

ПРИЛОЖЕНИЕ НА КОМЕРСИАЛНИ ФАГОВИ ПРЕПАРАТИ (БАКТЕРИОФАГИ) СРЕЩУ АНТИБИОТИЧНО РЕЗИСТЕНТНИ БАКТЕРИАЛНИ ИЗОЛАТИ В БЪЛГАРИЯ

Н. Кълвачев¹, И. Цеков², И. Сираков¹, А. Стратев^{3,4}, Й. Кижева⁵, Р. Гергова¹, Т. Стратева¹

¹Катедра по медицинска микробиология „Проф. д-р Иван Митов, дмн“, Медицински факултет, МУ – София

²Вирусологична лаборатория, МБАЛ Надежда – София

³Клиника по анестезиология и интензивно лечение, УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ – София

⁴Катедра по анестезиология и интензивно лечение, Медицински факултет, МУ – София

⁵Катедра „Обща и промишлена микробиология“, Биологичен факултет, Софийски университет „Св. Климент Охридски“

APPLICATIONS OF COMMERCIAL PHAGE PREPARATIONS (BACTERIOPHAGES) AGAINST ANTIBIOTIC RESISTANT BACTERIAL ISOLATES IN BULGARIA

N. Kalvatchev¹, I. Tsekov², I. Sirakov¹, A. Stratev^{3,4}, Y. Kizheva⁵, R. Gergova¹, T. Strateva¹

¹Department of Medical Microbiology “Prof. Dr. Ivan Mitov”, Faculty of Medicine, Medical University – Sofia

²Virology Laboratory, Nadezhda Women’s Health Hospital – Sofia

³Clinic of Anaesthesiology and Intensive Care, University Multiprofile Hospital for Active Treatment “Sv. Ivan Rilski” – Sofia

⁴Department of Anaesthesiology and Intensive Care, Faculty of Medicine, Medical University – Sofia

⁵Department of General and Industrial Microbiology, Faculty of Biology, Sofia University “Sv. Kliment Ohridski”

Резюме. Бактериофагите (от гръцки phagos – “поглъщащ, изяждащ”) са вируси, които могат селективно да убиват бактерии. Тези вируси се откриват навсякъде в околната среда: в почви, реки, океани и дори в стомашно-чревния тракт при живите организми. Те са открити преди повече от 100 години, но след въвеждане на антибиотиците интересът към тях се загубва. С увеличаване на антибиотичната резистентност научните разработки спрямо бактериофагите се засилват в посока разработване на медицински изделия, съдържащи подобрени фагови коктейли. Понастоящем обаче липсват сравнителни или клинични проучвания в областта на фаготерапията в България. Някои държави все повече прибягват към този вид лечение, докато други едва сега разглеждат тяхната регулация. Това проучване цели да бъде разработен алгоритъм за първоначално изследване на ефекта след употреба на комерсиално достъпен фагов препарат, с оглед ползването му като модел за следване. Подбрани и изследвани бяха 38 клинично значими бактериални изолата от хоспитализирани и амбулаторни пациенти, демонстрирали антимикробна резистентност към стратегическите антибиотици за лечение на съответните инфекции. Към тях бяха добавени още 12 щама *Escherichia coli*, изолирани от хранителни продукти. Резултатите показаха, че използваните бактериофаги имат ефект само срещу отделни щамове на някои от тестваните бактериални видове (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* и *Streptococcus pyogenes*). В допълнение се демонстрират липсата на цитотоксичен ефект, измерен върху мезенхимни стволови клетки, както и стабилността при съхранение и повторно използване на фаговия коктейл. Имайки предвид голямата разновидност и наличие на фагови препарати, тези коктейли следва да бъдат определяни строго индивидуално върху вече изолиран щам на даден бактериален вид. Само по този начин евентуален терапевтичен подход чрез бактериофаги би дал желаните антибактериален резултат.

