

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ БАКТЕРІОФАГІВ РІЗНОГО СПЕКТРУ ДІЇ ЗА ЛІТИЧНОЮ АКТИВНІСТЮ ПРОТИ ШТАМІВ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ЯК АЛЬТЕРНАТИВА АНТИБІОТИКОТЕРАПІЇ

Голікова О.С.^{1,2}, Кришук Ю.С.²

¹КПІ ім. Ігоря Сікорського, golikova.oleksandra@iit.kpi.ua

²Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів

Abstract

The global spread of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*, including methicillin-resistant strains (MRSA) and isolates with inducible macrolide-lincosamide-streptogramin B (iMLSB) resistance, poses a significant clinical and veterinary challenge. This study assessed the *in vitro* lytic efficacy of bacteriophages with varying host specificities against phenotypically diverse *St. aureus* strains.

Keywords: bacteriophage, lytic activity, *Staphylococcus aureus*, MRSA, iMLSB.

Вступ. Резистентність до антимікробних засобів (AMR) визнана однією з провідних глобальних загроз для здоров'я людей і тварин. За даними «*The Lancet*», у 2019 році з нею було пов'язано майже 5 мільйонів смертей, з яких понад 1 млн – безпосередньо спричинені стійкими бактеріями [1]. Особливе занепокоєння викликає *Staphylococcus aureus*, поширений збудник інфекцій шкіри, м'яких тканин, дихальних шляхів і сепсису. У 2021 році зокрема метицилін-резистентний золотистий стафілокок (MRSA) асоціювався з більш ніж 550 000 смертей по всьому світу, що створює величезний тиск на системи охорони здоров'я. MRSA-штами нині становлять від 25 % до 80 % усіх ізолюваних біотипів *St. aureus* залежно від регіону [2–4]. Дана проблематика ускладнюється тривалою стагнацією у розробці нових антибіотиків: висока собівартість, низька рентабельність і ризики розвитку резистентності обмежують інвестиційну привабливість цього напрямку [5].

Антибіотикорезистентність також серйозна загроза для ветеринарної медицини та продовольчої безпеки. У сільському господарстві антибіотики досі часто використовують не тільки з терапевтичною метою, а й для профілактики та стимуляції росту. За прогнозами FAO, світове споживання антибіотиків у тваринництві до 2040 року може зрости на 30 % порівняно з 2019 роком [6]. Широко поширений *St. aureus* регулярно викликає мастити у корів, дерматити у свиней, сепсис у птиці, що веде до втрат молока, зниження продуктивності й значних економічних збитків [7].

За цих умов бактеріофаги – високоспецифічні віруси, що здатні лізувати визначені бактеріальні клітини, – розглядаються як перспективна альтернатива антибіотикотерапії. Вони не порушують нормальну мікрофлору, мають природну здатність до самоампліфікації та не спричиняють токсичних ефектів [8]. Клінічні дослідження засвідчили відсутність серйозних побічних ефектів та ефективну ерадикацію MRSA у частини пацієнтів [9]. В експериментах на моделі воскової молі фаги PYO і Sb забезпечували високе виживання личинок навіть за низького множинного коефіцієнту інфекції (MOI = 0,1) порівняно з контролем, що свідчить про значний лізис бактерій за мінімального фагового навантаження

[10]. Інші дослідження підтвердили, що фаги здатні руйнувати біоплівки та знижувати вірулентність *St. aureus* на інертних поверхнях, що критично важливо у разі інфекцій, пов'язаних з імплантатами, катетерами, або у клінічній чи ветеринарній хірургії [11].

Матеріали та методи. У дослідженні використано три бактеріофаги з різним спектром дії: стафілококовий, стрепто-стафілококовий та полівалентний, отримані з колекції бактеріофагів бактеріологічного відділу клініко-діагностичного центру ТОВ «Клініка Маркова». Оцінку чутливості проводили у Відділі бактеріологічних досліджень та контролю якості ветеринарних імунобіологічних засобів Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів, як тест-культури застосовано п'ять штамів *Staphylococcus aureus* із колекції Національного центру штамів мікроорганізмів ДНКІБШМ: *Staphylococcus aureus* UNCSM–017, *Staphylococcus aureus* UNCSM–022, *Staphylococcus aureus* UNCSM–060, *Staphylococcus aureus* UNCSM–073, *Staphylococcus aureus* UNCSM–107.

