

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»

Кафедра вірусології

Завідувач кафедри проф. Ірина БУДЗАНІВСЬКА

Протокол № ____ засідання кафедри

від « ____ » _____ 2026 р.

**МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА
БАКТЕРІОФАГІВ, СПЕЦИФІЧНИХ ДО *KLEBSIELLA SPP.***

Випускна кваліфікаційна робота
студентки денної форми навчання
за спеціальністю 091 «Біологія та біохімія»

Морміль Олександри Юріївни

Науковий керівник від кафедри
канд. біол. наук, доц. Харіна А.В.

Робота виконана на базі ТОВ «НеоПроБіоКеар-Україна»

під керівництвом доктора філософії Корнієнко Н.О.

Оцінка захисту роботи

Київ – 2026 р.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

БСА	–	Бортницька станція аерації;
НК	–	негативна колонія;
НПБК	–	ТОВ «НеоПроБіоКеар-Україна»;
ЕОР	–	efficiency of plating, ефективність висіву;
MDR	–	multidrug-resistant, мультирезистентний;
MDR-hvKp	–	multidrug-resistant hypervirulent <i>Klebsiella pneumoniae</i> , мультирезистентна гіпервірулентна <i>Klebsiella pneumoniae</i> ;
PDR	–	pandrug-resistant, панрезистентний;
R-M	–	restriction-modification system, система рестрикції- модифікації;
ST	–	sequence type, сиквенс-тип;
XDR	–	extensively drug-resistant, екстенсивно резистентний.

ЗМІСТ

ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. Загальна характеристика <i>Klebsiella</i> spp. та клінічне застосування бактеріофагів.....	7
1.1. Характеристика роду <i>Klebsiella</i>	7
1.1.1. Історія відкриття та становлення родового поняття.....	7
1.1.2. Таксономія та філогенія.....	7
1.1.3. Загальні морфологічні, біохімічні та генетичні характеристики.....	9
1.1.4. Механізми резистентності до антибіотиків.....	13
1.2. Вплив бойових дій на поширення <i>K. pneumoniae</i> у світі та в Україні.....	15
1.3. Фаготерапія.....	19
1.4. Способи терапевтичної доставки бактеріофагів.....	22
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи досліджень.....	25
2.1. Матеріали.....	25
2.1.1. Бактеріофаги.....	25
2.1.2. Культури бактерій.....	25
2.1.3. Живильні середовища.....	25
2.2. Методи досліджень.....	26
2.2.1. Культивування бактерій.....	26
2.2.2. Виділення бактеріофагів.....	27
2.2.3. Отримання чистих ліній бактеріофагів.....	27
2.2.4. Накопичення бактеріофагів.....	28
2.2.5. Титрування бактеріофагів.....	28
2.2.6. Визначення спектру літичної активності бактеріофагів.....	29
2.2.7. Виділення ДНК.....	31
2.2.8. Підготовка бібліотек для секвенування.....	31
2.2.9. Секвенування.....	32
2.2.10. Перевірка стабільності бактеріофагів після небулізації.....	32
2.2.11. Біоінформатична обробка даних.....	33

	4
2.2.12. Статистична обробка даних	34
РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та обговорення	35
3.1. Первинна характеристика бактеріофагів	35
3.2. Морфологія негативних колоній досліджуваних зразків	37
3.3. Характеристика геномів бактеріофагів.....	43
3.4. Спектр літичної активності досліджуваних бактеріофагів.....	47
3.5. Стабільність досліджуваних бактеріофагів після небулізації	50
ВИСНОВКИ	55
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	56

ВСТУП

Антимікробна резистентність ставить під загрозу ефективне лікування та профілактику все більшої кількості бактеріальних інфекцій [1]. Здатність бактерій накопичувати гени стійкості призвела до появи штамів із резистентністю, яка характеризується повною нечутливістю до всіх наявних терапевтичних агентів [2]. Основними механізмами такого захисту є ферментативна інактивація ліків, модифікація мішеней дії антибіотиків, зниження проникності мембран та активне виведення препаратів за допомогою ефлюкських pomp [3].

Одним із найнебезпечніших представників грамнегативних патогенів є *Klebsiella pneumoniae*, яку ВООЗ класифікувала як пріоритетну загрозу для здоров'я людини. Ці грамнегативні, інкапсульовані бактерії родини *Enterobacteriaceae* пройшли шлях від збудників важких позалікарняних пневмоній наприкінці XIX століття до статусу провідних госпітальних патогенів XXI століття, що демонструють конвергенцію екстремальної антибіотикорезистентності та високої вірулентності. Роль *K. pneumoniae* у поширенні генів стійкості, зокрема карбапенемаз, робить її центральним об'єктом досліджень у контексті розробки альтернативних терапевтичних стратегій, наприклад, таких як використання бактеріофагів (фаготерапія) [4].

Ситуація з антибіотикорезистентністю в Україні була складною ще до повномасштабного вторгнення РФ, що пояснювалося безрецептурним доступом до антибіотиків до 2019 року та відсутністю систематичного моніторингу резистентності [5]. Рівень стійкості до карбапенемів серед ізолятів *K. pneumoniae* вже був високим і становив близько 43–61% у 2018–2020 рр., сягаючи 54–70% у 2021 році [6]. У військових шпиталях у період 2014–2020 рр. резистентність до карбапенемів серед грамнегативних бактерій коливалася від 29,5% до 64,2% [5]. *K. pneumoniae* була присутня у мікробіомі бойових ран учасників АТО/ООС, проте не була абсолютним лідером. Її частка серед ранових патогенів у період 2014–2020 рр. становила 8,6%, а деякі

міжнародні клони високого ризику (наприклад, сиквенс-типи ST307 та ST147), взагалі не виявлялися у поранених військовослужбовців в Україні до 2022 року [7].

Повномасштабна війна стала каталізатором селекції та поширення резистентних штамів *K. pneumoniae* унаслідок перевантаження та руйнування медичної інфраструктури, складної логістики евакуації та масового застосування антибіотиків широкого спектра [8]. Серед збудників інфекцій бойових ран її частка зросла з 8,6% до 20,7% [7], а за деякими даними — до 39,0% [9]. У відділеннях інтенсивної терапії кардіохірургічного профілю частота виявлення *Klebsiella* spp. серед грамнегативних збудників зросла з 60% (у 2021 р.) до 84% (у 2023 р.) [10]. Почастішали випадки виділення панрезистентних штамів, які є стійкими до всіх наявних антибіотиків, включаючи колістин та цефідерокол [2, 11]. Через медичну евакуацію поранених та міграцію цивільного населення, епідемічні українські штами *K. pneumoniae* поширилися лікарнями багатьох країн Європи, ставши причиною локальних нозокоміальних спалахів [12, 13].

Вичерпання ефективних схем терапії робить пошук альтернативних методів лікування стратегічною необхідністю для національної безпеки. Фаготерапія є ефективним та гнучким інструментом для боротьби з резистентними штамми *K. pneumoniae*. Попри значні біологічні та регуляторні виклики, використання фагових коктейлів та генно-інженерних рішень на основі фагів у поєднанні з антибіотиками здатне докорінно змінити парадигму лікування важких інфекцій у постантибіотичну еру.

Для успішного клінічного впровадження фаготерапії необхідно мати глибоке розуміння біологічних властивостей вірусів. Саме тому мета роботи полягала у виділенні та характеристиці ізолятів бактеріофагів, специфічних до *Klebsiella* spp., для оцінки їхнього терапевтичного потенціалу.

РОЗДІЛ 1

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА *KLEBSIELLA* SPP. ТА КЛІНІЧНЕ ЗАСТОСУВАННЯ БАКТЕРІОФАГІВ

1.1. Характеристика роду *Klebsiella*

1.1.1. Історія відкриття та становлення родового поняття

Бактерії, що нині належать до роду *Klebsiella*, були вперше ідентифіковані у 1882 році німецьким патологоанатомом Карлом Фрідлендером під час дослідження зразків легеневої тканини пацієнтів із пневмонією [4]. У той час виявлений грамнегативний мікроорганізм отримав назву «пневмокок Фрідлендера» (або бацила Фрідлендера). Сучасне найменування рід здобув у 1885–1886 роках, коли італійський ботанік та мікробіолог Вітторе Тревізан запропонував назву *Klebsiella* на честь німецького мікробіолога Едвіна Клебса (1834–1913) [14]. Едвін Клебс виступав піонером у галузі патології та належав до числа перших дослідників, що впровадили бактеріологічні методи для вивчення природи хвороб. З розвитком медичної науки було остаточно визнано високу патогенність цих бактерій, здатних викликати широкий спектр інфекційних процесів [15].

1.1.2. Таксономія та філогенія

Відповідно до сучасної систематики, рід *Klebsiella* належить до родини ентеробактерій (*Enterobacteriaceae*), яка охоплює безліч біохімічно відмінних родів, зокрема *Escherichia*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* тощо [16]. Загалом до цього роду відносять 27 дочірніх таксонів [4].

Філогенетична структура роду є розгалуженою. Усі види умовно поділяються на комплекс видів *Klebsiella pneumoniae* (KpSC) та інші, генетично віддалені таксони (наприклад, *K. oxytoca*, *K. michiganensis*, *K. grimontii*, *K. pasteurii*, *K. spallanzanii*, *K. indica*, *K. terrigena*, *K. huaxiensis*), які мають близько 90% нуклеотидної схожості з KpSC. Деякі з колишніх видів роду (*K. terrigena*, *K. planticola* та *K. ornithinolytica*) на основі геномного аналізу (зокрема послідовності гена *rpoB*) були перенесені до окремого роду *Raoultella* [16].

Комплекс видів *K. pneumoniae* не має формального таксономічного статусу, але об'єднує близькоспоріднені види, які демонструють 95–96% генетичної гомології з класичною *K. pneumoniae sensu stricto* [16]. На сьогодні геномний аналіз виділяє сім основних філогенетичних груп у межах цього комплексу (табл. 1.1).

Таблиця 1.1

Філогенетичні групи комплексу видів *K. pneumoniae* [17, 18]

Філогрупа	Вид/Підвид	Особливості та клінічна роль
1	2	3
Kp1	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	Основний клінічний патоген
Kp2	<i>K. quasipneumoniae</i> subsp. <i>quasipneumoniae</i>	Опортуністичний патоген, часто виявляється в середовищі
Kp3	<i>K. variicola</i> subsp. <i>variicola</i>	Убіквітарний вид (рослини, тварини, люди), спричиняє важкі бактеріємії
Kp4	<i>K. quasipneumoniae</i> subsp. <i>similipneumoniae</i>	Генетично близький до Kp2, має нижчу частоту виявлення
Kp5	<i>K. variicola</i> subsp. <i>tropica</i>	Зустрічається переважно в екосистемах тропічних регіонів

Продовження таблиці 1.1

1	2	3
Кр6	<i>K. quasivariicola</i>	Нещодавно описаний вид, ідентифікований у клінічних ізолятах
Кр7	<i>K. africana</i>	Рідкісний таксон, специфічний для африканського континенту

Традиційно вид *K. pneumoniae* поділяли на три підвиди на основі їхніх клінічних особливостей: *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* (збудник озени) та *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* (збудник склероми дихальних шляхів) [4]. Однак новітні інструменти повногеномного секвенування довели, що підвиди *ozaenae* та *rhinoscleromatis* філогенетично є специфічними гіпервірулентними клональними групами (відповідно CG90 та CG3) всередині широкої популяції *K. pneumoniae* [16, 18].

1.1.3. Загальні морфологічні, біохімічні та генетичні характеристики

Представники роду *Klebsiella* є грамнегативними, нерухомими паличкоподібними бактеріями, що не утворюють спор. Їхні фізичні розміри зазвичай становлять від 0,3 до 2,0 мкм у ширину та від 0,6 до 6,0 мкм у довжину. Відмінною морфологічною ознакою є здатність утворювати товсту полісахаридну капсулу, яка вкриває клітинну стінку і надає колоніям типового блискучого, слизового (мукоїдного) вигляду на агарових середовищах. Ця структура слугує потужним бар'єром проти факторів вродженого імунітету хазяїна [19].

Біохімічно ці мікроорганізми є факультативними анаеробами, що здатні до виживання та розмноження як у присутності, так і за відсутності кисню.

Бактерії цієї групи є оксидазонегативними, проте каталазопозитивними, а також здатні ферментувати лактозу [14].

Пангеном *K. pneumoniae* характеризується високою пластичністю і налічує від 5 до 6 млн п.н. [17]. Бактерія має «відкритий» тип пангеному: її коровий (консервативний) геном відповідає за базові функції життєзабезпечення, тоді як аксесорний (допоміжний) геном постійно поповнюється новим генетичним матеріалом через горизонтальне перенесення (плазмиди, інтегриони, транспозони). Саме аксесорний геном забезпечує мікроорганізму набуття генів антибіотикорезистентності та факторів вірулентності [14].

Рід *Klebsiella* вважається убіквітарним. Бактерії повсюдно поширені у природному середовищі: їх знаходять у ґрунті, воді, стічних водах і на поверхні рослин [3]. У людей та тварин ці ентеробактерії виступають як сапрофітні представники нормальної мікробіоти, безсимптомно колонізуючи шлунково-кишковий тракт, ротоглотку, дихальні шляхи та шкіру [4, 15]. У середньому, від 5% до 38% здорових людей є носіями бактерії в калі, а від 1% до 6% — у носоглотці. Утім, у пацієнтів лікарень цей показник різко зростає (до 75%), часто через селективний тиск антибіотиків [14].

Клінічно найбільш значущими є два основні патотипи: класична *K. pneumoniae* (сКр) та гіпервірулентна *K. pneumoniae* (hvКр). Класичний патотип здебільшого є причиною нозокоміальних (внутрішньолікарняних) інфекцій в осіб зі слабким імунітетом або серйозними супутніми захворюваннями [16]. Зазвичай викликає нозокоміальні пневмонії (зокрема вентилятор-асоційовані), інфекції сечовивідних шляхів, бактеріємію та сепсис, інфекції хірургічних ран та м'яких тканин [19]. Бактерії цієї групи мають помірну вірулентність, проте здатні активно акумулювати гени антибіотикорезистентності (наприклад, поширені клональні групи CG258, CG15, CG147, CG307) [18, 20]. Натомість гіпервірулентний патотип становить особливу загрозу, адже він здатен спричиняти інвазивні інфекції у імунокомпетентних людей у позалікарняних умовах та відрізняється високою

схильністю до утворення небезпечних метастатичних вогнищ по всьому тілу (ендофтальміт, менінгіт, абсцеси селезінки та печінки, остеомієліт) [4]. Представники цього патотипу, історично асоційовані з країнами Азії, спричиняють піогенний абсцес печінки, важку негоспітальну пневмонію, некротизуючий фасціїт. Тривалий час вони залишалися чутливими до більшості антибіотиків [20].

Сучасним глобальним трендом, що викликає надзвичайне занепокоєння світової медичної спільноти, є небезпечна конвергенція цих двох фенотипів, яка призводить до виникнення та поширення мультирезистентних гіпервірулентних клонів (MDR-hvKp) [2, 18]. Завдяки інтенсивному горизонтальному переносу генів та здатності формувати стійкі біоплівки, такі міжнародні клони високого ризику, як сиквенс-типи (ST) 11, 147, 258, 307 та 395, набули глобального розповсюдження, ставши провідною причиною екстремально резистентних інфекцій та витісняючи менш агресивні штами в лікарняному середовищі по всьому світу [9, 12, 18, 21].