Ключови думи: бактериофаги, комерсиален фагов препарат, фаготерапия

Abstract. Bacteriophages (from the Ancient-Greek word phagos (φάγος) – “devouring, eating”) are viruses that can selectively kill bacteria. These viruses are found everywhere around us, in soils, rivers, oceans and even in the gastrointestinal tract of living organisms. They were discovered more than 100 years ago, but after the introduction of antibiotics, the research interest in them was lost. With the increase in antibiotic resistance, scientific research on bacteriophages has intensified in the direction of developing medical products containing selected phage cocktails. However, there is currently a lack of comparative or clinical trials in the field of phage therapy in Bulgaria. Some countries are adopting this type of treatment, while others are only considering their regulation. This study aims to develop an algorithm for the initial study of the effect of using a commercially available phage preparation, with a view to using it as a model for follow-up. Thirty-eight clinically relevant bacterial isolates from hospitalized and outpatient patients, which demonstrated antimicrobial resistance to strategic antibiotics for the treatment of the respective infections, were selected and studied. Twelve additional *Escherichia coli* strains isolated from food products were added. The results showed that the bacteriophages used were effective only against some of the tested bacterial strains (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Streptococcus pyogenes*). In addition, the lack of cytotoxic effect measured on mesenchymal stem cells was demonstrated, as well as stability during storage and reuse of the phage cocktail. Given the wide variety and availability of phage preparations, these cocktails must be determined strictly individually on an already isolated bacterial strain. Only in this way, a possible therapeutic approach using bacteriophages would lead to the desired antibacterial result.

Key words: bacteriophages, commercial phage preparation, phage therapy

ВЪВЕДЕНИЕ

Исторически данни

През лятото на 1915 г., в разгара на Първата световна война, група войници, разположени в покрайнините на Париж, са засегнати от огнище на тежка хеморагична дизентерия. Разследването на това огнище е възложено на младия френско-канадски учен Феликс д'Ерел. Работейки в престижния Институт Пастър, той бързо изолира и идентифицира *Shigella dysenteriae* като етиологичен причинител на дизентерията при пехотинците [1]. Д'Ерел работи с фекални проби от пациентите и наблюдава как култури от бактерии не прорастват, а по-скоро са лизирани, а капки от вече лизирани култури имат способността да унищожават други бактериални колонии, разположени в съседство. След филтриране през антибактериален филтър мистериозният антибактериален ефект не изчезвал. Феликс д'Ерел публикувал своите изследвания пред Френската академия на науките през 1917 г., като предполагал, че ефектът на лизиране е причинен от „невидим микроб“, антагонист на дизентерийния бацил. Въвел и термина „бактериофаг“, за да обозначи предполагаемия лизис на микроби (от гръцки „фагин“, което означава „да се яде“).

Бактериофагите предизвикват значителен интерес и сред руските учени. Руско-украинският микробиолог Николай Гамалей за първи път наблюдавал феномена лизис при чумните бактерии през 1898 г. След като монографията на Д'Ерел „Бактериофагът: ролята му в имунитета“ е преведена на руски през 1926 г., пионерът на клетъчния имунитет Иля Мечников е впечатлен. Той прекарва години наред във Франция и създава пряка връзка между руските микробиолози и френските институции. Георги Елиев, грузински учен, работил с Д'Ерел в Париж през 1918-1920 г., основава в Тбилиси първата бактериологична лаборатория, изцяло посветена на фаговите разработки [2].

В България има малко на брой изследвания на бактериофаги в областта на медицинската микробиология [3]. През 1969 г. Владимир Късовски сравнява и прилага за диагностика български антраксни бактериофаги, изолирани от почвата [4]; през 1973 г. бактериофаги срещу *Klebsiella pneumoniae* се използват за фаготипиране на различните щамове [5]; ентерококови фаги се прилагат за диагностика от Папаркова през 1976 г. [6]; а Моллов фаготипизира *Salmonella enteritidis* със собствени изолирани фаги [7]. Тези ранни български проучвания поставят основите на фаговата наука (фагологията) у нас, а техните приложения в областта на диагностиката и епидемиологията дават ценна информация как да се използват бактериофагите занапред. Към момента в Лабораторията по обща и промишлена микробиология на Софийския университет „Св. Климент Охридски“ се разработват

национални и международни проекти в сферата на бактериофагите и проблемите, свързани с бактериалната резистентност. През 2025 г. екип от същото звено охарактеризира три новоизолирани бактериофага, насочени срещу *Enterococcus faecalis*, изолирани от отпадни води [8].

