬКА

Протокол № ____ засідання кафедри

від “ ____ ” _____ 2025 р.

**ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ АКТИВНОСТІ БАКТЕРІОФАГІВ ТА
АНТИБІОТИКІВ ПРОТИ РЕЗИСТЕНТНИХ БАКТЕРІЙ**

Випускна кваліфікаційна робота
студента денної форми навчання
за спеціальністю 091 «Біологія та біохімія»
Ляшенко Семена Олександровича

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

Робота виконана на базі ТОВ “Неопробіокеар-Україна”
під керівництвом доктора філософії, начальниці лабораторії контролю якості
Корнієнко Н.О.

Оцінка захисту роботи

Київ – 2025 р.

ЗМІСТ

ВСТУП	4
РОЗДІЛ 1. Теоретико-методологічні основи використання бактеріофагів для лікування бактеріальних інфекцій.....	5
1.1. Мультирезистентні бактерії	5
1.2. Загальна характеристика бактеріофагів	8
1.3. Загальні аспекти фаготерапії, її переваги та недоліки.....	16
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи досліджень	27
2.1. Культури мікроорганізмів та бактеріофаги	27
2.2. Диско-дифузний метод	288
2.3. Спот-тест для визначення чутливості до бактеріофагів.....	29
2.4. Виділення бактеріофагів із навколишнього середовища	29
2.5. Визначення інфекційного титру виділених бактеріофагів.....	30
2.6. Визначення чутливості ізолятів до виділених бактеріофагів.....	30
2.7. Схема експериментальних досліджень	31
2.8 Статистична обробка отриманих результатів	322
РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та обговорення	33
3.1. Антибіотикорезистентність клінічних ізолятів <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i>	33
3.2. Чутливість клінічних ізолятів <i>Klebsiella pneumoniae</i> до наданих бактеріофагів	355
3.3. Характеристика нововиділених <i>K. pneumoniae</i>	36
3.4. Характеристика до виділених бактеріофагів <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>Pseudomonas</i>	41
3.5 Порівняння сумісної дії антибіотиків з бактеріофагами	42

3.6. Аналіз антибіотикорезистентності клінічних ізолятів	455
3.7. Обговорення результатів	45
ВИСНОВКИ	48
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	49

ВСТУП

Бактеріофаги – це віруси, які вибірково вражають бактеріальні клітини. Історія бактеріофагів включає в себе майже півстолітній досвід комплексних досліджень, що проводяться в різних країнах світу, що дозволяє широко використовувати їх для вирішення багатьох проблем в області мікробіології, вірусології, генетики, біохімії, імунології, радіобіології та біотехнології. Антибактеріальний ефект препаратів бактеріофагів обумовлений впровадженням геному фага в бактеріальну клітину з подальшим його розмноженням і лізисом інфікованої клітини. Бактеріофаги, що вивільнилися в зовнішнє середовище в результаті лізису, повторно заражають і лізують інші бактеріальні клітини, діючи до повного знищення патогенних бактерій у вогнищі запалення. З медичної точки зору препарати-бактеріофаги мають такі безперечні і незаперечні переваги, як висока специфічність їх дії проти штамів господаря, відсутність токсичності, нездатність викликати дисбактеріоз і алергічні реакції. Бактеріофаги можуть застосовуватися як самостійний лікарський засіб або разом з антибіотиками та імунопрепаратами. Тому вивчення бактеріальних вірусів, яке спочатку розвивалося як вузька область медичної та ветеринарної мікробіології, в даний час набуває загальнобіологічне значення. Однак, незважаючи на накопичену велику кількість наукового матеріалу по вивченню біологічних властивостей бактеріофагів, багато питань вимагають додаткових досліджень. Наприклад, у більшості глибоко вивчених модельних фагів Т-серії не вдалося з'ясувати функцію багатьох синтезованих ними продуктів. До сих пір відсутня єдина схема систематики і морфологічної класифікації цих мікроорганізмів, відсутні стандартні набори бактеріофагів багатьох збудників хвороб тварин і людини, а також схеми і регламенти їх застосування.

Мета роботи — Виділити з доквілля бактеріофаги, активні проти клінічних бактерій та дослідити їхню активність при сумісному застосуванні з антибіотиками в умовах *in vitro*.

РОЗДІЛ 1. ТЕОРЕТИКО-МЕТОДОЛОГІЧНІ ОСНОВИ ВИКОРИСТАННЯ БАКТЕРІОФАГІВ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ БАКТЕРІАЛЬНИХ ІНФЕКЦІЙ

1.1. Мультирезистентні бактерії

Мультирезистентний організм – це мікроорганізм, який стійкий до багатьох антибіотиків. Стійкість мікроорганізму до антибіотиків означає, що певні методи лікування не зможуть з ним впоратися або будуть менш ефективними.

Більшість інфекцій, спричинених мультирезистентними мікроорганізмами, поширюються через прямий контакт з біологічними рідинами інфікованої людини, такими як кров, ранові виділення, сеча, кал або мокрота (мокротиння). Також вони можуть поширюватися через обладнання або поверхні, на яких знаходяться ці мікроорганізми. Мультирезистентні мікроорганізми не поширюються простим контактом, наприклад, через дотик або обійми [2].

Складність лікування інфекцій, викликаних мультирезистентними мікроорганізмами, полягає в тому, що багато антибіотиків на них не діють.

Приклади мультирезистентних мікроорганізмів: метицилін-резистентний золотистий стафілокок, резистентні ацинетобактерії.

Інфекції, спричинені мультирезистентними бактеріями, лікують антибіотиками, до яких мікроорганізми, що їх викликали, не стійкі. Ваш лікар підбере ліки (ліки) залежно від того, звідки виникла інфекція та який мікроорганізм її викликав.

Поява мультирезистентних організмів в основному пов'язана з неправильним прийомом антибіотиків. м'яса, наприклад, курей і великої рогатої худоби [5].

На першому етапі лише деякі бактерії можуть пережити дію

антибіотика. Але чим частіше приймаються антибіотики, тим більша ймовірність появи резистентних бактерій.

Якщо концентрація антибіотика, необхідна для пригнічення росту, перевищує певний рівень – граничне значення – то розглянутий антибіотик стає марним як терапевтичний, оскільки граничне значення означає максимальну дозу того антибіотика, яку можна безпечно вводити пацієнтам.

Для опису бактерій, стійких до ряду не пов'язаних між собою класів антибіотиків, був розроблений набір термінів. Ця класифікація обумовлена збільшенням числа класів антибіотиків, до яких бактерії стійкі, від мультирезистентних (MDR), надзвичайно резистентних (XDR) до панрезистентних мікроорганізмів (PDR). Взаємозв'язок між цими класами бактерій ілюструється на діаграмі Венна нижче з визначеннями для кожного з них [1].

MDR (мультирезистентні штами) Нечутливість хоча б до одного лікарського засобу з трьох і більше класів антибіотиків;

XDR (Extremely Resistant Strains) Нечутливість принаймні до одного препарату у всіх класах антибіотиків, крім двох або менше класів;

PDR (пан-резистентні штами) Нечутливість до всіх класів протимікробних препаратів.

Набута антибіотикорезистентність розвивається внаслідок утворення мутацій (резистентний клон) або отримання зміненого генетичного матеріалу від інших бактерій того ж або іншого виду (горизонтальне внутрішньо- або міжвидове поширення). Гени резистентності розташовані на мобільних елементах – плазмідах (окремо від хромосомних молекул ДНК, здатних до автономної реплікації) або на транспозонах (мобільні послідовності ДНК, здатні переміщатися в межах геному) [3].

Мультирезистентні бактерії ускладнили лікування інфекцій як у людей, так і у тварин. Це явище посилюється надмірним і недоцільним використанням антибіотиків в медицині і сільському господарстві, а також перенесенням генів резистентності між різними видами бактерій. Тому поява цих бактерій

викликала гостру потребу в розробці нових терапевтичних та управлінських стратегій.

Інфекції є однією з основних причин ускладнень і смертності серед онкологічних хворих, що пов'язано з їх імунodefіцитним станом, що обумовлено як самою природою захворювання, так і ефектом застосовуваних методів лікування (хіміотерапія, опромінення, застосування протимікробних препаратів). Супутні фактори ризику інфекції включають тривале перебування в стаціонарі та широке використання різних інвазивних медичних пристроїв, таких як катетери, стенти, шунти [6].

В останні роки в структурі бактеріальних інфекцій, виявлених у онкологічних хворих, спостерігається чітка тенденція до збільшення частки мультирезистентних штамів грамнегативних бактерій, особливо серед представників сімейства Enterobacteriaceae (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*), і неферментуючих (*Acinetobacter baumannii* і *Pseudomonas aeruginosa*).

Носії множиннорезистентних бактерій і члени їх сімей повинні дотримуватися особливої гігієни. Мета полягає в першу чергу в тому, щоб захистити від інфекцій людину, інфіковану бактеріями, – пояснює Опікунська рада у справах людей похилого віку (KDA) у Кельні. Тому слід надягати одноразові рукавички, щоб видалити видимі забруднення з крові або фекалій. Бруд видаляють тільки папером, а забруднену ділянку дезінфікують [8].

Слід використовувати готовий до використання дезінфікуючий розчин або ганчірку, змочену в дезінфікуючому засобі. На упаковці має бути зазначено, що продукт внесено до списку Союзу прикладної гігієни (VAH). Цей список є чимось на кшталт знаку високої якості, пояснює KDA у своїй новій брошурі «Боротьба з мультирезистентними бактеріями».

До мультирезистентних бактерій належать метицилін, золотистий стафілокок (MRSA). Носії таких бактерій не хворіють, але якщо їх імунітет з яких-небудь причин ослабне, наприклад, в результаті хіміотерапії або тривалого перебування катетера в сечовому міхурі, вони можуть серйозно захворіти [4].

Мультирезистентні грамнегативні бактерії (бактерії MRGN) — це збірна назва великої групи різних бактерій, які мають різні властивості, але мають одну спільну рису. Вони резистентні, тобто не реагують, на часто використовувані антибіотики. Розрізняють бактерії, стійкі до чотирьох (4MRGN) або трьох специфічних груп антибіотиків (3MRGN). Залежно від групи, бактерії виявляються в шлунково-кишковому тракті тварин і людини або на шкірі; рідше в носоглотці, анальної області, а також на сирих продуктах. Резистентні бактерії особливо поширені там, де використовується велика кількість антибіотиків. Тому в останні роки вони стали зростаючою проблемою при лікуванні хворих в стаціонарах. Тим часом бактерії MRGN живуть в організмі приблизно кожні п'ять чоловік зі ста здорових людей. Здорових людей, в організмі яких є бактерії MRGN, називають носіями MRGN. Однак бактерії для них не є проблемою, оскільки вони захищені від хвороб здоровою імунною системою. Лікування стає необхідним тільки після того, як бактерії MRGN проникли, наприклад, зі шкіри або кишечника в рани або кровотік і стали MRGN-інфекцією [9]

При інфікуванні MRGN можуть розвиватися різні симптоми в залежності від того, де в організмі відбувається інфекція. Можливими ознаками захворювання є лихоманка, ранові інфекції і запалення сечовивідних або дихальних шляхів. Існує також небезпека інфекційних захворювань кровотоку, при яких в кровотік заносяться бактерії. Інфекційні захворювання, спричинені бактеріями MRGN, важче піддаються лікуванню, ніж інфекційні захворювання, спричинені бактеріями, які не мають стійкості до антибіотиків. Вони часто бувають тривалими і характеризуються підвищеною кількістю летальних випадків.

1.2. Загальна характеристика бактеріофагів

Бактеріофаги (фаг, від грец. phagos – пожираючи) – група вірусів, які

паразитують на бактеріях. Бактеріофаги широко поширені в природі і зустрічаються у воді, ґрунті, стічних водах, організмах людини і тварин, а також в бактеріальних культурах.

Бактеріофаги розрізняються за своєю хімічною будовою, типом нуклеїнової кислоти, будовою фагових частинок, морфологією негативних колоній, характером взаємодії з мікробною клітиною. Для позначення бактеріофагів використовуються букви латинського і грецького алфавітів, наприклад, фаги – це добре вивчені фаги кишкової палички λ , ϕ X174, fd, f2, R17, T2.

Як і всі віруси, бактеріофаги в позаклітинній формі є метаболічно інертними частинками. Більшість з них мають добре сформовану головку і хвіст різного ступеня вираженості, іноді з додатковими структурами, що опосередковують адсорбцію фага на бактеріальній клітині (рис. 1). Типова фагова частинка (віріон) складається з головки і відростка (хвоста). Розміри фагів досягають 20-200 нм. Середній діаметр головки - 60-100 нм, довжина відростка - 100-200 нм [11].

Довжина хвоста зазвичай в 2-4 рази перевищує діаметр голови. Голівка містить генетичний матеріал – одноланцюгову або дволанцюгову РНК або ДНК з ферментом транскриптазою в неактивному стані, оточену білковою оболонкою – капсидом. Нуклеїнова кислота і капсид разом складають нуклеокапсид. Хвіст, або відросток, являє собою білкову трубку - продовження білкової оболонки голови, в основі хвоста знаходиться АТФ-аза, яка регенерує енергію для введення генетичного матеріалу. Відросток має вигляд порожнистої трубки, оточеної оболонкою, що містить скоротливі білки. У ряду вірусів оболонка здатна скорочуватися, оголюючи частину стрижня. В кінці процесу у багатьох бактеріофагів з'являється базальна пластинка, від якої відходять тонкі довгі нитки для полегшення прикріплення фага до бактерії.

