СПЕКТР АКТИВНОСТІ КОМЕРЦІЙНИХ ПРЕПАРАТІВ БАКТЕРІОФАГІВ ПРОТИ МЕТИЦИЛІН-РЕЗИСТЕНТНИХ ІЗОЛЯТІВ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

А. Ю. Ющенко¹, здобувач,
Т. О. Гаркавенко², канд. вет. наук,
З. С. Клестова¹, д-р вет. наук, професор

¹Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів,
вул. Донецька, 30, м. Київ, 03151, Україна
yushchenkoalla@gmail.com

²Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики
та ветеринарно-санітарної експертизи,
вул. Донецька, 30, м. Київ, 03151, Україна

Метицилін-резистентний *S. aureus* (MRSA) було уперше описано у 1962 році і з тих пір вважається основним збудником нозокоміальних інфекцій в усьому світі. MRSA розділяють на 3 категорії: внутрішньолікарняні інфекції (HA-MRSA), позалікарняні (CA-MRSA) та штами, виділені від тварин (LA-MRSA). Останні викликають особливу увагу та занепокоєння, оскільки тварини потенційно є резервуаром зоонозних інфекцій. За даними досліджень 2015-2019 рр., частка резистентних штамів склала 53.8% від усіх стафілококів, виділених від продуктів тваринництва, об'єктів довкілля та зразків патологічного матеріалу тварин. Окрім того, різноманіття циркулюючих штамів MRSA не досліджувалось.

Лікування інфекцій у гуманній та ветеринарній практиці, що викликані резистентними збудниками, залишається складним завданням і потребує альтернативних рішень. Застосування бактеріофагів є перспективною детекційною, терапевтичною і профілактичною стратегією з доведеною ефективністю. В рамках даної роботи нами було досліджено спектр активності двох комерційних препаратів бактеріофагів (Бактеріофаг Стафілококовий та Інтесті Бактеріофаг виробництва Eliava BioProduction, Грузія) проти циркулюючих ізолятів MRSA, виділених від тварин, продуктів харчування тваринного походження, а також з навколишнього середовища. Крім того, з цих препаратів нами було виділено і досліджено дві чисті лінії бактеріофагів. Обидва препарати показали різний рівень активності проти ізолятів, що були використані в дослідженні. Препарат Інтесті викликав лізис 60 % тестових ізолятів, коли виділений з нього фаг виявився неефективним. Бактеріофаг Стафілококовий мав активність на рівні 30 %. У той час, реізольований з цього препарату фаг був активним проти 70 % протестованих нами ізолятів. Уперше представлені дані по спектру активності комерційних препаратів та чистих ліній фагів проти ізолятів LA-MRSA на території України. У подальшому планується дослідження препаратів на більшій колекції штамів, а також секвенування виділених чистих ліній бактеріофагів.

Ключові слова: БАКТЕРІОФАГИ, *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, РЕЗИСТЕНТНІСТЬ, ЛІТИЧНА АКТИВНІСТЬ.

ACTIVITY RANGE OF COMMERCIAL PHAGE PREPARATIONS AGAINST METHICILLIN-RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLATES

Alla Yushchenko¹, Tetiana Garkavenko², Zinaida Klestova¹

¹State Scientific Control Institute of Biotechnology and Strains of Microorganisms
30, Donetska str., Kiev, 03151, Ukraine
yushchenkoalla@gmail.com

²State Scientific and Research Institute of Laboratory Diagnostics
and Veterinary and Sanitary Expertise
30, Donetska str., Kiev, 03151, Ukraine

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) was first discovered in 1962, since then it has been recognized as a major causative agent of healthcare-associated infections. MRSA infections are usually divided into three groups: hospital- (HA), community- (CA) and livestock-associated (LA) MRSA. The incidence of LA-MRSA infections among livestock and companion animals is a great concern because these sources could potentially be reservoirs for zoonotic infections. In Ukraine, recent statistics indicated approximately 82 % of tested livestock were *S. aureus* positive with 53.8 % of resistance. In addition, the diversity of MRSA in Ukraine has not been investigated.

Antibiotic resistance during treatment in both clinical practice and veterinary medicine remains a challenge and requires alternative solutions. Bacteriophage-based treatment represents a promising biocontrol strategy with proven effectiveness against MRSA. The purpose of our research was to evaluate the activity of two commercial phage preparations against a local collection of LA-MRSA host strains and to characterize and adapt individual phages isolated from these preparations with the desired goal of enhancing their efficacy.