Обща характеристика на бактериофагите

Фагите се делят на два основни вида. Литичните притежават способността да унищожават бактериалните гостоприемници чрез клетъчен лизис. Това ги отличава от лизогенните фаги, които интегрират генетичния си материал в бактериалните геноми и в някои случаи улесняват хоризонталния трансфер на гени за антибиотична резистентност или вирулентност. Най-често бактериофагите се състоят от капсид (глава), който обгръща генетичния им материал (ДНК или РНК), и опашна структура, която опосредства инфекцията чрез доставяне на генома в бактериалния гостоприемник. Капсидната структура играе важна роля за поддържане на стабилността и инфекциозността на фаговата частица. Опашните влакна пък са от решаващо значение за специфичността на гостоприемника, свързвайки се с повърхностните рецептори на бактериите [9].

Днес, с увеличаване на антибиотичната резистентност на бактериалните патогени, интересът към фагите отново се завръща, като най-много усилия се полагат в разработването на медицински изделия, съдържащи фаги под една или друга форма. Съществуват редица източници на информация, както и места извън България, от които могат да бъдат закупени разнообразни комерсиални фагови препарати. Към настоящия момент обаче в страната липсват публикувани сравнителни или клинични проучвания, които да оценят ефекта и да предложат алгоритъм на работа с тях. В допълнение, тепърва сред европейските държави и в частност България, ще се дискутира създаването на законова рамка, чрез която да се осъществяват регистрация и контрол на комерсиални бактериофаги за употреба в хуманната медицина. От друга страна, комерсиалните фагови препарати са слабо познати сред клиничните микробиолози, вирусолози и практикуващи лекари. Всичко това обуславя и относителната липса на опит в областта на клиничната фаготерапия у нас.

Настоящото проучване цели да бъде разработен алгоритъм за първоначално изследване на ефекта след употреба на комерсиално достъпен фагов препарат. По този начин се оформят база за методология и модел за следване при работа с бактериофаги в медицинската практика. В допълнение се демонстрират липсата на цитотоксичен ефект, измерван чрез приложение върху мезенхимни стволови клетки, както и стабилността при съхранение и повторно използване на фаговия коктейл.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Събиране на клинични изолати

В продължение на две години (2024-2025 г.) бяха подбирани клинично значими бактериални изолати от хоспитализирани и амбулаторни пациенти с различни медицински диагнози, демонстрирали антимикробна резистентност (AMP) към стратегическите антибиотици за лечение на съответните инфекции. Подборът включваше ограничен брой бактериални видове, кореспондиращ със състава на използвания коктейл от комерсиални бактериофаги, а именно: *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris* и *Proteus mirabilis*.

В табл. 1 са описани изследваните 38 клинични изолата, както следва: 3 изолата *S. pyogenes* от па-

циенти с фарингит и резистентност към макролиди; 7 *S. aureus* с различна степен на резистентност към ампицилин; общо 15 *E. coli* (4 изолирани от рани на долни крайници, а 11 от уринарни проби), чийто профил на AMP включваше резистентност към флуорохинолони, триметоприм-сулфаметоксазол и цефалоспорици; 11 карбапенем-резистентни *P. aeruginosa* с екстензивна лекарствена резистентност; и по един щам *P. vulgaris* и *P. mirabilis*, изолирани от раневи секрети на пациенти.

Следва да се отбележи, че 5 от изследваните щамове *P. aeruginosa* са изолирани от критично болни пациенти, лекувани в интензивно отделение на голяма университетска болница в София, с клинична диагноза сепсис или пневмония, асоциирана с механична вентилация. Изолатите, обозначени като Рае49 и Рае50, са получени от гърлен секрет и урина от един и същ пациент.