Вживання *Klebsiella* в організмі хазяїна та її здатність уникати імунної відповіді забезпечується складним арсеналом факторів вірулентності (табл. 1.2).

Таблиця 1.2

Основні фактори вірулентності роду *Klebsiella* [4, 14, 19, 22]

Фактор вірулентності	Генетичні детермінанти, структура	Механізм патогенної дії
1	2	3
Капсула (CPS)	Локус <i>cps</i> (K1, K2), гени <i>rmpA/rmpA2</i>	Пригнічення фагоцитозу та лізису комплементом, зумовлює гіпермукоїдність

Продовження таблиці 1.2

1	2	3
Ліпополісахарид (LPS)	Ліпід А, коровий олігосахарид, О-антиген	Ендотоксична активність, захист від факторів комплементу, уникнення імуної відповіді
Сидерофори	Ентеробактин (<i>entB</i>), аеробактин (<i>iuc</i>), сальмохелін (<i>iro</i>), ієрсиніабактин (<i>ybt</i>)	Конкурентне захоплення заліза Fe ³⁺ з білків хазяїна, маркери гіпервірулентності
Фімбрії	Тип 1 (<i>fim</i>), Тип 3 (<i>mrkABCD</i>)	Адгезія до епітелію дихальних та сечовивідних шляхів, ініціація формування біоплівки на абіотичних поверхнях
Білки зовнішньої мембрани (OMPs)	<i>OmpA</i> та ін.	Пригнічення запальної відповіді, захист від макрофагів
Інші фактори	Колібактин (<i>clb</i>), мікроцин E492 (<i>mce</i>), алантоїн (<i>allS</i>)	Пошкодження ДНК клітин хазяїна, метаболічна адаптація під час інвазії

Таким чином, виживання та патогенність представників роду *Klebsiella* зумовлені не окремими детермінантами, а синергічною дією розгалуженого арсеналу факторів вірулентності. Поєднання капсульного захисту, ефективних систем захоплення заліза та здатності до адгезії дозволяє бактерії не лише успішно протистояти імуному тиску хазяїна, але й швидко адаптуватися до різних екологічних ніш — від природних екосистем до госпітального середовища.

Комплексна взаємодія цих механізмів на фоні високої пластичності аксесорного геному створює підґрунтя для формування гіпервірулентних та мультирезистентних штамів. Розуміння молекулярних основ функціонування цих факторів є критично важливим для розробки нових стратегій діагностики та терапії інфекцій, спричинених *Klebsiella*, особливо в умовах стрімкого поширення антибіотикорезистентності.

1.1.4. Механізми резистентності до антибіотиків

Глобальна проблема, пов'язана з поширенням представників роду *Klebsiella*, зумовлена їхньою високою генетичною пластичністю та здатністю акумулювати гени стійкості, що призводить до еволюції штамів від мультирезистентності (MDR) до екстенсивної (XDR) та панрезистентності (PDR) [2, 3]. Відповідно до критеріїв ECDC/CDC, ці категорії визначаються наступним чином:

- Мультирезистентність (MDR) — нечутливість штамів до щонайменше одного антимікробного препарату у трьох і більше категоріях антибіотиків.
- Екстенсивна резистентність (XDR) — стійкість до представників усіх класів антибіотиків, за винятком одного чи двох.
- Панрезистентність (PDR) — повна нечутливість ізоляту до всіх доступних терапевтичних агентів [15, 23].

Найпоширенішим механізмом резистентності є ферментативна інактивація антибіотиків, яка реалізується через кілька ключових систем. Бета-лактамази розширеного спектра (ESBL), зокрема ферменти типів CTX-M (що є домінуючим глобально), SHV та TEM, гідролізують пеніциліни, монобактами та цефалоспорини широкого спектра. Окрему небезпеку становлять карбапенемази — ферменти, що руйнують препарати резерву. До них належать серинові карбапенемази (наприклад, KPC, поширена в багатьох регіонах), метало-бета-лактамази (NDM, VIM, IMP), які використовують йон

цинку для деградації майже всіх бета-лактамів, та ферменти класу D (OXA-48) [3, 15, 18]. Крім того, аміноглікозид-модифікуючі ферменти (AMEs), такі як ацетилтрансферази (AAC), фосфотрансферази (APH) та нуклеотидилтрансферази (ANT), забезпечують хімічну інактивацію відповідного класу препаратів [3].

Іншим критичним механізмом резистентності є модифікація клітинних мішеней, що робить дію антибіотиків неефективною внаслідок зміни структур, на які вони спрямовані [2, 3, 15]. Стійкість до фторхінолонів виникає через мутації в генах *gyrA* (ДНК-гіраза) та *parC* (топоізомераза IV), що знижує спорідненість препаратів до цих ферментів. Резистентність до колістину (поліміксинів) забезпечується модифікацією ліпиду А в ліпополісахариді, що зменшує його негативний заряд і перешкоджає зв'язуванню препарату. Це досягається через хромосомні мутації в генах *mgrB*, *pmrB*, *phoP/phoQ* або набуття плазмідного гена *mcr-1*. Стійкість високого рівня до аміноглікозидів реалізується через ферменти метилювання 16S рРНК (наприклад, ген *armA*), що блокує зв'язування антибіотика з рибосомою [24]. Водночас мутації в пеніцилін-зв'язуючих білках (PBPs) знижують їхню спорідненість до бета-лактамічних препаратів [3].

Обмеження доступу препаратів до внутрішньоклітинного простору досягається через зниження проникності клітинної стінки внаслідок втрати поринів. Порини, передусім OmpK35 та OmpK36, є каналами в зовнішній мембрані для дифузії гідрофільних антибіотиків. Їхні мутації, зниження експресії або повна втрата радикально обмежують доступ карбапенемів та цефалоспоринів, що часто діє синергічно з продукцією бета-лактамаз [15]. Паралельно з цим функціонують активні ефлюксні помпи, такі як системи AcrAB-TolC та OqxAB родини RND, які активно виводять антибіотики з клітини. Гіперекспресія цих pomp забезпечує одночасну стійкість до широкого кола сполук, включаючи фторхінолони, макроліди, тетрацикліни (зокрема тигециклін) та бета-лактами [3].

Додатковий рівень захисту забезпечується здатністю до формування біоплівки, які створюють непроникний полімерний матрикс. Взаємодія бактерій у біоплівці через систему «відчуття кворуму» координує експресію факторів вірулентності та стійкості [3]. Особливе значення мають метаболічно неактивні клітини-персистери (persisters), здатні витримувати концентрації антибіотиків у 10–1000 разів вищі за летальні, що сприяє хронізації інфекцій [14]. Одним викликом є феномен гетерорезистентності, коли прихована субпопуляція резистентних клітин усередині загалом чутливої популяції бактерій призводить до невдалої терапії [3].

1.2. Вплив бойових дій на поширення *K. pneumoniae* у світі та в Україні

Повномасштабна військова агресія проти України спричинила поширення високорезистентних штамів *K. pneumoniae*, змінивши структуру госпітальних інфекцій [25]. Мінно-вибухові та вогнепальні поранення супроводжуються масивним ураженням м'яких тканин, розтрощенням кісток і високим ступенем первинного мікробного забруднення, проте в процесі поетапного лікування та медичної евакуації «первинні» мікроорганізми швидко витісняються грамнегативними нозокоміальними патогенами [26, 27]. Еволюційний тиск, зумовлений необхідністю щоденного емпіричного застосування антибіотиків широкого спектра дії для великої кількості поранених, а також перевантаженість медичної інфраструктури, форс-мажорні умови роботи лікарень і складна логістика евакуації створили ідеальне середовище для селекції та стрімкої внутрішньолікарняної передачі супербактерій [21]. Як наслідок, *K. pneumoniae* стала лідером серед збудників гнійно-запальних ускладнень: частота її виділення у відділеннях інтенсивної терапії кардіохірургічного профілю зросла з 60% у 2021 р. до 84% у 2023 р. серед усіх грамнегативних бактерій, а в загальній структурі ранових інфекцій

її частка сягає від 20,7% до 39,0%, витісняючи історично домінуючі грампозитивні коки та навіть інші неферментуючі бактерії [8–10].

Особливістю українських ізолятів *K. pneumoniae* є формування специфічного резервуара збудників з екстремальною (XDR) та панрезистентністю (PDR), що поєднується з високим рівнем вірулентності [6]. Геномний аналіз клінічних ізолятів, виділених від поранених українських військових і цивільних (як в Україні, так і в клініках ЄС), демонструє циркуляцію специфічних сиквенс-типів (ST), які поєднують полірезистентність із генами гіпервірулентності (табл. 1.3) [2, 6, 24].

Таблиця 1.3

Домінуючі сиквенс-типи *K. pneumoniae*, виділені від пацієнтів з України [2, 6, 7, 11, 12, 20, 24, 28]

Сиквенс-тип (ST)	K-серотип	Характеристика резистентності	Маркери вірулентності
1	2	3	4
ST395	K2, K39, K64, KL108	Карбапенемази (NDM-1, -5, OXA-48), CTX-M-15, <i>armA</i> . XDR (~45%). Стійкість до цефідероколу	<i>ybt, iuc, rmpA/A2</i>
ST307	KL102	NDM-1, KPC-2/-3. XDR (~50%). Резистентність до аміноглікозидів	<i>ybt, iuc, rmpA</i>
ST147	K64, K10	Ко-продукція NDM-1/-5 та OXA-48. PDR та XDR фенотипи (включаючи стійкість до колістину)	<i>ybt, iuc</i> . Гібридні плазмиди вірулентності-резистентності

Продовження таблиці 1.3

1	2	3	4
ST23 (CG10146)	KL57, O2v.2	Гібридний клон: NDM-1, ОХА-48, КРС-2. Екстремально широкий спектр стійкості порівняно з класичним ST23-К1	<i>ybt, iuc, rmpA/A2,</i> <i>clb</i> (колібактин). Епідемічний клон

Ключовою генетичною характеристикою цих ізолятів є наявність широкого арсеналу детермінант стійкості: понад 84% штамів продукують бета-лактамази розширеного спектра (наприклад, СТХ-М-15), а резистентність до карбапенемів зумовлена масовим поширенням метало-бета-лактамаз (переважно NDM-1, NDM-5, VIM) та серинових карбапенемаз (ОХА-48, КРС-2/-3) [6, 26, 29, 30]. Вкрай небезпечним явищем є часта ко-продукція кількох карбапенемаз (наприклад, NDM + ОХА-48) в одній бактеріальній клітині, що нівелює ефективність новітніх інгібітор-захищених бета-лактамів (наприклад, цефтазидим-авібактаму), а також формування стійкості до антибіотиків «останнього резерву», таких як колістин (завдяки хромосомним мутаціям у генах *pmrB* та *phoP*) та цефідерокол [2, 13, 31, 32].

Надзвичайно тривожним є той факт, що багато українських ізолятів містять химерні плазмиди типу IncFIB+IncHI1B (наприклад, похідні від pNDM-MAR та pLVPK), які одночасно несуть гени мультирезистентності (наприклад, *bla*NDM-1, *armA*) та маркери гіпервірулентності [6, 24]. Експерименти *in vivo* на мишах та *Galleria mellonella* показали, що такі панрезистентні штами зберігають і навіть посилюють свою патогенність, спричиняючи гостру летальність у модельних організмах [2].

Такий безпрецедентний рівень поширення полірезистентних і гіпервірулентних штамів становить серйозну глобальну загрозу, що виходить

далеко за межі України. Масова медична евакуація військовослужбовців із тяжкими бойовими травмами і масштабна міграція цивільного населення призвели до транскордонного перенесення цих конвергентних клонів до лікарень багатьох країн Європи, зокрема Німеччини, Нідерландів, Польщі, Данії, Іспанії та Великої Британії [5, 6, 12, 13, 21].

Системи епідеміологічного нагляду цих держав зафіксували різке, епідемічне зростання випадків виявлення NDM-продукуючих штамів *K. pneumoniae*, які були генетично безпосередньо пов'язані з українськими пацієнтами [13, 33]. Наприклад, у Німеччині у 2022 році відбувся сплеск NDM-1 та NDM-1/OXA-48 штамів, безпосередньо асоційованих із пацієнтами з України (до 32% всіх випадків NDM-1) [13, 21]. Також документують нозокоміальне передавання в закладах країн, що приймають пацієнтів. Повідомлялося про випадки внутрішньолікарняної передачі штаму *K. pneumoniae* ST147 (з *bla*NDM-1) від українських пацієнтів до місцевих хворих у педіатричному онкологічному центрі в Нідерландах. Передача частково була пов'язана з контамінацією водопровідної системи (раковин) лікарень, що підтверджує надзвичайну здатність цих штамів до виживання, формування біоплівки та колонізації медичного середовища [12].

Оскільки традиційні алгоритми емпіричної терапії на Заході не розраховані на ко-продукцію метало-бета-лактамаз (NDM) та серинових карбапенемаз (OXA-48), лікарі стикаються з ситуацією, коли навіть найновіші комбіновані антибіотики виявляються безсилями [31, 32]. Європейський центр профілактики та контролю захворювань ввів суворі рекомендації щодо обов'язкового скринінгу та застосування превентивної ізоляції всіх пацієнтів, госпіталізованих з України [6, 34].

Українські та іноземні науковці шукають альтернативні шляхи лікування. Фахівці з України використовують альтернативні підходи для подолання панрезистентних інфекцій бойових ран. Зокрема, успішно застосовується комбінація азитроміцину та меропенему: азитроміцин, який сам по собі не є активним проти грамнегативних бактерій, індукує перебудову клітинної

стілки *K. pneumoniae*. Таким чином, XDR/PDR-штами стають чутливими до меропенему [35]. На міжнародному рівні наукова спільнота розробляє персоналізовану фаготерапію, виділяючи бактеріофаги з українських стічних вод, йдеться про проєкт Phage Support Ukraine [24].

1.3. Фаготерапія

Глобальна криза антимікробної резистентності зумовила безпрецедентний інтерес до альтернативних методів лікування інфекцій, серед яких провідне місце займає фаготерапія, що базується на використанні літичних бактеріофагів для цілеспрямованої ерадикації патогенних бактерій [36]. Історія цього підходу бере початок із відкриття вірусів бактерій Фредеріком Туортом у 1915 році та Феліксом д'Ереллем у 1917 році, причому перше задокументоване клінічне застосування фагів відбулося у Парижі в 1919 році для лікування бактеріальної дизентерії [37]. Хоча західна медицина майже повністю відмовилася від фагів після початку масового виробництва антибіотиків, інтенсивні дослідження та клінічна практика неперервно тривали у країнах Східної Європи, зокрема в Інституті Еліави у Грузії та в Інституті Гіршфельда у Польщі [38, 39]. Нині мультирезистентні патогени, особливо *K. pneumoniae*, становлять критичну загрозу для систем охорони здоров'я в усьому світі, що робить відродження фаготерапії надзвичайно актуальним завданням, оскільки вона пропонує механізм дії, який докорінно відрізняється від традиційних хімічних антимікробних препаратів [40].

Фундаментальні біологічні властивості бактеріофагів забезпечують їм значні переваги над класичними антибіотиками, проте водночас зумовлюють і певні недоліки, що вимагає ретельного підходу до їх застосування у клінічній практиці. У табл. 1.4 наведено порівняльну характеристику цих двох класів антимікробних агентів.

