

Колесник Олександра Олегівна,
аспірант, кафедра клініко-лабораторної та
морфофункціональної діагностики,
ДВНЗ «Ужгородський національний університет»
ORCID ID: 0000-0002-1331-4151
м. Ужгород, Україна

Кривцова Марина Валеріївна,
доктор біологічних наук, професор,
завідувачка кафедри
клініко-лабораторної та морфофункціональної діагностики,
ДВНЗ «Ужгородський національний університет»
ORCID ID: 0000-0001-8454-2509
м. Ужгород, Україна

Харіна Алла Володимирівна,
кандидат біологічних наук, доцент,
кафедра вірусології,
ННЦ «Інститут біології та медицини»,
Київський національний університет імені Тараса Шевченка
ORCID ID: 0000-0002-0722-6374
м. Київ, Україна

Морміль Олександра Юріївна,
ТОВ «НЕОПРОБІОКЕАР»
ORCID ID: 0009-0009-2071-7280
м. Київ, Україна

Савенко Маріанна Вікторівна,
кандидат біологічних наук,
асистент кафедри клініко-лабораторної
та морфофункціональної діагностики
ДВНЗ «Ужгородський національний університет»
ORCID ID: 0000-0003-4434-182X
м. Ужгород, Україна

Ефективність бактеріофагів щодо ізолятів ускладнених вогнестрільних ран в експериментах *in vitro*

Вступ. Суттєвий ріст резистентності до антибіотиків, високий рівень летальності та інвалідизації внаслідок формування мультирезистентних та панрезистентних інфекцій як у монокультури, так і у складі асоціацій, вимагає пошуку нових засобів та методологічних прийомів до стратегії лікування ускладнених персистуючих інфекцій, особливо в умовах ускладнених ранових інфекцій. У пошуку альтернативних антимікробних засобів бактеріофаги знову почали привертати увагу дослідників та клініцистів.

Метою роботи було дослідити чутливість ізолятів виділених із ранових поверхонь вогнестрільних ран до бактеріофагів.

Збір біологічного матеріалу проводили на базі центральної міської клінічної лікарні. З цією метою з ранової поверхні брали мазок за допомогою стерильної транспортної системи FLmedical (Italy). Вивчення антимікробної активності проводили у мікробіологічній лабораторії ННЦ «Мікробіології та біотехнології». Для проведення досліджень були використані клінічні ізоляти: *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Staphylococcus aureus* та *Pseudomonas spp.* Ізоляти бактеріофагів були надані ТОВ «Неопробіокеар-Україна».

Встановлено найвищу ефективність бактеріофагу щодо бактерій роду *Staphylococcus*. Дослідження чутливості клінічних ізолятів *S.aureus* показали, що їхня фагочутливість становить 81,8%. Серед досліджених штамів *Klebsiella spp.* 60% виявились стійкими до специфічного бактеріофага. Досліджені ізоляти *Escherichia coli* та *Pseudomonas spp.* проявляли низьку чутливість до бактеріофагів (33,3% та 16,7% відповідно).

Отримані дані вказують про потенціальну ефективність та перспективність фаготерапії в умовах ранових інфекцій.

Штамоспецифічна чутливість до бактеріофагів свідчить про доцільність пацієнтоорієнтованого підходу та визначення чутливості ізоляту до бактеріофагу до початку лікування.

Ключові слова: бактеріофаги, антибіотикорезистентність, фагочутливість, *in vitro*, фагово-антибіотиковий синергізм

Kolesnyk Oleksandra Olehivna, PhD Student at the Department of Clinical Laboratory and Morphofunctional Diagnostics, Uzhhorod National University, ORCID ID: 0000-0002-1331-4151, Uzhhorod, Ukraine

Kryvtsova Maryna Valeriivna, Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of the Department of Clinical Laboratory and Morphofunctional Diagnostics, Uzhhorod National University, ORCID ID: 0000-0001-8454-2509, Uzhhorod, Ukraine