Т-фаги (англійського типу) є найбільш вивченими. Вони складають Т групу колі-дизентерійних фагів, в яку входять 7 представників: 4 непарних Т1, Т3, Т5 і Т7 і 3 парних Т2, Т4, Т6 [12].

Класичні, так звані «хвостаті» фаги складають основну масу бактеріофагів (96%). Застосування сучасних електронних мікроскопів, а також удосконалення методів приготування препаратів для електронної мікроскопії дозволили більш детально вивчити тонку структуру фагів. З'ясувалося, що вона дуже різноманітна і у багатьох фагів складніша, ніж будова вірусів і ряду вірусів людини і тварин. В даний час існує велика кількість фагів з морфологією, відмінною від класичної. Фаги відрізняються один від одного формою, розмірами, складністю організації, хімічним складом вірусної частинки. Відомо, що фаги лізують мікроорганізми різних груп можуть бути ідентичні за своєю морфологією. У той же час фаги, активні по відношенню до однієї і тієї ж бактеріальної культури, можуть різко відрізнитися за своєю структурою. Таким чином, серед фагів, здатних лізувати різні штами кишкової палички, виявлені всі відомі морфологічні типи фагів [14].

Різноманіття геномів бактеріофагів дуже велике: обсяги генома коливаються від 20 до майже 700 кб, хоча довжина більшості геномів фагів становить близько 50 кб. Найбільшим представником є бактеріофаг G. Його геном довжиною 670 kb є одним з лідерів серед усіх вірусних геномів, в 4 рази більшим за найдрібніший бактеріальний геном.

Більшість досліджених фагів мають дволанцюгову ДНК (λ , T4, Мю, Р-фаги та ін.), Але є групи фагів з одноланцюговою ДНК (ϕ X174, нитчасті бактеріофаги), дво- і одноланцюговою РНК (ϕ 6, MS2). Бактеріофаги, як і інші віруси, складаються з нуклеїнової кислоти і білка. Загальна кількість білка в частинці фага становить 50–60%, нуклеїнових кислот – 40–50%. У хімічному складі деяких фагів виявлена ДНК з незвичайними азотистими основами. Фаг T2 замість цитозину містить 5-гідроксиметилцитозин, а всередині головки фага знаходиться білок, що містить поліаміни (спермін, путресцин). Цей білок відіграє роль у суперспіралі ДНК фага, що сприяє його розміщенню у відносно невеликій голівці. Частинки багатьох фагів під покровом дистальної частини відростка містять фермент лізоцим [16].

Є представники, геном яких сегментований, але в основному геноми

представлені цілими лінійними або кільцевими молекулами нуклеїнових кислот. Сучасна класифікація бактеріальних вірусів заснована на будові частинки фага і характеристиках нуклеїнової кислоти. За даними Міжнародної класифікації та номенклатури вірусів в даний час виділяють 13 сімейств найбільш вивчених бактеріофагів.

Важливою властивістю бактеріофагів є їх специфічність: бактеріофаги, як правило, бактерій певного виду. Відносини між фагом і чутливою до нього клітиною складна і не завжди закінчується лізисом клітини і розмноженням фага в ній. Залежно від специфічності розрізняють одновалентні фаги, які лізують бактеріальні культури певного виду, фаги типу, які лізують окремі штами в межах виду, і полівалентні фаги, які можуть індукувати лізис групи споріднених видів мікроорганізмів. Інфікування клітини, яке закінчується загибеллю клітини і розмноженням в ній фага, називається продуктивною інфекцією. Найважливіша особливість фага полягає в тому, що його розмноження може відбуватися тільки в живих клітинах, що знаходяться в стадії росту і розвитку. У загиблих клітинах, а також в продуктах клітинного метаболізму розмноження фагів не відбувається [13].

За характером взаємодії з мікробною клітиною розрізняють вірулентні і помірні бактеріофаги.

Час від моменту інфікування клітини фагом до лізису клітини називається латентним періодом. Перша половина латентного періоду, під час якої в інфікованій клітині ще не вдається виявити інфекційний фаг, називається латентним періодом. Кожна фаг-бактерієва система в стандартних експериментальних умовах характеризується певними значеннями латентного і латентного періодів. Тривалість цього періоду різна для різних типів фагів в залежності від температури навколишнього середовища, складу навколишнього середовища та інших факторів. Латентний період фагів може становити від 15-40 хвилин до 5 годин і більше. У фагів актиноміцетів латентний період може бути ще довшим. При низьких температурах латентний період значно збільшується.

Бактеріофаг може розвиватися за двома моделями: лізогенним і літичним шляхами. Помірні і вірулентні бактеріофаги мають однаковий цикл розвитку на початкових етапах взаємодії з бактеріальною клітиною. Вірулентні бактеріофаги розвиваються за літичною моделлю, яка включає такі стадії:

- Адсорбція бактеріофага на фаг-специфічних рецепторах клітин. Адсорбція фагів на поверхні клітини бактерій відбувається за допомогою специфічних рецепторів, які розташовані на кінчику нитки, шипа або хвоста. У свою чергу, клітинна стінка бактерії містить свої фагоспецифічні рецептори, які розпізнаються фагом. Рецептори одних фагів розташовані в ліпопротеїдному шарі клітинної стінки, для інших – в ліпополісахаридному шарі. У ряду фагів рецептори розташовуються на джгутиках або пілах. Адсорбція фага є відправною точкою його життєвого циклу. Вона дуже специфічна і тому дає можливість використовувати фаги на практиці, наприклад, для ідентифікації бактерій, а також в лікувальних і профілактичних цілях.

Пластинка з шипами прикріплюється до стінки, що міститься в них лізоцим викликає лізис клітинної стінки в місці контакту. При цьому іони кальцію активують АТФ-азу, що міститься в білках оболонки, і оболонка скорочується. Його довжина зменшується в 2 рази, кількість витків також зменшується в 2 рази. В результаті скорочення оболонки внутрішня паличка пронизує клітинну стінку в області, зруйнованої лізоцимом, і цитоплазматичну мембрану [15].

- Ін'єкція фагової нуклеїнової кислоти в клітину господаря. ДНК фага вводиться в клітину за допомогою наступного: близько 10% її активно вводиться під час скорочення хвостового покриву; інша частина ДНК фага втягується в цитоплазму бактерій за рахунок процесів транскрипції і роботи трансляційного апарату. Білки капсиду залишаються поза клітинною стінкою.

Спільна реплікація фага і бактеріальної нуклеїнової кислоти. Нуклеїнова кислота фага керує синтезом ферментів фага за допомогою білоксинтезуючого апарату бактерії. Фаг так чи інакше інактивує ДНК і РНК

хазяїна, а ферменти фага повністю розщеплюють його; РНК фага «підпорядковує» клітинний механізм синтезу білка. Реплікація геномної ДНК або РНК фага протікає відповідно до загальним механізмом реплікації. Ступінь залежності реплікації ДНК фагів від хромосоми клітини визначається набором генів у фагів. Великі фаги (фаг Т4) розмножуються абсолютно автономно; середні частково потребують допомоги бактеріальних генів, а дрібні (фаг М13) майже повністю залежать від хромосомних генів. Після початку реплікації починається синтез пізніх вірусних інформаційних РНК. В результаті утворюється другий набір вірусоспецифічних білків, що включають субодиниці вірусного капсиду.

Збірка знову синтезованих віріонів являє собою укладення нуклеїнової кислоти фага в білкову оболонку (морфогенез фага). У малих фагів морфогенез протікає за типом самозбірки. У фага Т4 цей процес вимагає активності більше 40 генів і відбувається за участю трьох незалежних ліній. На одному відбувається збірка хвоста (участь 20 генів), на іншому – головки фага (близько 16 генів), на третьому – збірка ворсинок (5 генів). З'єднання хвоста з головою не вимагає участі генів, але воно не може відбутися до тих пір, поки і хвостовий відросток, і голова не будуть повністю встановлені. Таким же чином ворсинки можуть прикріпитися до хвоста тільки після його повного з'єднання з головою. Завдяки суворому генетичному контролю з боку фага забезпечується послідовність і послідовність всіх процесів його внутрішньоклітинного розмноження [17].

- Лізис клітин. Клітина лопається під впливом лізоциму; вивільняється близько 200–1000 нових фагових частинок; Фаги вражають інші бактерії. Вихід знову синтезованих фагів з клітини відбувається:

- 1) брунькуванням (М13 - єдиний фаг, який не викликає загибелі клітини при виході з клітини);

- 2) шляхом лізису клітини зсередини. Він здійснюється лізоцимом і викликає загибель клітин. Лізоцим синтезується у вигляді пізнього вірус-специфічного білка. Він впливає на пептидоглікановий шар клітинної стінки

бактерій, в результаті стінка розривається, і фагове потомство залишає клітину. Іноді лізис бактерій відбувається ззовні, як наслідок адсорбції багатьох фагів на одній клітині, але розмноження фагів не відбувається. Зазвичай після введення генома фага в клітину вона стає несприйнятливою до суперінфекції цим фагом, тобто проникнення інших геномів фагів стає неможливим.

Помірні бактеріофаги після поділу клітин знаходяться в стані профаги (лізогенний шлях). Лізогенез – це здатність бактеріальної культури переносити фаг в особливій неінфекційній формі – профагі – в незліченній кількості поколінь. У формі профага вірус не є патогенним для клітини, зберігаючи, однак, потенційну здатність ставати вірулентним при переході до зрілого (активного) фага. Профаг знаходиться в клітині або в стані, інтегрованому з бактеріальною хромосоною (наприклад, λ , P22), або у вигляді цитоплазматичної частинки, зокрема, профаги P1 і N15 локалізуються в цитоплазмі клітини-хазяїна, утворюючи самостійний реплікон, подібний до бактеріальних плазмід [18].

Бактерії, які містять у своїх клітинах профаг, називаються лізогенними. Лізогенні бактерії можуть лізисувати і вивільняти зрілий фаг (або спонтанно, або при впливі індукуючих факторів: ультрафіолетового випромінювання, іонізуючого випромінювання, лікування деякими кислотами, перекисами, антибіотиками). Найбільш ефективними і широко використовуваними індукторами є ультрафіолетові промені і антибіотик мітоміцин С.

Лізогенізація – це процес переходу бактеріальної клітини в лізогенний стан внаслідок інфікування помірним фагом. Помірні фаги відіграють важливу роль в обміні генетичним матеріалом між бактеріями. Цей процес називається трансдукцією. Розрізняють загальну (узагальнену або неспецифічну) і специфічну трансдукцію.

Ф. д'Ерель припустив, що бактеріофаг розмножується всередині мікробних клітин, в результаті чого в навколишнє середовище потрапляють численні дочірні нащадки. Розмноження бактеріофагів в мікробних клітинах на щільному живильному середовищі проявляється утворенням стерильних

плям або негативних колоній. У рідкому живильному середовищі розмноження бактеріофагів призводить до просвітлення середовища. Пізніше було встановлено, що бактеріофаги розмножуються тільки всередині бактерій певних видів.

Бактеріофаги широко поширені в природі – їх виділяють з води, ґрунту, кишечника людини, тварин і птахів, з їжі, тобто з тих предметів, в яких живуть мікроорганізми. Бактеріофаги можуть потрапляти в зовнішнє середовище з виділеннями хворих, реконвалесцентів і носіїв. У зв'язку з цим бактеріофаги кишкових бактерій є індикаторами фекального забруднення ґрунту і води.

Фаги більш стійкі до дії фізичних і хімічних факторів навколишнього середовища, ніж багато вірусів людини. Більшість з них інактивовані при температурі вище 65-70 °С, добре переносять заморожування і довго зберігаються при низьких температурах і сушінні. Сулема (0,5% розчин), фенол (1,0% розчин) не надають на них інактивуючої дії. При цьому 1,0% розчин формаліну інактивує частинки фага протягом декількох хвилин. Виявлена резистентність бактеріофагів до дії іонізуючого випромінювання та УФ-випромінювання.

Кожен бактеріофаг викликає лізис (розчинення) певного виду бактерій. Тому бактеріофаги позначають буквами латинського або російського алфавіту з числовим індексом, перед яким стоїть назва виду бактерій (наприклад, фаги *E. coli* T2). Фаги лізуючі дизентерійні бактерії називаються дизентерійними бактеріофагами, лізуючі сальмонели – сальмонельозними бактеріофагами, лізуючі дифтерійні бактерії – дифтерійними бактеріофагами і т.д. здатні вражати еукаріотичні клітини.

За спектром літичної дії виділяють такі групи бактеріофагів:

- типові (типоспецифічні) бактеріофаги (Т-фаги) взаємодіють з окремими типами (варіантами) бактерій в межах одного виду;
- моновалентні бактеріофаги (монофаги) взаємодіють з бактеріями того ж виду;
- полівалентні бактеріофаги (поліфаги) взаємодіють з бактеріями

декількох споріднених видів.

За механізмом взаємодії з клітинами бактеріофаги поділяють на вірулентні і помірні. Вірулентні бактеріофаги (літичні бактеріофаги) проникають в бактерії, розмножуються в них і залишають бактеріальну клітину, викликаючи її лізис. Помірні бактеріофаги після проникнення в клітину вставляють свою нуклеїнову кислоту в геном бактерії і не викликають її лізису.