Таблиця 1.4

**Порівняльна характеристика властивостей антибіотиків та
бактеріофагів [41, 42]**

Характеристика	Антибіотики	Бактеріофаги
Специфічність	Широкий спектр дії, ризик розвитку дисбіозу та пригнічення нормофлори	Висока специфічність (штамова або видова), збереження інтактним нормального мікробіому
Фармакокінетика	Концентрація поступово зменшується внаслідок метаболізму та виведення	Самореплікація у вогнищі інфекції за умови наявності чутливих бактеріальних клітин
Вплив на біоплівки	Обмежена дифузія крізь матрикс, низька ефективність	Руйнування матриксу за допомогою ферментів деполімераз
Резистентність	Статична молекула, швидкий відбір стійких бактеріальних штамів	Спільна еволюція, можливість подолання стійкості

Терапевтичне застосування фагів проти *K. pneumoniae* є яскравим прикладом того, як можна використовувати специфічні вразливості патогену. Головним фактором вірулентності цієї бактерії є товста полісахаридна капсула, яка захищає клітину від фагоцитозу та дії антибіотиків [43]. Цей захисний бар'єр успішно долається завдяки наявності у бактеріофагів специфічних деполімераз — ферментів, що здійснюють селективну деградацію полісахаридів певних К-типів. Руйнуючи капсулу, фаги «демаскують» бактерію, яка стає критично вразливою до дії ефекторів імунної системи хазяїна [42]. Більше того, коли *K. pneumoniae* намагається уникнути фагової інфекції шляхом мутацій, що призводять до втрати капсули або

модифікації ліпополісахаридних рецепторів, вона стикається з глибоким еволюційним компромісом, втрачаючи свій гіпермукоїдний фенотип, знижуючи вірулентність і часто відновлюючи чутливість до антибіотиків [43, 44]. Цей феномен забезпечує міцне підґрунтя для інтеграції фаготерапії в сучасні протоколи лікування панрезистентних штамів *K. pneumoniae*, зокрема у пацієнтів із тяжкими пораненнями та полімікробними інфекціями [2, 24].

Незважаючи на значні теоретичні та практичні переваги, широке впровадження фаготерапії стикається зі складним комплексом біологічних, клінічних та регуляторних бар'єрів. Бактерії використовують потужний арсенал механізмів захисту від фагів, серед яких системи рестрикції-модифікації, CRISPR-Cas, маскування рецепторів та шляхи абортівної інфекції, що сприяє швидкій появі фагорезистентних бактеріальних варіантів [44, 45]. Водночас імунна система ссавців, зокрема ретикулоендотеліальна система печінки та селезінки, здатна стрімко виводити циркулюючі фаги з кровообігу, а вироблення нейтралізуючих антитіл може суттєво послабити ефективність повторних фагових введень [38]. З клінічної та фармакологічної точок зору, здатність фагів до самореплікації створює надзвичайно складні, нелінійні фармакокінетичні та фармакодинамічні профілі, які сильно залежать від початкової щільності бактеріальної популяції, що ускладнює розрахунок оптимального дозування та вибір шляхів введення [40, 41]. Зрештою, регуляторні рамки залишаються фундаментальною перешкодою, оскільки сучасні системи затвердження ліків орієнтовані на хімічно стабільні молекули, а не на біологічні об'єкти, що еволюціонують і часто вимагають створення персоналізованих «магістральних» препаратів безпосередньо для кожного пацієнта [36, 43].

Науковці розробляють низку стратегій оптимізації для подолання описаних викликів. Створення фагових коктейлів, що об'єднують кілька різних вірусів, які використовують різні бактеріальні рецептори, ефективно розширює терапевтичний спектр і пригнічує появу стійких мутантів [41]. Концепція фаго-антибіотичної синергії є одним із перспективних напрямів

досліджень, оскільки комбінований вплив обох агентів створює селективний тиск, який змушує бактерії до реалізації еволюційних компромісів, за яких набуття резистентності до одного антимікробного фактора зумовлює підвищення вразливості до іншого [44]. Для вирішення фармакокінетичних обмежень та уникнення імунного кліренсу розробляються різні системи доставки, такі як ліпосоми, полімерні мікрокапсули та гідрогелі, що захищають фаги від агресивних біологічних середовищ, включаючи шлункову кислоту та антитіла [36]. Поряд із фізичним захистом віріонів, прогрес у галузі генної інженерії та синтетичної біології відкриває можливості для конструювання рекомбінантних фагів із розширеним спектром хазяїв. Модифіковані вектори здатні забезпечувати прецизійну доставку ефекторних молекул, зокрема систем CRISPR-Cas, для селективної елімінації детермінант антибіотикорезистентності у таких патогенів, як *K. pneumoniae* [45]. Стратегічно важливим кроком для повноцінної інтеграції персоналізованої фаготерапії в рутинну клінічну практику є створення адаптивних нормативно-правових баз, розширення добре описаних фагових банків та впровадження алгоритмів машинного навчання для швидкого підбору бактеріофагів [38].

1.4. Способи терапевтичної доставки бактеріофагів

Ефективність фаготерапії як альтернативного або додаткового методу лікування бактеріальних інфекцій фундаментально залежить від обраного способу доставки бактеріофагів до вогнища ураження. Метод адміністрування визначає фармакокінетичні та фармакодинамічні властивості вірусних препаратів, їхню біодоступність, здатність долати фізіологічні бар'єри та уникати передчасного імунного кліренсу в організмі господаря [46]. У науковій літературі розглядаються кілька ключових шляхів введення фагів: системний (внутрішньовенний, внутрішньом'язовий, внутрішньочеревний), пероральний, інгаляційний та локальний (топічний) [47].

Системне введення, зокрема внутрішньовенне, забезпечує найшвидший розподіл фагів по всьому організму, дозволяючи їм досягати більшості органів та тканин за дуже короткий проміжок часу. Водночас основним викликом системної доставки є швидке розпізнавання та елімінація вірусних часток органами ретикулоендотеліальної системи, переважно макрофагами печінки та селезінки, що вимагає ретельного розрахунку дозування або застосування методів інкапсуляції [47].

Пероральна доставка є найменш інвазивною та традиційно застосовується для терапії шлунково-кишкових інфекцій, проте її системна біодоступність є вкрай низькою через інактивацію фагів кислим середовищем шлунка та травними ферментами [46]. Для захисту фагових часток при пероральному прийомі застосовуються системи доставки, такі як ліпосоми, гідрогелі та полімерні мікрокапсули, які забезпечують їхнє виживання та контрольоване вивільнення в кишечнику [38].

Інгаляційний (аерозольний) шлях доставки за допомогою небулайзерів є критично важливим для лікування респіраторних інфекцій, оскільки він дозволяє створювати високі концентрації препарату безпосередньо у нижніх дихальних шляхах [48]. Основною проблемою цього методу є механічний стрес та нагрівання під час аерозолізації, що може пошкоджувати структуру фагів (особливо їхні хвостові відростки), тому перевага надається вібраційно-сітчастим небулайзерам порівняно зі струменевими або ультразвуковими [36].

Локальна доставка передбачає безпосереднє нанесення фагів на рани, опіки, введення в порожнини суглобів або інтравезикальне (внутрішньоміхурове) зрошення [37]. Цей метод дозволяє мінімізувати імунний кліренс і ризик системних алергічних реакцій та створити високе співвідношення вірусних часток до бактерій безпосередньо у місці формування біоплівки [48].

Лікування інфекцій, спричинених мультирезистентними штамми *K. pneumoniae*, вимагає комплексного та специфічного підходу до доставки фагів, зважаючи на те, що цей патоген здатний викликати широкий спектр

важких нозологій: від некротизуючих пневмоній та сепсису до інфекцій медичних імплантатів та ускладнених ран [43].

У випадках важких системних інфекцій, зумовлених панрезистентними гіпервірулентними штамами *Klebsiella*, що часто зустрічається у пацієнтів із політравмами та бойовими пораненнями, перевага надається внутрішньовенному введенню фагових коктейлів у поєднанні з антибіотикотерапією [2, 37]. Така комбінація дозволяє не лише знизити бактеріальне навантаження у крові, але й використовувати механізми еволюційних компромісів патогену [43].

При перипротезних суглобових інфекціях та хронічних остеомієлітах, спричинених *K. pneumoniae*, клінічні протоколи найчастіше використовують комбінований підхід: системне внутрішньовенне введення фагів супроводжується локальною доставкою — прямим хірургічним зрошенням рани або імплантату під час процедури дебридменту [37].

Окремим і надзвичайно важливим напрямком застосування бактеріофагів проти *Klebsiella* є деколонізація шлунково-кишкового тракту. Мультирезистентні штами бактерії часто безсимптомно колонізують кишечник госпіталізованих пацієнтів, створюючи ендogenous резервуар для подальших летальних інфекцій. Для ерадикації такого носійства застосовується пероральна доставка фагових препаратів (іноді поєднана з інтравектальним введенням), що дозволяє цілеспрямовано знищити колонії *K. pneumoniae* у кишковому мікробіомі, не порушуючи при цьому баланс корисної коменсальної мікрофлори [47].

Таким чином, бактеріофаги, завдяки своїй здатності до специфічного розпізнавання рецепторів та руйнування капсульних полісахаридів за допомогою деполімераз, є перспективною альтернативою антибіотикам. Успішна реалізація цього потенціалу у клінічній практиці безпосередньо залежить від глибини розуміння біологічних властивостей вірусів та обґрунтованого вибору методів їх введення.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Матеріали

2.1.1. Бактеріофаги

У ході роботи досліджували 9 ізолятів бактеріофагів. Виділення фагів проводили зі стічних вод Бортницької станції аерації протягом 2023–2025 років.

2.1.2. Культури бактерій

Для виділення, накопичення та перевірки спектру активності бактеріофагів застосували 106 клінічних ізолятів бактерій роду *Klebsiella* з колекції НПБК. Вони відрізняються за спектром чутливості до антибіотиків та були виділені з різних джерел. Використовували нічні культури бактерій, культивовані у рідкому поживному середовищі та на скошеному агарі.

2.1.3. Живильні середовища

Для культивування бактерій використовували рідкі та агаризовані поживні середовища виробництва Merck (Німеччина): трипсиново-соєвий бульйон (Tryptic Soy Broth) та трипсиново-соєвий агар (Tryptic Soy Agar). Детальний склад середовищ наведено у підрозділі 2.2.1.

2.2. Методи досліджень

2.2.1. Культивування бактерій

Бактерій культивували у рідкому поживному середовищі та на скошеному агарі. Перелік використаних живильних середовищ і їх склад наведено у табл. 2.1.

Таблиця 2.1

Склад живильних середовищ

Середовище	Склад, г/л
Тryptic Soy Broth (Merck, Німеччина) Трипсиново-соєвий бульйон	Панкреатичний лізат казеїну – 17,0 Папаїновий лізат соєвих бобів – 3,0 D(+) моногідрат глюкози – 2,5 NaCl – 5,0 K ₂ HPO ₄ – 2,5
Тryptic Soy Agar (Merck, Німеччина) Трипсиново-соєвий агар	Панкреатичний лізат казеїну – 15,0 Папаїновий лізат соєвих бобів – 5,0 NaCl – 5,0 Агар-агар – 15,0

Використовували трипсиново-соєвий бульйон у якості основного середовища для культивування бактерій і постановки вірусологічних експериментів. Бактерії культивувалися в аеробних умовах за температури 37 °С.

2.2.2. Виділення бактеріофагів

Виділення бактеріофагів проводили зі стічних вод Бортницької станції аерації методом подвійних агарових шарів. Для цього зразок води пропускали через шприцевий фільтр з розміром пор 0,45 мкм. Після чого 500 мкл зразка вносили в 7 мл агаризованого середовища (0,7% агару) разом зі 100 мкл суспензії свіжої нічної культури бактерії і наносили на нижній шар застиглому агаризованого середовища (1,4% агару). Результати враховували після інкубації протягом 24 годин за температури 37 °С за наявності негативних колоній на бактеріальному газоні. Визначали розмір та структуру окремих негативних колоній і вилучали віддалені бляшки для отримання чистих ліній. Вилучені негативні колонії переносили в 1 мл 0,9%-го розчину NaCl, зберігали за температури 4 °С.

2.2.3. Отримання чистих ліній бактеріофагів

Для отримання чистих ліній бактеріофагів проводили щонайменше п'ять раундів пасажувань. Для вихідного зразка виконували серію десятирикратних розведень. Після чого 500 мкл кожного розведення вносили в 7 мл агаризованого середовища (0,7% агару) разом зі 100 мкл суспензії свіжої нічної культури бактерії і наносили на нижній шар застиглому агаризованого середовища (1,4% агару). Результати враховували після інкубації протягом 24 годин за температури 37 °С. Окремі негативні колонії вилучали та переносили в 1 мл 0,9%-го розчину NaCl та зберігали за температури 4 °С.

2.2.4. Накопичення бактеріофагів

Накопичення бактеріофагів, вилучених у вигляді окремих негативних колоній після пасажувань, проводилось методом зливного лізису. Для цього до 7 мл агаризованого середовища (0,7% агару) додавали 500 мкл такого розведення бактеріофагів, яке дає суцільний лізис з окремими невеликими ділянками газону бактерії, і 100 мкл суспензії свіжої нічної культури бактерії, на якій цей фаг утворює чіткі та прозорі негативні колонії. Після інкубації протягом 24 годин за температури 37 °С на поверхню наносили 10 мл 0,9%-вого розчину NaCl. Після інкубації протягом доби за температури 4 °С зразок центрифугували при 4900 об/хв за температури 15 °С протягом 45 хвилин на центрифугі Megafuge ST Plus Series (Thermo Scientific, США) і фільтрували через бактеріальний фільтр 0,22 мкм.

2.2.5. Титрування бактеріофагів

Для визначення точного титру бактеріофагів у вихідних бактеріальних лізатах і у лізатах після накопичення використовували метод агарових шарів за Грація. Для цього вихідну суспензію розводили серією десятикратних розведень. Після чого 500 мкл кожного розведення вносили до 7 мл агаризованого середовища (0,7% агару) разом зі 100 мкл суспензії свіжої нічної культури бактерії і наносили на нижній шар застиглому агаризованого середовища (1,4% агару). Облік проводили після інкубації протягом 24 годин за температури 37 °С, враховували результати по розведенню, у якому спостерігали окремі негативні колонії. Кількість фагових часток у 1 мл фаголізату вираховували за формулою:

$$T = \frac{n}{V \times a}, \quad (2.1)$$

де T – кількість фагових часток у 1 мл (титр), БУО/мл;

n – кількість бляшок на одній чашці Петрі, шт;

V – об'єм внесеного вірусвмісного матеріалу, мл;

a – розведення, яке використовували.





Для приблизного визначення концентрації бактеріофагів у бактеріальних лізатах використовували краплинний тест. Вихідну суспензію розводили серією десятикратних розведень. На нижній шар застиглому агаризованого середовища (1,4% агару) наносили 7 мл агаризованого середовища (0,7% агару) разом зі 100 мкл суспензії свіжої нічної культури бактерії. Після застигання верхнього шару крапали по 5 мкл кожного розведення на відповідні сектори. Переносили чашку в термостат після повного висихання крапель. Результати враховували після інкубації протягом 24 годин за температури 37 °С за наявності лізису бактеріального газону на секторах.