Kharina Alla Volodymyrivna, Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, Virology Department, ESC 'Institute of Biology and Medicine', Taras Shevchenko National University of Kyiv, ORCID ID: 0000-0002-0722-6374, Kyiv, Ukraine

Mormil Oleksandra Yuriivna, NEOPROBIOCARE-UKRAINE LLC, ORCID ID: 0009-0009-2071-7280, Kyiv, Ukraine

Savenko Marianna Viktorivna, Candidate of Biological Sciences, Assistant Professor at the Department of Clinical Laboratory and Morphofunctional Diagnostics, Uzhhorod National University, ORCID ID: 0000-0003-4434-182X, Uzhhorod, Ukraine

Efficacy of bacteriophages against isolates of complex gunshot wounds in *in vitro* experiments

A significant increase in antibiotic resistance, high mortality and disability rates due to the formation of multidrug-resistant and pan-resistant infections both in monoculture and in associations necessitates the search for new tools and methodological techniques for the treatment of complicated persistent infections, especially in the context of complex wound infections. In the search for alternative antimicrobial agents, bacteriophages have once again begun to attract the attention of researchers and clinical surgeons.

The **aim of the study** was to investigate the sensitivity of isolates isolated from the wound surfaces of gunshot wounds to bacteriophages.

The biological material was collected at the Central City Clinical Hospital. For this purpose, a swab was taken from the wound surface using a sterile transport system, FLmedical (Italy). The antimicrobial activity was studied in the microbiological laboratory of the Research and Educational Centre 'Microbiology and Biotechnology'. The following clinical isolates were used for the study: *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas spp.* The bacteriophage isolates were provided by Neoprobicare-Ukraine LLC.

It was found that the bacteriophage was most effective against *Staphylococcus aureus* genus bacteria. The susceptibility tests of clinical isolates of *S. aureus* showed that their phage susceptibility was 81.8%. Among the studied *Klebsiella spp.* strains, 60% were resistant to a specific bacteriophage. The studied isolates of *Escherichia coli* and *Pseudomonas spp.* showed low sensitivity to bacteriophages (33.3% and 16.7%, respectively).

The data obtained indicate the potential effectiveness and good prospects of phage-based therapy in the treatment of wound infections.

The strain-specific susceptibility to bacteriophages indicates the feasibility of a patient-centred approach and determination of the isolate's susceptibility to bacteriophage before starting treatment.

Key words: bacteriophages, antibiotic resistance, phage sensitivity, *in vitro*, phage-antibiotic synergy.

Вступ. Бактеріофаги відомі вже понад століття. Першим їх активність помітив британський вчений Ернест Ханбері Ханкін у 1896 році, коли вивчав, як вода з річки Ганг впливає на холерний вібріон. Було встановлено, що вода знищує бактерії холери, ймовірно, завдяки присутності у ній специфічних фагів. Під час Першої світової війни британський дослідник Фредрік Творт та франко-канадський науковець Фелікс д'Ерелль виявили зони лізису на бактеріальних культурах, що свідчило про дію фагів. Д'Ерелль почав використовувати цей феномен для лікування бактеріальних інфекцій, що стало початком фагової терапії [1,2].

У літературі описано ефективність використання бактеріофагів для лікування багатьох бактеріальних інфекцій. Найчастіше бактеріофаги застосовуються при інфекціях шлунково-кишкового тракту, спричинених *Escherichia coli*, *Proteus spp.*, *Vibrio cholerae*, *Shigella spp.* та *Salmonella spp.* Ефективність фаготерапії також доведена у випадках трофічних виразок, хронічних ран, діабетичної стопи і муковісцидозу. Останнім часом бактеріофаги привертають дедалі більшу увагу в травматології для лікування інфекцій, викликаних антибіотикорезистентними мікроорганізмами [3].

Особливо даний напрямок є перспективним для вирішення інфекційних ускладнень ранових інфекцій в умовах військового стану.