Бактеріофаги мають виражені антигенні властивості. При парентеральному введенні бактеріофагів в організмі утворюються антитіла, які нейтралізують літичну (розчиняючу) активність фага. У той же час дія антифагальних сироваток строго специфічно. Крім того, фаги відрізняються один від одного антигенними властивостями. Групові антигени виявляються в деяких споріднених фагах. Сироватки використовують кроликам, які імунізують підшкірно двічі протягом 3 тижнів. Сироватку звільняють від формених елементів шляхом центрифугування.

1.3. Загальні аспекти фаготерапії, її переваги та недоліки

Для виявлення мікроорганізмів, в тому числі для діагностики інфекційних захворювань (у фаговій діагностиці – метод непрямой діагностики інфекційних захворювань, який полягає у виділенні специфічного фага з організму хворого).

Широке застосування антибіотиків при лікуванні бактеріальних інфекцій призвело до різкого зниження ефективності антибіотикотерапії. Багато ізолятів патогенних бактерій, виділені від хворих і в стаціонарах, є мультирезистентними і швидко набувають стійкості до нових антибіотиків з широким спектром дії. Поширенню знову виниклої резистентності у бактерій сприяють різні способи горизонтального перенесення генів, у тому числі за участю мобільних генетичних елементів [19].

Проблема боротьби з множинно антибіотикорезистентними патогенними бактеріями, що виникла в останні два десятиліття, призвела до необхідності пошуку і розробки нових методів лікування інфекцій, викликаних такими бактеріями. В даний час подібного роду дослідження в різних напрямках проводяться в багатьох лабораторіях по всьому світу.

Традиційно фаготерапія ґрунтується на використанні природних фагів для інфекції та лізису бактерій у місці інфекції. Розвиток біотехнологічних методів в даний час дозволяє розширити можливості фаготерапії за рахунок створення біоінженерних бактеріофагів і використання очищених літичних фагових білків. Дослідження щодо використання таких фагів та їх літичних білків у лікуванні інфекцій, спричинених мультирезистентними бактеріями, показали, що фаготерапія може бути ефективною як як альтернатива, так і як доповнення до лікування антибіотиками.

Фаготерапія є альтернативою антибіотикотерапії. Її переваги та недоліки [19].

Кожен вид антибіотикотерапії, фаг або антибіотик, має свої переваги і недоліки. Щоб фагова терапія пройшла успішно, необхідно швидко і точно виявити збудника, що викликав інфекцію. Суворі специфіка взаємодії фага з господарем, з одного боку, є великою перевагою, з іншого – серйозною перешкодою в боротьбі з патогенним мікроорганізмом. Незважаючи на те, що розроблено ряд молекулярно-генетичних методів, що дозволяють швидко ідентифікувати патогенні бактерії, цей процес призводить до втрати часу до лікування. Потенційно ця проблема вирішується застосуванням фагових коктейлів з розширеним спектром дії на бактерії.

Не всі фаги, здатні інфікувати, розмножуватися, викликати лізис і загибель бактерій, придатні для фагових коктейлів. Непридатними для лікувальних цілей довгий час вважалися так звані помірні фаги, які здатні інтегрувати свій генетичний матеріал в геном інфікованої бактерії і трансдукувати чужорідні гени, в тому числі гени вірулентності і стійкості до антибіотиків. В цілому використовувалися добре охарактеризовані строго

вірулентні фаги з найширшим спектром господарів, які ефективно і бажано швидко розмножуються в клітинах патогенних бактерій. Прогрес у технологіях секвенування та синтетичної біології тепер надає нові можливості для використання помірних фагів у лікуванні інфекційних захворювань

Для виявлення бактеріального забруднення (в індикації фагів, коли наявність фага розглядається як непрямий показник забрудненості досліджуваного матеріалу).

Для подолання вузької специфічності багатьох вірулентних фагів і для повного охоплення патогенних штамів, що викликали те чи інше захворювання, використовуються так звані фагові коктейлі з багатьох бактеріофагів, відібраних з фагових банків. Такі банки безперервно поповнюються знову виділеними фагами, так як бактерії швидко еволюціонують.

Фаги широко поширені в природі, тому виділення і підбір ефективних нових фагів проводиться у відносно короткі терміни, в той час як виділення нових антибіотиків є трудомістким і дорогим процесом. Нові фаги повинні бути охарактеризовані, отримані в достатній кількості, очищені і дозволені для клінічного застосування. Для кожної інфекції використовуються як стандартні, так і індивідуальні коктейлі.

Рецептура фагових коктейлів є більш складним процесом, ніж використання вже наявних стандартизованих коктейлів або складання комбінацій антибіотиків, що обумовлено широким розмаїттям фагів, що зберігаються в банках і знову виділених. Оскільки успіх фаготерапії залежить від складу фагового коктейлю, перевага віддається новому складеному фаготерапії з урахуванням особливостей бактеріальної інфекції та властивостей фагів [16].

У разі важких інфекційних захворювань застосовують також комбінації бактеріофагів і антибіотиків, які підвищують ефективність лікування.

Фаготерапія має ряд переваг, які роблять її привабливою альтернативою антибіотикотерапії. Вище вже згадувалося, що для фагів характерна

специфічність до певних штамів бактерій. При інфікуванні вони не пошкоджують нормальну бактеріальну флору; Знижується ризик вторинного інфікування, що часто спостерігається при застосуванні антибіотиків. Ефективність лікування фагом досить висока в зв'язку з тим, що він зберігається і розмножується до тих пір, поки присутній конкретний господар. Антибіотики зазвичай досить швидко виводяться або розщеплюються. Після лікування інфекції частинки фагів не зберігаються в організмі через відсутність бактеріальних клітин господаря, тоді як антибіотики здатні зберігатися в навколишньому середовищі. Потрапляючи в місце інфекції, експоненціально розмножується фаг досить ефективний при використанні в більш низьких дозах і з більш рідкісною частотою застосування, ніж це потрібно при лікуванні антибіотиками.

Найголовніше, що фаги ефективно вбивають як чутливі, так і стійкі до антибіотиків бактеріальні клітини. Оскільки фаги інфікують тільки бактеріальні клітини і не впливають на клітини ссавців, ризику токсичності для хазяїна немає.

Фаги і антибіотики в своїй дії на бактерії виявляють одну загальну властивість – здатність неминуче викликати утворення резистентних клонів. У процесі еволюції бактерії придбали ряд механізмів, які перешкоджають зв'язуванню фагів, інфекції та реплікації в клітинах.

Адсорбція фагів за допомогою рецепторів поверхні бактеріальної клітини перешкоджають системи, що блокують цей процес (блокування рецепторів, формування позаклітинного матриксу, вироблення конкурентного інгібітора). Розвиток внутрішньоклітинних фагів гальмують системи рестрикції модифікації бактерій, CRISPR-Cas (Clastered Regular Interspaced Short Palindromic Repeats, CRISPR та споріднені гени cas), BREX (виключення бактеріофагів), які розрізають ДНК геномів фагів або блокують реплікацію ДНК [14].

Іншим механізмом резистентності до фагової інфекції є системи виключення суперінфекції, що кодуються іншими профагами в геномі

бактеріальної клітини, які захищають її від інфікування спорідненими фагами . Поява резистентних форм, що є основною проблемою при застосуванні антибіотиків, менш значна у випадку з фагами, так як для подолання цієї резистентності завжди можуть бути використані інші фаги з такою ж специфічністю для господарів. Крім того, було показано, що утворення резистентних до фагору бактерій відбувається набагато рідше, ніж бактерій, стійких до антибіотиків.

Деякі фаги мають вроджену здатність «обманювати» механізми бактеріального захисту за допомогою метилаз, що кодуються фагами. Метилази, зв'язуючись з геномами фагів, порушують їх розпізнавання захисними системами і забезпечують їх виживання і поява фагових частинок з більш широким діапазоном специфічності, ніж батьківський фаг. Такий фаги представляють особливий інтерес для фаготерапії.

В кінці циклу розмноження вірулентні фаги індукують лізис бактерій. Поряд з потомством фагів в навколишнє середовище виділяються і різні продукти життєдіяльності бактерій, такі як ендотоксини грамнегативних бактерій, ліпополісахариди (ЛПС) та інші фактори, пов'язані з патогенністю. Вони можуть ініціювати вроджену імунну відповідь, впливати на вірулентність або викликати побічні ефекти в організмі господаря, такі як запальні процеси, які призводять до пошкодження ряду органів. Для подолання таких наслідків лікування фагами в даний час використовуються генетично модифіковані фаги і препарати літичних фагів [10].

Для профілактики деяких інфекційних захворювань (при фагопрофілактиці – метод профілактики деяких кишкових інфекційних захворювань (бактеріальна дизентерія, холера, сальмонельоз та ін.) за допомогою препаратів бактеріофагів).

Для лікування деяких інфекційних захворювань (у фаготерапії – методі лікування деяких інфекцій за допомогою препаратів бактеріофагів).

Фагова діагностика бактерій проводиться шляхом тестування на фаголіз в рідкому або щільному живильному середовищі. Фагові методи

діагностики використовуються в основному при роботі зі збудниками кишкових і особливо небезпечних інфекцій (дизентерія, черевний тиф, сальмонельоз, холера, сибірська виразка, бруцельоз). Коліфаги є адекватними індикаторами забруднення води колібактеріями, на яких вони паразитують, а також іншими кишковими вірусами, оскільки як коліфаги, так і кишкові віруси є спільним джерелом надходження в навколишнє середовище. Показник наявності коліфагів може бути використаний для оцінки ефективності процесів водопідготовки від вірусного забруднення.

Препарати бактеріофагів випускаються у вигляді таблеток, мазей, аерозолів, свічок і суспензій. Традиційною формою випуску є рідкий лікарський засіб. Широко використовуються такі лікувально-профілактичні культури бактеріофагів: стафілококова, стрептококова, дизентерійна, черевний тиф, сальмонела, коліфаг, протей, синьогнійна паличка. Піобактеріофаг також використовується для зниження частоти бактеріальних ускладнень у пацієнтів; Існують комбіновані препарати, що застосовуються при кишкових інфекціях, інфекціях стрептокової і стафілокової етіології, опіках і травмах, ускладнених гнійним запаленням [12].

Препарати бактеріофагів використовуються в клінічній практиці поряд з антибіотиками. Відомо, що в багатьох випадках фагові препарати перевершують інші антибактеріальні препарати за активністю проти антибіотикорезистентних збудників. Бактеріофаги не викликають несприятливих токсичних і алергічних реакцій і не мають протипоказань.

Застосування препаратів бактеріофагів стимулює активацію специфічних і неспецифічних факторів імунітету, тому фаготерапія особливо ефективна при лікуванні хронічних запальних захворювань на тлі імуносупресивних станів. Бактеріофаги не перешкоджають терапевтичному ефекту інших препаратів (антибіотиків, пробіотиків, синбіотиків) і не чутливі до їх впливу. Показовими за своєю ефективністю є результати поєднання фаготерапії та антибіотикотерапії при асоційованих інфекціях, спричинених мультирезистентними штамми *Pseudomonas aeruginosa* та *Staphylococcus*

aureus.

Таким чином, препарати бактеріофагів вигідно відрізняються від антибіотиків по ряду основних властивостей:

– бактеріофаги високоспецифічні при лікуванні інфекцій, не пригнічують нормальну мікрофлору і не порушують природну рівновагу внутрішнього середовища організму, тобто фаготерапія специфічна;

– бактеріофаги не мають протипоказань до застосування: їх можна призначати вагітним жінкам, годуючим матерям і дітям будь-якого віку, в тому числі недоношеним дітям; – бактеріофаги можна використовувати не тільки для лікування, але і для профілактики бактеріальних інфекцій;

– бактеріофаги не викликають розвитку резистентності у мікроорганізмів;

– бактеріофаги надають стимулюючу дію на гуморальні та клітинні ланки імунітету;

– бактеріофаги не мають токсичної, алергічної та тератогенної дії, що особливо важливо для людей з алергією на антибіотики.

– бактеріофаги ефективні при монотерапії, але також можуть використовуватися в комбінації з іншими препаратами, включаючи антибіотики і пробіотики.

Незважаючи на те, що фаготерапія має досить високу клінічну ефективність при лікуванні хворих на бактеріальні інфекції (80-95%), особливо викликані антибіотикорезистентними штамми мікроорганізмів, вона тривалий час не знайшла широкого застосування в міжнародній клінічній практиці [18].

Бактеріофаги, відкриті в минулому столітті, покликані створити гідну альтернативу антибіотикам при лікуванні багатьох захворювань бактеріального походження, володіючи наступними перевагами:

- бактеріофаги самостійно контролюють своє розмноження, розмножуючись тільки в присутності чутливої культури;
- бактеріофаги мають значно вищу специфічність, ніж антибіотики, що

призводить до найменшої шкоди нормальній мікрофлорі організму і, отже, до зниження ризику виникнення вторинних мікробних інфекцій, що супроводжують дисбактеріоз;

- бактеріофаги можуть знижувати вірулентність навіть резистентних штамів, використовуючи рецептори, що беруть участь у патогенезі бактерій, як мішень для адсорбції;
- відсутність виражених побічних ефектів при проведенні фагової терапії;
- фагову терапію можна застосовувати вагітним і годуючим жінкам, немовлятам, а також людям з алергією на антибіотики;
- бактеріофаги можуть використовуватися в профілактичних цілях: профілактика інфекції при контакті з мікробами, санація лікувальних установ, боротьба з внутрішньолікарняними інфекціями.
- прості у виробництві препарати на основі бактеріофагів, які можуть бути встановлені на місцевому рівні і відповідати потребам конкретної місцевості;
- фагові препарати можуть застосовуватися в комплексі з антибіотиками, що знижує ймовірність виникнення резистентності бактерій;
- препарати місцевої дії на основі бактеріофагів здатні проникати глибоко в тканини і розмножуватися в місці інфекції.