In our study, we tested two commercial phage preparations (Eliava BioProduction, Georgia) *Staphylococcus* Bacteriophage and Intesti Bacteriophage on local LA-MRSA isolates. In addition, we utilized two single phages we isolated from these preparations. Both commercial phage preparations showed variable activity against the tested isolates. Intesti Bacteriophage cocktail lysed 60 % of isolates, whereas the single phage isolated from it was found to be ineffective. *Staphylococcus* Bacteriophage preparation showed activity against 30 % of MRSA tested, while the isolated phage was active against 70 % of the tested isolates. For the first time in Ukraine, in this study we assessed host range of commercial phages on local circulating livestock-associated MRSA. Further host range analysis on an expanded collection of Ukrainian MRSA isolates as well as taxonomic and genomic characterization of the phages is planned.

Keyword: BACTERIOPHAGES, *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, RESISTANCE, LYTIC ACTIVITY.

Метицилін-резистентний *S. aureus* (MRSA) було вперше описано у 1962 році, з тих пір він вважається основним збудником нозокоміальних інфекцій і становить серйозну загрозу не тільки громадському здоров'ю, а й благополуччю тваринництва в Україні та усьому світі.

Виділяють три категорії MRSA: внутрішньолікарняні інфекції (hospital-associated, HA-MRSA), позалікарняні (community-associated, CA-MRSA) і штами, виділені від тварин (livestock-associated, LA-MRSA). Хоча саме дві перші категорії вважаються збудниками захворювань людей, дана класифікація не є коректною, оскільки існують дані щодо виділення ідентичних клонів в межах цих категорій – LA-MRSA були виділені від населення і навпаки – збудники нозокоміальних інфекцій були виділені зі зразків патологічного матеріалу від тварин та продуктів харчування тваринного походження (Sergelidis, & Angelidis, 2017).

Поширеність MRSA коливається в залежності від регіону. Наприклад, у 2014 році відсоток MRSA ізолятів в Європі становив від 0.9 % у Нідерландах до 56 % в Румунії. Незважаючи на те, що частота виявлення резистентних ізолятів *S. aureus* за останнє десятиріччя значно знизилась, у 7 з 29 країн ЄС частка MRSA залишається на рівні 25% або вище (European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2018/2019).

В Україні, за даними дослідження 2015 р, кількість метицилін-резистентний ізолятів, що були виділені від пацієнтів різних відділень київської лікарні, сягала 19 % (Salmanov & Verner, 2017).

Дослідження АУРА, що були проведені з грудня 2018 по травень 2019 р на базі медичної лабораторії Інституту мікробіологічних досліджень (м. Київ), частка виділених метицилін-резистентний ізолятів *S. aureus* з патологічного вмісту ран при позалікарняних інфекціях становила 27.2 % (Berezniakov, 2021).

Особливу увагу та занепокоєння викликають LA-MRSA, оскільки тварини потенційно є резервуаром зоонозних інфекцій (Fitzgerald, 2012). За даними досліджень 2015-2019 рр., частка резистентних штамів склала 53.8% від усіх стафілококів, виділених від продуктів тваринництва, об'єктів довкілля та зразків патологічного матеріалу тварин (Kozytska & Harkavenko, 2018).

Відсутність національної статистики поширеності MRSA, а також даних про їх генетичну приналежність і постійно зростаючий рівень виділених резистентних штамів вимагають запровадження нових методів боротьби та контролю даного збудника. Застосування бактеріофагів є перспективною детекційною, терапевтичною і профілактичною стратегією з доведеною ефективністю.

В Україні було проведено кілька досліджень щодо визначення активності комерційних препаратів проти резистентних штамів *S. aureus*, однак дослідним матеріалом в усіх випадках слугували зразки патматеріалу, зібрані від людей (Kotsar, 2016; Derkach et al., 2018; Lihonenko et al., 2019; Poniatovskiy et al., 2020). Тому метою нашої роботи було дослідити активність двох комерційних препаратів бактеріофагів проти ізолятів MRSA, виділених від тварин, продуктів харчування тваринного походження і з навколишнього середовища а також характеризувати та адаптувати бактеріофаги, виділені з цих препаратів, з метою підвищення ефективності їх застосування.