Чутливість штамів до бактеріофагів проводили за допомогою spot-тесту, що є стандартним методом для оцінки літичної активності фагів, а до антибіотиків – диско-дифузійним методом. Бактеріальну суспензію (0,5 за стандартом МакФарланда) інокулювали в об'ємі 100 мкл, висівали на поверхню кожної чашки з агаром Мюллера-Хінтона, розподіляли стерильним аплікатором, після чого розміщували диски з антибіотиками і наносили по 100 мкл кожного фагопрепарату у визначені зони. Інкубація тривала 18–24 год за 37 °С. Здійснювали одночасно оцінку дії бактеріофагів: візуально за наявністю зон лізису: «+» – повний (чітка прозора зона), «+–» – частковий (напівпрозора зона) або «–» – відсутній (зона відсутня), і дисків антибіотиків – за діаметрами зон затримки росту відповідно до EUCAST [12–13]. Кожен експеримент проводили у трьох повтореннях, результати аналізували методами описової статистики.

Результати та обговорення. Проведений аналіз свідчить про суттєві відмінності у профілях резистентності. Результати аналізу антимікробної активності наведено в таблиці 1. Більшість досліджених штамів, зокрема UNCMS-017, UNCMS-022, UNCMS-060, UNCMS-073, проявили невиражену чутливість до кліндаміцину (23–24 мм) та тетрацикліну (22–27 мм). Знижену чутливість зафіксовано до еритроміцину (15–17 мм) та канаміцину (17–18 мм). Бензилпеніцилін був ефективним для трьох штамів, однак UNCMS-073 проявив знижену чутливість (9 мм). Штам UNCMS-107 характеризувався вираженою резистентністю до більшості антибіотиків, включно з кліндаміцином, еритроміцином, бензилпеніциліном, оксациліном та азитроміцином, проявивши лише помірну чутливість до тетрацикліну (17 мм) та канаміцину (17 мм). Всі досліджені штами продемонстрували резистентність до оксациліну (0–8 мм) та азитроміцину, що відповідає профілю MRSA.

Таблиця 1. Зони затримки росту тест-штамів *Staphylococcus aureus* під впливом антибіотиків та зони лізису від бактеріофагів.

Антимікробні агенти	Тест-штами				
	<i>St.aureus</i> UNCSM– 017	<i>St.aureus</i> UNCSM– 022	<i>St.aureus</i> UNCSM– 060	<i>St.aureus</i> UNCSM– 073	<i>St.aureus</i> UNCSM– 107
диски з антибіотиками	зони затримки росту, мм				
кліндаміцин, 2 мкг	23±3	24±2	24±1	23±2	0
еритроміцин, 15 мкг	15±1	20±2	20±1	18±1	0
бензилпеніцилін, 10U	25±2	28±2	28±2	9±1	0
азитроміцин, 10мкг	15±2	23±3	18±2	17±2	0
тетрациклін, 30 мкг	22±1	24±1	27±3	24±3	0
оксацилін, 1мкг	8±1	0	0	0	0
канаміцин, 30 мкг	17±3	18±3	17±1	17±3	17±3
бактеріофаги	наявність і вираженість зони лізису				
стафілококовий	+	+	+	+-	–
стрепто- стафілококовий	+	+	+	+	–
полівалентний	+-	+	+	–	–

Особливу увагу привертає штам UNCMS-073, у якого виявлено позитивний результат D-тесту, тобто наявність індукованої резистентності до кліндаміцину за дії еритроміцину (iMLSB) [14]. За позитивного D-тесту, як показано на рис.1, навіть за зоною чутливості ≥ 21 мм до кліндаміцину, існує високий ризик клінічної неефективності лікування через активацію механізмів метилазного типу (ген *erm*). Таким чином, застосування кліндаміцину для терапії інфекцій, викликаних даним штамом, є недоцільним.