Останнім часом проводяться дослідження, які показують, що фаги завдяки геномній пластичності та швидкому розмноженню еволюціонують разом зі своїми бактеріальними господарями та набувають здатності долати системи бактеріального захисту (гени Anti-CRISPRs, Anti-BREV). Вони здатні мутувати, здійснювати геномні перебудови і обмінюватися генетичним матеріалом з іншими фагами або бактеріями [19].

Багато патогенних бактерій існує в організмі інфікованого хазяїна у вигляді біоплівки, що представляють собою складні утворення, що характеризуються специфічною просторовою організацією, наявністю позаклітинних полімерних утворень, підвищеною толерантністю до

протимікробних засобів. Утворення бактеріальних біоплівок відбувається спонтанно на інертних і біоматеріалах і є надзвичайно важливим для виживання бактерій та їх патогенності. Бактерії біоплівки стійкі до захисних сил хазяїна та антибіотикотерапії. Завдяки цьому вони часто є причиною багатьох важко піддаються лікуванню хронічних захворювань.

Взаємодія фагів з уже сформованими біоплівками є відносно складним і різноманітним процесом. Це залежить від ряду причин, зокрема від бактеріальних штамів, що використовуються як хазяїни фагів, характеристик фагів, структури та складу біоплівки. Першим, найважливішим етапом фагового інфікування бактеріальних клітин є адсорбція частинок фага на поверхні клітини за участю специфічних рецепторів. У випадку з планктонними бактеріями рецептори повністю доступні для фагів, оскільки вони не оточені матрицею EPS, що створює проблему для зв'язування фагів з рецепторами, як це має місце в бактеріях з біоплівкою. Наявність такої матриці в біоплівках разом зі зниженим метаболізмом клітин біоплівки та розмноженням фагорезистентних клонів у межах біоплівки створює основні обмеження у застосуванні фаготерапії при лікуванні захворювань, спричинених біоплівками.

Багато фаги здатні долати такі бар'єри за рахунок потрапляння в матрикс біоплівки частинок, що виробляють ферменти, що руйнують позаклітинний полімер. Існує три категорії гідролітичних ферментів, що кодується фагами, які здатні впливати на біоплівки.

1. Ферменти, що гідролізують позаклітинні полімерні речовини біоплівки;
2. Ферменти, що розщеплюють капсулу бактеріальної стінки;
3. Ферменти, що розщеплюють клітинну стінку бактерій.

Бактеріофаги здатні досягати фагових рецепторів і ініціювати продуктивну фагову інфекцію [16]. Нащадки фагів, що вивільняються в кінці літичного циклу, послідовно викликають загибель бактерій в більш глибоких шарах біоплівки. Ферменти, що розкладають матеріал бактеріальних капсул,

повинні сприяти просуванню фага до окремих і асоційованих бактерій.

Оскільки не всі бактеріофаги мають здатність синтезувати деполімерази та інші ферменти, що викликають руйнування біоплівки, в даний час використовуються методи генної інженерії для отримання модифікованих фагів, які включають гени ферментів, що розщеплюють EPS.

Для підвищення ефективності фаготерапії при біоплівкових інфекційних захворюваннях використовуються різні методи, включаючи рецептуру фагових коктейлів, комбінації фагів з антибіотиками або іншими протимікробними препаратами, механічне пошкодження біоплівок, а також використання генної інженерії для цілеспрямованої модифікації фагів.

Препарати, що містять кілька фагів з різним діапазоном хазяїна і різною специфічністю до бактеріальних рецепторів, відомі як «фагові коктейлі», створені для розширення спектра їх активності і запобігання виникненню фагорезистентних бактеріальних варіантів. Ряд досліджень показав, що лікування інфекцій біоплівки такими препаратами призводить до зменшення бактеріальної біомаси в уже сформованих біоплівках, в інших випадках до запобігання утворенню біоплівки [17].

Поєднання фагів з антибіотиками або антисептиками є ще однією стратегією використання фагів в якості терапевтичних засобів. Вона досить детально вивчена в дослідженнях з використанням як планктонних культур бактерій, так і біоплівок. У більшості випадків була показана підвищена антибактеріальна активність таких комбінацій в порівнянні з застосуванням тільки одного фага, одного антибіотика або антисептика. Зазвичай спостерігається синергетичний (підсилюючий) ефект, що призводить до швидкого видалення патогенних бактерій при використанні сублетальних концентрацій антибіотиків і фагів, часто з підвищенням вірулентності фагів. На тваринних моделях було показано, що таке лікування є профілактичним проти утворення резистентних бактерій.

Деякі з антибіотиків здатні блокувати клітинний цикл бактерій, що призводить до збільшення розмірів клітин, швидкого розмноження в них фагів

і їх швидкого вивільнення в результаті лізису клітин. Успіх комбінації залежить від підбору фагів, бактерій та антибіотиків. Той факт, що фаги і антибіотики по-різному діють всередині бактеріальних клітин, дає цьому виду терапії перевагу перед застосуванням фагових коктейлів з однаковими способами дії фагів проти появи резистентних бактеріальних мутантів.

Одним з перспективних напрямків у фаготерапії є використання фагових білків з антибактеріальним потенціалом. До них відносяться фагові ферменти, такі як ендолізени, віріон-асоційовані лізини (VALs) і полісахариддеполімерази. Ендолізени – це літичні ферменти, які використовуються фагами в кінці циклу реплікації для деградації пептидоглікану (PG), що призводить до швидкого лізису бактеріальних клітин і вивільнення фагового нащадка.

Однак не всі лізини однаково ефективні в терапевтичному плані. Спроби оптимізувати їх за допомогою біоінженерії виявилися перспективними в ряді випадків.

Іншими перспективними фаговими білками для використання в якості антимікробних засобів є полісахариддеполімерази, які розпізнають, зв'язують і розкладають полісахаридні сполуки, забезпечуючи доступ до раніше недоступних фагових рецепторів на поверхні бактеріальних клітин.

Завдяки високій специфічності деполімераз досягається руйнування бактерій і бактеріальних біоплівочок без пошкодження корисної мікробної флори в організмі людини. Бактеріофаги з деполімеразною активністю виявляють високий ступінь активності щодо бактерій-мішеней, оскільки ці ферменти беруть участь у багатьох процесах, допомагаючи фагам адсорбуватися, проникати в бактеріальні клітини та викликати деградацію клітин і біоплівочок. Очікується, що деполімерази також зроблять значний внесок у фагову терапію.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Культури мікроорганізмів та бактеріофаги

Клінічні штами *K. pneumoniae* 181, *K. pneumoniae* 198, *K. pneumoniae* 264, *K. pneumoniae* 339, *K. oxytoca* 242, *P. aeruginosa* 222, *P. aeruginosa* 224, *E. cloacae* 98, *E. cloacae* 147, *E. cloacae* 151, *E. cloacae* 273, *E. cloacae* 131, *E. cloacae* 153, *P. mirabilis* 104, *P. mirabilis* 240, *A. baumannii* 102, *A. baumannii* 139. були отримані з колекції Інституту травматології та ортопедії НАМН України. Для культивування вищезазначених бактеріальних культур використовували триптон-соевий бульйон (для нічних культур бактерій) та триптон-соевий агар. Зразки бактерій були посіяні на свіжий поживний агар і інкубували протягом 24 годин при 37°C. За допомогою регулярного субкультивування підтримували життєздатність і чистоту організмів.

Бактеріофаги, для визначення спектру чутливості отриманих бактеріальних культур *Klebsiella pneumoniae* були отримані з колекції ТОВ «НПБК-Україна» та виділено зі стічної води.

Для визначення чутливості ізолятів *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter baumannii* до антибіотиків диско-дифузійним методом використовували диски просочені антибіотиками (HIMEDIA). Для проведення вищезазначеного тесту використовували агаризоване середовище McConkey agar.

Стічні води для виділення фагів з навколишнього середовища були надані Бортницькою станцією аерації.

2.2. Диско-дифузний метод

Для визначення чутливості ізолятів було використано диско-дифузний метод. Кожен ізолят висівали штрихом на агаризоване середовище McConkey agar, після чого чашку Петрі ділили на сектори, та на кожен відповідний сектор наносили диски просочені антибіотиком (HIMEDIA). При проведенні даного тесту було використано такі антибіотики комерційного виробництва: ципрофлоксацин, доксициклін, цефепім, амікацин, гентаміцин, цефтріаксон, амріцилін сульбактам, амоксицилін клавуланат, піперацилін тазобактам, цефепім, цефотаксим, цефтазидим, цефтазидим авібактам, цефтріаксон, доріпенем, імipенем, меропенем, азтреонам, ципрофлоксацин, левофлоксацин, амікацин, гентаміцин, тобраміцин, ко-тримоксазол, коломіцин, цефоперазон, цефоперазон сульбактам.

Для оцінки резистентності бактерій до антибіотиків застосовували диско-дифузійний метод Кірбі-Бауера. На агаризоване середовище Мюллера-Хінтона засівали нічну культуру бактерій і розміщували диски, просочені антибіотиками у високій концентрації (виробник HIMEDIA). Досліджували антибіотики: імipенем, цефепім, амікацин, цефтріаксон, хлорамфенікол, меропенем, доксициклін, ципрофлоксацин. Чутливість бактерій до антибіотиків визначали за діаметром зони пригнічення росту (у мм), що вказує на сприйнятливість або стійкість бактерій до препарату.

Для вивчення стійкості відібрали зразки бактерій *P. aeruginosa*, на яких тестували дію бактеріофагів за допомогою спот-тесту відповідно до вказаного протоколу.

Для аналізу резистентності до комбінованої дії антибіотиків і бактеріофагів використовували диски з антибіотиками разом із бактеріофагами. На чашки Петрі з середовищем Мюллера-Хінтона засівали бактеріальну культуру з додаванням бактеріофагів у верхній шар поживного середовища, після чого на поверхню розміщували диски з антибіотиками.

Чашки інкубували при 37°C протягом 12 годин, результат оцінювали за

діаметром зон лізису (мм) навколо диска з антибіотиком та визначали чутливість кожного ізоляту відповідно до державних стандартів.

2.3. Спот-тест для визначення чутливості до бактеріофагів

Визначення чутливості ізолятів *K. pneumoniae* 181, *K. pneumoniae* 198, *K. pneumoniae* 264, *K. pneumoniae* 339, *K. oxytoca* 242, *P. aeruginosa* 222, *P. aeruginosa* 224, *E. cloacae* 98, *E. cloacae* 147, *E. cloacae* 151, *E. cloacae* 273, *E. cloacae* 131, *E. cloacae* 153, *P. mirabilis* 104, *P. mirabilis* 240, *A. baumannii* 102, *A. baumannii* 139. До бактеріофагів отриманих від «НПБК-Україна» проводили шляхом спот-тесту. Для цього змішували розплавлене триптон-соєве середовище (0,7% агару) із 100 мкл бактеріальної культури та наносили на чашки Петрі з трипто-соєвим середовищем (1,4% агару). Після застигання, чашку Петрі ділили на сектори та наносили зразки наданих фагів (5 мкл). Результат оцінювали після інкубації протягом 12 годин при 37°C. Позитивним результатом вважали наявність зон лізису.

2.4. Виділення бактеріофагів із навколишнього середовища

Для виділення бактеріофагів використовували зразки стічних вод з очисних споруд м. Києва. Для цього дослідження було відібрано чотири зразки води з Бортницької станції аерації. Проби води були зібрані в стерильні пробірки об'ємом 50 мл і зберігалися при температурі 4°C. Перед відбором проб вода на місцях забору була ретельно перемішана.

Після проведення відбору зразків стічних вод, останні очищалися за допомогою низькошвидкісного центрифугування в режимі 4900 об/хв, протягом 40 хвилин. Після, відбирали надосад та проводили додатковий етап очистки з використанням бактеріального фільтра, для звільнення від

бактеріального дебрису.

Проводили виділення фагів із очищених стічних вод з використанням методу подвійних агарових шарів (Грація). Для цього, підготували суміш триптон-соевого агару (вміст агару 0,7%), бактеріальної культури *Klebsiella pneumoniae* та 700 мкл отриманого супернатанту.

Цю суміш виливали на чашки Петрі з трипто-соевим агаром, що містить 1,4% агару. Після застигання верхнього шару агару чашки Петрі інкубували при 37°C протягом 12 годин.

Так, для деяких зразків спостерігали наявність ізольованих негативних колоній, матеріал з яких вищеплювали та переносили у мікропробірку з 1 мл буферного розчину.

2.5. Визначення інфекційного титру виділених бактеріофагів

Визначення інфекційного титру виділених бактеріофагів визначали шляхом спот-тесту. Методика даного тесту подібна до описаної в пункті роботи 2.3., проте на сектори наносили різні розведення одного бактеріофага. Для цього проводили серійні розведення, так, у лунки 96-лункового планшету вносили 180 мкл буферного розчину та в першу лунку вносили 20 мкл, піпетували та переносили 20 мкл із першої у другу і так далі.

Різні розведення наносили на відповідний сектор двошарового агару та залишали на 10 хвилин при кімнатній температурі, згодом інкубували при 37°C протягом 12 годин. Інфекційний титр визначали як останнє розведення при якому спостерігається формування зони лізису.