2.2.6. Визначення спектру літичної активності бактеріофагів

Для біологічної характеристики бактеріофагів визначали спектри їх літичної активності методом, описаним у пункті 2.2.5. Після застигання верхнього шару крапали по 5 мкл зразків фагів (титр 10^6 – 10^9 БУО/мл) на відповідні сектори. Для оцінки лізису використовували метод чотирьох плюсів, приклад шкали наведено у табл. 2.2.

Таблиця 2.2

**Шкала оцінки лізису при визначенні спектру літичної активності
бактеріофагів**

Оцінка	Характеристика	Опис	Приклад лізису*
+	Ріст бактерії, слабкий лізис	Мутна, непрозора зона лізису	
++	Ріст бактерії, слабкий лізис	Мутна зона лізису	
+++	Ріст бактерії слабкий, помітний лізис	Прозора зона лізису з невеликою мутністю	
++++	Ріст бактерії відсутній, повний лізис	Прозора зона лізису	

* – розміри колоній не співвідносяться, масштаб не збережено

При визначенні літичної активності враховували лише варіанти з трьома і чотирма плюсами для зменшення впливу можливої дії факторів, описаних у пункті 3.4 цієї роботи.

2.2.7. Виділення ДНК

Виділення геномної ДНК бактеріофагів проводили з попередньо очищених (після щонайменше п'яти раундів пасажувань) та концентрованих препаратів (титр 10^6 – 10^9 БУО/мл). Для екстракції нуклеїнових кислот використовували Phage DNA Isolation Kit (Norgen Biotek, Канада). Процедуру виконували у суворій відповідності до протоколу виробника. Отримані зразки ДНК зберігали за температури -20 °С.

2.2.8. Підготовка бібліотек для секвенування

Підготовку бібліотек для секвенування здійснювали з використанням набору TruSeq DNA Nano (Illumina, США). Фрагментацію ДНК проводили фізичним методом (ультразвукова дезінтеграція) з використанням системи фокусованого ультразвуку Covaris S220 (Covaris, США) згідно з інструкцією виробника.

Вимірювання концентрації та оцінку чистоти отриманих зразків ДНК проводили за допомогою флуориметра Qubit (Thermo Fisher Scientific, США) та спектрофотометра NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, США). Зразки, що відповідали вимогам за концентрацією та чистотою, були відібрані для подальшого секвенування.

Після завершення пробопідготовки проводили вимірювання концентрації готових бібліотек на флуориметрі Qubit. На основі отриманих даних здійснювали об'єднання бібліотек в еквімолярних співвідношеннях для отримання фінального пулу, готового до секвенування.

2.2.9. Секвенування

Секвенування геномів бактеріофагів проводили на платформі Illumina MiSeq у Latvian Biomedical Research and Study Centre (Рига, Латвія). Для запуску використовували набір реактивів MiSeq Reagent Nano Kit v2 (500 cycles). Секвенування здійснювали у режимі парних кінців (paired-end), мультиплексуючи 24 зразки в одному запуску.

2.2.10. Перевірка стабільності бактеріофагів після небулізації

Після встановлення точного титру методом титрування зразків за Грація перевіряли вплив небулізації на активність бактеріофагів. Використовували струменевий небулайзер Microlife NEB 200 Active (Microlife AG, Швейцарія). Перед початком процедури відбирали 1 мл фаголізату в мікропробірку в якості контрольної групи. За інструкцією виробника у розпилювальну камеру наливали 8 мл препарату. Для збирання аерозолу користувалися модифікованою установкою, запропонованою Astudillo et al. (рис. 2.1) [49].

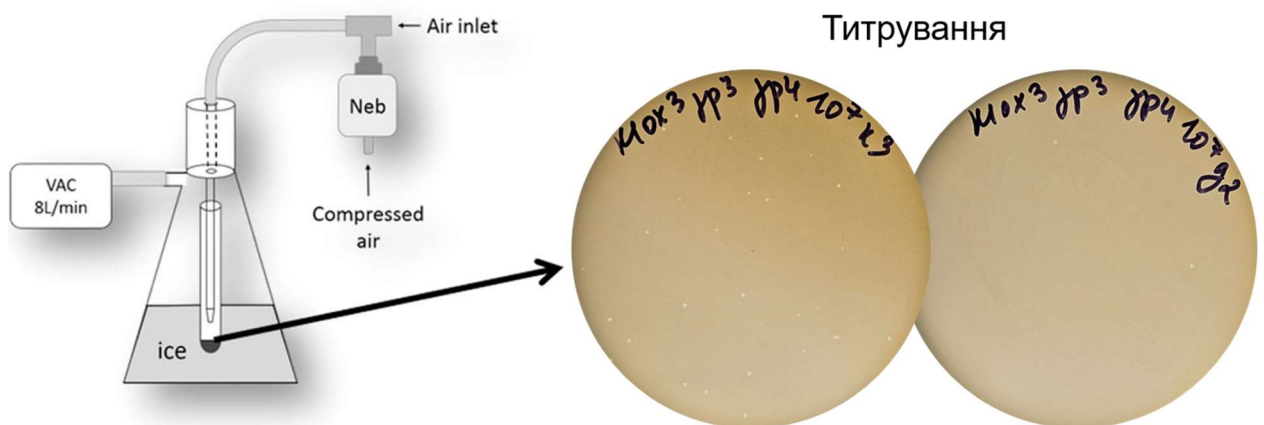


Рис. 2.1. Схема експерименту для перевірки стабільності бактеріофагів після небулізації. Ліворуч зображено установку для збирання аерозолу. Адаптовано з Astudillo et al. [49]

Використовували прилад вакуумного фільтрування Duran 1000 mL (DWK Life Sciences, Німеччина) та мембранний вакуумний насос GM-0.33II (Китай). Після небулізації всього об'єму розчину зібрану рідину і контрольний зразок титрували методом агарових шарів за Грація у трьох повтореннях. До 7 мл агаризованого середовища (0,7% агару) додавали 100 мкл суспензії нічної культури бактерії і 500 мкл розведених зразків, наносили на нижній шар застиглому агаризованого середовища (1,4% агару). Для висіву обирали розведення, при якому на газоні спостерігатимуться окремі негативні колонії. Після інкубації протягом 24 годин за температури 37° С рахували кількість окремих негативних колоній на газоні бактерії та встановлювали титр за формулою 2.1. Виконували статистичну обробку даних за допомогою програми Microsoft Excel.

2.2.11. Біоінформатична обробка даних

Повний цикл біоінформатичної обробки секвенованих зразків включав етапи контролю якості, збірки *de novo* та функціональної анотації повних геномів.

Попередню обробку прочитувань здійснювали за допомогою алгоритму *bbduk* із пакету *bbmap*. На цьому етапі проводили видалення низькоякісних ділянок та обрізання фрагментів за довжиною. Після нормалізації та контролю якості проводили збірку *de novo* з використанням *Unicycler* (версія 0.5.1) при різних параметрах, включно з варіацією K-мерів. Якість збірок оцінювали за допомогою програми *QUAST*, що дозволило обрати оптимальні варіанти для подальшого аналізу. Верифікацію структури зібраних геномів здійснювали шляхом картування необроблених прочитувань на отримані послідовності. Для визначення фізичних кінців молекул фагової ДНК використовували програмне забезпечення *PhageTerm*.

Для таксономічної ідентифікації ізолятів та пошуку найближчих гомологів проводили порівняння отриманих послідовностей із міжнародною базою даних GenBank (NCBI, США) за допомогою алгоритмів BLAST.

Функціональну анотацію геномів проводили комплексно із застосуванням інструментів Pharookka, GeneMark, Prodigal, Aragorn (для тРНК), ТМНММ та Phobius (для трансмембранних доменів). Пошук консервативних доменів та верифікацію функцій білків здійснювали за допомогою BLASTp, HHpred та бази даних NCBI CDD. Кожна відкрита рамка зчитування (ORF) підлягала ручній верифікації для точного визначення функції білкового продукту.

Для оцінки геномної подібності та кластеризації отриманих ізолятів на основі нуклеотидної ідентичності використовували програму VIRIDIC. Візуалізацію порівняння генних кластерів та структурної організації геномів виконували за допомогою інструменту clinker.

2.2.12. Статистична обробка даних

Титрування в експерименті з перевірки стабільності виконувалися в трьох повтореннях. Для кожного зразка розраховували середні значення десяткового логарифму титрів контрольної та дослідної груп та їх різницю, а також стандартне відхилення, стандартну помилку та коефіцієнт варіації. Для порівняння середніх значень між контрольними та дослідними групами використовувався двовибірковий t-критерій Стьюдента для незалежних вибірок. Значення вважали статистично значущими при $p < 0,05$. Отримані результати представлено у вигляді середнього значення \pm стандартне відхилення.

Оформлення таблиць, розрахунок статистичних параметрів та графічну візуалізацію виконували за допомогою програми Microsoft Excel.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Первинна характеристика бактеріофагів

Бактеріофаги виділяли зі стічних вод Бортницької станції аерації методом подвійних агарових шарів. Використовували 5 клінічних ізолятів *Klebsiella* spp. як хазяїв, щоб збільшити різноманітність отриманих фагів. Усього було виділено 9 зразків. Вони відрізнялися за морфологією і розмірами негативних колоній. У ході роботи було отримано негативні колонії різних морфологій (рис. 3.1-3.3).



Рис. 3.1. Первинне виділення бактеріофагів зразка PhK2, бактерія *K. michiganensis* 3b7



Рис. 3.2. Первинне виділення бактеріофагів зразків PhK4 та PhK5, бактерія *K. michiganensis* 3b7

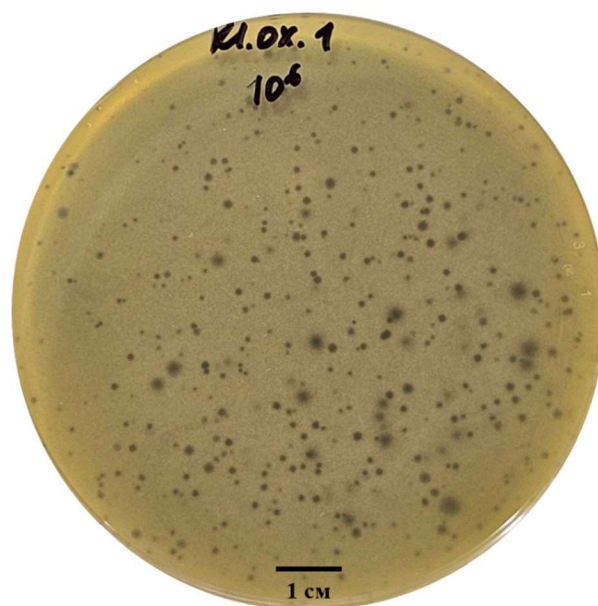


Рис. 3.3. Первинне виділення бактеріофагів зразків PhK6 та PhK7, бактерія *K. michiganensis* 1

Виділення різних фагів свідчить про високе різноманіття умовно-патогенних бактерій та сприйнятливих до них бактеріофагів у міській стічній воді. Для отримання чистих ліній вилучали окрему віддалену негативну колонію і проводили пасажування.

3.2. Морфологія негативних колоній досліджуваних зразків

Зразок PhK1 був попередньо виділений зі стічних вод БСА із негативної колонії на газоні бактерії *K. pneumoniae* M. Бактеріофаги цього зразка утворюють бляшки <1 мм в діаметрі з ореолом (рис. 3.4).

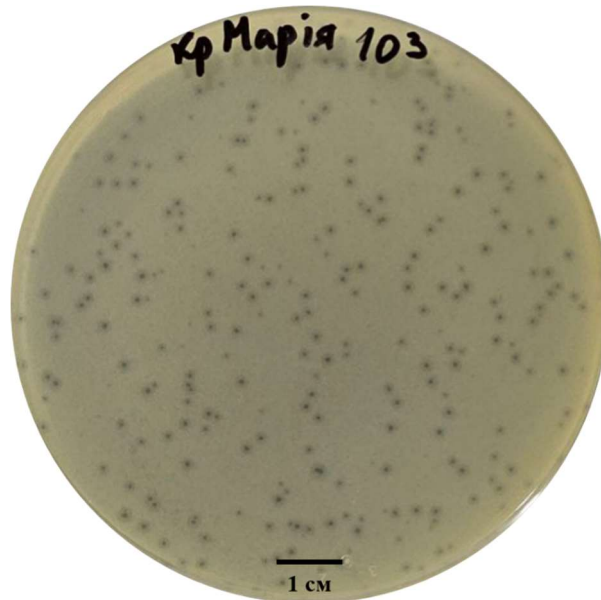


Рис. 3.4. Морфологія негативних колоній ізоляту зі зразка PhK1, розведення 10^{-3} , бактерія *K. pneumoniae* M

Зразки PhK2 та PhK3, а також PhK4 та PhK5 були отримані в червні 2025 року з двох проб стічної води БСА на газоні бактерії *K. michiganensis* 3b7. Вони були розділені шляхом вилучення окремих негативних колоній і пасажувань. У бактеріофагів PhK2 спостерігали утворення чітких бляшок 1 мм в діаметрі без ореолу (рис. 3.5).

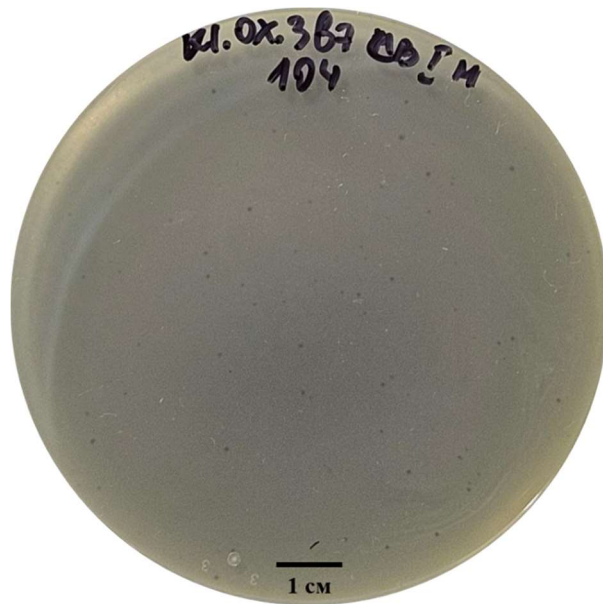


Рис. 3.5. Морфологія негативних колоній ізоляту зі зразка PhK2, розведення 10^{-4} , бактерія *K. michiganensis* 3b7

Для фагів зразка PhK3 характерні бляшки 1-2 мм в діаметрі з ореолом та нечітким центром (рис. 3.6).



Рис. 3.6. Морфологія негативних колоній ізоляту зі зразка PhK3, розведення 10^{-4} , бактерія *K. michiganensis* 3b7

Бактеріофаги PhK4 утворюють чіткі бляшки 1-1,5 мм в діаметрі без ореолу (рис. 3.7).

