


## МІКРОБІОЛОГІЯ, ЕПІЗООТОЛОГІЯ ТА ІНФЕКЦІЙНІ ХВОРОБИ

УДК 338.439.021.1

### Визначення ефективності застосування препарату Фагомаст з різними титрами *Phage SAvB14*

Горюк Ю.В. 

Подільський державний аграрно-технічний університет

 Горюк Ю.В. E-mail: goruky@ukr.net

Горюк Ю.В. Визначення ефективності застосування препарату Фагомаст з різними титрами *Phage SAvB14*. Науковий вісник ветеринарної медицини, 2021. № 2. С. 57–64.

Horiuk Y. Determination of the drug Fagomast effectiveness with different titers of *Phage SAvB14*. *Nauk. visn. vet. med.*, 2021. № 2. PP. 57–64.

Рукопис отримано: 17.09.2021 р.  
Прийнято: 30.09.2021 р.  
Затверджено до друку: 09.12.2021 р.

Doi: 10.33245/2310-4902-2021-168-2-57-64

Лікування бактеріальних інфекцій бактеріофагами є одним з альтернативних методів. Однак, застосування вільно розпорозених бактеріофагів для лікування спричинює їх інактивацію у фізіологічних умовах. Тому важливо під час фаготерапії враховувати концентрації бактеріофагів.

Мета дослідження – визначення оптимального титру бактеріофага *Phage SAvB14* в препараті Фагомаст для ефективного лікування субклінічного маститу у корів, зумовленого *Staphylococcus aureus var. bovis*.

Для дослідження з визначення оптимальної терапевтичної дози бактеріофагового препарату Фагомаст *in vitro* сформовано групи тварин за принципом аналогів. Контролем були тварини, яким для лікування застосовували препарат на основі антибіотиків згідно з інструкцією з його використання. Коровам першої дослідної групи застосовували зразки препарату з титром *Phage SAvB14*  $10^{-7}$  БУО/мл, другій дослідній групі – з титром  $10^{-8}$  БУО/мл та третій групі –  $10^{-9}$  БУО/мл.

Встановлено, що високу терапевтичну ефективність проявляють всі партії Фагомасту (81,8–92,8 %), однак тривалість лікування тварин була різною. За застосування препарату Фагомаст з титром фагів  $10^{-9}$  БУО/мл лікування коротше на 1 добу порівняно з коровами, яким вводили титр фагів  $10^{-8}$  БУО/мл та на 1,5 доби порівняно з коровами першої групи, яким вводили титр фагів  $10^{-7}$  БУО/мл. Результати терапевтичної ефективності Фагомасту з титром бактеріофагів  $10^{-8}$  та  $10^{-9}$  БУО/мл у препараті підтверджено реакцією з мастидином, яка через 48 годин оцінена як сумнівна, а через 72 години – як негативна, як і за лікування антибіотиком. Вміст *S. aureus* у секреті корів через 12 годин після введення препарату з титром фагів  $10^{-9}$  БУО/мл знизився у 6 разів ( $P \leq 0,05$ ), а через 48 годин – у 40 разів ( $P \leq 0,05$ ), після 60 годин терапії взагалі не виділявся. Водночас титр бактеріофагів залишався на рівні  $10^{-7}$  БУО/мл, і коли кількість чутливих бактерій знизилася до нуля, зменшився на 2 порядки. Тому слід зазначити, що підтримування вищої концентрації фагових віріонів приводить до кращого розподілу фагів у молочній залозі, а отже, до поліпшення зв'язування фагів з клітинами-господарями та їх знищення.

**Ключові слова:** бактеріофаги, *Staphylococcus aureus*, фаготерапія, бактеріофаговий препарат, мастит, корови.

**Постановка проблеми та аналіз останніх досліджень.** Бактеріофаги – це природні віруси, які проявляють високу специфічність до бактеріального господаря [1–3]. Після того як фаг інфікує бактерію, вставляючи його генетичний матеріал через клітинну стінку та мембрану, метаболізм господаря перенаправляється для полегшення швидкої реплікації фагів. До завершальної стадії циклу репліка-

ції бактеріофагів ендолізину, кодовані фагом, впливають на клітинну стінку бактерії зсередини, що приводить до вивільнення фагового потомства і знищення бактерії [4, 5]. Глобальний інтерес до терапії фагами проявляється у зростаючій кількості останніх клінічних випробувань із застосуванням перорального, внутрішньовенного або місцевого застосування фагів [5–8].

Однак є кілька обмежень щодо використання бактеріофагів у медицині, одним з яких є тривалість їх активності *in vivo* [5, 7]. Подібно до фармацевтичних препаратів, які мають терапевтичний період напіврозпаду, у бактеріофагів з часом відбувається спад літичної активності через вплив шкідливих чинників навколишнього середовища [6, 8]. Тому основною проблемою використання вільно розпорочених бактеріофагів для лікування є їх інактивація у фізіологічних умовах. Важливо врахувати, що потрібні концентрації бактеріофагів та тривалість фагового лікування достатньо не обґрунтовані й досі.

Дослідники [9, 10] вказують, що фаготерапію можна розділити на активну та пасивну. Пасивні методи фаготерапії забезпечують достатню кількість фагів для знищення цільових бактерій, тобто індуктивну щільність, щоб знищити більшість цих бактерій для контролю інфекції навіть за відсутності виробництва нових фагових віріонів *in situ* [11]. Активне лікування фагами, навпаки, передбачає виробництво нових віріонів *in situ* [11, 12]. Для того щоб активне лікування було успішним, має бути наявна достатня кількість бактерій, які здатні підтримувати великі розміри фагових вибухів для досягнення залишкової щільності фагів [13]. Однак перешкодами активного типу може бути те, що бактерії, які наявні в природному середовищі можуть бути менш фізіологічно активними та не підтримувати ті розміри фагових вибухів, які є в лабораторних умовах [14, 15]. Водночас зміни у фізіології бактерій або зміни в експресії бактеріальних генів у відповідь на вплив зовнішніх чинників можуть зменшувати кількість молекул рецепторів на поверхні бактеріальної клітини, необхідних для адсорбції фагів [16, 17]. Крім того не всі бактеріальні штами здатні підтримувати великі розміри вибуху або швидку адсорбцію віріонів. Отже навіть з врахуванням достатньої щільності фагів *in vitro*, все ще може бути важко досягнути адекватного рівня зростання популяції фагів, що приведе до успішного активного лікування *in vivo*.