Таблица 1. Клинично значими бактериални изолати с резистентност към стратегически антибиотици, получени от пациенти с различни медицински диагнози

Лаб №	Пациент/год.	Диагноза	Изпраща	Вид проба	Изолат
1	М/4	Фарингит	СМДЛ	Гърлен секрет	<i>S. pyogenes</i>
2	М/27	Фарингит	МУ – София	Гърлен секрет	<i>S. pyogenes</i>
3	М/12	Фарингит	МУ – София	Гърлен секрет	<i>S. aureus</i>
4	М/45	Ранева инфекция	МУ – София	Рана	<i>S. aureus</i>
5	М/37	Ранева инфекция	МУ – София	Рана	<i>S. aureus</i>
6	М/34	Ранева инфекция	СМДЛ	Рана	<i>S. aureus</i>
7	М/37	Баланит	СМДЛ	Гланс пенис	<i>S. aureus</i>
8	Ж/28	Уроинфекция	МУ – София	Урина	<i>S. aureus</i>
9	Ж/49	Уроинфекция	МУ – София	Урина	<i>S. aureus</i>
10	Ж/37	Ранева инфекция	СМДЛ	Рана	<i>E. coli</i>
11	М/69	Ранева инфекция	УМБАЛ	Рана	<i>E. coli</i>
12	Ж/38	Ранева инфекция	СМДЛ	Рана	<i>E. coli</i>
13	М/58	Ранева инфекция	СМДЛ	Рана	<i>E. coli</i>
14	Ж/25	Уроинфекция	СМДЛ	Урина	<i>E. coli</i>
15/42	Ж/34	Уроинфекция	СМДЛ	Урина	<i>E. coli</i>
16/42 т.	Ж/39	Уроинфекция	СМДЛ	Урина	<i>E. coli</i>
17	Ж/42	Уроинфекция	МУ – София	Урина	<i>E. coli</i>
18	Ж/41	Уроинфекция	МУ – София	Урина	<i>E. coli</i>
19	Ж/28	Уроинфекция	СМДЛ	Урина	<i>E. coli</i>
20/47	Ж/49	Уроинфекция	СМДЛ	Урина	<i>E. coli</i>
21	Ж/32	Уроинфекция	СМДЛ	Урина	<i>E. coli</i>
22/113	Ж/36	Уроинфекция	СМДЛ	Урина	<i>E. coli</i>
23	Ж/33	Уроинфекция	МУ – София	Урина	<i>E. coli</i>
24	Ж/47	Уроинфекция	МУ – София	Урина	<i>E. coli</i>
25/Рае49	М/50	Уроинфекция	УМБАЛ	Гърлен секрет	<i>P. aeruginosa</i>
26/Рае50	М/50	Уроинфекция	УМБАЛ	Урина	<i>P. aeruginosa</i>
27/Рае55	М/67	COVID-19	УМБАЛ	Урина	<i>P. aeruginosa</i>
28/Рае57	М/76	COVID-19	УМБАЛ	Кръв	<i>P. aeruginosa</i>
29/Рае58	М/53	ОКС, ВАП	УМБАЛ, ИО	БАЛ	<i>P. aeruginosa</i>
30/Рае59	М/63	ИБС, сепсис	УМБАЛ, ИО	Кръв	<i>P. aeruginosa</i>
31/Рае60	М/57	ДТС, сепсис	УМБАЛ, ИО	Кръв	<i>P. aeruginosa</i>
32/Рае61	Ж/62	Лапаротомия	УМБАЛ, ИО	Урина	<i>P. aeruginosa</i>
33/Рае62	М/71	Задържане на урина	УМБАЛ	Урина	<i>P. aeruginosa</i>
34/Рае67	Ж/81	Остър панкреатит, сепсис	УМБАЛ, ИО	Кръв	<i>P. aeruginosa</i>
35/Рs162	М/54	Уроинфекция	МУ – София	Урина	<i>P. aeruginosa</i>
36	М/12	Уроинфекция	СМДЛ	Урина	<i>P. mirabilis</i>
37	Ж/20	Уроинфекция	СМДЛ	Урина	<i>P. vulgaris</i>
38	М/7	Фарингит	СМДЛ	Гърлен секрет	<i>S. pyogenes</i>

Легенда: М – мъж; Ж – жена; год. – години; 16/42 т. – лаб. № 16/42 с точка; СМДЛ – самостоятелна медико-диагностична лаборатория; МУ – медицински университет; УМБАЛ – университетска многопрофилна болница за активно лечение; ИО – интензивно отделение; ОКС – остър коронарен синдром; ИБС – исхемична болест на сърцето; ДТС – дезартикуляция на тазобедрена става; БАЛ – бронхоалвеоларен лаваж; ВАП – вентилаторно асоциирана пневмония; в удебелен шрифт (почернен) – чувствителни на бактериофаги изолати