2.6. Визначення чутливості ізолятів до виділених бактеріофагів

Для оцінки спектру хазяїв бактеріофагів, виділених зі стічних вод,

використовували культури бактерій: *K. pneumoniae* 181, *K. pneumoniae* 198, *K. pneumoniae* 264, *K. pneumoniae* 339, *K. oxytoca* 242. *P. aeruginosa* 222, *E. cloacae* 224, *E. cloacae* 98, *E. cloacae* 147, *E. cloacae* 151, *E. cloacae* 273, *E. cloacae* 131, *E. cloacae* 153, *P. mirabilis* 104, *P. mirabilis* 240. *A. baumannii* 102, *A. baumannii* 139. Для цього 3 мл 0,7 % теплого (48-50 °C) верхнього агару змішували з 100 мкл кожної бактеріальної культури в різних стерильних пробірках і розливали на окремі чашки Петрі зі свіжим твердим поживним агаром (1,4%). Після застигання верхнього шару агару вносили 5 мкл кожного виділеного фага на відповідний сектор.

2.7. Схема експериментальних досліджень

Отже, для проведення експерименту культивували ізоляти *K. pneumoniae* 181, *K. pneumoniae* 198, *K. pneumoniae* 264, *K. pneumoniae* 339, *K. oxytoca* 242. *P. aeruginosa* 222, *E. cloacae* 224, *E. cloacae* 98, *E. cloacae* 147, *E. cloacae* 151, *E. cloacae* 273, *E. cloacae* 131, *E. cloacae* 153, *P. mirabilis* 104, *P. mirabilis* 240. *A. baumannii* 102, *A. baumannii* 139. Після цього проводили визначення чутливості даних культур до дії різних антибіотиків шляхом диско-дифузного методу (Рис. 2.1.).

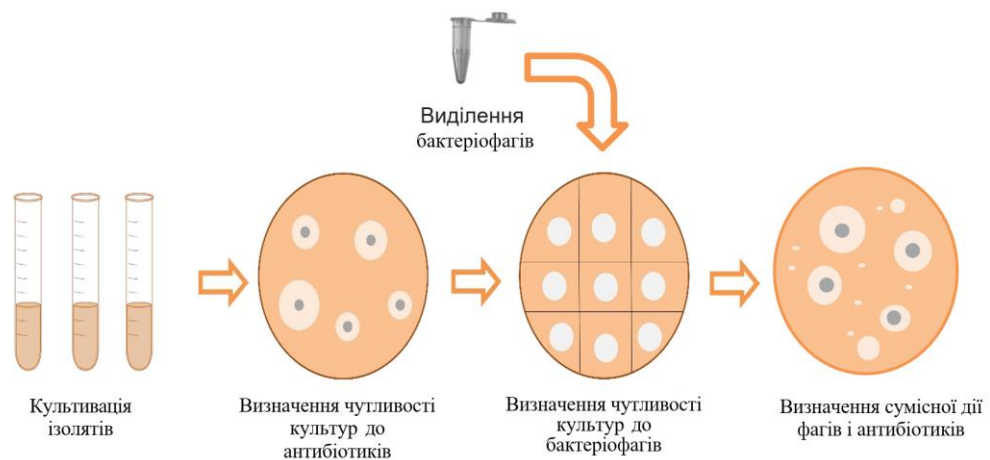


Рис 2.1. Схема, що демонструє основні етапи експерименту

Наступним етапом, визначали чутливість вищезазначених ізолятів бактерій до фагів, наданих ТОВ «НПБК-Україна». Після проводили виділення фагів із навколишнього середовища, з використанням культури *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, що виявилась як антибіотико- так і фагорезистентною (Рис. 2.1.).

2.8 Статистична обробка отриманих результатів

Статистичну обробку результатів проводили стандартними методами у програмі Microsoft Excel (Windows 11). Визначали стандартну похибку при вимірюванні діаметру зон лізису, утворених в результаті проведення диско-дифузного тесту, для визначення чутливості/резистентності клінічних штамів до антибіотиків.

Продовження таблиці 3.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Цефтазидим авібактам	-	-	-	-	-	-	-	-
Цефтріаксон	-	-	-	-	-	-	-	-
Доріпенем	-	-	-	-	-	-	-	-
Іміпенем	-	-	-	-	-	-	-	-
Меропенем	-	-	-	-	-	-	-	-
Азтреонам	-	-	-	-	-	-	-	-
Левофлоксацин	-	-	-	-	-	-	-	-
Амікацин	-	-	-	-	-	-	-	-
Гентаміцин	-	-	-	-	-	-	-	-
Тобраміцин	-	-	-	-	-	-	-	-
Ко-тримоксазол	-	-	-	-	-	-	-	-
Коломіцин	+	+	+	+	+	+	+	+
Цефоперазон	-	-	-	-	-	-	-	-
Цефоперазон сульбактам	-	-	-	-	-	-	-	-

K.p – *Klebsiella pneumoniae*;

E.c – *Enterobacter cloacae*;

A.b – *Acinetobacter baumannii*.

Статус бактерії (чутлива, умовно чутлива, резистентна) визначали відповідно до діаметру зони пригнічення росту для кожного антибіотика. У таблиці (Додаток А) наведено дані про антибіотикорезистентність клінічних ізолятів.

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».

3.2. Чутливість клінічних ізолятів *Klebsiella pneumoniae* до наданих бактеріофагів

В результаті проведення спот-тесту було проведено визначення чутливості ізолятів *Klebsiella pneumoniae* 181, *K. pneumoniae* 339, *K. pneumoniae* 264, *K. pneumoniae* 198 до бактеріофагів отриманих від «НПБК-Україна».

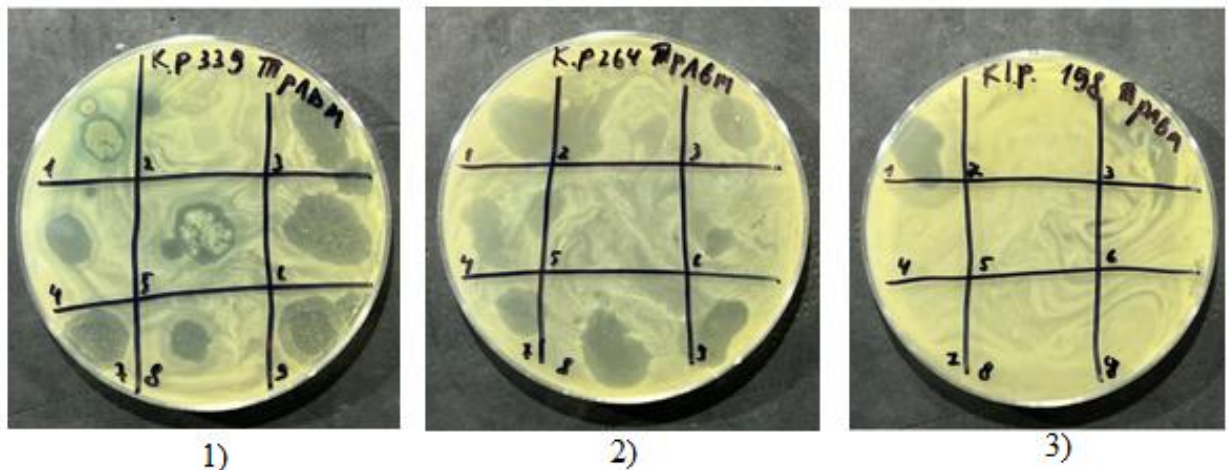


Рис. 3.1. Результат спот-тесту для визначення спектру чутливості бактеріофагів, де: 1) *K. pneumoniae* 339; 2) *K. pneumoniae* 264; 3) *K. pneumoniae* 198

Визначили, що ізоляти *K. pneumoniae* 339 та *K. pneumoniae* 264 були чутливими до кожного з 9 наданих зразків бактеріофагів, в той час як клінічний ізолят *K. pneumoniae* 198 був резистентний до 8 тестових бактеріофагів і чутливий лише до одного. Таким чином, вищезазначений ізолят виявився як фаго- так і антибіотикорезистентним (Рис. 3.1.).

Ореол навколо бляшки вказує на декапсуляцію бактеріальної клітини-хазяїна під впливом виробленого фагом розчинного ферменту, такого як деполімераза (Рис. 3.1., 1). Нечітке кільце вказує на те, що фаг виробляв фермент деполімеразу, який проникнув крізь шар агару і руйнував бактеріальний капсульний полісахарид капсульний полісахарид (КПС) на різні олігосахаридних компонентів. Індукована фагом деполімераза позитивно

впливає на поглинання фага поверхнею бактеріальної клітини. Ці ферменти можуть бути пов'язані з частинками фага як вільні ферменти, що утворюються під час проліферації та літичного циклу фага або як вільний, так і зв'язаний фермент [40, 41].

3.3. Характеристика нововиділених *K. pneumoniae*

Для виділення бактеріофагів із стічних вод було використано культуру бактерії *Klebsiella pneumoniae 181*, що була надана спеціалістами ДУ Інституту травматології та ортопедії НАМН України, у зв'язку з резистентністю даного ізоляту, як до антибіотиків, так і до наданих бактеріофагів.

Для виділення бактеріофагів використовували зразки стічних вод з очисних споруд м. Києва. Для цього дослідження було відібрано чотири зразки води з Бортницької станції аерації. Було відібрано 4 зразка стічних вод, що очищались, як описано вище (Табл. 3.2.). Після проведення виділення фагів методом подвійних агарових шарів було відібрано 8 зразків негативних колоній з різними морфологічними характеристиками.

Таблиця 3.2

Результат спот-тесту різних зразків води

Зразок води	Спот-тест	Примітки
№ 1	-	Вода світла без домішок
№ 2	-	Вода світла без домішок
№ 3	+	Вода темного кольору з твердими домішками
№ 4	-	Вода світла з твердими домішками

Необхідно зазначити, що негативні колонії формувались лише з використанням зразка стічної води №3, тоді як інші 3 зразки не формували жодної літичної зони. Однією з причин такого сценарію може бути різниця в чисельності бактерій-хазяїв у місцях відбору зразків, оскільки бактеріофаги є обов'язковими паразитами, а їхнє проліферація бактеріофагів залежить від росту бактерій-хазяїв [36]. Якщо бактерії-господарі присутні в меншій щільності у вихідних зразках води, менше шансів для специфічних фагів хазяїна взаємодіяти один з одним і послідовно проліферація фагів може не відбуватися, оскільки для більшості фагів успішне розмноження вимагає принаймні $\sim 10^3$ - 10^4 КУО/мл [37].

Більше того, Podschun та ін. [33] виявили, що вид *Klebsiella* присутній не у всіх водоймах. Лише половина (53 %) зразків містили бактерії *Klebsiella*, причому *Klebsiella pneumoniae* була найпоширенішим видом (52 % від загальної кількості виділених зразків), а також присутнім у дуже низькій щільності (1-5 КУО на 250 мл).

Якщо *Klebsiella pneumoniae* в місці відбору проб №1, №2 і №4 була присутня в недостатній щільності то фаг не міг проліферувати і зберігався в низькій кількості. З іншого боку, зразок води № 3 був взятий з каналізаційної труби, розташованої всередині на Бортницькій станції аерації, де бактерії-господарі, найімовірніше, є в надлишку.

Спостерігаючи за морфологією бляшок, виявлених під час аналізу бляшок під час ізоляції, лише прозорі бляшки розглядалися для подальшої ізоляції, оскільки прозора зона свідчить про повний лізис усіх бактерій в межах області. Отже, фаг, присутній у цій зоні, був літичним. Після кожного успішного зараження і реплікації фага, він викликав лізис клітини-хазяїна і вивільняв велику кількість прогеніфагів, які, в свою чергу, інфікували навколишні бактерії і повторювали цикл, збільшуючи зону лізису. Однак, всі прозорі бляшки не мали однакового розміру. Ця різниця в розмірі бляшок вказує на присутність у зразку води більш ніж одного типу фага.

Фізичний розмір фага також впливає на загальний розмір бляшки, яку

він продукує. Оскільки менший фаг має менший фізичний розмір, він легше і швидше дифундує крізь напівтвердий агар, утворюючи зону лізису. У той час як більшому фагу буде складніше дифундувати, отже, він буде утворювати менший розмір бляшки [39]. Таким чином, фаг був відібраний і виділений з води зразка, який утворював найбільший розмір бляшок, припускаючи, що ізолюваний фаг мав менший фізичний розмір, що важливо для досягнення більш ефективного лізису організму-хазяїна *Klebsiella pneumoniae*.

Необхідно також додати, що серед 8 відібраних зразків 3 не формували негативних колоній при наступних пасажах. Тому подальшу роботу проводили зі зразками виділених фагів №1, №4, №6, №7, №8.

Бактеріофаги титрували на двошаровому агарі за допомогою спот-тесту, як описано вище. Вихідний фаголізат піддавали серійному розведенню в буферному розчині до 10^{-10} від початкової концентрації.

Так, зразки фагів після накопичення, центрифугування та фільтрування (0.22 мкм фільтр) мали інфекційні титри 10^9 для № 1; 10^8 – для № 4, № 6, № 7, № 8.

Визначення спектру чутливості виділених бактеріофагів до клінічних штамів бактерій

Виділені фаги досліджувались на предмет їх літичної здатності проти різних видів хазяїв. Клінічні штами *K. pneumoniae* 339, *K. pneumoniae* 264, *K. pneumoniae* 198 були перевірені на співпадіння спектрів чутливості до виділених бактеріофагів (№ 1,4,6,7,8) за допомогою спот-тесту.