Матеріали і методи. Ізоляцію та ідентифікацію ізолятів *S. aureus* проводили у науково-дослідному бактеріологічному відділі Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи та поміщених на зберігання в Музей ізолятів збудників зоонозних інфекцій бактеріальної етіології відповідно до чинних методик (DSTU 6888-1:2003 (ISO 6888-1:1999, IDT). Метицилінрезистентність виявляли за методологією EUCAST ДДМ за скринінгу з цефокситіном (30 мкг/диск), оцінюючи ізолят резистентним за умови, що діаметр зони інгібування складає >22 мм (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Antimicrobial susceptibility testing EUCAST disk diffusion method. Version 8.0. 2020. 22 p.). Усього при визначенні спектру активності бактеріофагів було використано 10 ізолятів MRSA.

В якості дослідних препаратів використовували Бактеріофаг Стафілококовий (монофаг) та Інтесті Бактеріофаг (містить коктейль фагів, активних проти *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Proteus*, *Shigella*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) виробництва Eliava BioProduction, Грузія.

Для накопичення і вивчення біологічних властивостей фагів в якості бактерії-господаря використовували референтний штам *S. aureus* ATCC 25293 з колекції Національного центру штамів мікроорганізмів Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів. Для отримання чистих ліній фагів застосовували метод подвійних агарових

шарів з подальшим виколування одиничних колоній. Процедуру пасажування повторювали 5 разів до отримання однорідної популяції фагів. Робочий фаголізат отримали методом культивування фагів і бактерій у рідкому середовищі (бульйон ЛБ). Суміш інкубували за температури 37 °C протягом 24 годин, після чого центрифугували 20 хв при 6000 об. Супернатант пропускали через бактеріальні фільтри і переносили у стерильні пробірки, після чого зберігали у холодильнику при +4 °C з додаванням хлороформу (Bonilla et al., 2016). Титри отриманих фаголізатів визначали за методом Грація і виражали у БУО/мл (бляшкоутворюючих одиницях/мл) (Abedon & Katsaounis, 2018).

Літичну активність препаратів та ізольованих бактеріофагів визначали методом спот-тесту по утворенню зон лізису у місці нанесення зразків (Khan Mirzaei & Nilsson, 2015). Крім того, було досліджено можливість фагів реплікуватись всередині клітини-господаря і проведено оцінку негативних колоній, оскільки наявність зон лізису у спот-тесті не завжди свідчить про успішний літичний цикл і продуктивний інфекційний процес. Титри визначали за методом Грація і виражали у БУО/мл (бляшкоутворюючих одиницях/мл).

Ефективність культивування (Efficacy of plating, EOP) визначали як співвідношення титру фагу на тестовій культурі до титру фагу на чутливій референтній культурі і підраховували за формулою:

$$E = T/T_0,$$

де: E – ефективність культивування (efficiency of plating), T – титр фага на тест-культурі, T₀ - титр фага на чутливій культурі.

Якщо співвідношення (EOP) було 0.5 або вище, тобто у випадку, коли на тест-культурі кількість БУО складала принаймні 50 % від кількості БУО на чутливій референтній культурі, таку взаємодію фаг-господар вважали продуктивною інфекцією. Якщо EOP було у межах 0.1 – 0.5 – інфекційний процес мав середню продуктивність, та EOP від 0.001 до 0.1 відповідало низькій продуктивності. Інфекція, при якій EOP що дорівнювало або було нижче за 0.001, була класифікована як непродуктивна (Viazis et al., 2011).

Результати й обговорення. Нами було виділено 2 чисті лінії фагів з комерційних препаратів Бактеріофаг Стафілококовий та Інтесті Бактеріофаг - *Nibbler 21* та *ISinB* відповідно. Обидва фаги формують невеликі за розміром (близько 1 мм колоній з чітким краєм). Титри фагів *ISinB* та *Nibbler 21* на референтному штамі *S.aureus* ATCC 25923 склали $1,6 \times 10^9$ БУО/мл та $1,5 \times 10^9$ БУО/мл, відповідно (рис.). Однак, дані фаги не є ідентичними, оскільки мають різний спектр літичної активності (дані представлені нижче).

Результати спот-тесту були враховані через 24 год культивування при 37 °C. У місці нанесення дослідних зразків бактеріофагів спостерігали утворення зон лізису, тобто у місці нанесення фагів бактеріальний ріст був відсутній. Препарат Стафілококовий показав активність проти трьох ізолятів. У той час, препарат Інтесті виявився активним проти шести з десяти ізолятів MRSA.

Чистий фаг *Nibbler 21*, що був виділений нами з препарату Стафілококовий бактеріофаг, був активним проти семи з десяти досліджених ізолятів MRSA. Чистий бактеріофаг *ISinB*, виділений з препарату Інтесті, виявився активним лише проти одного з досліджених ізолятів.