Събиране на изолати от храни

Като допълнение към описаните по-горе клинични изолати бяха подбрани още 12 щама *E. coli*, изолирани от хранителни продукти, намиращи се в търговската мрежа и на пазари. Те бяха подбрани с цел изучаването им за някои фактори на патогенност и разпространението им сред храните и впоследствие бяха добавени към настоящото проучване. В случаите на месни продукти пробите бяха взети стерилно от дълбочина на месото (2-3 cm) чрез разрез със стерилен нож, предварително обгорен със спирт, и вкарване на стерилен тампон в направения отвор (табл. 2.). Първоначално култивирахме на прости хранителни среди (месопептонен бульон), а след това препосяхахме на кръвен и Макконки агар.

Таблица 2. Бактериални изолати от продукти, събирани през търговската мрежа или пазари

Лаб №	Вид проба	Източник на материал	Изолиран бактерии
6	Сурово краве мляко	пазар	<i>E. coli</i>
7	Сурово краве мляко	пазар	<i>E. coli</i>
134	Пиле грил	продукт от търговска мрежа	<i>E. coli</i>
138	Пиле грил	продукт от търговска мрежа	<i>E. coli</i>
298-3	Сурово краве мляко	пазар	<i>E. coli</i>
298-4	Сурово краве мляко	пазар	<i>E. coli</i>
339	Свинско месо	продукт от търговска мрежа	<i>E. coli</i>
342	Свинско контрафиле	продукт от търговска мрежа	<i>E. coli</i>
343	Свинско контрафиле	продукт от търговска мрежа	<i>E. coli</i>
344	Свинско контрафиле	продукт от търговска мрежа	<i>E. coli</i>
348	Свински котлет	продукт от търговска мрежа	<i>E. coli</i>
356	Свински бут	продукт от търговска мрежа	<i>E. coli</i>

Легенда: удебелен шрифт (почернен) – чувствителни на бактериофаги изолати

След идентифициране на бактериите отново инокулирахме изолата в епруветки, съдържащи течна среда тиогликолатен бульон, а към тях добавяхме фаговия коктейл в различни концентрации от по 1000 µl, 100 µl и 10 µl съответно.

Работа с избран комерсиален фагов препарат

Първоначално изолираните бактерии на кръвен агар и Макконки агар бяха идентифицирани чрез конвенционални биохимични тестове и автоматизирана система BD Phoenix M50 (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) според инструкциите на производителя. Всеки изолат беше инокулиран в три различни епруветки, съдържащи 1 ml течна тиогликолатна среда. Бактериалната суспензия беше стандартизирана до оптична плътност 0.5

по Макфарланд. След това към всяка епруветка беше добавян наличният към момента концентрат с комерсиален фагов коктейл (Пиобактериофаг – ПИОФАГ, Украйна) в обем от 1000 µl, 100 µl и 10 µl, съответно към всяка от трите епруветки. По данни на производителя (Neo Probir care, INC) всеки ml от препарата съдържа по 1×10^5 PFU/ml бактериофаги.

След инкубация на 37°C за 24 часа в термостат отчитаме визуално получения резултат под формата на избистряне или помътняване на тиогликолатната среда, което е използвано за индикация за бактериалния растеж. След повторна посевка бяха определяни микробно число и общ брой колонии на същите хранителни среди от първичните посевки. Вторичните посевки винаги бяха придружени от положителни и отрицателни контроли на съответните бактериални изолати.

Работа с клетъчни култури

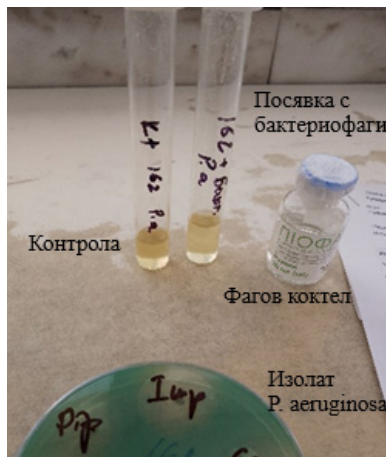
Допълнителни проучвания бяха насочени към заразяване на мезенхимни стволни клетки с изследваните бактериофаги. След инокулиране и проследяване на 24-ти, 48-и, 72-ри час културите бяха изследвани за наличност на токсични ефекти, увреждане или специфични цитопатични ефекти, следствие от фаговите препарати. Заразахме клетъчните култури с фаги и измерихме клетъчна метаболитна активност чрез МТТ теста (основен метод в биологията за оценка на клетъчната жизнеспособност и пролиферация, основан на редукцията на жълтата тетразолиево сол) [10].