За пасивного лікування здатність виробляти нові фагові віріони під час знищення цільових бактерій також є корисною характеристикою, хоча б заради консервативності з погляду максимального збільшення кількості фагів і негативного впливу їх на бактерії [11, 12].

Було розроблено протимаститний препарат Фагомаст на основі бактеріофага *Phage SAvB14*, який виділений на молочних фермах та проявляє високі літичні властивості щодо *Staphylococcus aureus var. bovis*. У лаборатор-

них умовах виявили, що через 8 годин контакту вірусу і бактерій розпочався процес лізису мікробних клітин і їх кількість зменшилась на один порядок, а через 32 години від початку контакту фага з біоплівкою бактеріальні клітини не виділялися [15].

Тому для вивчення терапевтичної ефективності застосування бактеріофагових препаратів необхідно визначити оптимальні умови та бактерицидну концентрацію фагів, яка необхідна для знищення бактерій.

**Метою дослідження** було визначення оптимального титру бактеріофага *Phage SAvB14* у препараті Фагомаст для ефективного лікування субклінічного маститу у корів, спричиненого *Staphylococcus aureus var. bovis*.

**Матеріал і методи дослідження.** Для визначення оптимальної терапевтичної дози препарату на основі бактеріофагів Фагомаст в лабораторних умовах розроблено дослідні зразки з різними титрами бактеріофага *Phage SAvB14* літичного щодо *Staphylococcus aureus var. bovis*:  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  та  $10^{-9}$  БУО/мл. Препарат фасували у шприци по 10 мл для індивідуального використання та зберігали в холодильнику. Стерильність препаратів кожної партії перевіряли методом інокуляції 1 мл в 5 мл стерильного м'ясопептонного бульйону, який інкубували за температури 37 °C та спостерігали за помутнінням бульйону протягом 48 годин, після чого проводили відсів на чашки Петрі з м'ясопептонним агаром. Крім того, з кожної партії залишали один шприц, який після завершення досліду повертали до лабораторії для підтвердження концентрації фагів.

Для дослідження з визначення оптимальної терапевтичної дози бактеріофагового препарату Фагомаст *in vitro* було сформовано чотири групи тварин за принципом аналогів (одна контрольна та три дослідних). Перед постановкою досліду тварин обстежували на наявність субклінічного маститу за допомогою 2 % мастидину та проводили посів секрету молочної залози для виявлення та ідентифікації збудника. Тварин вважали хворими на субклінічну форму маститу, коли реакція з мастидином була оцінена у «++++» і «++++» та виділявся золотистий стафілокок у кількості більше 1000 КУО/мл.

Контролем були тварини, яким для лікування застосовували препарат на основі антибіотиків згідно з інструкцією з його використання.

Коровам першої дослідної групи застосовували зразки препарату з титром *Phage SAvB14*  $10^{-7}$  БУО/мл, другій дослідній групі з титром  $10^{-8}$  БУО/мл та третій групі –  $10^{-9}$  БУО/мл (табл. 1).

Таблиця 1 – Схема проведення досліджень

Група тварин	Титр <i>Phage SAvB14</i> у дослідному зразку препарату, БУО/мл	Схема лікування
Контрольна	Застосовували препарат на основі антибіотиків згідно з інструкцією з його використання	
Перша	10 <sup>-7</sup>	Препарат вводили в дозі 10 мл, через кожні 12 годин
Друга	10 <sup>-8</sup>	Препарат вводили в дозі 10 мл, через кожні 12 годин
Третя	10 <sup>-9</sup>	Препарат вводили в дозі 10 мл, через кожні 12 годин

Схема лікування корів дослідних груп включала інфузію 10 мл препарату, який вводили після здоювання двічі на добу. До доїння дійки обробляли за звичайною процедурою, яку використовують на фермі. Після доїння дійки корів, взятих в дослід, обробляли 70 % спиртом та вводили дослідний препарат. Після інфузії молочну залозу масажували поступальними рухами вгору для кращого розподілення діючої речовини в залозі.

Асептично зразки секрету корів відбирали з кожної чверті вимені для визначення титру фага та вмісту стафілококів перед кожним наступним введенням препарату (через кожні 12 годин). Тварин вважали здоровими, коли з чвертей вимені не виділяли золотистий стафілокок та реакцію з мастидином оцінювали як негативну.

Для визначення кількості *S. aureus* використовували BD Baird-Parker Agar (HiMedia, Індія). Культивування проводили за температури 37 °С, результати оцінювали через 24–48 годин. Титр бактеріофагів визначали за методикою, описаною [8]. Виявлення субклінічного маститу проводили методом швидкого тесту з мастидином.

Отримані результати досліджень оброблено статистично з використанням програм Microsoft Excel і Statistika 10 Edition, результати середніх значень вважали вірогідними за  $P \leq 0,05$ .

**Результати дослідження.** За визначення оптимальної кількості фагових частин *in vivo* розроблено три партії препарату Фагомаст з титрами 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-8</sup> та 10<sup>-9</sup> БУО/мл, ефективність застосування яких наведена в таблиці 2.