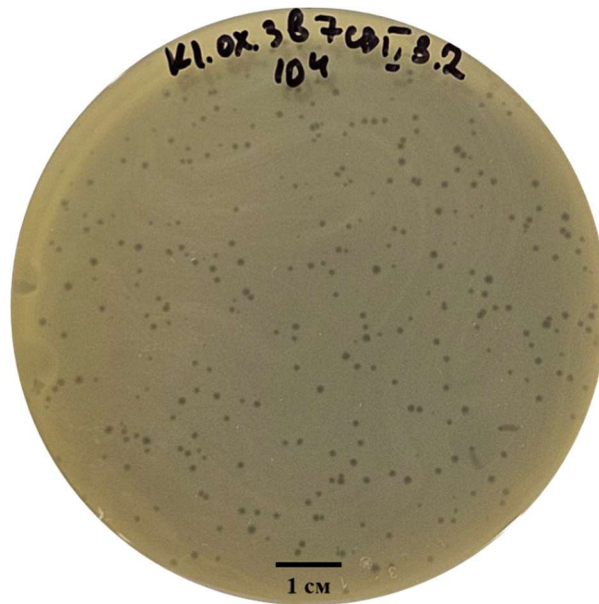


Рис. 3.7. Морфологія негативних колоній ізоляту зі зразка PhK4, розведення 10^{-4} , бактерія *K. michiganensis* 3b7

Для зразка PhK5 спостерігали утворення дрібних чітких негативних колоній <1 мм в діаметрі без ореолу (рис. 3.8).



Рис. 3.8. Морфологія негативних колоній ізоляту зі зразка PhK5, розведення 10^{-4} , бактерія *K. michiganensis* 3b7

З однієї проби стічної води БСА в лютому 2025 року виділили 2 зразки бактеріофагів, PhK6 та PhK7, на газоні бактерії *K. michiganensis* 1. Фаги були

отримані шляхом вилучення окремих негативних колоній і пасажувань. Бактеріофаги PhK6 утворюють чіткі бляшки 1 мм в діаметрі без ореолу (рис. 3.9).

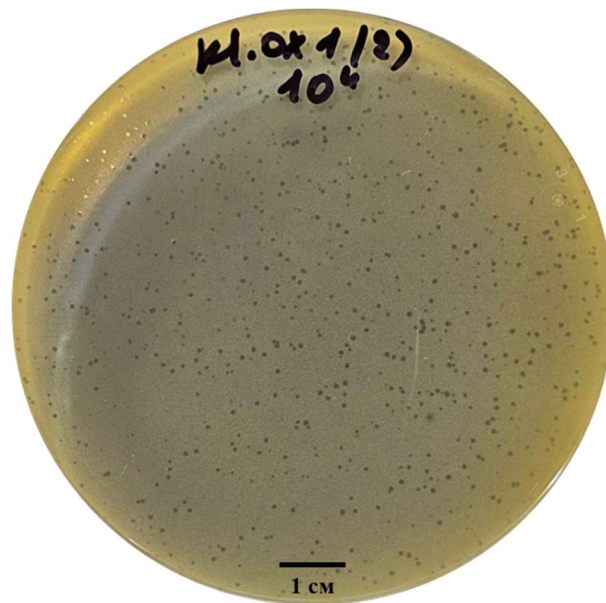


Рис. 3.9. Морфологія негативних колоній ізоляту зі зразка PhK6, розведення 10^{-4} , бактерія *K. michiganensis* 1

Зразок PhK7 характеризується бляшками 2-3 мм в діаметрі з ореолом та нечітким центром (рис. 3.10).

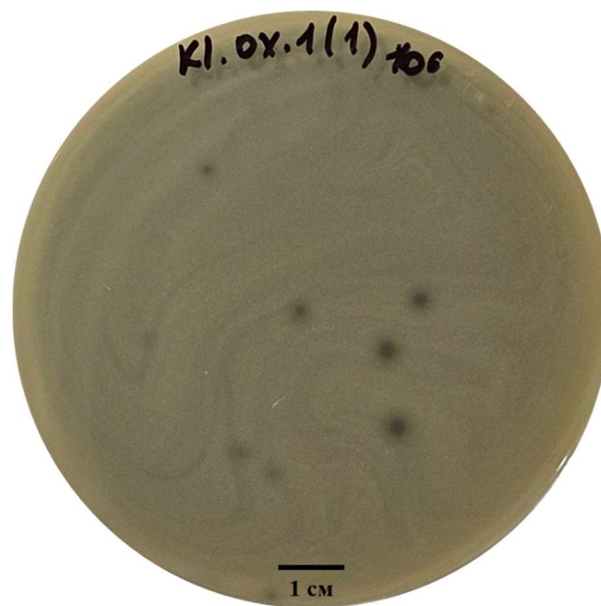


Рис. 3.10. Морфологія негативних колоній ізоляту зі зразка PhK7, розведення 10^{-4} , бактерія *K. michiganensis* 1

Зразок PhK12 був виділений зі стічних вод БСА. Бактеріофаги утворюють чіткі негативні колонії 1-1,5 мм в діаметрі з ореолом (рис. 3.11). Спостерігали мінливість у морфології колоній цього зразка – бляшки можуть бути без ореолу. Зміни носять спорадичний характер, а їх природа залишається невідомою.

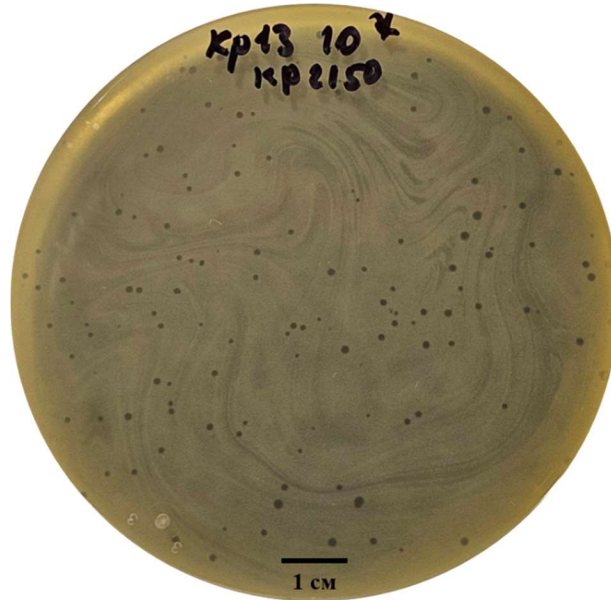


Рис. 3.11. Морфологія негативних колоній ізоляту зі зразка PhK12, розведення 10^{-7} , бактерія *K. pneumoniae* 2150

Зразок PhK14 був виділений зі стічних вод БСА, із негативної колонії на газоні бактерії *K. pneumoniae* 1646. У процесі роботи з ізолятом було знайдено хазяїна, який краще підтримував реплікацію фагів, тому дослідження і накопичення цього зразка проводилися на *K. pneumoniae* 361. У бактеріофагів PhK14 на цьому хазяїні спостерігали утворення чітких бляшок <1 мм в діаметрі з чітким ореолом (рис. 3.12).

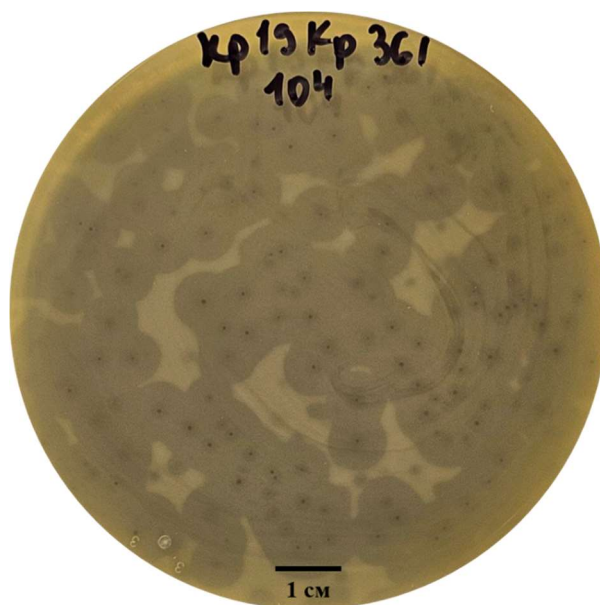


Рис. 3.12. Морфологія негативних колоній ізоляту зі зразка PhK12, розведення 10^{-4} , бактерія *K. pneumoniae* 361

Фаги зі зразків PhK1, PhK3, PhK7, PhK12 та PhK14 утворюють негативні колонії з ореолами (див. рис. 3.4, 3.6, 3.10, 3.11, 3.12). Ці гало містять неінфіковані клітини бактерій у стаціонарній фазі, оптична щільність яких була знижена під дією дифузних деполімераз, що руйнують капсули [50]. При описі таких негативних колоній важливо пам'ятати, що вимірюванню підлягає лише центральна частина бляшки, а зона ореолу має виключатися з аналізу для забезпечення точності результатів, оскільки діаметр гало збільшується з часом [51].

Таким чином, виділені фаги є перспективним джерелом для біотехнологічного отримання деполімераз. Зараз значна увага приділяється пошуку та розробці систем експресії цих ферментів, адже вони мають широкий спектр застосувань, наприклад, терапія проти бактеріальних патогенів, ерадикація біоплівки, а також для промислового виробництва олігосахаридів [52]. Дослідники неодноразово виділяли бактеріофаги з деполімеразами і підтверджували ефективність цих ферментів для лікування бактеріальних інфекцій [53–56].

Варто додати, що морфологія негативних колоній, які утворює один ізолят бактеріофага, залежить не лише від будови капсули хазяя, а й від складу поживного середовища та умов культивування [57, 58].

3.3. Характеристика геномів бактеріофагів

У результаті секвенування та біоінформатичного аналізу було отримано 9 завершених геномів бактеріофагів. Для кожного геному визначили загальну кодувальну здатність, тобто який відсоток ділянок кодує білки, знайшли найближчого відомого гомолога у GenBank та рівень відмінності від нього (унікальність). Сучасна класифікація вірусів прокариотів, згідно з останніми релізами ICTV (MSL 41), відійшла від морфологічного поділу на користь геномної таксономії [59]. Це дозволило чітко ідентифікувати виділені ізоляти на рівні родів та родин.

Загальні характеристики геномів наведено у табл. 3.1. Зауважимо, що всі фаги належать до різних видів, проте бактеріофаги PhK6 та PhK7 є представниками вже ідентифікованих vB_KpnM_KpV477 та KpnP_VR4605 відповідно (мають значення унікальності геному близько 5%). Усі ізоляти мають унікальність геному менше ніж 30%, порівняно із відомими фагами бази GenBank, що свідчить про їхню належність до вже відомих родів.

Більшість ізолятів мають високий показник кодувальної здатності (84–95%), а також належать до різних морфотипів: 4 зразки належать до подоподібних, 3 до міоподібних та 2 до сифоподібних вірусів.

Таблиця 3.1

Загальні характеристики геномів досліджених бактеріофагів

Фаг	Кодувальна здатність геному, %	Унікальність геному фага, %	Родина, підродина	Рід
PhK1	91,33	9,43	<i>Ackermannviridae</i>	<i>Taipeivirus</i>
PhK2	85,78	9,14	<i>Demerecviridae</i>	<i>Sugarlandvirus</i>
PhK3	94,37	20,78	<i>Autographiviridae,</i> <i>Slopevirinae</i>	<i>Drulisvirus</i>
PhK4	84,43	7,46	<i>Demerecviridae</i>	<i>Sugarlandvirus</i>
PhK5	95,34	6,08	<i>Straboviridae</i>	<i>Slopevirus</i>
PhK6	94,23	4,27	<i>Straboviridae,</i> <i>Tevenvirinae</i>	<i>Jiaodavirus</i>
PhK7	91,02	5,59	<i>Autographiviridae,</i> <i>Studiervirinae</i>	<i>Teetrevirus</i>
PhK12	91,84	6,33		<i>Przondovirus</i>
PhK14	91,3	10,28		

Для оцінки геномної подібності провели порівняння послідовностей у програмі VIRIDIC (рис. 3.13). На основі рівня нуклеотидної ідентичності встановлено наявність двох чітко виражених кластерів — ізоляти PhK2 та PhK4 належать до роду *Sugarlandvirus* (кластер роду 4), та фаги PhK12 і PhK14 є представниками роду *Przondovirus* (кластер 2).

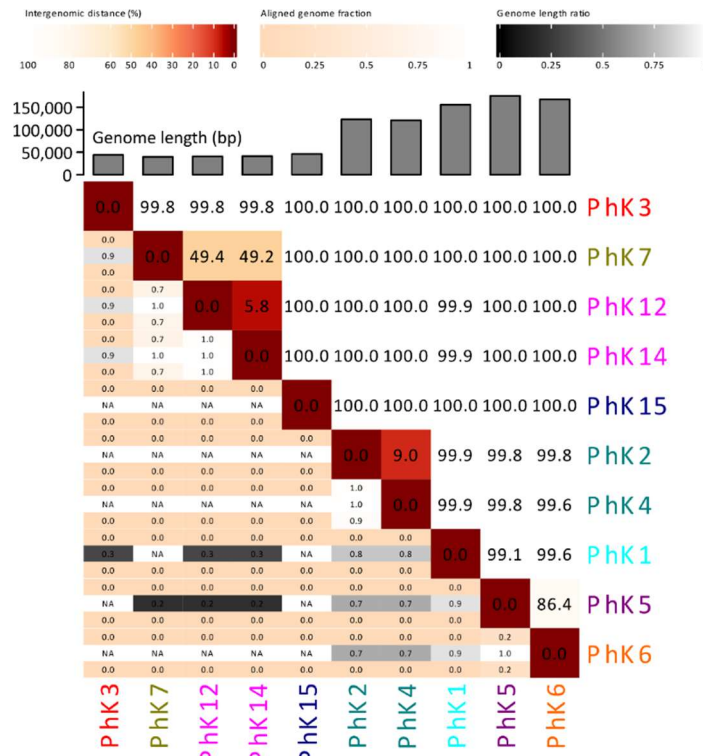


Рис. 3.13. Теплова карта значень міжгеномної подібності нуклеотидних послідовностей виділених бактеріофагів. Мітки, що позначають геноми, забарвлені довільно на основі подібності на рівні роду

Функціональна анотація показала відмінності в межах кластерів, що можуть бути пов'язані з рекомбінаційними подіями та модульною природою фагових геномів. Такі результати свідчать про значну різноманітність отриманих ізолятів і підтверджують тезу про високе різноманіття умовно-патогенних бактерій та сприйнятливих до них бактеріофагів у міській стічній воді.

Спостерігали модульну організацію, характерну для бактеріофагів: структурні білки (капсид, упаковка ДНК, хвостовий відросток), білки, що беруть участь у процесах, пов'язаних із реплікацією, транскрипцією, тощо, білки лізису хазяїна та гени взаємодії з клітиною бактерії. Розподіл функціонально анотованих генів подано у табл. 3.2.

Таблиця 3.2

Результати функціональної анотації геномів бактеріофагів

Фаг	Загальна кількість генів	Капсид та упаковка ДНК	Хвостовий відросток	ДНК, РНК, метаболізм	Регуляція транскрипції	Лізис	Інтеграція/ексцизія	Гени додаткового метаболізму, взаємодії із хазяїном,	Транспортні РНК
PhK1	197	16	16	30	4	4	0	8	5
PhK2	176	9	12	38	2	5	0	4	23
PhK3	56	9	4	8	0	3	0	1	0
PhK4	169	9	12	28	2	5	0	4	24
PhK5	265	17	30	52	5	7	0	4	2
PhK6	273	20	29	52	9	8	0	9	15
PhK7	48	9	4	12	0	3	0	2	0
PhK12	50	9	3	10	0	3	0	2	0
PhK14	49	9	3	12	0	3	0	2	0

Ізолят PhK1 належить до роду *Taiteivirus*. Ці фаги характеризуються великими геномами (157–161 т.п.н.) та низьким ГЦ-складом (близько 46%). Наявність 5 генів тРНК у PhK1 (табл. 3.2) є типовою рисою роду, що допомагає вірусу адаптуватися до транскрипційного апарату *K. pneumoniae* [60].