Дослідження взаємодії між бактеріофагами та антибіотиками *in vivo* здебільшого демонструють синергійний ефект. Водночас деякі дослідження описують випадки антагонізму або нейтральної взаємодії між цими антимікробними агентами. Останні наукові публікації, присвячені комбінованому застосуванню бактеріофагів та антибіотиків у лікуванні пацієнтів із тяжкими бактеріальними інфекціями, свідчать про покращення клінічних результатів при одночасному використанні обох терапевтичних засобів [4].

Суттєвий ріст резистентності до антибіотиків вимагає пошуку нових антимікробних препаратів, тому бактеріофаги знову почати привертати увагу дослідників та клініцистів. Саме про це свідчить незначна кількість систематичних наукових експериментальних даних у літературі. Водночас, нашими попередніми дослідженнями та даними літератури показано, що чутливість до бактеріофагів є також вибірковою, тому актуальним залишається розробка нових препаратів на основі бактеріофагів та встановлення рівня їхньої чутливості до клінічних ізолятів ранових інфекцій.

Метою роботи було дослідити чутливість ізолятів виділених із ранових поверхонь вогнестрільних ран до бактеріофагів.

Методологія та методи дослідження. Забір біологічного матеріалу проводили на базі центральної міської клінічної лікарні. З цією метою з ранової поверхні брали мазок за допомогою стерильної транспортної системи FLmedical (Italy). Вивчення антимікробної активності проводили у мікробіологічній лабораторії ННЦ «Мікробіології та біотехнології». Для проведення досліджень були використані клінічні ізоляти: *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Staphylococcus aureus* та *Pseudomonas spp.*

Чутливість мікроорганізмів до бактеріофагів визначали за наступною методикою. Із 24-годинної культури мікроорганізмів готували суспензію (інокулом) у стерильному фізіологічному розчині. Інокулом висівали на поверхню агару Мюллер Хінтон. Досліджувані бактеріофаги наносили на середовище у кількості 10 мкл. У трьохкратній послідовності. Облік результатів проводили через 24 год. після інкубації у термостаті (37°C). Наявність стерильної зони у місці нанесення бактеріофагу свідчила про чутливість ізоляту [5].

Ізоляти бактеріофагів були надані ТОВ «Неопробіокеар-Україна» згідно договору про співп-

рацю. Для дослідження були обрані окремі лабораторні ізоляти бактеріофагів, які були нещодавно виділені зі стічних вод з використанням наступних бактеріальних тест-культур *Klebsiella pneumoniae* DSM30104, *Staphylococcus aureus* DSM 799, *Escherichia coli* DSM 1103, *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071.

Виклад основного матеріалу дослідження. Дослідження чутливості клінічних ізолятів *S.aureus* показали, що їхня фагочутливість становить 81,8% (табл. 1, рис. 1-2). При цьому, не спостерігалась принципова відмінність чутливості між мікроорганізмами, що перебували у складі асоціацій та монокультури. Для асоціацій значення чутливості становило 80%, для монокультур – 83,3%.

Серед досліджених штамів *Klebsiella spp.* 60% виявились стійкими до специфічного бактеріофага (табл. 1, рис. 2-3). В той же час, деякі ізоляти клебсіел, які характеризувались низькою чутливістю до антибіотиків (табл. 2) були чутливими до бактеріофагу. Дана тенденція свідчить про те, що у ряді випадків бактеріофаг (за умови специфічної чутливості патогену), може бути альтернативою антибіотику або мати виразний підсилюючий ефект антибіотикотерапії.

Досліджені ізоляти *Escherichia coli* та *Pseudomonas spp.* проявляли низьку чутливість до бактеріофагів (33,3% та 16,7% відповідно) (табл. 1, рис. 2).