Із даних таблиці 2 видно, що високу терапевтичну ефективність проявляли всі партії Фагомасту (81,8–92,8 %), однак тривалість лікування тварин була різною. Зокрема, під час застосування препарату Фагомаст з титром фагів 10<sup>-9</sup> БУО/мл тварини одужали майже одночасно з коровами яким для лікування використовували антибіотики. При цьому тривалість лікування була коротшою на 1 добу ( $P \leq 0,05$ ), ніж корів другої групи, яким вводили титр фагів 10<sup>-8</sup> БУО/мл та на 1,5 доби ( $P \leq 0,05$ ) порівняно з коровами першої групи, яким вводили титр фагів 10<sup>-7</sup> БУО/мл.

Отримані дані підтверджені в лабораторних умовах. Показники секрету корів за застосування препарату Фагомаст з різними титрами бактеріофага *Phage SAvB14* наведено в таблиці 3.

Таблиця 2 – Ефективність застосування дослідних зразків препарату Фагомаст з різними титрами бактеріофага *Phage SAvB14*

Група тварин	Титр <i>Phage SAvB14</i> у дослідному зразку препарату, БУО/мл	Піддано лікуванню		Результати лікування, одужало:		Тривалість лікування, діб	
		корів, n (%)	чвертей вимені, n (%)	корів, n (%)	чвертей вимені, n (%)		
Контрольна	Застосовували препарати на основі антибіотиків	7 (100)	15 (100)	7 (100)	13 (86,6)	3,0	
Дослідні	Перша	10 <sup>-7</sup>	5 (100)	11 (100)	5 (100)	9 (81,8)	4,0*
	Друга	10 <sup>-8</sup>	5 (100)	14 (100)	5 (100)	13 (92,8)	3,5*
	Третя	10 <sup>-9</sup>	6 (100)	12 (100)	6 (100)	11 (91,6)	2,5*

Примітка: \*– $P \leq 0,05$  порівняно з коровами контрольної групи.

Дані представлені в таблиці 3 підтверджують результати терапевтичної ефективності Фагомасту з більш високим вмістом бактеріофага. Зокрема, після застосування препарату з титром бактеріофагів  $10^{-8}$  та  $10^{-9}$  БУО/мл через 48 годин реакція з мастидином була оцінена як сумнівна, а через 72 години – як негативна. Такі ж результати отримали за лікування препаратом з антибіотиком. Зокрема у корів першої групи (титр фагів у препараті  $10^{-7}$  БУО/мл) спостерігали позитивні результати через 72 та 96 годин відповідно.

Результати дослідження вмісту золотистого стафілокока та титру *Phage SAvB14* у секреті наведено в таблиці 4.

Із даних таблиці 4 видно, що вміст *S. aureus* у секреті корів третьої групи через 12 годин після введення препарату з титром фагів  $10^{-9}$  БУО/мл знизився у 6 разів ( $P \leq 0,05$ ), а через 48 годин – у 40 разів ( $P \leq 0,05$ ), після 60 годин терапії взагалі не виділявся. При цьому титр бактеріофагів залишався на рівні  $10^{-7}$  БУО/мл, і коли кількість чутливих бактерій знизилася до нуля скоротився на 2 порядки. Тимчасом, за титру  $10^{-7}$  та  $10^{-8}$  БУО/мл зменшення золотистого стафілокока відбувалося повільніше, через 12 після застосування дослідних зразків першої і другій груп корів кількість бактерій знизилася у 2,3 та 2,8 разів ( $P \leq 0,05$ ) відповідно. Секрет, вільний від золотистого стафілокока у тварин першої групи отримали через 96 годин, другої групи – через 84 години, що у 1,6 та 1,4 рази пізніше, ніж у третій групі. Титр бактеріофагів у секреті корів першої і другої груп у першу добу лікування був дещо нижчим, ніж у третій:  $10^{-5}$  та  $10^{-6}$  БУО/мл та продовжував поступово знижуватися за зменшення кількості цільових бактерій.

**Обговорення.** Під час розроблення фагового препарату необхідно розрахувати таку дозу фага у засобі, яка буде ефективною навіть за пасивного фагового лікування. Попередніми дослідженнями встановлено, що внесення фаголізату з титром фагів  $10^{-8}$  БУО/мл зменшує кількість золотистого стафілокока у 1,5 рази краще, ніж за титрів  $10^{-6}$  БУО/мл відповідно. При цьому результати отримані за дослідження впливу фага з титром  $10^{-9}$  БУО/мл майже не відрізнялися від тих, що отримані за випробування титру  $10^{-8}$  БУО/мл [18]. Найвний ряд досліджень, які вивчали бактерицидну активність бактеріофагів від *S. aureus* у молоці. Молоко являє собою складне середовище, що складається з різних компонентів, таких як ліпіди, молочні білки (казеїни, сироваткові протеїни) та власна бактеріальна мікрофлора [19]. Дослідження фагів як альтернативного методу лікування стафілококового маститу у великої рогатої худоби потребує вивчення бактерицидної активності фагів у молоці, з огляду на майбутнє внутрішньоцистернальне застосування препарату. У попередніх дослідженнях показано, що ліпіди та білки молочної сироватки пригнічують здатність фагів зв'язуватися з бактеріями-господарями [20]. Однак, дослідники [21] встановили, що додавання фагової суміші (*STA1.ST29*, *EBI.ST11* та *EBI.ST27*) об'ємом 1 мл у концентрації  $1,2 \times 10^9$  БУО/мл до сирого молока, зараженого *S. aureus*, спричиняло зменшення в середньому на 83,6 % кількості бактерій через вісім годин інкубації. Водночас у пастеризованому молоці відмічали 100 % знищення клітин стафілококів фагом. Розглядаючи ці результати, слід зазначити, що здатність фагів зменшувати кількість бактерій *S. aureus* зберігається і в сирому молоці, однак з дещо меншою ефективністю.