Ізоляти PhK5 (*Slopekvirus*) та PhK6 (*Jiaodavirus*) представляють родину *Straboviridae*. Рід *Slopekvirus* часто виявляється домінантним у стічних водах завдяки здатності інфікувати широке коло хазяїв. У нашому дослідженні PhK5 показав високу кодувальну здатність (95,34%), що характерно для цих екологічно успішних міоподібних вірусів.

Фаги PhK2 та PhK4 віднесені до роду *Sugarlandvirus*. Велика кількість тРНК (23–24 гени), виявлена у PhK2 та PhK4 (табл. 3.2), корелює з літературними даними про цей рід (23–28 тРНК), що свідчить про складну регуляцію їхнього життєвого циклу [61, 62].

Група подоподібних фагів (PhK3, PhK7, PhK12, PhK14) належить до родини *Autographiviridae*. Особливу увагу привертає кластер роду *Przondovirus* (PhK12, PhK14), який є найчисельнішим родом у сучасних базах даних. Їхня «популярність» зумовлена компактним геномом (близько 40 тис. п.н.) та обов'язковою наявністю однієї-двох деполімераз, що робить їх ідеальними інструментами для картування капсульних типів *Klebsiella* [63].

У таблиці 3.2 вказано кількість генів, що кодують відповідні білки із зазначених функціональних категорій, або ж РНК. Важливо, що в жодному з геномів не виявлено генів інтеграз/ексцизназ або інших маркерів лізогенності, а також генів вірулентності чи антибіотикорезистентності, що свідчить про безпечність фагів для подальших застосувань.

3.4. Спектр літичної активності досліджуваних бактеріофагів

Спектр літичної активності виділених бактеріофагів досліджували на 106 ізолятах бактерій роду *Klebsiella* з колекції НПБК. Результати представлені на діаграмі (рис. 3.14). Виділені фаги відрізняються за спектром літичної активності та лізують 62 зі 106 тестованих ізолятів. Із 9 досліджених зразків 2 є вузькоспеціалізованими і здатні лізувати менше 10 тестованих ізолятів *Klebsiella*, а 6 зразків лізували від 12 до 28% ізолятів. Найбільш широкий спектр активності (44,3%) продемонстрував міоподібний бактеріофаг PhK5, який належить до роду *Slopekvirus*.

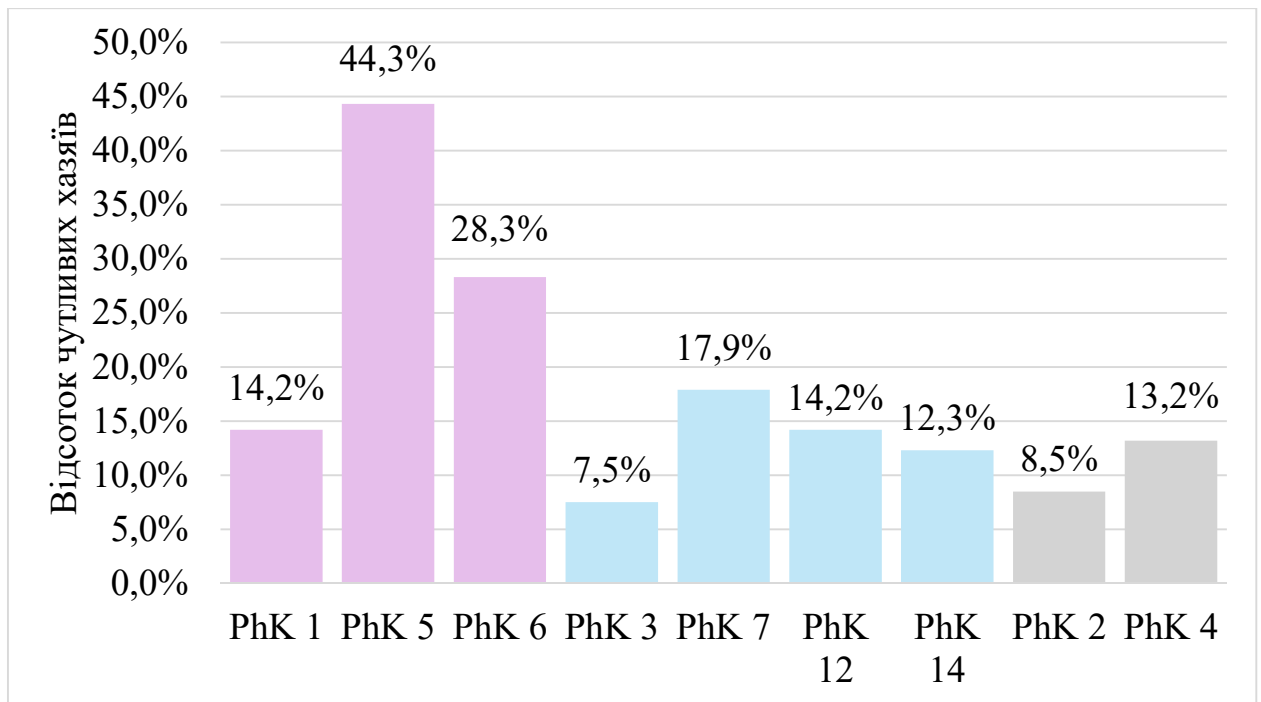


Рис. 3.14. Активність виділених бактеріофагів на різних ізолятах *Klebsiella* spp. Міоподібні бактеріофаги позначено рожевим кольором, подоподібні — блакитним і сифоподібні показані сірим.

Виділені у цьому дослідженні бактеріофаги демонструють показники літичної активності, які узгоджуються з даними інших науковців. Група вчених із Китаю виділила зі стічних вод лікарні і характеризувала бактеріофаг vB_KrP_HS106, який має 63,4% активності [64]. Іспанські вчені виділили і описали фаг vB_KrnM-VAC66, який продемонстрував здатність інфікувати 61,7% клінічних штамів [65], а бразильські науковці дослідили фаг vB_KrnS_Uniso31, який показує лізис клінічних ізолятів *K. pneumoniae* на рівні 42,3% [52].

Особливий інтерес викликає той факт, що ізолят PhK5 виявився генетично спорідненим зі згаданим фагом vB_KrnM-VAC66 — рівень унікальності PhK5 становить лише 6,08%. Така висока подібність до одного з найбільш ефективних фагів у дослідженні науковців з Іспанії пояснює високу літичну активність PhK5 (44,3%) і на нашій вибірці. Спектр дії VAC66 охоплює критично важливі для клінічних умов капсульні типи KL2, KL13,

KL24, KL64 та KL151 [65]. Спорідненість PhK5 до цього фага вказує на його здатність ефективно долати капсульні бар'єри та уникати бактеріальних систем захисту (CRISPR-Cas та R-M), що робить його перспективним компонентом для створення універсальних фагових коктейлів.

Але, фаги з відносно вузькими спектрами активності також зустрічаються у дослідженнях, наприклад, зі стічних вод у Гізі було виділено фаг vB_Kpn_ZC2 з активністю 23,3% [66]. Група вчених з Китаю та США виділила 54 бактеріофаги, які значно варіювали за своїми спектрами активності. Аналіз частоти фагів за діапазоном хазяїв показав, що більшість ізолятів зазвичай лізують від 11 до 30 штамів, що узгоджується з нашими результатами для 6 зразків [67].

Варто зауважити, що показник літичної активності бактеріофагів, специфічних до бактерій роду *Klebsiella*, суттєво залежить від вибірки штамів-хазяїв. Оскільки полісахаридна капсула *K. pneumoniae* створює фізичний бар'єр для доступу фага до поверхневих рецепторів, успішність інфекції зумовлена насамперед функціонуванням деполімераз, локалізованих на хвостових відростках або шипах віріона. Станом на сьогодні описано 77 серотипів і понад 180 KL типів капсули [68], проте більшість досліджених фагів кодують лише одну-дві деполімерази, що обмежує спектр їхніх хазяїв кількома капсульними типами [51]. Водночас у літературі повідомлялося про виділення фагів, що несуть 8 [69] та 9 [70] деполімераз.

У роботі ми використовували бактеріальні ізоляти, виділені з різних джерел у різний час, але без відомостей про їхні капсульні типи. З огляду на це, визначений спектр активності не є вичерпним, проте він дозволяє охарактеризувати специфічність фагів саме до локальних клінічних ізолятів.

Зазвичай після первинного скринінгу методом краплинного тесту проводять оцінку ЕОР на чутливих хазяях для кількісної характеристики ефективності інфекції. При використанні методу ЕОР показники літичної активності, як правило, знижуються, оскільки нівелюється вплив таких

артефактів, як «лізис ззовні», деградація клітин під дією сполук, які присутні у фаголізаті, а також вплив невідповідності множинності інфекції (MOI).

Такі характеристики як відсутність генів антибіотикорезистентності, маркерів лізогенії та факторів вірулентності, а також зручність накопичення фагів та різноманітність спектрів чутливих ізолятів бактерій дозволили використовувати виділені зразки для подальших досліджень їхньої стабільності.

3.5. Стабільність досліджуваних бактеріофагів після небулізації

Важливим аспектом розробки антибактеріальних препаратів для лікування інфекцій дихальних шляхів, спричинених *Klebsiella* spp., є можливість їх доставки безпосередньо до вогнища запалення (легень та бронхів) у формі аерозолю [71]. У зв'язку з цим було досліджено вплив дії небулайзера, тобто процесу небулізації, на стабільність бактеріофагів різних морфотипів.

Результати експерименту продемонстрували, що стабільність віріонів при переході в аерозольний стан корелює з їхньою морфологією (рис. 3.15). Найбільш суттєве зниження титру спостерігали у представників роду *Sugarlandvirus* (PhK2, PhK4), що мають сифоподібний морфотип (довгий нескоротливий хвіст): падіння інфекційного титру склало 1,03 та 0,67 \log_{10} БУО/мл відповідно. Також статистично значуще зниження титру (на 0,36 \log_{10} БУО/мл) відмічено для міоподібного фага PhK1 (рід *Taipeivirus*).

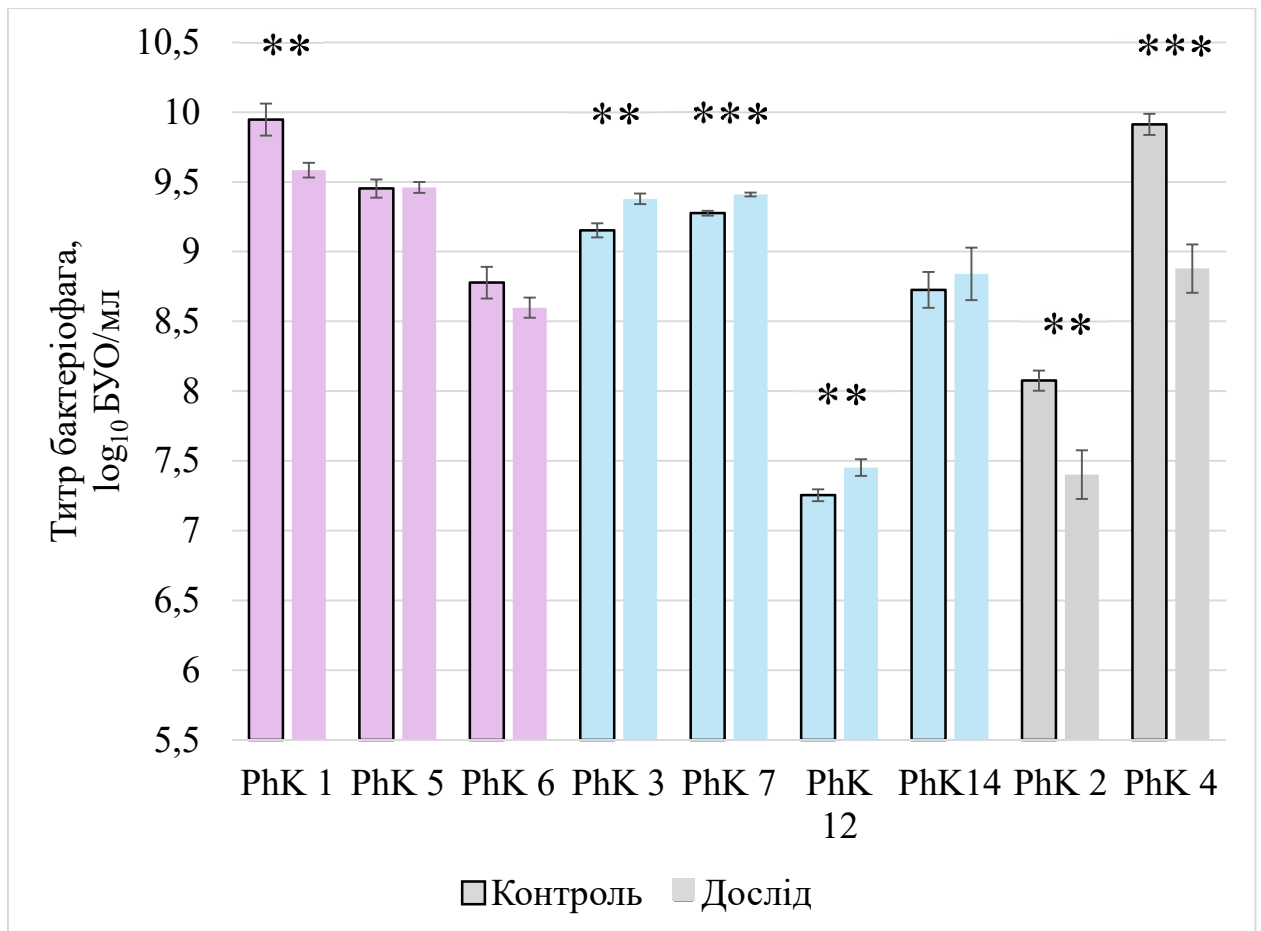


Рис. 3.15. Стабільність досліджених ізолятів фагів, специфічних до *Klebsiella* spp., після небулізації. Кількість рядів титрувань для кожного експерименту – 3. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Міоподібні бактеріофаги позначено рожевим кольором, подоподібні — блакитним і сифоподібні показані сірим.

Такі результати пояснюються високою чутливістю складних хвостових апаратів до механічного напруження зсуву (shear stress) та гідродинамічного стресу, що виникає під час проходження рідини через дрібні отвори та зіткнення з дефлектором небулайзера (рис 3.16) [72]. Водночас, для міоподібних бактеріофагів PhK5 та PhK6 різниця між показниками контролю та дослідів не була статистично значущою, що може свідчити про стійкість віріонів до механічного стресу під час небулізації.