Рис. Негативні колонії фагу *Nibbler 21* на референтному штамі *S. aureus* ATCC 25923

Літична активність фагів проти ізолятів MRSA була значно нижчою у порівнянні з референс-штамом. Значення EOP на тест-культурах для виділеного бактеріофагу *Nibbler 21* відповідало низькій продуктивності інфекційного процесу ($EOP < 0.5$), а для виділеного нами фагу *ISinB* інфекційний процес взагалі був непродуктивним ($EOP < 0.001$).

Титри комерційних препаратів і бактеріофагів, а також індекс ефективності культивування (Efficacy of plating, EOP) представлені у таблиці.

Таблиця

Результати визначення титрів комерційних препаратів і чистих ліній бактеріофагів

№	Зразок	Nibbler 21		ISinB		Інтести Бактеріофаг		Стафілококовий Бактеріофаг	
	Штами	Титр (БҮО/мл)	Efficacy of plating (EOP)	Титр (БҮО/мл)	Efficacy of plating (EOP)	Титр (БҮО/мл)	Efficacy of plating (EOP)	Титр (БҮО/мл)	Efficacy of plating (EOP)
1	27/69	3×10^6	0,002	6×10^2	> 0.001	$8,4 \times 10^5$	0,9	R	R
2	28/70	7×10^6	0,005	R	R	$1,4 \times 10^5$	0,15	R	R
3	35/90	$1,6 \times 10^6$	0,001	R	R	R	R	R	R
4	36/91	R	R	R	R	R	R	R	R
5	39/94	R	R	R	R	R	R	R	R
6	56/142	2×10^6	0,001	R	R	$1,3 \times 10^5$	0,14	6×10^3	0,2
7	60/153	$1,4 \times 10^6$	0,001	R	R	$2,4 \times 10^5$	0,25	5×10^3	0,16
8	64/157	R	R	R	R	R	R	R	R
9	69/164	$2,3 \times 10^6$	0,002	R	R	1×10^6	1,08	3×10^3	0,1
10	75/170	4×10^6	0,003	R	R	2×10^6	2,15	R	R
11	<i>S.aureus</i> ATCC 25923	$1,5 \times 10^9$	-	$1,6 \times 10^9$	-	$9,3 \times 10^5$	-	$3,1 \times 10^4$	-

Примітка: R – резистентний штам

ВИСНОВКИ

1. Уперше представлені дані по спектру активності комерційних препаратів та чистих ліній фагів проти ізолятів LA-MRSA на території України.

2. Препарат Інтесті показав високу активність проти 60 % ізолятів (n=10). У той час, одиничний фаг (*ISinB*), виділений з даного препарату, виявився неефективним. Отримані результати можливо пояснити так:

– ефективність застосування окремо взятого фага є нижчою, оскільки препарат Інтесті містить коктейль бактеріофагів, що можуть перебувати у стані синергії і мати вищу активність (Schmerer et al., 2014).

– оскільки виділений нами фаг *ISinB* культивувався і був адаптований до референтного штаму *S.aureus* ATCC 25923, ймовірно міг втратити здатність інфікувати широкий спектр господарів.

4. Інший досліджений нами препарат (Стафілококовий) мав спектр активності 30 %, коли реізольований з нього фаг (*Nibbler 21*) інфікував 70 % дослідних ізолятів MRSA. Це доводить, що виділений і адаптований нами одиничний фаг є специфічним до більшої кількості бактерій-господарів, але значно нижчу продуктивність при інфікуванні MRSA, у порівнянні з референтним штамом *S.aureus* ATCC 25923 (EOP < 0.1). Подальше вивчення механізмів адаптації і взаємодії у системі фаг-господар дозволить селекціонувати максимально ефективний бактеріофаг з широким спектром літичної активності.

Перспективи досліджень. Оскільки дана робота є першим кроком у сфері застосування бактеріофагів проти збудників зоонозних інфекцій, у майбутньому планується проведення масштабного скринінгу усіх локально доступних комерційних препаратів бактеріофагів на більшій колекції ізолятів, у першу чергу, проти метицилін-резистентного *S.aureus*. Подальше дослідження препаратів на більшій колекції штамів, а також секвенування виділених чистих ліній бактеріофагів дозволить переглянути стратегію контролю даного патогену. Окрім того, проводиться робота по виділенню та характеристизації «диких» фагів та створення колекції бактеріофагів, що можуть бути використані для біоконтролю збудників небезпечних інфекцій.