Таблиця 3 – Результати тесту з мастидином за застосування препарату Фагомаст з різними титрами бактеріофага *Phage SAvB14*

Тривалість лікування, годин	Група тварин			
	Контрольна	Дослідні		
		перша	друга	третья
0	++++	+++	++++	++++
24	++	+++	+++	++
48	++	++	++	++
72	+	++	+	+
96	+	+	+	+

Примітка: «++++» та «+++» – реакція позитивна; «++» – реакція сумнівна; «+» – реакція негативна.

Таблиця 4 – Кількісні показники вмісту золотистого стафілокока та титру *Phage SAvB14* у секреті корів за застосування дослідних зразків препарату Фагомаст

Тривалість лікування, год	Група тварин							
	Контрольна		Дослідні					
			перша		друга		третя	
	Титр <i>Phage SAvB14</i> у секреті, БУО/мл	Вміст <i>S. aureus</i> у секреті, КУО/мл	Титр <i>Phage SAvB14</i> у секреті, БУО/мл	Вміст <i>S. aureus</i> у секреті, КУО/мл	Титр <i>Phage SAvB14</i> у секреті, БУО/мл	Вміст <i>S. aureus</i> у секреті, КУО/мл	Титр <i>Phage SAvB14</i> у секреті, БУО/мл	Вміст <i>S. aureus</i> у секреті, КУО/мл
0 (початок досліджу)	-	5000±450	-	4200±336	-	4900±392	-	4800±432
12	-	-	$1,2 \times 10^{-5} \pm 9,6 \times 10^{-3}$	1800±144*	$2,3 \times 10^{-6} \pm 1,8 \times 10^{-5}$	1700±136*	$4,5 \times 10^{-7} \pm 3,6 \times 10^{-6}$	800±64*
24	-	0	$1,7 \times 10^{-5} \pm 1,3 \times 10^{-4}$	980±78	$3,4 \times 10^{-6} \pm 3,0 \times 10^{-5}$	850±67	$3,2 \times 10^{-7} \pm 2,8 \times 10^{-6}$	420±33
36	-	-	$3,1 \times 10^{-4} \pm 2,4 \times 10^{-3}$	630±50	$6,2 \times 10^{-6} \pm 4,9 \times 10^{-5}$	510±40	$1,5 \times 10^{-7} \pm 1,2 \times 10^{-6}$	160±14
48	-	0	$2,6 \times 10^{-4} \pm 2,0 \times 10^{-3}$	420±33	$3,7 \times 10^{-5} \pm 3,3 \times 10^{-4}$	180±16	$1,2 \times 10^{-7} \pm 1,0 \times 10^{-6}$	120±11*
60	-	-	$2,6 \times 10^{-4} \pm 2,0 \times 10^{-3}$	250±22	$6,1 \times 10^{-5} \pm 5,4 \times 10^{-4}$	60±5	$4,5 \times 10^{-5} \pm 3,6 \times 10^{-4}$	0
72	-	0	$3,4 \times 10^{-4} \pm 2,7 \times 10^{-3}$	130±11	$4,8 \times 10^{-4} \pm 3,8 \times 10^{-3}$	40±4	$3,8 \times 10^{-5} \pm 3,0 \times 10^{-4}$	0
84	-	-	$3,5 \times 10^{-3} \pm 3,1 \times 10^{-2}$	100±9	$2,4 \times 10^{-3} \pm 2,1 \times 10^{-2}$	0**	$6,4 \times 10^{-4} \pm 5,7 \times 10^{-3}$	0
96	-	0	$1,9 \times 10^{-3} \pm 1,7 \times 10^{-2}$	0**	$2,4 \times 10^{-3} \pm 1,9 \times 10^{-2}$	0	$1,4 \times 10^{-4} \pm 1,1 \times 10^{-3}$	0

Примітка: - не проводили визначення; \*– $P \leq 0,05$  порівняно з початковою кількістю; \*\*– $P \leq 0,05$  порівняно з третьою групою.

За результатами дослідження встановлено, що високу терапевтичну ефективність проявляють всі партії Фагомасту (81,8–92,8 %), однак тривалість лікування тварин була різною. Під час застосування препарату Фагомаст з титром фагів  $10^{-9}$  БУО/мл вона коротша на 1 добу ніж у корів, яким вводили титр фагів  $10^{-8}$  БУО/мл та на 1,5 доби порівняно з коровами першої групи, яким вводили титр фагів  $10^{-7}$  БУО/мл. Отже, застосування вищої концентрації фагових віріонів приводить до кращого розподілу фагів у молочній залозі, зокрема до поліпшення зв'язування фагів з клітинами-господарями та їх знищення.

Результати ефективності Фагомасту з титром бактеріофагів  $10^{-8}$  та  $10^{-9}$  БУО/мл підтверджено реакцією з мастидином, яка через 48 годин оцінена як сумнівна, а через 72 години – негативна, як і за лікування антибіотиком. Вміст *S. aureus* у секреті корів через 12 годин після введення препарату з титром фагів  $10^{-9}$  БУО/мл знизився у 6 разів ( $P \leq 0,05$ ), а через 48 годин – у 40 разів ( $P \leq 0,05$ ), після 60 годин терапії взагалі не виділявся. При цьому титр бактеріофагів залишався на рівні  $10^{-7}$  БУО/мл, і коли кількість чутливих бактерій знизилася до

нуля знизився на 2 порядки. Аналізуючи отримані результати можна стверджувати, що у молочній залозі титр бактеріофагів підтримувався не лише за пасивного введення препарату, а також за отримання нових віріонів під час знищення бактерій. Дослідники [22] за вивчення здатності літичного бактеріофага К елімінувати внутрішньоцистернальну інфекцію у корів під час лактації виявили його здатність розмножуватися у молочній залозі корови, при цьому зменшуючи вміст золотистого стафілокока. Високу ефективність застосування стафілококових бактеріофагів багаторазово підтверджено багатьма вченими на моделях тварин [23–26].