Ефективність протиклебсієльного бактеріофагу можна продемонструвати на клінічному випадку. З рани була висіяна асоціація мікроорганізмів, до складу якої входили *Klebsiella pneumoniae* та *Candida glabrata*. У таблиці 2 продемонстровано антибіотикограму *K.pneumoniae* аналіз якої вказує на високий рівень резистентності ізолюваної культури (чутливість проявлялась тільки до Колістину 25мкг та Неоміцину). Визначення чутливості культури до бактеріофагу показав його ефективність (рис 3). Таким чином бактеріофаг може бути альтернативою антимікробної терапії, або доповненням до неї.

Водночас слід відмітити, що чутливість до фагів була штамоспецифічною, що свідчить про необхідність встановлення чутливості до фагового препарату перед початком лікування.

Аналіз отриманих нами даних з визначення чутливості ізолятів ранових вогнегострильних поверхонь до антибіотиків вказує на високий рівень резистентності мікроорганізмів до антибіотиків. Водночас дослідження чутливості ізолятів із раневих поверхонь вказує, що

Таблиця 1

Чутливість клінічних ізолятів ускладнених ранових поверхонь до бактеріофагів

Мікроорганізм	Абсолютна кількість	Кількість чутливих	Відсоток чутливості
<i>Klebsiella spp.</i>	15	6	40%
<i>Staphylococcus aureus</i>	33	27	81,8%
<i>Escherichia coli</i>	9	3	33,3%
<i>Pseudomonas spp.</i>	6	1	16,7%



Рис. 1. Дослідження чутливості клінічних ізолятів *Staphylococcus aureus* до специфічного бактеріофагу

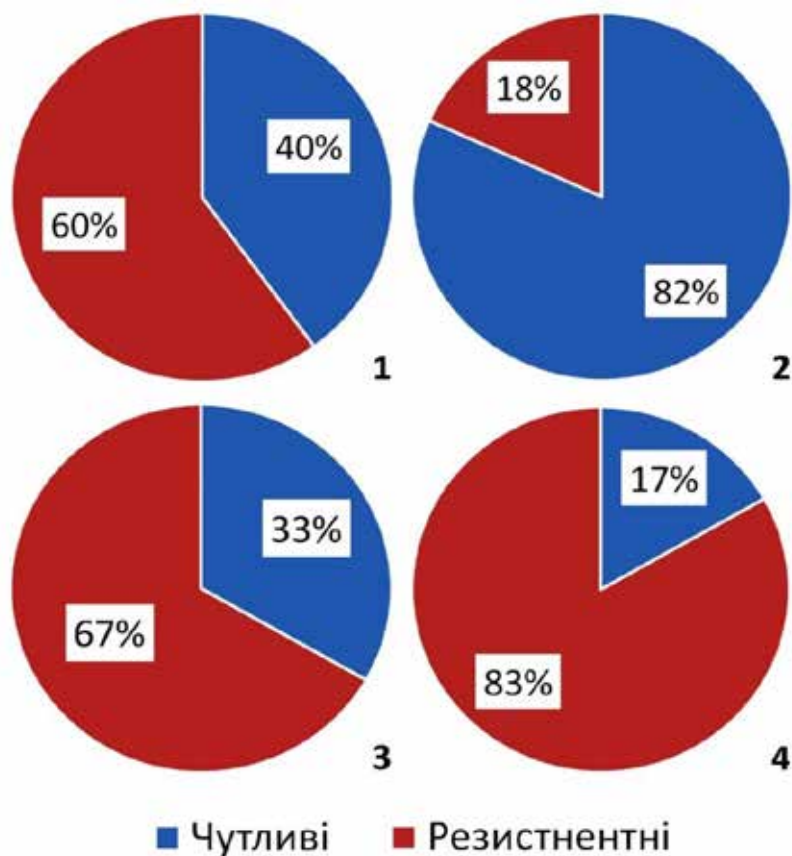


Рис. 2. Відсоткове співвідношення чутливих та нечутливих до бактеріофагів клінічних ізолятів ускладнених ранових вогнистий поверхонь: 1 – *Klebsiella spp.*; 2 – *Staphylococcus aureus*; 3 – *Escherichia coli*; 4 – *Pseudomonas spp.*

ефективність застосування бактеріофагу є штамспецифічною, що вимагає індивідуалізованого пацієнторієнтованого підходу у стратегії лікування із застосуванням антимікробного препарату, в тому числі і бактеріофаг.