За результатами виділені фаги (№ 1,4,6,7,8) виявилися здатними лізувати всі 3 із представлених ізолятів *Klebsiella pneumoniae*. На ізоляті *K. pneumoniae* 339 був найбільш активним і утворив 8 зон лізису; на ізоляті *K. pneumoniae* 264 – 6 зон лізису; на ізоляті *K. pneumoniae* 198 – 2 зони лізису.

Було встановлено, що клінічні штамми *K. pneumoniae* 339, *K. pneumoniae* 264, *K. pneumoniae* 198 є чутливими до всіх 5 виділених фагів (Табл 3.3.).

Таблиця 3.3

Результат визначення спектру чутливості виділених бактеріофагів до клінічних штамів бактерій

Виділений бактеріофаг	Клінічний штам <i>K. pneumoniae</i>		
	339	264	198
1	+	+	+
4	+	+	+
6	+	+	+
7	+	+	+
8	+	+	+

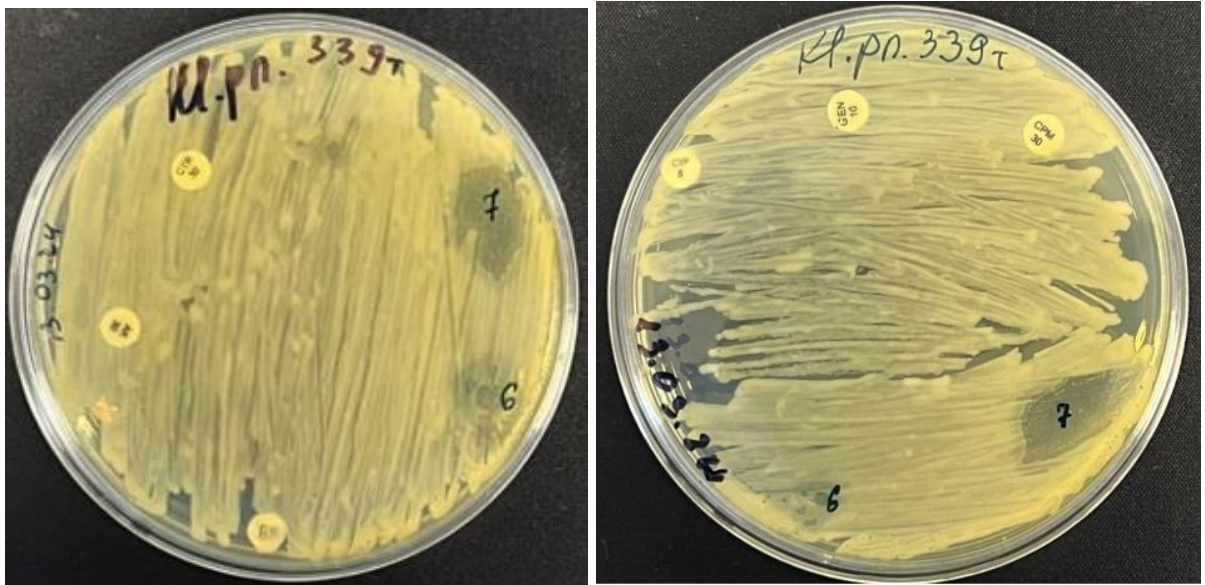


Рис. 3.2. Чутливість клінічного ізолята *K. pneumoniae* 339 до ряду антибіотиків та зразків виділених фагів №6 та №7



Рис. 3.3. Чутливість клінічного ізолята *K. pneumoniae* 264 до ряду антибіотиків та зразків виділених фагів №4 та №8

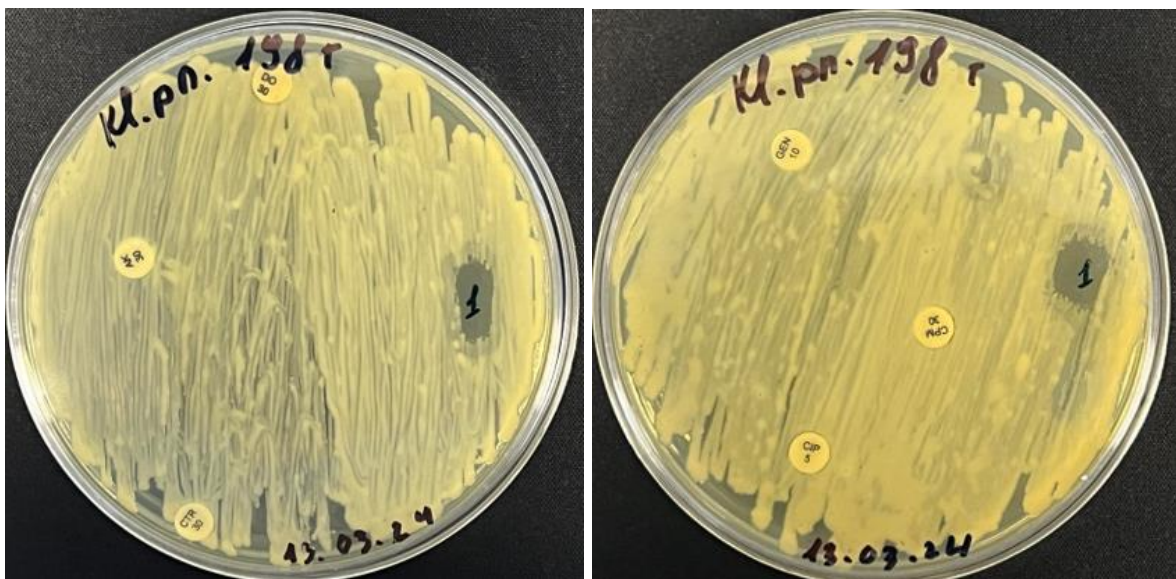


Рис. 3.4. Чутливість клінічного ізолята *K. pneumoniae* 198 до ряду антибіотиків та зразку виділеного фагу №1

На рисунках продемонстровано чутливості бактеріальних культур *K. pneumoniae* 339, *K. pneumoniae* 264, *K. pneumoniae* 198 як до деяких із протестованих антибіотиків, так і до виділених фагів (Рис. 3.2.-3.4.). Було підтверджено, що досліджувані фаги мають потенціал до використання в

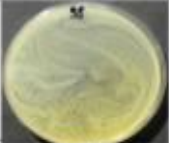




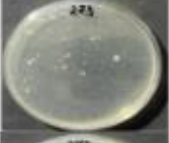


терапії пацієнтів у майбутньому, в той час як антибіотики виявились неефективними.

3.4. Характеристика до виділених бактеріофагів *Enterobacter cloacae*, *K. oxytoca*, *Pseudomonas*

На моделі цих фагів проводили порівняння методів збагачення та без збагачення.

Таблиця 3.4

Порівняння чутливості клінічних ізолятів після збагачення

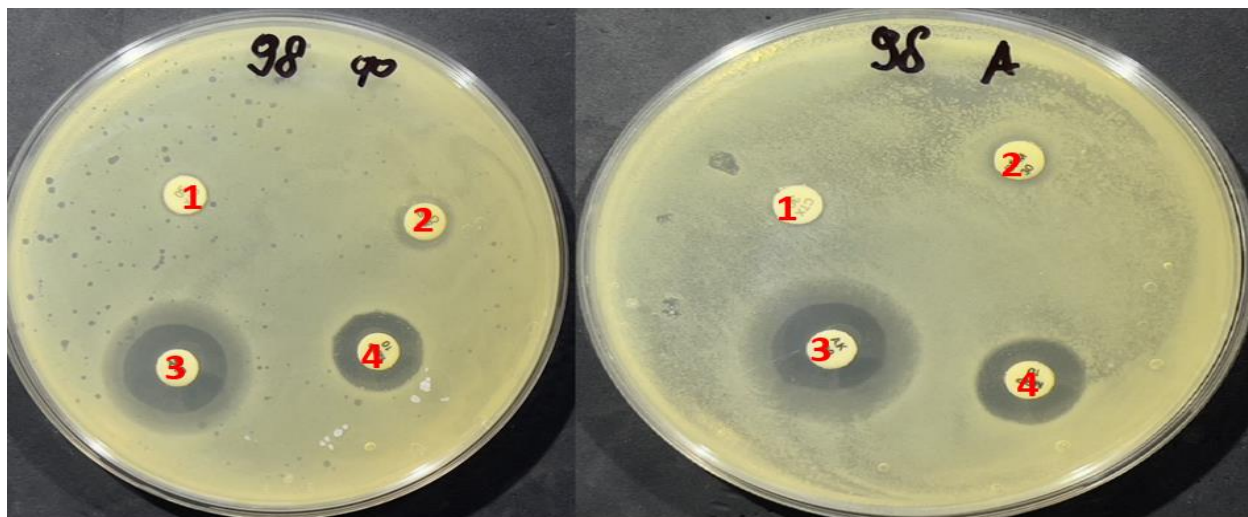
	До збагачення		Після збагачення	
<i>E. cloacae</i> 98	-		250+ негативних колоній	
<i>E. cloacae</i> 147	-		150+ негативних колоній розміром 3-4 мм	
<i>E. cloacae</i> 151	3-5 негативних колоній		100+ негативних колоній	
<i>E. cloacae</i> 273	1 негативна колонія		Суцільний лізис	
<i>K. oxytoca</i> 242	50 негативних колоній дрібних та є великі		Суцільний лізис	

Намагалися виділити бактеріофаги *Pseudomonas*, *Enterobacter cloacae*, *K. oxytoca*. Як виявилось, метод з збагаченням виявився найефективнішим. Для кожного бактеріофага було отримано чисту лінію, шляхом п'ятиразового пересівання вмісту відокремлених негативних колоній, що дозволило

забезпечити високу специфічність та однорідність популяції фагів. Цей методичний підхід спрямований на усунення можливих контамінацій та підвищення стабільності властивостей фагів, що є критично важливим для подальших досліджень та практичного застосування. У процесі виділення бактеріофагів зразки були багаторазово перевірені на чистоту та здатність лізувати цільові бактерії, що дозволяє гарантувати точність результатів під час експериментів. Для ізолятів бактерій *Enterobacter cloacae* з номерами 98, 147, 151 та 273 були виділені специфічні бактеріофаги, кожен з яких демонструє активність щодо відповідних штамів. Це відкриває можливості для подальшого вивчення їх лізисної активності та потенційного використання у фаготерапії або біотехнологічних процесах.

3.5 Порівняння сумісної дії антибіотиків з бактеріофагами

Проведення досліджень щодо сумісного впливу антибіотиків і бактеріофагів є вкрай необхідним у зв'язку зі зростаючою стійкістю бактерій до антибактеріальних препаратів. Тому вирішили перевірити вплив одночасної дії фагів та антибіотиків на ріст чотирьох бактерій – *Enterobacter cloacae* 98, *Klebsiella oxytoca* 242, *Enterobacter cloacae* 151, *Enterobacter cloacae* 147 (Рис. 3.5.-3.8.).

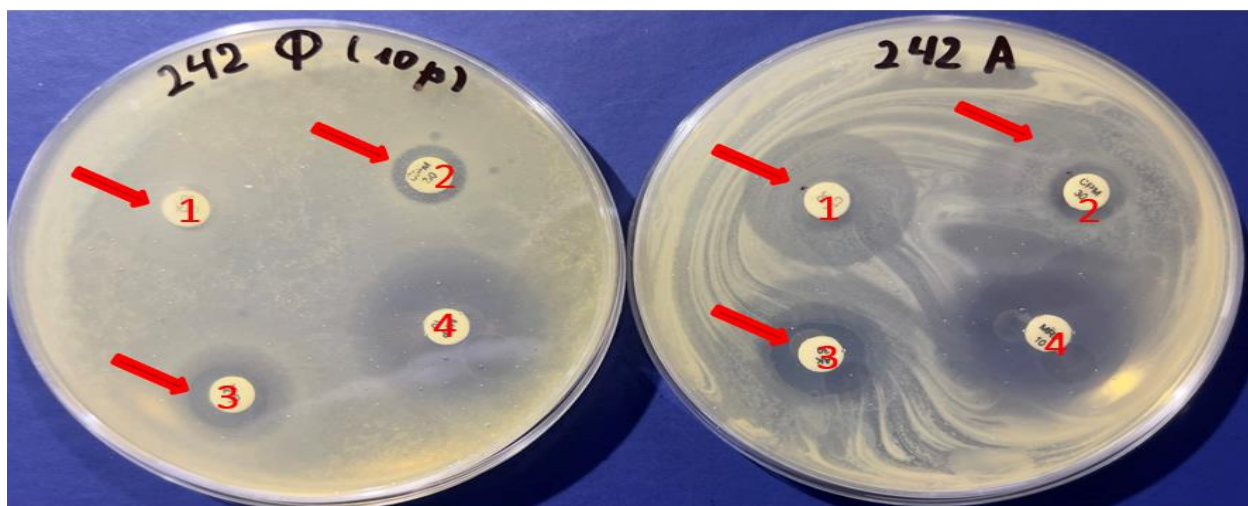


Enterobacter cloacae 98
(Ф) Бактеріофаг

Enterobacter cloacae 98
(А) Антибіотик

Рис 3.5. Дослідження сумісної дії фагів та антибіотиків на ріст бактерії *Enterobacter cloacae* 98

- 1 - Цефотаксим (СТХ 30) 2 - Цефепім (СРМ 30)
3 - Амікацим (АК 30) 4 - Меропенем (МРР 10)