References

Abedon, S.T., Katsaounis, T.I. (2018). Basic Phage Mathematics. In: Clokie M., Kropinski A., Lavigne R. (eds) Bacteriophages. Methods in Molecular Biology // Humana Press, New York, NY. 1681. 1-31.

Berezniakov, I.H. (2021). Stan antybiotykoRezystentnosti v Ukraini: rezultaty doslidzhennia AURA. Chastyna 1. Credit: <https://health-ua.com/news/63462-stan-antibiotikorezistentnost-vukran-rezultati-doslidzhennya-aura-chastyna-1> [In Ukrainian].

Bonilla, N. et al. (2016). Phage on tap-a quick and efficient protocol for the preparation of bacteriophage laboratory stocks. PeerJ. 4:e2261. Credit: <https://doi.org/10.7717/peerj.2261>.

Derkach, S.A., Kutsai, N.M., Horodnytska, N.I., Habysheva, L.S. (2018). Porivnialna aktyvnist antysynohniinykh antybiotykiv ta bakteriofahiv vidnosno pozalikarnianykh shtamiv P. aeruginosa // Visnyk problem biolohii i medytsyny. 4;1(146). 204–208. [In Ukrainian].

DSTU 6888-1:2003 (ISO 6888-1:1999, IDT). Mikrobiolohiia kharchovykh produktiv i kormiv dlia tvaryn. Horyzontalniy metod pidrakhuvannia koahulazopozytyvnykh stafilokokiv (*Staphylococcus aureus* ta inshykh vydiv). Chastyna 1. Metod z vykorystanniam aharovoho seredovyshcha Beard-Parkera. [In Ukrainian].

European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2018/2019. Credit: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/ECDC-EFSA-joint-FWD-AMR.pdf>.

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). (2020). Antimicrobial susceptibility testing EUCAST disk diffusion method. Version 8.0. Credit: <https://www.eucast.org>.

Fitzgerald, JR. (2012). Livestock-associated *Staphylococcus aureus*: origin, evolution and public health threat // Trends Microbiol. 20(4). 192-198.

Khan Mirzaei, M. & Nilsson, AS. (2015). 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. 10(3):e0127606. Credit: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127606>.

Kotsar, O.V. et al. (2016). Alternatyvnyi zasib sanatsii rezydentnykh nosiiv zolotystoho stafilokoka // Infektsiini khvoroby: Vseukrainskyi naukovo-praktychnyi medychnyi zhurnal. 2. 54-57. [In Ukrainian].

Kozytska, T.H. & Harkavenko, T.O. (2018). Analiz rezultativ doslidzhennia shchodo naiavnosti metytsylinrezystentnoho stafilokoka (MRSA) v kharchovykh produktakh tvarynnoho pokhodzhennia // Naukovyi visnyk Lvivskoho natsionalnoho universytetu veterynarnoi medytsyny ta biotekhnolohii imeni S. Z. Gzhytskoho. Seriia: Veterynarni nauky. 20(87). 112-115. [In Ukrainian].

Lihonenko, O.V., Dihtiar, I.I, Borysenko, M.M. et al. (2019). Vykorystannia bakteriofahiv u kompleksnomu likuvanni khronichnykh vohnepalnykh osteomiielitiv // Problemy viiskovoi okhorony zdorovia: zb. nauk. prats Ukrainskoi viiskovo-medychnoi akademii. 51. 140-144. Credit: <http://elib.umsa.edu.ua/jspui/handle/umsa/12096>. [In Ukrainian].

Poniatovskyi, V., Bondarchuk, O., Prystupiuk, M., Smikodub, O. and Shyrobokov V. (2020). Bacteriophages against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. Medicni perspektivi (Medical perspectives). 25, 4. 73–80. DOI: <https://doi.org/10.26641/2307-0404.2020.4.221232>.

Salmanov, A.G. & Verner, O.M. (2017). Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Kyiv Surgical Hospital (Ukraine) // International Journal of Antibiotics and Probiotics. 1(2). 73-83.

Sergelidis, D., & Angelidis, A.S. (2017). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a controversial food-borne pathogen // Lett Appl Microbiol. 64(6). 409-418.

Schmerer, M., Molineux, I.J., Bull, J.J. (2014). Synergy as a rationale for phage therapy using phage cocktails. PeerJ. 2:e590. Credit: <https://peerj.com/articles/590/>.

Viazis, S., Akhtar, M., Feirtag, J, Brabban, AD, Diez-Gonzalez, F. (2011). Isolation and characterization of lytic bacteriophages against enterohaemorrhagic *Escherichia coli* // Appl Microbiol. 110(5). 1323-1331.