Одним із перспективних напрямків є спільне введення бактеріофагів та антибіотиків. Так, у 2020 році вченими клініки Майо (Міннесота, США) було опубліковано результати спільного застосування бактеріофагів та антибіотиків. У пацієнта після тотального ендопротезування колінного суглоба через ускладнення викликане *K.pneumoniae* була загроза ампутації ноги. Комбіноване застосування бактеріофагу з міноцикліном не тільки покращила загальний стан пацієнта (зменшення набряку, болю та часткове відновлення функції кінцівки), але й знизило прояви побічних реакцій до антибіотика. Вчені також відмітили антибіоплівкотвірну активність бактеріофагу [6].

У наших попередніх дослідженнях було показано, що чутливість ізолятів ранових інфекцій широко варіює і щодо сучасних антисептиків, які застосовуються для лікування гнійних інфекцій [7].

Існують дані, що із розвитком резистентності до фагів бактерії стають більш чутливими до дії антибіотиків. Таким чином з'являється нова стратегія лікування бактеріальних інфекцій. Правильний підбір фагів дозволить застосовувати їх як препарати, що підсилюють дію антибіотиків шляхом підвищення чутливості бактерій до них [8].

Також варто зазначити, що існує «порог проліферації фагів». Це критична концентрація бактерій при якій ефективність фагів знижується. У природі спостерігається чітка зміна циклів – підвищення концентрації бактерій супроводжується збільшенням концентрації фагів, що згодом спричинить зниження концентрації бактерій, а потім і фагів. Саме тому доцільним є застосування комбінованої терапії фагів та антибіотиків [1].

Дослідження показують, що застосування фагів і антибіотиків особливо рекомендовано для лікування грампозитивних бактерій, включаючи метицилінрезистентний *Staphylococcus aureus* (MRSA) і мультирезистентні штами *Enterococcus*. Проте синергія була відносно ефективнішою проти чутливого до антибіотиків штаму, ніж проти антибіотикорезистентного [4].

Безпечність застосування бактеріофагів пов'язана з їх вибірковою активністю на бактеріальні клітини. В межах одного бактеріального виду існує лише кілька штамів, чутливих до певного фага. Через це вважається, що фаги мають вузьке коло господарів. На практиці це означає, що під час фаготерапії кожен ізолят пацієнта має бути перевірений на відповідні фаги. Також це означає, що фаги не вплинуть на корисний мікробіом організму [9, 10].

Отже, в епоху швидких темпів розвитку антибіотикорезистентності, успіх лікування ускладнених персистуючих інфекцій залежить від призначення дієвого

Таблиця 2

Антибіотикограма ізоляту *Klebsiella pneumoniae* із ускладненої вогнестрільної рани

Антибіотик	Вміст у диску, мкг	Діаметр зони затримки росту, мм	Інтерпретація чутливості *
Цефалоспори́ни			
цефуроксим	30	0	R
цефтріаксон	30	0	R
цефоперазон/сульбактам		0	R
цефтазидим	10	0	R
Пеніцилі́ни			
Амоксицилін/клавулонат	20/10	0	R
Піперацилін/тазобактрам	30/6	0	R
Фторхіноло́ни			
офлоксацин	5	0	R
ципрофлоксацин	5	0	R
моксифлоксацин	5	0	R
Левовфлоксацин	5	0	R
Поліпепти́дні антибіоти́ки			
Колістин	10	10	I
Колістин	25	12	S
Карбапенеми			
меропенем	10	0	R
іміпенем/циластатин	10	0	R
Аміноглікози́ди			
Неоміцин		19	S
Амікацин	30	0	R
Тобраміцин	10	0	R
Монобакта́ми			
Азтреонам	30	0	R

* S – чутливий, I – чутливий при збільшеній експозиції, R – резистентний

Рис. 3. Дослідження чутливості клінічних ізолятів *Klebsiella pneumoniae* до специфічного бактеріофагу

антимікробного препарату на підставі результатів лабораторних аналізів щодо чутливості мікроорганізмів щодо антимікробного засобу, в тому числі бактеріофагу.