Крім того, введення препарату через кожні 12 годин здатне підтримувати ефективну фагову інфекцію у місці запалення, що є ключовою вимогою за розробки бактеріофагових препаратів.

Отже, використання бактеріофагового препарату Фагомаст є альтернативою за лікування субклінічного стафілококового маститу у корів. Однак ефективність фагової терапії залежить від досягнення відносно високих титрів фагів *in situ*. Найкращим дослідним варіантом бактеріофагового препарату Фагомаст виявився з титром *Phage SAvB14*  $10^{-9}$  БУО/мл.

**Висновки.** Встановлено, що препарат Фагомаст з різними титрами бактеріофагів проявляє терапевтичну ефективність у 81,8–92,8 %. Тривалість лікування дослідним варіантом бактеріофагового препарату Фагомаст з титром *Phage SAvB14*  $10^9$  БУО/мл коротша на 1 добу, ніж корів яким вводили титр фагів  $10^8$  БУО/мл та на 1,5 доби порівняно з коровами, яким вводили титр фагів  $10^7$  БУО/мл.

Після застосування титрів бактеріофагів  $10^8$  та  $10^9$  БУО/мл у препараті Фагомаст через 48 годин реакція з маститом оцінена як сумнівна, а через 72 години – як негативна.

Вміст *S. aureus* у секреті корів через 12 годин після введення препарату з титром фагів  $10^9$  БУО/мл знижується у 6 разів ( $P \leq 0,05$ ), і після 60 годин терапії взагалі не виділяється. У разі застосування препарату два рази на добу титр бактеріофагів залишається на рівні  $10^7$  БУО/мл протягом всього процесу лікування.

**Перспективи подальших досліджень.** Вивчити та порівняти терапевтичну ефективність застосування розробленого бактеріофагового препарату Фагомаст за лікування маститу у корів з препаратами на основі антибіотиків.

**Відомості про дотримання біоетичних норм.** Експериментальні дослідження проводили із дотриманням вимог Закону України № 3447 – IV від 21.02.06 р. «Про захист тварин від жорстокого поводження» та відповідно до основних принципів «Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та наукових цілей» (Страсбург, 1986), Національного конгресу з біоетики «Загальні етичні принципи експериментів на тваринах» (Київ, 2001).

**Відомості про конфлікт інтересів.** Автор заявляє про відсутність конфлікту інтересів.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Safety of bacteriophage therapy in severe *Staphylococcus aureus* infection / A. P. Fabijan et al. *Nature microbiology*. 2020. Vol. 5. No. 3. P. 465–472. DOI:10.1038/s41564-019-0634-z
2. Concerted dispersion of *Staphylococcus aureus* biofilm by bacteriophage and 'green synthesized' silver nanoparticles / S. Manoharadas et al. *RSC Advances*. 2021. Vol. 11. No. 3. P. 1420–1429. DOI:10.1039/D0RA09725J
3. Strategy for mass production of lytic *Staphylococcus aureus* bacteriophage pSa-3: contribution of multiplicity of infection and response surface methodology / S. G. Kim et al. *Microbial Cell Factories*. 2021. Vol. 20. No. 1. P. 1–12. DOI:10.1186/s12934-021-01549-8
4. Horiuk Y. V. Lytic Activity of Staphylococcal Bacteriophage on Different Biotypes of *Staphylococcus aureus*. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*. 2019. Vol. 21. No. 94. P. 115–120. DOI:10.32718/nvlvet9421
5. Kakasis A., Panitsa G. Bacteriophage therapy as an alternative treatment for human infections. *A comprehensive re-*

*view. International journal of antimicrobial agents*. 2019. Vol. 53. No. 1. P. 16–21. DOI:10.1016/j.ijantimicag.2018.09.004

6. Plasma clearance of bacteriophage Q $\beta$  particles as a function of surface charge / D. E. Prasuhn Jr et al. *Journal of the American Chemical Society*. 2008. Vol. 130. No. 4. P. 1328–1334. DOI:10.1021/ja075937f

7. Standardized bacteriophage purification for personalized phage therapy / T. Luong et al. *Nature Protocols*. 2020. Vol. 15. No. 9. P. 2867–2890. DOI:10.1038/s41596-020-0346-0

8. Phage on tap-a quick and efficient protocol for the preparation of bacteriophage laboratory stocks / N. Bonilla et al. *Peer J*. 2016. Vol. 4. P. 1–18. DOI:10.7717/peerj.2261

9. Payne R. J., Jansen V. A. Phage therapy: the peculiar kinetics of self-replicating pharmaceuticals. *Clinical pharmacology & therapeutics*. 2020. Vol. 68. No. 3. P. 225–230. DOI:10.1067/mcp.2000.109520

10. Isolation of Phages and Study of their In vitro Efficacy on *Staphylococcus aureus* Isolates Originating from Bovine Subclinical Mastitis / A. S. Srujana et al. *Indian Journal of Animal Research*. 2021. Vol. 1. P. 1–5. DOI:10.18805/IJAR.B-4331

11. Abedon S. Phage therapy pharmacology: calculating phage dosing. *Advances in applied microbiology*. 2011. Vol. 77. P. 1–40. DOI:10.1016/B978-0-12-387044-5.00001-7

12. Nilsson A. S. Pharmacological limitations of phage therapy. *Uppsala journal of medical sciences*. 2019. Vol. 124. No. 4. P. 218–227. DOI:10.1080/03009734.2019.1688433

13. Manohar P., Tamhankar A. J., Leptih S., Ramesh N. Pharmacological and immunological aspects of phage therapy. *Infectious Microbes & Diseases*. 2019. Vol. 1. No. 2. P. 34–42. DOI:10.1097/IM9.0000000000000013