Култивирахме монослойни клетъчни линии в модифицирана среда (DMEM) (Gibco, Австрия), допълнена с 15% фетален телешки серум (Gibco, Австрия), 100 U/ml пеницилин и 0.1 mg/ml стрептомицин (Gibco, USA) в матрочета. Клетките поставяхме в 96-ямкови плаки в обем 200 µl и ги оставяхме да се прикрепят към дъното за 24 часа в инкубатор на 37°C и 5% CO₂. След инкубиране на третираните клетки се извърши колориметричен анализ с МТТ тест (Sigma Chemical Co.). Използвахме ELISA четец за микроплаки при дължина на вълната $\lambda = 550$ nm с референтна дължина на вълната $\lambda = 630$ nm [11]. Анализирахме чувствителност към цитотоксични агенти, клетъчен стрес и директна клетъчна смърт.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

В условията на нашата опитна постановка бяха взети и подбрани общо 50 проби от пациенти, изследвани в различни медицински заведения, и проби от продукти, налични в търговската мрежа. Селектирани бяха бактерии, които да съответстват на целевите бактерии в използвания от нас фагов коктейл (Пиобактериофаг – ПИОФАГ, Украйна), насочен към *S. pyogenes*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *P. vulgaris* и *P. mirabilis*.

Първоначално всяка проба поставяхме в две епруветки, съдържащи по 1 ml тиогликолат. В двете инокулирахме вече изолираните и идентифицирани щамове, но само в едната добавяхме по 1000 µl бактериофаги. В първата епруветка следяхме за естественото размножаване на бактерии (контрола проба) – фиг. 1.



Фиг. 1. Инокулация на щам *P. aeruginosa* след изолиране и интерпретация на антимикробната резистентност чрез дифузионен дисков метод (антибиограма)

След инкубация на 37°C за 24 часа в термостат отчитаме визуално получения резултат под формата на избистряне или помътняване на хомогената.

Известно е, че за да се възпроизведе даден бактериофаг, той трябва да внедри своя геном в чувствителни бактериални „хазяи“, където, използвайки биохимичните системи и химични съставки на последния, синтезира вирусни елементи съгласно кодираното в генома на съответния фаг. Невинаги обаче, когато е налице адсорбция на фаги, се стига до внедряване (инфекция) и последващо възпроизвеждане на потомство, способно да поддържа инфекциозния процес. Някои бактериофаги се адсорбират върху бактериалния хазяин и го убиват (лизират), без да произведат нови вирусни частици. Ето защо 24 часа след смесването на бактериите с фаги отчитаме дали има чувствителни към тях бактерии чрез наличие на лизиране, за което се съди по избистряне на разтвора. Обратно, помътняване на течността бе индикатор за растеж и размножаване на бактерии, без те да бъдат засегнати от бактериофагите.

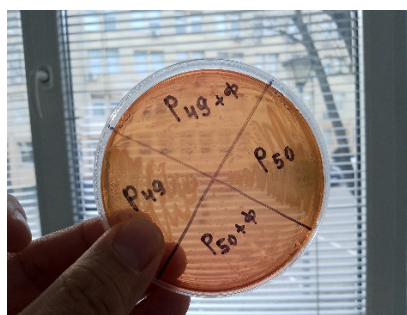
Във втори експеримент използвахме общо 4 епруветки с по 1 ml тиогликолатна среда. В контролна епруветка инокулирахме вече изолираните бактерии и проследявахме за растеж. В останалите 3 епруветки, съдържащи бактерии и тиогликолат, добавяхме различни концентрации бактериофаги, съответно 1000 µl, 100 µl и 10 µl. След 24 часа инкубация проверявахме за степента на бистрота или помътняване и отново пресявахме пробите на кръвен и Макконки

агар. На фиг. 2 са показани първичните посевки в епруветки с тиогликолат и последващото пресяване на сектори на твърдите хранителни среди след 24-часова инкубация.