Висновки з дослідження. Дослідження показали, що відсоток чутливості ізолятів до фагів складав 40% для *Klebsiella spp*, 82% для *S.aureus*, 33% для *E.coli*

та 17% для *Pseudomonas spp*. Це свідчить про потенціальну ефективність та перспективність фаготерапії в умовах ранових інфекцій.

Штамоспецифічна чутливість до бактеріофагів свідчить про доцільність пацієнт орієнтованого підходу та визначення чутливості ізоляту до бактеріофагу до початку лікування.

REFERENCES

1. Skurnik M. Can bacteriophages replace antibiotics?. *Antibiotics*, 2022 Apr 26;11(5):575. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11050575>
2. Torianyk II, Kalinichenko SV, Minukhin VV, Melentyeva KV, Moiseienko TM, Ovetchyn PV, et al. Bacteriophages current statement of the problem and its historical interpretations. *Annaly Mechnykovskoho Instytutu*, 2023;(1):21-28 <https://doi.org/10.5281/zenodo.7721892>
3. Poniatovskiy VA, Shyrobokov VP, Bobyr VV, Kharina AV. Bacteriophages as a possible direction of fighting antibiotic-resistant strains of microorganisms. *Preventyvna medytsyna. Teoriia i praktyka*, 2023;1(1):33-37
4. Łusiak-Szelachowska M, Międzybrodzki R, Drulis-Kawa Z, Cater K, Knežević P, Winogradow C, et al. Bacteriophages and antibiotic interactions in clinical practice: what we have learned so far. *Journal of Biomedical Science*, 2022 Mar 30;29(1):23. <https://doi.org/10.1186/s12929-022-00806-1>
5. Derkach SA. Bacteriophages: current issues of phase preparation and evaluation of their activity. *Infektsiini khvoroby*, 2022;(1):5-10. <https://doi.org/10.11603/1681-2727.2022.1.13014>
6. Cano EJ, Cafilisch KM, Bollyky PL, Van Belleghem JD, Patel R, Fackler J, et al. Phage therapy for limb-threatening prosthetic knee *Klebsiella pneumoniae* infection: case report and in vitro characterization of anti-biofilm activity. *Clinical Infectious Diseases*, 2021 Jul 23;73(1):144-151. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa705>
7. Kolesnyk OO, Kryvtsova MV, Savenko MV, Urovskyy OO. Efficiency of antiseptic drugs on isolates from complicated gunshot wounds in in vitro studies. *Intermedical journal*, 2024;(1):123-128 <https://doi.org/10.32782/2786-7684/2024-1-19>
8. Chan BK, Sistro M, Wertz JE, Kortright KE, Narayan D, PE Turner Phage selection restores antibiotic sensitivity in MDR *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific reports*, 2016 May 26;6(1): 26717.
9. Uyttendaele S, Chen B, Onsea J, Ruythooren F, Debaveye Y, Devolder D. Safety and efficacy of phage therapy in difficult-to-treat infections: a systematic review. *The Lancet Infectious Diseases*, 2022;22(8):208-220. 10.1016/S1473-3099(21)00612-5
10. Aryan Rahimi-Midani, Seon-Woo Lee, Tae-Jin Choi. Potential Solutions Using Bacteriophages against Antimicrobial Resistant Bacteria. *Antibiotics*, 2021 Dec 06;10(12):1496 <https://doi.org/10.3390/antibiotics10121496>