14. Potential of bacteriophages as disinfectants to control of *Staphylococcus aureus* biofilms / J. Song et al. *BMC microbiology*. 2021. Vol. 21. No. 1. P. 1–14. DOI:10.1186/s12866-021-02117-1

15. Influence of staphylococcal *Phage SAvB14* on biofilms, formed by *Staphylococcus aureus* variant *bovis* / Y. V. Horiuk et al. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2019. Vol. 10. No. 3. P. 314–318. DOI:10.15421/021948

16. Danis-Wlodarczyk K., Dąbrowska K., Abedon S. T. Phage therapy: the pharmacology of antibacterial viruses. *Current Issues in Molecular Biology*. 2020. Vol. 40. No. 1. P. 81–164. DOI:10.21775/cimb.040.081

17. Hoyland-Kroghsbo N. M., Mærkedahl R. B., Svenningsen S. L. A quorum-sensing-induced bacteriophage defense mechanism. *MBio*. 2013. Vol. 4. No. 1. P. 1–8. DOI:10.1128/mBio.00362-12

18. Horiuk Y. The effect of various titers of bacteriophages on the amount of *Staphylococcus aureus* variant *bovis*. *Veterinary Science, Technologies of Animal Husbandry and Nature Management*. 2020. Vol. 5. P. 26–31. DOI:10.31890/vtpp.2020.05.05

19. Evaluation of increased milking frequency as an additional treatment for cows with clinical mastitis / V. Krömker et al. *Journal of dairy research*. 2010. Vol. 77. No. 1. P. 90–94. DOI:10.1017/S0022029909990422

20. The recombinant phage lysine LysK has a broad spectrum of lytic activity against clinically relevant staphylococci, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / S. O'flaherty et al. *Journal of bacteriology*. 2005. Vol. 187. No. 20. P. 7161–7164. DOI:10.1128/JB.187.20.7161-7164.2005

21. Titze I., Lehnerr T., Lehnerr H., Krömker V. Efficacy of bacteriophages against *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. *Pharmaceuticals*. 2020. Vol. 13. No. 3. P. 1–22. DOI:10.3390/ph13030035

22. Efficacy and pharmacokinetics of bacteriophage therapy in treatment of subclinical *Staphylococcus aureus* mastitis in lactating dairy cattle / J.J. Gill et al. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006. Vol. 50. No. 9. P. 2912–2918. DOI:10.1128/AAC.01630-05

23. Bacteriophage  $\Phi$ SA012 has a broad host range against *Staphylococcus aureus* and effective lytic capacity in a mouse mastitis model / H. Iwano et al. *Biology*. 2018. Vol. 7. No. 1. P. 1–13. DOI:10.3390/biology7010008

24. Isolation and characterization of phages with lytic activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains belonging to clonal complex 398 / B. Kraushaar et al. *Archives of virology*. 2013. Vol. 158. No. 11. P. 2341–2350. DOI:10.1007/s00705-013-1707-6

25. Evaluation of phage therapy in the treatment of *Staphylococcus aureus*-induced mastitis in mice / H. Geng et al. *Folia microbiologica*. 2020. Vol. 65. No. 2. P. 339–351. DOI:10.1007/s12223-019-00729-9

26. Wills Q. F., Kerrigan C., Soothill J. S. Experimental bacteriophage protection against *Staphylococcus aureus* abscesses in a rabbit model. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2005. Vol. 49. No. 3. P. 1220–1221. DOI:10.1128/AAC.49.3.1220-1221.2005

#### REFERENCES

1. Fabijan, A. P., Lin, R. C., Ho, J., Maddocks, S., Zakour, N. L. B., Iredell, J. R. (2020). Safety of bacteriophage therapy in severe *Staphylococcus aureus* infection. *Nature microbiology*. Vol. 5, no. 3, pp. 465–472. DOI:10.1038/s41564-019-0634-z

2. Manoharadas, S., Altaf, M., Alrefaei, A. F., Devasia, R. M., Hadj, A. Y. M. B., Abuhasil, M. S. A. (2021). Concerted dispersion of *Staphylococcus aureus* biofilm by bacteriophage and 'green synthesized' silver nanoparticles. *RSC Advances*. Vol. 11, no. 3, pp. 1420–1429. DOI:10.1039/D0RA09725J

3. Kim, S. G., Kwon, J., Giri, S. S., Yun, S., Kim, H. J., Kim, S. W., Park, S. C. (2021). Strategy for mass production of lytic *Staphylococcus aureus* bacteriophage pSa-3: contribution of multiplicity of infection and response surface methodology. *Microbial Cell Factories*. Vol. 20, no. 1, pp. 1–12. DOI:10.1186/s12934-021-01549-8

4. Horiuk, Y. V. (2019). Lytic Activity of Staphylococcal Bacteriophage on Different Biotypes of *Staphylococcus aureus*. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*. Vol. 21, no. 94, pp. 115–120. DOI:10.32718/nvlvet9421

5. Kakasis, A., Panitsa, G. (2019). Bacteriophage therapy as an alternative treatment for human infections. A comprehensive review. *International journal of antimicrobial agents*. Vol. 53, no. 1, pp. 16–21. DOI:10.1016/j.ijantimicag.2018.09.004

6. Prasuhn Jr, D. E., Singh, P., Strable, E., Brown, S., Manchester, M., Finn, M. G. (2008). Plasma clearance of bacteriophage Q $\beta$  particles as a function of surface charge. *Journal of the American Chemical Society*. Vol. 130, no. 4, pp. 1328–1334. DOI:10.1021/ja075937f

7. Luong, T., Salabarría, A. C., Edwards, R. A., Roach, D. R. (2020). Standardized bacteriophage purification for personalized phage therapy. *Nature Protocols*. Vol. 15, no. 9, pp. 2867–2890. DOI:10.1038/s41596-020-0346-0