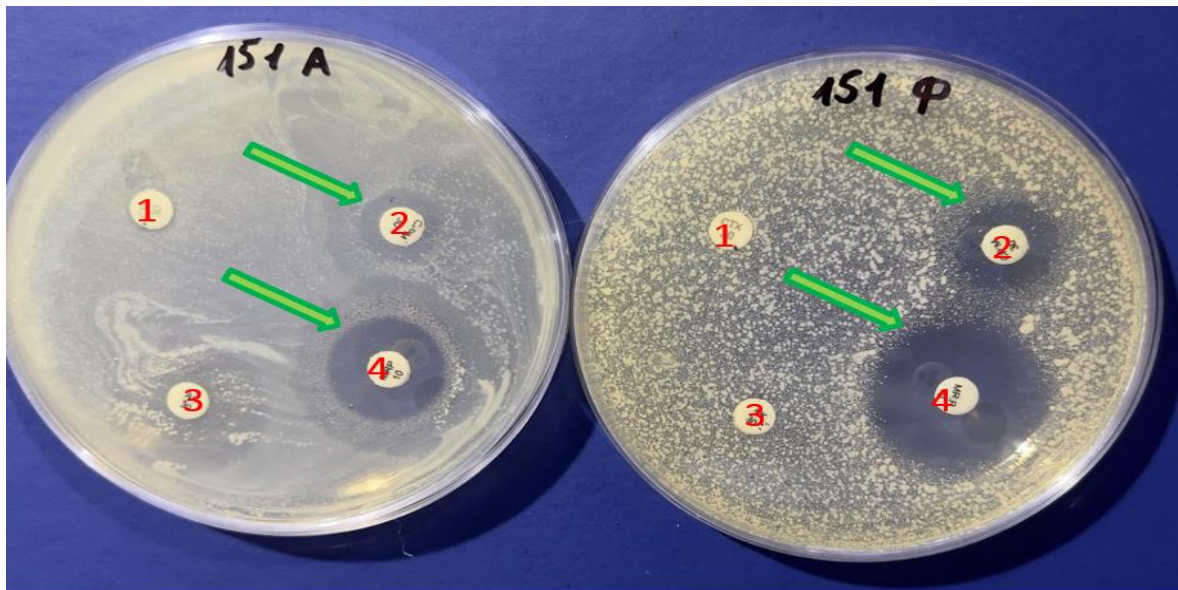


Klebsiella oxytoca 242
(Ф) Бактеріофаг

Klebsiella oxytoca 242
(А) Антибіотик

Рис 3.6. Дослідження сумісної дії фагів та антибіотиків на ріст бактерії *Klebsiella oxytoca* 242

- 1 - Цефотаксим (СТХ 30) 2 - Цефепім (СРМ 30)
3 - Амікацим (АК 30) 4 - Меропенем (МРР 10)



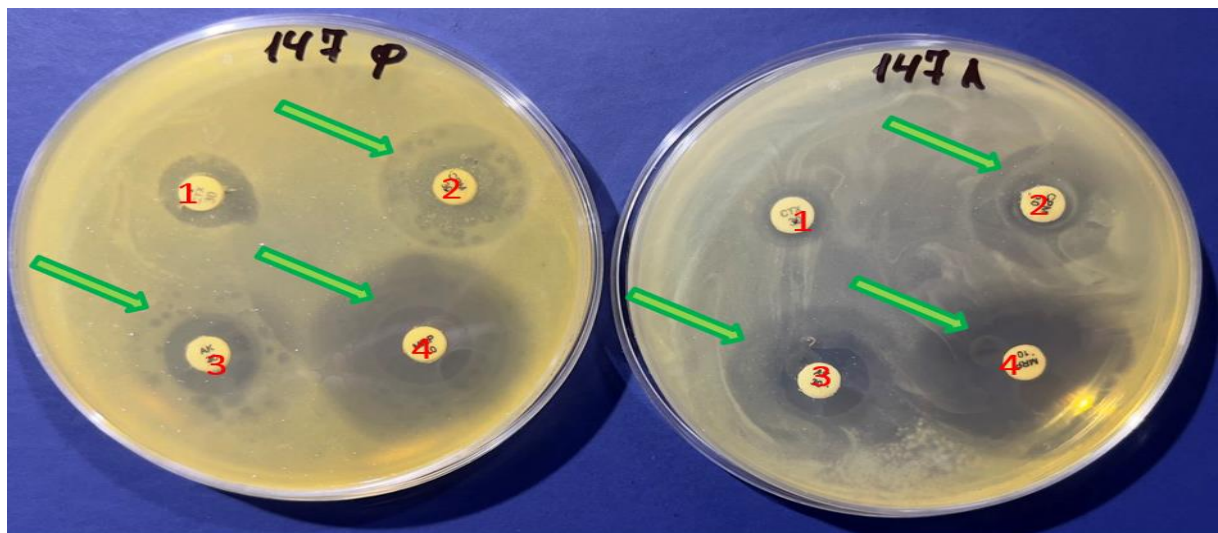
Enterobacter cloacae 151
(А) Антибіотик

Enterobacter cloacae 151
(Ф) Бактеріофаг

Рис. 3.7. Дослідження сумісної дії фагів та антибіотиків на ріст бактерії *Enterobacter cloacae* 151

1 - Цефотаксим (СТХ 30) 2 - Цефепім (СРМ 30)

3 - Амікацим (АК 30) 4 - Меропенем (MRP 10)



Enterobacter cloacae 147
(Ф) Бактеріофаг

Enterobacter cloacae 147
(А) Антибіотик

Рис 3.8. Дослідження сумісної дії фагів та антибіотиків на ріст бактерії *Enterobacter cloacae* 147

1 - Цефотаксим (СТХ 30) 2 - Цефепім (СРМ 30)

3 - Амікацим (АК 30) 4 - Меропенем (MRP 10)

Комбіноване використання фагів та антибіотиків може забезпечити синергічний ефект, підвищуючи ефективність лікування інфекцій навіть у випадках мультирезистентних штамів. Вивчення таких взаємодій дозволяє визначити оптимальні концентрації, черговість введення препаратів та умови, за яких спільна дія буде максимально результативною. Окрім того, це відкриває перспективи зниження дозування антибіотиків, що, в свою чергу, сприяє зменшенню побічних ефектів і запобігає подальшому розвитку резистентності. Таким чином, комплексні дослідження є важливим кроком до створення нових терапевтичних підходів у боротьбі з бактеріальними інфекціями.

3.6. Аналіз антибіотикорезистентності клінічних ізолятів

Результати диско-дифузійного тесту засвідчили, що клінічні штами *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* та *Acinetobacter baumannii* мають виражену резистентність до переважної більшості із протестованих антибіотиків. Усього було протестовано 26 препаратів, і лише до одного з них — коломіцину — усі штами зберігали чутливість. Такі дані свідчать про те, що клінічні ізоляти, отримані у межах цього дослідження, належать до категорії XDR (extensively drug-resistant), що є типовим для внутрішньолікарняної мікрофлори, особливо у пацієнтів ортопедо-травматологічного профілю.

3.7. Обговорення результатів

Після тестування чутливості до наданих фагових препаратів було встановлено, що штами *K. pneumoniae* 339 та *K. pneumoniae* 264 продемонстрували повну чутливість до всіх дев'яти зразків бактеріофагів, що значно розширює можливості застосування фаготерапії для лікування

відповідних інфекцій. Натомість штам *K. pneumoniae* 198 виявився фагорезистентним до восьми із дев'яти зразків, що потребує подальшого поглибленого дослідження щодо механізмів фагорезистентності.

Аналогічно було виділено високоспецифічні фаги до *Enterobacter cloacae* 98, 147, 151, 273 та *Klebsiella oxytoca* 242. Усі отримані бактеріофаги продемонстрували високий рівень активності та стабільність при повторному пересіванні, що вказує на можливість створення на їх основі стандартних фагопрепаратів для практичного застосування.

Особливу увагу було приділено аналізу сумісної дії фагів та антибіотиків. Дослідження проводилося за стандартною методикою з використанням дисків, просочених антибіотиками, та спільного застосування бактеріофагів у живильному середовищі. За результатами цього етапу експерименту було встановлено, що у більшості випадків дія бактеріофагів та антибіотиків є синергічною. Зокрема, фаги до *E. cloacae* 273 у поєднанні з цефепімом, цефотаксимом, амікацином і меропенемом демонстрували значно вираженішу інгібіцію росту бактерій, порівняно із самостійною дією кожного з агентів.

Водночас, було також зафіксовано окремі випадки антагоністичної взаємодії, зокрема між бактеріофагом до *K. oxytoca* 242 та цефепімом/меропенемом, що проявлялось у зниженні активності обох компонентів при спільному використанні. Це вказує на необхідність індивідуального підбору терапевтичних комбінацій, що є критично важливим у клінічній практиці.

Отримані дані підтверджують високий терапевтичний потенціал бактеріофагів як у якості монопрепаратів, так і у складі комбінованої фагово-антибіотикотерапії. Особливої актуальності це набуває у випадках лікування інфекцій, викликаних мультирезистентними штамми, до яких сучасні антибактеріальні засоби виявляються неефективними.

З іншого боку, обмеженням фаготерапії залишається її висока специфічність — кожен бактеріофаг активний лише щодо певних штамів бактерій. Таким чином, для широкого клінічного застосування необхідне

попереднє тестування ізолятів пацієнта на чутливість до конкретного фага. Також перспективними напрямками є дослідження взаємодій фагів з компонентами імунної системи, зокрема можливе формування антитіл до фагів у організмі пацієнта, що може обмежувати ефективність повторних курсів лікування.

Проведене дослідження є вагомим внеском у наукову базу щодо ефективності фаготерапії в умовах зростаючої проблеми антибіотикорезистентності. Результати можуть бути використані для розробки локальних протоколів фаготерапії у лікувальних закладах, що спеціалізуються на складних інфекційних ускладненнях, зокрема у відділеннях хірургії, травматології, опікових центрів тощо.

Таким чином, результати проведеного дослідження підтверджують високу ефективність бактеріофагів у боротьбі з мультирезистентними клінічними ізолятами грамнегативних бактерій. Використання бактеріофагів як у вигляді монотерапії, так і в комбінації з антибіотиками демонструє значну активність проти ізолятів, резистентних до більшості сучасних антибактеріальних засобів. Виявлена синергічна дія у поєднанні фагів з окремими антибіотиками вказує на перспективність комбінованих підходів у лікуванні тяжких інфекційних захворювань. Разом з тим, специфічність фагів та можливі антагоністичні взаємодії потребують ретельного підбору препаратів та індивідуального тестування чутливості ізолятів до фагів. Отримані результати мають практичне значення для розробки ефективних терапевтичних схем та впровадження фаготерапії в клінічну практику у боротьбі з антибіотикорезистентними інфекціями.

ВИСНОВКИ

1. Бактеріальні ізоляти, отримані від пацієнтів ортопедо-травматологічного профілю, характеризуються високою стійкістю до антибактеріальних препаратів. Серед них три ізоляти *Klebsiella pneumoniae* три *Enterobacter cloacae* і два *Acinetobacter baumannii* були ідентифіковані як XDR (екстремально резистентні).
2. Зі стічної води виділено бактеріофаги, здатні лізувати бактерії *Enterobacter cloacae* 98, 147, 151 та *Klebsiella oxytoca* 242. Метод виділення бактеріофагів зі збагаченням показав значно вищу ефективність у порівнянні зі стандартною методикою виділення фагів.
3. Результати досліджень сумісної дії фагів з антибіотиками показали синергійний ефект фагів *E. cloacae* 273 з цефепімом, цефотаксимом, амікацином, і меропенемом.
4. На моделі бактеріофага *Klebsiella oxytoca* 242 встановлено антагоністичну взаємодію з антибіотиками цефепімом і меропенемом, що проявлялася у зниженні кількості негативних колоній в зоні дифузії антибіотика. Натомість, цефотаксим і амікацин не справляли помітного впливу на активність досліджуваного бактеріофага.
5. Встановлена здатність ізольованих бактеріофагів лізувати антибіотикорезистентні бактеріальні штами та досягати високих титрів у лабораторних умовах свідчить про їхній потенціал як перспективних терапевтичних засобів для лікування бактеріальних інфекцій, як у монотерапії, так і в комбінації з антибіотиками.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Бехтерева, М.К. (2014). Місце бактеріофагів в лікуванні інфекційних захворювань шлунково-кишкового тракту. *Педіатрія*, 2, сс. 36–40.
2. Воробей, Є., Бойко, Н., Сівак, О., Дзюбак, С. та Підлісецький, А. (2014). Лікувально-профілактичні препарати бактеріофагів. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*, 64, сс. 52–66.
3. Воронкова, О.С., Власенко, І.Г., Бойко, Н.В. та Дзюбак, С.Д. (2012). Перспективи використання діагностичних та лікувальних препаратів бактеріофагів у медицині. *Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, медицина*, 3, сс. 26–31.
4. Жмінько, П.Г., Федченко, О.В. та Зінов'єва, М.Л. (2015). Бактеріофаги: актуальні питання безпечного застосування (огляд літератури). *Сучасні проблеми токсикології, харчової та хімічної безпеки*, 3, сс. 71–81.
5. Скроцька, О.І. та Пирог, Т.П. (2011). *Загальна вірусологія: конспект лекцій для студентів напрямку 6.051401 «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання*. Київ: НУХТ, 137 с.
6. Шевченко, Т.М. (2014). Характеристика чутливості до антибіотиків та фагів штамів стафілококів, що виділені з репродуктивного тракту мишей. *Патологія*, 3, сс. 68–72.
7. Abedon, S.T. (2011). *Bacteriophages and Biofilms: Ecology, Phage Therapy, Plaques*. Hauppauge: Nova Science Publishers.
8. Abedon, S.T., Kuhl, S.J., Blasdel, B.G. and Kutter, E.M. (2011). Phage treatment of human infections. *Bacteriophage*, [online] Volume 1(2), pp. 66–85. Available at: <https://doi.org/10.4161/bact.1.2.15845> [Accessed 14 Mar. 2011].
9. Abedon, S.T. (2015). Ecology of anti-biofilm agents I: antibiotics versus bacteriophages. *Pharmaceuticals (Basel)*, [online] Volume 8(3), pp. 525–558. Available at: <https://doi.org/10.3390/ph8030525> [Accessed 2 Sep. 2015].