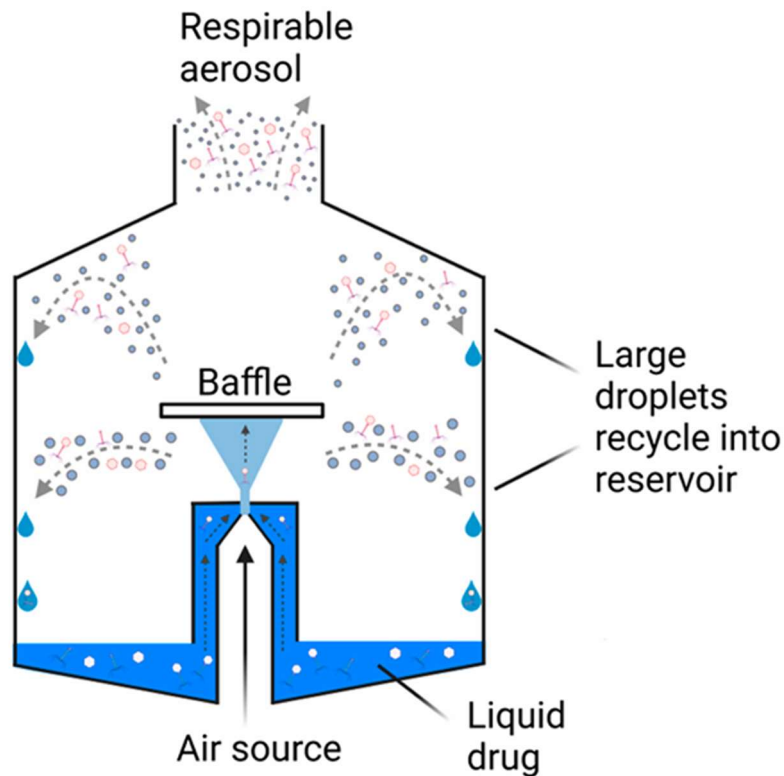


Рис. 3.16. Схематичне зображення процесу аерозолізації у камері струменевого небулайзера. Стиснене повітря (Air source) захоплює рідину (Liquid drug), утворюючи первинний аерозоль. Зіткнення крапель з дефлектором (Baffle) призводить до утворення респірабельної фракції (Respirable aerosol), великі краплі повертаються у резервуар (Large droplets recycle into reservoir) для повторної небулізації. Віріони позначено червоним. Адаптовано з Flint et al. [73]

Згідно з даними Leung et al., бактеріофаги з довгими відростками (міо- та сифоподібні віруси) є значно вразливішими до небулізації порівняно з подоподібними фагами. Зокрема, для сифовірусу D29 падіння титру може сягати $3,7 \log_{10}$ БУО/мл [74]. Візуалізація методом трансмісійної електронної мікроскопії підтверджує, що механічне пошкодження віріонів найчастіше проявляється у формі відриву хвостового відростка від капсида, що призводить до повної втрати інфекційності навіть за умови збереження цілісності капсида з геномом. Крім того, напруження може призводити до передчасного виходу нуклеїнової кислоти, що залишає порожні капсиди [49].

Водночас, незважаючи на зафіксоване зниження, усі досліджувані зразки зберегли титр на рівні, достатньому для терапевтичного застосування, що вказує на загальну придатність цих фагів для інгаляційної доставки [41]. Схожі результати було отримано в клінічних випробуваннях коктейлю VX004-A (BiomX) для *Pseudomonas aeruginosa*, де втрати при небулізації становили менше одного порядку (\log_{10}), забезпечуючи ефективну дозу доставлених часток [75]. Ben Porat et al. також зазначають, що хоча небулізація супроводжується зниженням титру, воно є варіабельним (від 0,2 до 2,8 \log_{10} БУО/мл) і залежить більше від самого процесу, тобто типу пристрою, складу буфера та фізичних характеристик, ніж від подальшого проходження дихальними шляхами [71].

Окрему увагу привертає динаміка титру подоподібних фагів (PhK3 та PhK7 та PhK12), для яких було зафіксовано парадоксальне підвищення кількості негативних колоній після небулізації на 0,13–0,23 \log_{10} БУО/мл (рис. 3.16). Цей феномен ми пов'язуємо з ефектом механічної деагрегації віріонів. У нативному фаголізаті віріони часто існують не у вигляді окремих частинок, а утворюють конгломерати. Причини агрегації можуть бути у злипанні частинок через залишки бактеріальних капсульних полісахаридів або клітинного дебрису, а також у самоасоціації капсидів при високих концентраціях фага [72].

При підрахунку титру методом агарових шарів один такий агрегат, що містить, наприклад, 5–10 віріонів, утворює лише одну негативну колонію. Під час небулізації високочастотні коливання та механічні удари краплин об стінки камери небулайзера призводять до розриву слабких нековалентних зв'язків усередині конгломератів. У результаті агрегати розпадаються на поодинокі вільні віріони, що призводить до зростання титру (кількості інфекційних одиниць) у дрібнодисперсному аерозолі. Це узгоджується з даними Leung et al. щодо високої стійкості подоподібних вірусів (наприклад, PEV2), які демонструють мінімальний вплив небулізації на стабільність завдяки відсутності довгого хвостового відростка [74].

Хоча в доступній літературі частіше описується деактивація фагів при небулізації, виявлений нами ефект деагрегації свідчить про надзвичайну механічну міцність подоподібних фагів родів *Drulisvirus*, *Teetrevirus* та *Przondovirus*. Flint et al. наголошують, що через відсутність єдиних закономірностей для всіх фагів, результати можуть бути специфічними для кожного окремого ізоляту [73]. У нашому випадку стабільність подоподібних фагів робить їх ідеальними кандидатами для використання в інгаляційних фагових коктейлях, оскільки процес доставки не лише не пошкоджує їх, а й сприяє кращому розподілу вірусних частинок у об'ємі препарату. Крім того, використання таких стабільних морфотипів дозволяє уникнути потреби у складних системах стабілізації (наприклад, ліпосомальному інкапсулюванні), які часто застосовуються для захисту чутливіших фагів від стресу небулізації [72].

ВИСНОВКИ

1. Зі стічних вод виділили дев'ять ізолятів бактеріофагів, здатних лізувати клінічні ізоляти *Klebsiella* spp. Вони відрізняються за морфологією негативних колоній, таксономічним положенням, геномними характеристиками і за спектром чутливих хазяїв.

2. Спектр літичної активності виділених ізолятів коливається у межах 7–45%, що свідчить про вибіркковість дії. Найбільш широкий спектр хазяїв властивий міоподібним бактеріофагам.

3. Усі секвеновані віруси демонструють унікальність геному менше ніж 30% у порівнянні з відомими бактеріофагами в GenBank, що підтверджує їх приналежність до вже відомих родів. Бактеріофаги PhK6 та PhK7 є представниками вже ідентифікованих видів, оскільки мають значення унікальності геному близько 5%.

4. Біоінформатичний аналіз підтверджує, що всі ізоляти є літичними і не містять факторів вірулентності, маркерів лізогенності та генів антибіотикорезистентності, що свідчить про безпечність фагів для подальшого клінічного застосування.

5. Стабільність віріонів при переході в аерозольний стан корелює з їхньою морфологією. У сифоподібних бактеріофагів падіння інфекційного титру склало 0,67 та 1,03 \log_{10} БУО/мл, для одного з міоподібних фагів — 0,36 \log_{10} БУО/мл. Усі досліджувані зразки зберегли титр на рівні, достатньому для терапевтичного застосування, що вказує на загальну придатність цих фагів для інгаляційної доставки.

6. Отже, виділені бактеріофаги є перспективними складниками антибактеріальних препаратів, оскільки не містять маркерів лізогенності, генів вірулентності та антибіотикорезистентності, мають спектр активності, що покриває 62 зі 106 тестованих локальних клінічних ізолятів *Klebsiella* spp. та зберігають терапевтично допустимі показники титру після небулізації.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Prestinaci, F., Pezzotti, P. and Pantosti, A. (2015). Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathog. Glob. Health*, [online] Volume 109(7), p. 309. Available at: <https://doi.org/10.1179/2047773215y.0000000030> [Accessed 14 March 2026].
2. Ljungquist, O. et al. (2024). Pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated from Ukrainian war victims are hypervirulent. *J. Infect.*, [online] Volume 89(6), p. 106312. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2024.106312> [Accessed 8 March 2026].
3. Ding, J., Yan, W., Zheng, R., Ma, M. and Jiang, L. (2025). Combating *Klebsiella pneumoniae*: from antimicrobial resistance mechanisms to phage-based combination therapies. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, [online] Volume 15. Available at: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2025.1691215> [Accessed 9 March 2026].
4. Jin, S. S., Wang, W. Q., Jiang, Y. H., Yu, Y. T. and Wang, R. L. (2025). A comprehensive overview of *Klebsiella pneumoniae*: Resistance dynamics, clinical manifestations, and therapeutic options. *Infect. Drug Resist.*, [online] Volume 18, pp. 1611–1628. Available at: <https://doi.org/10.2147/idr.s502175> [Accessed 12 March 2026].
5. Vasylyeva, O. (2025). Antimicrobial resistance in Ukraine — what healthcare providers need to know when treating Ukrainian refugees. *Advances in Clinical Medical Research and Healthcare Delivery*, [online] Volume 5(4), pp. 74–80. [online]. Available at: <https://doi.org/10.53785/2769-2779.1333> [Accessed 9 March 2026].
6. Biedrzycka, M., Izdebski, R., Hryniewicz, W., Gniadkowski, M. and Żabicka, D. (2025). Carbapenemase-producing *Enterobacterales* from patients arriving from Ukraine in Poland, March 2022–February 2023. *Infect. Dis. Ther.*, [online] Volume 14(2), pp. 401–419. Available at: <https://doi.org/10.1007/s40121-024-01097-9> [Accessed 9 March 2026].

7. Kovalchuk, V. P., Mc Gann, P., Bohush, H. L., Fomina, N. S., Fomin, O. O. and Kondratiuk, V. M. (2025). Antimicrobial resistance and genomic epidemiology of bacterial war-wound infections: Ukraine, 2014–2023. *Zaporozhye Med. J.*, [online] Volume 27(5), pp. 355–360. Available at: <https://doi.org/10.14739/2310-1210.2025.5.338948> [Accessed 8 March 2026].
8. Holubnycha, V. M. and Kholodylo, O. V. (2025). War impact on antimicrobial resistance and bacteriological profile of wound infections in Ukraine. *Commun. Med.*, [online] Volume 5(1), pp. 1–6. Available at: <https://doi.org/10.1038/s43856-025-01056-6> [Accessed 9 March 2026].
9. Коцар, О. В. та Кочнєва, О. В. (2025). *Klebsiella pneumoniae* – провідний збудник ранової інфекції. *Інфекційні Хвороби*, [online] Том 2(2), сс. 41–46. Доступно за посиланням: <https://doi.org/10.11603/1681-2727.2025.2.15299> [Дата звернення 10 Бер. 2026].
10. Chyzh, K., Malysheva, T. and Mazur, A. (2024). Microbiological spectrum of pathogens in cardiac surgery patients in the intensive care unit. *Emerg. Med.*, Volume 20(8), [online] pp. 781–786. Available at: <https://doi.org/10.22141/2224-0586.20.8.2024.1815> [Accessed 10 March 2026].
11. Mc Gann, P. T. et al. (2023). Six extensively drug-resistant bacteria in an injured soldier, Ukraine. *Emerg. Infect. Dis.*, [online] Volume 29(8), pp. 1692–1695. Available at: <https://doi.org/10.3201/eid2908.230567> [Accessed 11 March 2026].
12. Smit, W. L. et al. (2024). Nosocomial transmission of NDM-1-containing *Klebsiella pneumoniae* ST147 in a Dutch pediatric oncology center associated with patients from Ukraine. *BMC Infect. Dis.*, [online] Volume 24(1). Available at: <https://doi.org/10.1186/s12879-024-10368-2> [Accessed 11 March 2026].

13. Sandfort, M. et al. (2022). Increase in NDM-1 and NDM-1/OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in Germany associated with the war in Ukraine, 2022. *Eurosurveillance*, [online] Volume 27(50), pp. 1–7. Available at: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es.2022.27.50.2200926> [Accessed 10 March 2026].
14. Asokan, S. et al. (2025). *Klebsiella pneumoniae*: A growing threat in the era of antimicrobial resistance. *Microbe (Netherlands)*, [online] Volume 7, p. 100333. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.microb.2025.100333> [Accessed 10 March 2026].
15. Li, J., Shi, Y., Song, X., Yin, X. and Liu, H. (2025). Mechanisms of antimicrobial resistance in *Klebsiella*: Advances in detection methods and clinical implications. *Infect. Drug Resist.*, [online] Volume 18, pp. 1339–1354. Available at: <https://doi.org/10.2147/idr.s509016> [Accessed 12 March 2026].
16. Dong, N., Yang, X., Chan, E. W. C., Zhang, R. and Chen, S. (2022). *Klebsiella* species: Taxonomy, hypervirulence and multidrug resistance. *eBioMedicine*, [online] Volume 79, p. 103998. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.103998> [Accessed 12 March 2026].
17. Ikuta, K. S. et al. (2022). Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet*, [online] Volume 400(10369), pp. 2221–2248. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(22\)02185-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(22)02185-7) [Accessed 13 March 2026].
18. Krestetska, S., Peretyatko, O., Sklyar, N. and Yagnuk, Y. (2025). Carbapenem resistance shapes the population structure of *Klebsiella pneumoniae*. *Annals of Mechnikov's Institute*, [online] Volume 1, pp. 3–9. Available at: <https://doi.org/10.5281/zenodo.15011907> [Accessed 10 March 2026].
19. Abbas, R. et al. (2024). General overview of *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology and the role of siderophores in its pathogenicity. *Biology*, [online] Volume 13(2), p. 78. Available at: <https://doi.org/10.3390/biology13020078> [Accessed 11 March 2026].

20. Biedrzycka, M. et al. (2022). MDR carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* of the hypervirulence-associated ST23 clone in Poland, 2009-19. *J. Antimicrob. Chemother.*, [online] Volume 77(12), pp. 3367–3375. Available at: <https://doi.org/10.1093/jac/dkac326> [Accessed 12 March 2026].
21. Schreiber, S. et al. (2026). War injuries and antimicrobial resistance: what impact do multi-resistant pathogens have on the treatment of Ukrainian war-wounded patients?. *Eur. J. Trauma Emerg. Surg.*, [online] Volume 52(1). Available at: <https://doi.org/10.1007/s00068-026-03116-5> [Accessed 13 March 2026].
22. Jiang, X. et al. (2025). The global genomic landscape of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from 1932 to 2021. *mLife*, [online] Volume 4(4), pp. 378–396. Available at: <https://doi.org/10.1002/mlf2.70029> [Accessed 14 March 2026].
23. Magiorakos, A. P. et al. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.*, [online] Volume 18(3), pp. 268–281. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x> [Accessed 20 March 2026].
24. Green, S. et al. (2026). Genomic epidemiology of conflict-associated *Klebsiella pneumoniae* in Ukraine reveals a high-risk clone with a hybrid plasmid vulnerable to phages. [online]. Available at: <https://doi.org/10.64898/2026.01.21.700813> [Accessed 13 March 2026].
25. Pallett, S. J. C. et al. (2025). Evolving antimicrobial resistance of extensively drug-resistant Gram-negative severe infections associated with conflict wounds in Ukraine: an observational study. *Lancet Reg. Heal. - Eur.*, [online] Volume 52, p. 101274. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.lanep.2025.101274> [Accessed 14 March 2026].