8. Bonilla, N., Rojas, M. I., Cruz, G. N. F., Hung, S. H., Rohwer, F., Barr, J. J. (2016). Phage on tap—a quick and efficient protocol for the preparation of bacteriophage laboratory stocks. *Peer J*. Vol. 4, pp. 1–18. DOI:10.7717/peerj.2261

9. Payne, R. J., Jansen, V. A. (2000). Phage therapy: the peculiar kinetics of self-replicating pharmaceuticals. *Clinical pharmacology & therapeutics*. Vol. 68, no. 3, pp. 225–230. DOI:10.1067/mcp.2000.109520

10. Srujana, A. S., Sonalika, J., Akhila, D. S., Juliet, M. R., Sheela, P. (2021). Isolation of Phages and Study of their In vitro Efficacy on *Staphylococcus aureus* Isolates Originating from Bovine Subclinical Mastitis. *Indian Journal of Animal Research*. Vol. 1, pp. 1–5. DOI:10.18805/IJAR.B-4331

11. Abedon, S. (2011). Phage therapy pharmacology: calculating phage dosing. *Advances in applied microbiology*. Vol. 77, pp. 1–40. DOI: 10.1016/B978-0-12-387044-5.00001-7

12. Nilsson, A. S. (2019). Pharmacological limitations of phage therapy. *Upsala journal of medical sciences*. Vol. 124, no. 4, pp. 218–227. DOI: 10.1080/03009734.2019.1688433

13. Manohar, P., Tamhankar, A. J., Leptihn, S., Ramesh, N. (2019). Pharmacological and immunological aspects of phage therapy. *Infectious Microbes & Diseases*. Vol. 1, no. 2, pp. 34–42. DOI:10.1097/IM9.0000000000000013

14. Song, J., Ruan, H., Chen, L., Jin, Y., Zheng, J., Wu, R., Sun, D. (2021). Potential of bacteriophages as disinfectants to control of *Staphylococcus aureus* biofilms. *BMC microbiology*. Vol. 21, no. 1, pp. 1–14. DOI:10.1186/s12866-021-02117-1

15. Horiuk, Y. V., Kukhtyn, M. D., Stravskyy, Y. S., Klymnyuk, S. I., Vergeles, K. M., Horiuk, V. V. (2019). Influence of staphylococcal *Phage SAvB14* on biofilms, formed by *Staphylococcus aureus* variant bovis. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. Vol. 10, no. 3, pp. 314–318. DOI:10.15421/021948

16. Danis-Włodarczyk, K., Dąbrowska, K., Abedon, S. T. (2020). Phage therapy: the pharmacology of antibacterial viruses. *Current Issues in Molecular Biology*. Vol. 40, no. 1, pp. 81–164. DOI:10.21775/cimb.040.081

17. Hoyland-Kroghsbo, N. M., Mærkedahl, R. B., Svenningsen, S. L. (2013). A quorum-sensing-induced bacteriophage defense mechanism. *MBio*, Vol. 4, no. 1, pp. 1–8. DOI:10.1128/mBio.00362-12

18. Horiuk, Y. (2020). The effect of various titers of bacteriophages on the amount of *Staphylococcus aureus* variant bovis. *Veterinary Science, Technologies of Animal Husbandry and Nature Management*. Vol. 5, pp. 26–31. DOI:10.31890/vtp.2020.05.05

19. Krömker, V., Zinke, C., Paduch, J. H., Klocke, D., Reimann, A., Eller, G. (2010). Evaluation of increased milking frequency as an additional treatment for cows with clinical mastitis. *Journal of dairy research*. Vol. 77, no. 1, pp. 90–94. DOI: 10.1017/S0022029909990422

20. O'flaherty, S., Coffey, A., Meaney, W., Fitzgerald, G. F., Ross, R. P. (2005). The recombinant phage lysine LysK has a broad spectrum of lytic activity against clinically relevant staphylococci, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology*. Vol. 187, no. 20, pp. 7161–7164. DOI:10.1128/JB.187.20.7161-7164.2005

21. Titze, I., Lehnerr, T., Lehnerr, H., Krömker, V. (2020). Efficacy of bacteriophages against *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. *Pharmaceuticals*. Vol. 13, no. 3, pp. 1–22. DOI:10.3390/ph13030035

22. Gill, J. J., Pacan, J. C., Carson, M. E., Leslie, K. E., Griffiths, M. W., Sabour, P. M. (2006). Efficacy and pharmacokinetics of bacteriophage therapy in treatment of subclinical *Staphylococcus aureus* mastitis in lactating dairy cattle. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. Vol. 50, no. 9, pp. 2912–2918. DOI: 10.1128/AAC.01630-05

23. Iwano, H., Inoue, Y., Takasago, T., Kobayashi, H., Furusawa, T., Taniguchi, K., Tamura, Y. (2018). Bacteriophage  $\Phi$ SA012 has a broad host range against *Staphylococcus aureus* and effective lytic capacity in a mouse mastitis model. *Biology*. Vol. 7, no. 1, pp. 1–13. DOI:10.3390/biology7010008

24. Kraushaar, B., Thanh, M. D., Hammerl, J. A., Reetz, J., Fetsch, A., Hertwig, S. (2013). Isolation and characteriza-

tion of phages with lytic activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains belonging to clonal complex 398. Archives of virology. Vol. 158, no. 11, pp. 2341–2350. DOI:10.1007/s00705-013-1707-6

25. Geng, H., Zou, W., Zhang, M., Xu, L., Liu, F., Li, X., Xu, Y. (2020). Evaluation of phage therapy in the treatment of *Staphylococcus aureus*-induced mastitis in mice. Folia microbiologica. Vol. 65, no. 2, pp. 339–351. DOI: 10.1007/s12223-019-00729-9

26. Wills, Q. F., Kerrigan, C., Soothill, J. S. (2005). Experimental bacteriophage protection against *Staphylococcus aureus* abscesses in a rabbit model. Antimicrobial agents and chemotherapy. Vol. 49, no. 3, pp. 1220–1221. DOI: 10.1128/AAC.49.3.1220-1221.2005

#### Определение эффективности применения препарата Фагомаст с различными титрами *Phage SAvB14* Горюк Ю. В.

Лечение бактериальных инфекций бактериофагами является одним из альтернативных методов. Однако использование свободно разбросанных бактериофагов для лечения приводит к их инактивации в физиологических условиях. Поэтому важно при фаготерапии учитывать концентрации бактериофагов.