10. Ackermann, H.W. (2009). Bacteriophage classification. In: M.R.J. Clokie, A.M. Kropinski, ed. *Bacteriophages: Methods and Protocols*, vol. 1. Totowa: Humana Press, pp. 67–82.
11. Alavidze, Z. and Kutter, E. (2012). *Phage therapy in bacterial infections treatment. 1st ed.* Boca Raton: CRC Press.
12. *Antimicrobial resistance: global report on surveillance.* (2014). Geneva: World Health Organization.
13. Azeredo, J. and Sutherland, I.W. (2008). The use of phages for the removal of infectious biofilms. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 9(4), pp. 261–266.
14. Borges, A.L., Davidson, A.R. and Bondy-Denomy, J. (2017). The discovery, mechanisms and evolutionary impact of anti-CRISPRs. *Annual Review of Virology*, [online] Volume 4(1), pp. 37–59. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-101416-041616> [Accessed 25 Sep. 2017].
15. Borysowski, J. and Górski, A. (2008). Phage therapy: current status and future perspectives. *Medicinal Research Reviews*, 28(6), pp. 887–919.
16. Brüßow, H. and Hendrix, R.W. (2002). Phage genomics: small is beautiful. *Cell*, 108(1), pp. 13–16.
17. Chan, B.K., Abedon, S.T. and Loc-Carrillo, C. (2013). Phage cocktails and the future of phage therapy. *Future Microbiology*, [online] Volume 8(6), pp. 769–783. Available at: <https://doi.org/10.2217/fmb.13.47> [Accessed 1 Jun. 2013].
18. Chanishvili, N. (2012). *A literature review of the practical application of bacteriophage research.* Hauppauge, NY: Nova Science Publishers.
19. Cisek, A., Dabrowska, I., Gregorczyk, K. and Wyzewski, Z. (2016). Phage therapy in bacterial infections treatment. One hundred years after the discovery of bacteriophages. *Current Microbiology*, [online] Volume 74(2), pp. 277–283. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00284-016-1166-8> [Accessed 29 Nov. 2016].

20. Dabrowska, K., Swiatała-Jelen, K., Opolski, A., Weber-Dabrowska, B. and Gorski, A. (2005). Bacteriophage penetration in vertebrates. *Journal of Applied Microbiology*, 98(1), pp. 7–13.
21. Davies, E.V., James, C.E., Williams, D., O'Brien, S., Fothergill, J.L., Haldenby, S., Paterson, S., Winstanley, C. and Brockhurst, M.A. (2016). Temperate phages enhance pathogen fitness in chronic lung infection. *The ISME Journal*, [online] Volume 10(10), pp. 2553–2555. Available at: <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.51> [Accessed 13 Apr. 2016].
22. Doron, S., Melamed, S., Ofir, G., Leavitt, A., Lopatina, A., Keren, M., Amitai, G. and Sorek, R. (2018). Systematic discovery of antiphage defence systems in the microbial pangenome. *Science*, [online] Volume 359(6379). Available at: <https://doi.org/10.1126/science.aar4120> [Accessed 2 Mar. 2018].
23. Dublanchet, A., Fruciano, E. and Marais, A. (2013). Bacteriophages and biofilms. *Pathologie Biologie*, 61(2), pp. 51–55.
24. Eklund, C. and Wyss, O. (1962). Enzyme associated with bacteriophage infection. *Journal of Bacteriology*, 84(6), pp. 1209–1215.
25. Gabisonia, T.G. (2015). Bacteriophages and their use in medical practice. *Georgian Medical News*, 244, pp. 7–12.
26. Gasiunas, G., Sinkunas, T. and Siksnys, V. (2014). Molecular mechanisms of CRISPR-mediated microbial immunity. *Cellular and Molecular Life Sciences*, [online] Volume 71(3), pp. 449–465. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1438-6> [Accessed 1 Feb. 2014].
27. Goldfarb, T., Sberro, H., Weinstock, W., Cohen, O., Doron, S., Charpak-Amikam, Y., Afik, S., Ofir, G. and Sorek, R. (2015). BREX, a phage resistance system widespread in microbial genomes. *The EMBO Journal*, [online] Volume 34(2), pp. 169–183. Available at: <https://doi.org/10.15252/embj.201489455> [Accessed 15 Jan. 2015].
28. Gutiérrez, D., Fernández, L., Rodríguez, A. and García, P. (2021). Current phage therapy developments against bacterial infections. *Current Opinion in Microbiology*, 6, pp. 1–9.

29. Harper, D.R., Parracho, H.M., Walker, J., Sharp, R., Hughes, G., Werthén, M., Lehman, S. and Morales, S. (2014). Bacteriophages and biofilms. *Antibiotics*, [online] Volume 3(3), pp. 270–284. Available at: <https://doi.org/10.3390/antibiotics3030270> [Accessed 7 Jul. 2014].
30. Jarvis, W.R. (1985). The epidemiology of nosocomial infections caused by *Klebsiella pneumoniae*. *Infection Control*, 6(2), pp. 68–74.
31. Kuchment, A. (2011). Phage therapy: the comeback of the century. *IEEE Pulse*, 2(6), pp. 60–66.
32. Kutataladze, M. (2015). Experience of the Eliava Institute in bacteriophage therapy. *Virologica Sinica*, [online] Volume 30(1), pp. 80–81. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12250-014-3557-0> [Accessed 1 Feb. 2015].
33. Kutateladze, M. and Adamia, R. (2010). Bacteriophages as potential new therapeutics or supplement antibiotics. *Trends in Biotechnology*, [online] Volume 28(12), pp. 591–595. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.08.001> [Accessed 1 Dec. 2010].
34. Kutter, E. and Sulakvelidze, A. (2005). *Bacteriophages: Biology and Applications*. Boca Raton: CRC Press.
35. Kwiatek, M., Parasion, S., Rutyna, P., Mizak, L., Gryko, R., Niemcewicz, M., Olender, D. and Nowicki, M. (2012). Characterization of a bacteriophage, isolated from a cow with mastitis, that is lytic against *Staphylococcus aureus* strains. *Archives of Virology*, 157(2), pp. 76–88.
36. Labrie, S.J., Samson, J.E. and Moineau, S. (2010). Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature Reviews Microbiology*, [online] Volume 8(5), pp. 317–327. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2315> [Accessed 1 May 2010].
37. Lin, D.M., Koskella, B. and Lin, H.C. (2017). Phagotherapy: an alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*, [online] Volume 8(3), pp. 162–173. Available at: <https://doi.org/10.4292/wjgpt.v8.i3.162> [Accessed 6 Aug. 2017].

38. Lopes, A. (2021). *Klebsiella pneumoniae* infections: virulence factors, pathogenesis, and antimicrobial resistance. *Pathogens*, [online] Volume 10(3), pp. 312–336. Available at: <https://doi.org/10.3390/pathogens10030312> [Accessed 9 Mar. 2021].
39. Monk, A.B., Rees, C.D., Barrow, P., Hagens, S. and Harper, D.R. (2010). Bacteriophage applications: where are we now? *Letters in Applied Microbiology*, [online] Volume 51(4), pp. 363–369. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02916.x> [Accessed 1 Oct. 2010].
40. Monteiro, R., Pires, D.P. and Costa, A.R. (2019). Phage therapy: going temperate? *Trends in Microbiology*, [online] Volume 27(4), pp. 378–378. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.12.008> [Accessed 1 Apr. 2019].
41. Montgomerie, J.Z. (1979). Epidemiology of *Klebsiella* and hospital-associated infections. *Reviews of Infectious Diseases*, 1(5), pp. 736–753.
42. Moradpour, Z., Ghasemian, A. and Kafil, H.S. (2018). Phage therapy as a new approach in the treatment of urinary tract infections caused by *Escherichia coli*. *Caspian Journal of Internal Medicine*, 9(2), pp. 128–134.
43. Parasion, S., Kwiatek, M., Gryko, R., Mizak, L. and Malm, A. (2014). Bacteriophages as an alternative strategy for fighting biofilm development. *Polish Journal of Microbiology*, 63(2), pp. 137–145.
44. Pires, D.P., Cleto, S., Sillankorva, S., Azeredo, J. and Lu, T.K. (2015). Phage therapy: a step forward in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Journal of Virology*, [online] Volume 89(15), pp. 7449–7456. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.00385-15> [Accessed 1 Aug. 2015].
45. Podschun, R. and Ullmann, U. (2001). Incidence of *Klebsiella* species in surface waters and their expression of virulence factors. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), pp. 3325–3327.
46. Romanova, Y.M., Mulabaev, N.S., Tolordava, E.R., Seregin, A.V., Seregin, I.V., Alexeeva, N.V., Stepanova, T.V., Levina, G.A., Barkhatova, O.I., Gamova, N.A., Goncharova, S.A., Didenko, L.V. and Rakovskaya, I.V. (2015).

- Microbial communities on kidney stones. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 30(2), pp. 78–84.
47. Rostkowska, O.M., Międzybrodzki, R. and Górski, A. (2007). Antystaphylococcal activity of bacteriophages lytic for *Staphylococcus aureus* strains of phage group III. *Folia Microbiologica (Praha)*, 52(3), pp. 263–266.
 48. Sabouri, S., Sepehrizadeh, Z., Amirpour-Rostami, S. and Skurnik, M. (2011). The use of bacteriophages in the control of urinary tract infections caused by *Escherichia coli*. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 14(5), pp. 390–397.
 49. Shurma, S., Chatterjee, S., Datta, S., Prasad, R.K. and Vaizala, M.G. (2016). Bacteriophages and their applications: an overview. *Folia Microbiologica*, [online] Volume 62(1), pp. 17–55. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12223-016-0471-x> [Accessed 12 Oct. 2016].
 50. Sillankorva, S.M., Oliveira, H. and Azeredo, J. (2012). Bacteriophages and their role in food safety. *International Journal of Microbiology*, [online] Volume 2012(1), pp. 86–94. Available at: <https://doi.org/10.1155/2012/863945> [Accessed 15 Dec. 2012].
 51. Siringan, P., Connerton, P.L., Cummings, N.J. and Connerton, I.F. (2014). Alternative bacteriophage life cycles: the carrier state of *Campylobacter jejuni*. *Open Biology*, [online] Volume 4(5), 130200. Available at: <https://doi.org/10.1098/rsob.130200> [Accessed 16 Apr. 2014].
 52. Strathdee, S.A., Hatfull, G.F., Mutalik, V.K. and Schooley, R.T. (2023). Phage therapy: from biological mechanisms to future directions. *Cell*, [online] Volume 186(1), pp. 17–31. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.11.017> [Accessed 5 Jan. 2023].
 53. Sulakvelidze, A. (2005). Phage therapy: an attractive option for dealing with antibiotic-resistant bacterial infections. *Drug Discovery Today*, 10(11), pp. 807–809.
 54. Sulakvelidze, A., Alavidze, Z. and Morris, J.G. Jr. (2001). Bacteriophage therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(3), pp. 649–659.

55. Summers, W.C. (2001). Bacteriophage therapy. *Annual Review of Microbiology*, 55, pp. 437–451.
56. Tsonos, J., Vandenheuvel, D., Briers, Y., De Greve, H., Hernalsteens, J.P. and Lavigne, R. (2015). Complete genome sequence of the podovirus bacteriophage phi-MYBPC3A. *Genome Announcements*, [online] Volume 5(3), pp. 47–51. Available at: <https://doi.org/10.1128/genomeA.01463-14> [Accessed 5 Mar. 2015].
57. Weinbauer, M.G. (2004). Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(2), pp. 127–181.

Антибіотикорезистентність клінічних ізолятів

№	Антибіотик	222 (P.S)	224 (P.S)	102 (A.b)	139 (A.b)	98 (E.C)	147 (E.C)	151 (E.C)	273 (E.C)	104 (P.M)	240 (P.M)	242 (K.O)	339 (K.P)	264 (K.P)	198 (K.P)	131 (E.C)	153 (E.C)
1	Ампіцилін																
2	Піперацилін тазобактам	-	-		-		-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
3	Цефепім	-	-				-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
4	Цефтазидим	-	-				-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
5	Іміненем	-	-				-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
6	Меропенем	-	+				-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
7	Азтреонам	-	-				-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
8	Ципрофлоксацин	-	-				-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
9	Левовфлоксацин	-	-				-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
10	Амікацин	+	+				+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
11	Гентаміцин						-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
12	Тобраміцин	+	+				-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
13	Ко - тримоксазол						-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
14	Коломіцин	+	+				+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
15	Тікарцилін клавуланат	-	-				-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
16	Пінерцилін	-	-				-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-