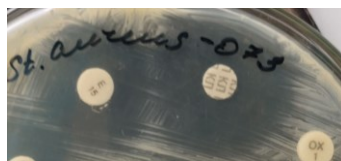


Рис. 1. Характерне «скошення» зони затримки росту у вигляді букви «D» навколо диску з кліндаміцину зі сторони диску з еритроміцином.

Оцінка лізису бактеріофагами (табл. 1) показала повну літичну активність щодо всіх штамів, окрім UNCMS-107, у стрепто-стафілококового бактеріофага. Дещо менш ефективним був стафілококовий фаг, полівалентний – виявив обмежену активність.

Висновки. Отримані результати засвідчили формування антибіотикорезистентності у досліджених штамів *Staphylococcus aureus*, зокрема метицилін-резистентності (MRSA) та індукованої резистентності до

кліндаміцину (iMLS_B). Стрепто-стафілококовий бактеріофаг серед усіх наявних фагопрепаратів проявив найвираженішу літичну активність щодо досліджуваних штамів, демонструючи потенціал фагів як доповнення до антибіотикотерапії або альтернативи для резистентних інфекцій. Перспективними є подальші дослідження та персоналізація фаготерапії для клінічного та ветеринарного застосування.

Список використаної літератури:

1. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis / C. J. Murray et al. *The Lancet*. 2022. Vol. 399, no. 10325. P. 629–655. URL: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(21)02724-0).
2. Global burden of bacterial antimicrobial resistance 1990–2021: a systematic analysis with forecasts to 2050 / M. Naghavi et al. *The Lancet*. 2024. Vol. 404, no. 10549. P. 1119–1226. URL: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(24\)01867-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(24)01867-1).
3. Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report: 2022. *World Health Organization (WHO)*. URL: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240062702>.
4. Worldwide epidemiology and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* / M. Monaco et al. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Cham, 2016. P. 21–56. URL: https://doi.org/10.1007/82_2016_3.
5. Antibiotic development – economic, regulatory and societal challenges / C. Årdal et al. *Nature Reviews Microbiology*. 2019. Vol. 18, no. 5. P. 267–274. URL: <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0293-3>.
6. Food and agriculture organization of the united nations. drivers, dynamics and epidemiology of antimicrobial resistance in animal production. Food & Agriculture Organization of the United Nations, 2017. 68 c. URL: <https://openknowledge.fao.org/items/58ede2fe-f837-4a9b-bcf9-8c4b3aba85c3>.
7. Antimicrobial drug use in food-producing animals and associated human health risks: what, and how strong, is the evidence? / K. Hoelzer et al. *BMC Veterinary Research*. 2017. Vol. 13, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1131-3>.
8. Phage therapy: what have we learned? / A. Górski et al. *Viruses*. 2018. Vol. 10, no. 6. P. 288. URL: <https://doi.org/10.3390/v10060288>.
9. Safety and tolerability of bacteriophage therapy for chronic rhinosinusitis due to *Staphylococcus aureus* / M. L. Ooi et al. *JAMA Otolaryngology–Head & Neck Surgery*. 2019. Vol. 145, no. 8. P. 723. URL: <https://doi.org/10.1001/jamaoto.2019.1191>.
10. Antibacterial efficacy of two commercially available bacteriophage formulations, staphylococcal bacteriophage and pyo bacteriophage, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: prevention and eradication of biofilm formation and control of a systemic infection of *Galleria mellonella* Larvae / T. Tkhalishvili et al. *Frontiers in Microbiology*. 2020. Vol. 11. URL: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00110>.
11. Bacteriophage therapy and current delivery strategies for orthopedic infections: A SCOPING review / J. Young та ін. *Journal of Infection*. 2024. Vol. 88, no. 3. P. 106125. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2024.106125>.
12. Khan Mirzaei M., Nilsson A. S. Isolation of phages for phage therapy: a comparison of spot tests and efficiency of plating analyses for determination of host range and efficacy. *PLOS ONE*. 2015. Vol. 10, no. 3. P. e0118557. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118557>.
13. Наказ МОЗ України №167 від 05.04.2007. Методичні вказівки «Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів».
14. Inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus*: Reason for treatment failure. *Journal of International Medicine and Dentistry*. 2015. Vol. 2, no. 2. P. 97–103. URL: <https://doi.org/10.18320/jimd/201502.0297>.