26. Kovalchuk, V. P. et al. (2025). Genetic basis and phenotypical manifestations of wound pathogens of the russian-ukrainian war. *Reports Vinnytsia Natl. Med. Univ.*, [online] Volume 29(4), pp. 560–565. Available at: [https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2025-29\(4\)-01](https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2025-29(4)-01) [Accessed 8 March 2026].
27. Lebreton, F. et al. (2025). High genetic relatedness between multidrug resistant bacteria before and after the 2022 invasion of Ukraine. *Genome Med.*, [online] Volume 17(1), pp. 1–14. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13073-025-01500-1> [Accessed 9 March 2026].
28. Stepanskyi, D. et al. (2024). Phenotypic and genomic analysis of bacteria from war wounds in Dnipro, Ukraine. *JAC-Antimicrobial Resist.*, [online] Volume 6(3), pp. 1–4. Available at: <https://doi.org/10.1093/jacamr/dlae090> [Accessed 10 March 2026].
29. Filonenko, H., Ishchenko, V., Garcia, D., Tsedyk, V., Korniyenko, V. and Ishchenko, L. (2024). The frequency of β -lactamase genes in ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Ukraine. *Regul. Mech. Biosyst.*, [online] Volume 15(3), pp. 436–440. Available at: <https://doi.org/10.15421/022461> [Accessed 12 March 2026].
30. Salmanov, A. G. et al. (2025). Healthcare associated infections in patients with combat wounds and antimicrobial resistance of the responsible pathogens in Ukraine: results of a multicenter study (2022-2024). *Wiad. Lek.*, [online] Volume 78(8), pp. 1624–1634. Available at: <https://doi.org/10.36740/wlek/209517> [Accessed 11 March 2026].
31. Verkaik, N. J. et al. (2024). Antimicrobial susceptibility to last-resort antibiotics in carbapenemase-producing bacteria from Ukrainian patients. *Microbiol. Spectr.*, [online] Volume 12(11). Available at: <https://doi.org/10.1128/spectrum.01142-24> [Accessed 13 March 2026].

32. Berger, F. K. et al. (2023). Occurrence, resistance patterns, and management of carbapenemase-producing bacteria in war-wounded refugees from Ukraine. *Int. J. Infect. Dis.*, [online] Volume 132, pp. 89–92. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2023.04.394> [Accessed 14 March 2026].
33. Stein, C., Zechel, M., Spott, R., Pletz, M. W. and Kipp, F. (2023). Multidrug-resistant isolates from Ukrainian patients in a German health facility: a genomic surveillance study focusing on antimicrobial resistance and bacterial relatedness. *Infection*, [online] Volume 51(6), pp. 1731–1738. Available at: <https://doi.org/10.1007/s15010-023-02061-4> [Accessed 11 March 2026].
34. Schultze, T. et al. (2023). Molecular surveillance of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in Ukrainian patients, Germany, March to June 2022. *Euro Surveill.*, [online] Volume 28(1), pp. 1–8. Available at: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es.2023.28.1.2200850> [Accessed 10 March 2026].
35. Мошинець, О. В. та ін. (2026). Комбінована терапія карбапенем-резистентних грамнегативних інфекцій в Україні. [online] сс. 29–39. Доступно за посиланням: <https://doi.org/10.32902/2663-0338-9-2026-1-29-39> [Дата звернення 8 Бер. 2026].
36. Alshehri, A. A. et al. (2026). Bacteriophages as therapeutic agents for pulmonary infections: From biological principles to clinical applications. *Pharmaceutics*, [online] Volume 18(3), pp. 1–38. Available at: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics18030387> [Accessed 6 March 2026].
37. Stacey, H. J., De Soir, S. and Jones, J. D. (2022). The safety and efficacy of phage therapy: A systematic review of clinical and safety trials. *Antibiotics*, [online] Volume 11(10), pp. 1–13. Available at: <https://doi.org/10.3390/antibiotics11101340> [Accessed 7 March 2026].
38. Palma, M. and Qi, B. (2024). Advancing phage therapy: A comprehensive review of the safety, efficacy, and future prospects for the targeted treatment of bacterial infections. *Infect. Dis. Rep.*, [online] Volume 16(6), pp. 1127–1181. Available at: <https://doi.org/10.3390/idr16060092> [Accessed 7 March 2026].

39. Uchechukwu, C. F. and Shonekan, A. (2024). Current status of clinical trials for phage therapy. *J. Med. Microbiol.*, [online] Volume 79(9). Available at: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001895> [Accessed 5 March 2026].
40. Blasco, L., Bleriot, I., Fernández-Grela, P., Paño-Pardo, J. R., Oteo-Iglesias, J. and Tomás, M. (2025). Pharmacokinetics and pharmacodynamics studies of phage therapy. *Farm. Hosp.*, [online] Volume 49(6), pp. T407–T412. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.farma.2025.07.007> [Accessed 4 March 2026].
41. Siopi, M. et al. (2024). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of bacteriophage therapy: a review with a focus on multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Clin. Microbiol. Rev.*, [online] Volume 37(3). Available at: <https://doi.org/10.1128/cmr.00044-24> [Accessed 3 March 2026].
42. Ferriol-González, C. et al. (2024). Targeted phage hunting to specific *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates is an efficient antibiotic resistance and infection control strategy. *Microbiol. Spectr.*, [online] Volume 12(10). Available at: <https://doi.org/10.1128/spectrum.00254-24> [Accessed 6 March 2026].
43. Ding, W., Wen, Y., Chen, L. and Du, H. (2026). Bacteriophage therapy against *Klebsiella pneumoniae*. *Microorganisms*, [online] Volume 14(1), p. 201. Available at: <https://doi.org/10.3390/microorganisms14010201> [Accessed 7 March 2026].
44. Le Bris, J., Chen, N., Supandy, A., Rendueles, O. and Van Tyne, D. (2025). Phage therapy for *Klebsiella pneumoniae*: Understanding bacteria–phage interactions for therapeutic innovations. *PLoS Pathog.*, [online] Volume 21(4), pp. 1–28. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1012971> [Accessed 2 March 2026].
45. Egido, J. E., Costa, A. R., Aparicio-Maldonado, C., Haas, P. J. and Brouns, S. J. J. (2022). Mechanisms and clinical importance of bacteriophage resistance. *FEMS Microbiol. Rev.*, [online] Volume 46(1), pp. 1–16. Available at: <https://doi.org/10.1093/femsre/fuab048> [Accessed 4 March 2026].

46. Dąbrowska, K. (2019). Phage therapy: What factors shape phage pharmacokinetics and bioavailability? Systematic and critical review. *Med. Res. Rev.*, [online] Volume 39(5), pp. 2000–2025. Available at: <https://doi.org/10.1002/med.21572> [Accessed 3 March 2026].
47. Zou, G. et al. (2023). Improving the safety and efficacy of phage therapy from the perspective of phage-mammal interactions. *FEMS Microbiol. Rev.*, [online] Volume 47(4), pp. 1–16. Available at: <https://doi.org/10.1093/femsre/fuad042> [Accessed 5 March 2026].
48. Williams, J., Severin, J., Temperton, B. and Mitchelmore, P. J. (2023). Phage therapy administration route, regimen, and need for supplementary antibiotics in patients with chronic suppurative lung disease. *PHAGE Ther. Appl. Res.*, [online] Volume 4(1), pp. 4–10. Available at: <https://doi.org/10.1089/phage.2022.0036> [Accessed 2 March 2026].
49. Astudillo, A., Leung, S. S. Y., Kutter, E., Morales, S. and Chan, H. K. (2018). Nebulization effects on structural stability of bacteriophage PEV 44. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, [online] Volume 125, pp. 124–130. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.01.010> [Accessed 20 March 2026].
50. Zeineldin, M. et al. (2023). Beyond the risk of biofilms: An up-and-coming battleground of bacterial life and potential antibiofilm agents. *Life*, [online] Volume 13(2), p. 503. Available at: <https://doi.org/10.3390/life13020503> [Accessed 10 February 2026].
51. Domingo-Calap, P. et al. (2020). Isolation and characterization of two *Klebsiella pneumoniae* phages encoding divergent depolymerases. *Int. J. Mol. Sci.*, [online] Volume 21(9), p. 3160. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms21093160> [Accessed 9 February 2026].
52. Balcão, V. M. et al. (2022). Isolation and molecular characterization of a novel lytic bacteriophage that inactivates MDR *Klebsiella pneumoniae* strains. *Pharmaceutics*, [online] Volume 14(7), p. 1421. Available at: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14071421> [Accessed 12 February 2026].

53. Hsieh, P. F., Lin, H. H., Lin, T. L., Chen, Y. Y. and Wang, J. T. (2017). Two T7-like bacteriophages, K5-2 and K5-4, each encodes two capsule depolymerases: isolation and functional characterization. *Sci. Rep.*, [online] Volume 7(1). Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04644-2> [Accessed 11 February 2026].
54. Wu, J. W., Wang, J. T., Lin, T. L., Liu, Y. Z., Wu, L. T. and Pan, Y. J. (2023). Identification of three capsule depolymerases in a bacteriophage infecting *Klebsiella pneumoniae* capsular types K7, K20, and K27 and therapeutic application. *J. Biomed. Sci.*, [online] Volume 30(1), pp. 1–12. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12929-023-00928-0> [Accessed 11 February 2026].
55. Pan, Y. J. et al. (2019). Identification of three podoviruses infecting *Klebsiella* encoding capsule depolymerases that digest specific capsular types. *Microb. Biotechnol.*, [online] Volume 12(3), p. 472. Available at: <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13370> [Accessed 12 February 2026].
56. Majkowska-Skrobek, G. et al. (2018). Phage-borne depolymerases decrease *Klebsiella pneumoniae* resistance to innate defense mechanisms. *Front. Microbiol.*, [online] Volume 9, p. 419180. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02517> [Accessed 9 February 2026].
57. Poniatovskyi, V. A., Shyrobokov, V. P. and Bobyr, V. V. (2025). The influence of different components of nutrient bacteriological media on plaque formation of bacteriophages. *Bull. Probl. Biol. Med.*, [online] Volume 1(1), p. 390. Available at: <https://doi.org/10.29254/2077-4214-2025-1-176-390-399> [Accessed 8 February 2026].
58. Jo, S. J. et al. (2025). Standardization of the agar plate method for bacteriophage production. *Antibiotics*, [online] Volume 14(1), pp. 1–14. Available at: <https://doi.org/10.3390/antibiotics14010002> [Accessed 8 February 2026].

59. Krupovic, M. et al. (2016). Taxonomy of prokaryotic viruses: update from the ICTV bacterial and archaeal viruses subcommittee. *Arch. Virol.*, [online] Volume 161(4), pp. 1095–1099. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2728-0> [Accessed 7 February 2026].
60. Tisalema-Guanopatín, E. et al. (2023). New bacteriophages members of the *Ackermannviridae* family specific for *Klebsiella pneumoniae* ST258. *PHAGE Ther. Appl. Res.*, [online] Volume 4(2), p. 99. Available at: <https://doi.org/10.1089/phage.2022.0039> [Accessed 7 February 2026].
61. Zhong, L. et al. (2025). Characterization and genetic analysis of two sugarlandviruses: *Klebsiella variicola* lytic phages vB_PZK-KV7 and vB_PZK-KV23. *Arch. Virol.*, [online] Volume 170(7), p. 156. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00705-025-06331-4> [Accessed 6 February 2026].
62. Luo, Z. et al. (2021). Isolation, genomic analysis, and preliminary application of a bovine *Klebsiella pneumoniae* bacteriophage vB_Kpn_B01. *Front. Vet. Sci.*, [online] Volume 8, p. 622049. Available at: <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.622049> [Accessed 6 February 2026].
63. Kolupaeva, N. V. et al. (2025). Characterization of novel przondovirus phage adeo infecting *Klebsiella pneumoniae* of the K39 capsular type. *Viruses*, [online] Volume 17(12), p. 1600. Available at: <https://doi.org/10.3390/v17121600> [Accessed 8 February 2026].
64. Chen, C., Tao, Z., Li, T., Chen, H., Zhao, Y. and Sun, X. (2023). Isolation and characterization of novel bacteriophage vB_KpP_HS106 for *Klebsiella pneumoniae* K2 and applications in foods. *Front. Microbiol.*, [online] Volume 14, p. 1227147. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1227147> [Accessed 9 February 2026].
65. Bleriot, I. et al. (2023). Proteomic study of the interactions between phages and the bacterial host *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiol. Spectr.*, [online] Volume 11(2). Available at: <https://doi.org/10.1128/spectrum.03974-22> [Accessed 10 February 2026].

66. Fayeze, M. S. et al. (2023). Morphological, biological, and genomic characterization of *Klebsiella pneumoniae* phage vB_Kpn_ZC2. *Viol. J.*, [online] Volume 20(1), pp. 1–16. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12985-023-02034-x> [Accessed 11 February 2026].
67. Li, M. et al. (2020). Isolation and characterization of novel lytic bacteriophages infecting epidemic carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains. *Front. Microbiol.*, [online] Volume 11, p. 522488. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01554> [Accessed 11 February 2026].
68. Concha-Eloko, R., Beamud, B., Domingo-Calap, P. and Sanjuán, R. (2025). Unlocking data in *Klebsiella* lysogens to predict capsular type-specificity of phage depolymerases. *Nat. Commun.*, [online] Volume 16(1), p. 8798. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-025-63861-w> [Accessed 12 February 2026].
69. Blundell-Hunter, G. et al. (2021). Characterisation of bacteriophage-encoded depolymerases selective for key *Klebsiella pneumoniae* capsular exopolysaccharides. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, [online] Volume 11, p. 686090. Available at: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.686090> [Accessed 10 February 2026].
70. Pan, Y.-J. et al. (2017). *Klebsiella* phage Φ K64-1 encodes multiple depolymerases for multiple host capsular types. *J. Virol.*, [online] Volume 91(6), pp. 2457–2473. Available at: <https://doi.org/10.1128/jvi.02457-16> [Accessed 9 February 2026].
71. Ben Porat, S. et al. (2021). Expanding clinical phage microbiology: Simulating phage inhalation for respiratory tract infections. *ERJ Open Res.*, [online] Volume 7(4). Available at: <https://doi.org/10.1183/23120541.00367-2021> [Accessed 23 January 2026].
72. Wang, X., Xie, Z., Zhao, J., Zhu, Z., Yang, C. and Liu, Y. (2021). Prospects of inhaled phage therapy for combatting pulmonary infections. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, [online] Volume 11, pp. 1–20. Available at: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.758392> [Accessed 22 January 2026].

73. Flint, R., Laucirica, D. R., Chan, H. K., Chang, B. J., Stick, S. M. and Kicic, A. (2023). Stability considerations for bacteriophages in liquid formulations designed for nebulization. *Cells*, [online] Volume 12(16), pp. 1–17. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells12162057> [Accessed 20 January 2026].
74. Leung, S. S. Y. et al. (2019). Jet nebulization of bacteriophages with different tail morphologies – Structural effects. *Int. J. Pharm.*, [online] Volume 554, pp. 322–326. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.11.026> [Accessed 19 January 2026].
75. Weiner, I. et al. (2025). Phage therapy with nebulized cocktail BX004-A for chronic *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis: a randomized first-in-human trial. *Nat. Commun.*, [online] Volume 16(1), pp. 1–15. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-025-60598-4> [Accessed 21 January 2026].