Цель исследования – определение оптимального титра бактериофага *Phage SAvB14* в препарате Фагомаст для эффективного лечения субклинического мастита у коров, вызванного *Staphylococcus aureus* var. *bovis*.

Для исследования по определению оптимальной терапевтической дозы бактериофагового препарата Фагомаст *in vitro* сформированы группы животных по принципу аналогов. Контролем были животные, которым для лечения применяли препарат на основе антибиотиков согласно инструкции по его использованию. Коровам первой опытной группы применяли партию препарата с титром *Phage SAvB14*  $10^{-7}$  БОЕ/мл, второй опытной группе – с титром  $10^{-8}$  БОЕ/мл и третьей группе –  $10^{-9}$  БОЕ/мл.

Установлено, что высокую терапевтическую эффективность проявляют все партии Фагомаста (81,8–92,8%), однако продолжительность лечения животных была разной. При применении препарата Фагомаст с титром фагов  $10^{-9}$  БОЕ/мл лечение короче на 1 сутки чем коров, которым вводили титр фагов  $10^{-8}$  БОЕ/мл и на 1,5 суток по сравнению с коровами первой группы, которым вводили титр фагов  $10^{-7}$  БОЕ/мл. Результаты терапевтической эффективности Фагомаста с титром бактериофагов  $10^{-8}$  и  $10^{-9}$  БОЕ/мл в препарате подтверждено реакцией с мастидином, которая через 48 часов оценена как сомнительная, а через 72 часа – негативная, как и при лечении антибиотиком. Содержание *S. aureus* в секрете коров через 12 часов после введения препарата с титром фагов  $10^{-9}$  БОЕ/мл снизилось в 6 раз ( $P \leq 0,05$ ), а через 48 часов – в 40 раз ( $P \leq 0,05$ ), и после 60 часов терапии вообще не выделялся. При этом титр бактериофагов оставался на уровне  $10^{-7}$  БОЕ/мл, и когда количество чувствительных

бактерий снизилась до нуля, снизилась на 2 порядка. Таким образом, можно сказать, что поддержание высокой концентрации фаговых вирионов приводит к лучшему распределению фагов в молочной железе, а, следовательно, к улучшению связывания фагов с клетками-хозяевами и их уничтожению.

**Ключевые слова:** бактериофаги, *Staphylococcus aureus*, фаготерапия, бактериофаговый препарат, мастит, коровы.

#### Determination of the drug Fagomast effectiveness with different titers of *Phage SAvB14*

Horiuk Y.

Treatment of bacterial infections with bacteriophages is one of the alternative methods. However, the use of freely dispersed bacteriophages for treatment causes their inactivation under physiological conditions. Therefore, it is important to consider the concentration of bacteriophages in phage therapy.

The aim of study – to determine the optimal titer of bacteriophage *Phage SAvB14* in the drug Fagomast for the effective treatment of subclinical mastitis in cows caused by *Staphylococcus aureus* var. *bovis*.

For research to determine the optimal therapeutic dose of the bacteriophage drug Fagomast *in vitro*, groups of animals were formed on the principle of analogues. Controls were animals treated with an antibiotic-based drug according to the instructions for use. Cows of the first experimental group were used samples of the drug with a titer of *Phage SAvB14*  $10^{-7}$  BFU/ml, the second experimental group with a titer of  $10^{-8}$  BFU/ml and the third group –  $10^{-9}$  BFU/ml.

It was found that all batches of Fagomast (81.8 - 92.8%) show good therapeutic efficacy, but the duration of treatment of animals was different. When using the drug Fagomast with a phage titer of  $10^{-9}$  BFU/ml, it is shorter by 1 day than cows that were injected with a phage titer of  $10^{-8}$  BFU/ml and 1.5 days compared with cows of the first group, which were injected with a phage titer of  $10^{-7}$  BFU/ml. The results of the therapeutic efficacy of Fagomast with a bacteriophage titer of  $10^{-8}$  and  $10^{-9}$  BFU/ml in the drug are confirmed by the reaction with Mastidine, which after 48 hours was assessed as doubtful, and after 72 hours – as negative, as with antibiotic treatment. The content of *S. aureus* in the secretion of cows 12 hours after administration of the drug with a phage titer of  $10^{-9}$  BFU/ml decreased 6 times ( $P \leq 0.05$ ), and after 48 hours 40 times ( $P \leq 0.05$ ), and after 60 hours of therapy did not stand out at all. The titer of bacteriophages remained at the level of  $10^{-7}$  BFU/ml, and when the number of susceptible bacteria decreased to zero it decreased by 2 orders of magnitude. Thus, it can be said that maintaining a higher concentration of phage virions leads to better distribution of phages in the breast, and thus to improved binding of phages to host cells and their destruction.

**Key words:** bacteriophages, *Staphylococcus aureus*, phagotherapy, bacteriophage drug, mastitis, cows.



Copyright: Горюк Ю.В. © This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ORCID iD:  
Горюк Ю.В.

<https://orcid.org/0000-0002-7162-8992>