Фиг. 2. Пресявка на клиничен изолат *P. aeruginosa* след смесване с бактериофаги. В контролната епруветка се отчита характерен бактериален растеж със зеленкав пигмент, докато в останалите се наблюдава различна степен на бистрота или помътняване в течните среди, доказващи лиза или растеж на бактерии

На фиг. 3 е показана снимка с резултати от проведените експерименти с бактериофаги. Карбапенем-резистентните изолати Рае49 и Рае50 са получени от един и същ хоспитализиран пациент, съответно от гърлен секрет и урина. След прибавяне на бактериофагите и инкубация за 24 часа отчетохме пълна бистрота в епруветката с течна хранителна среда (тиогликолатен бульон) при двете проби. Последващата пресявка на твърда хранителна среда Макконки показва липса на какъвто и да било бактериален растеж.

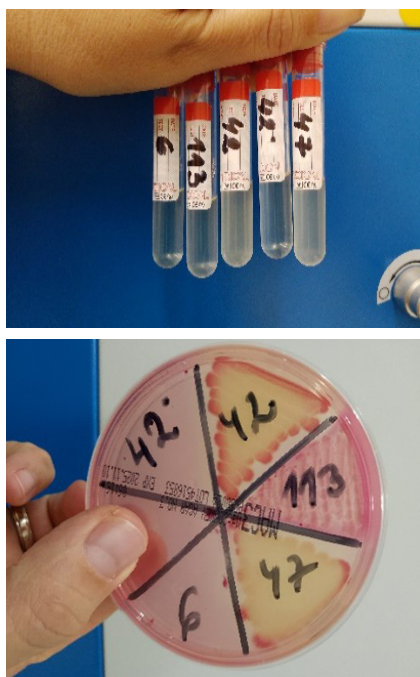


Фиг. 3. Посевки на *P. aeruginosa* с номера на пробите Рае49 и Рае50 след прилагане на бактериофаги. От снимката: Р49 и Р50 – контроли (бактерии без бактериофаги); Р49 + ф и Р50 + ф (бактериални изолати с добавени бактериофаги)

Коли бактериите също се оказаха чувствителни на нашия фагов коктейл. Изследвахме общо 27 изолата *E. coli*, 4 от които (лаб. номера 42, 42 т., 47 и 113) бяха лизирани от бактериофагите 24 часа след посевката им на течна хранителна среда. Тези чувствителни бактериални щамове полу-

чихме след рутинни микробиологични изследвания на пациенти със симптоми на уринарни инфекции. Още един щам *E. coli*, идентифициран в сурово краве мляко (лаб. номер 6), демонстрира чувствителност към фаговия коктейл.

На фиг. 4А може да се отчете степента на избистряне (бактериален лизис) при изследваните проби, докато фиг. 4Б представя пресявката от течните среди. Там, където видно личи помътняване, коли бактериите се размножават с различно микробно число на Макконки агар. Остава да бъде изяснен фактът, защо фагите действат с различна степен на различните бактериални щамове. Възможно е този факт да се обуславя от специфичността на захващане и адхезия на бактериалните рецептори с опашните влакна на вирусите.



Фиг. 4. А. Отчитане на степента на избистряне 24 ч след добавяне на фаги. Б. Отчитане на пресявката от течните на твърди хранителни среди

При експеримент с посевка на четири различни сектора (фиг. 5) с контрола и добавяне на различна концентрация бактериофаги (1000 μ l, 100 μ l и 10 μ l) отчетохме масов бактериален растеж при контролата (Сектор Контрола – без фагов коктейл). В секторите, където добавихме по 1000 μ l и 100 μ l фаги към изолираните бактерии, отчетохме липса на растеж, докато при посевките с най-малката концентрация от 10 μ l отчетохме растеж на бактерии в умерено количество.

На практика този опит *in vitro* показва, че има значение използваната концентрация от фаговия коктейл. Занапред, когато бактериофаги се използват *in vivo* на пациенти, тази информация би била крайно полезна. Следва да се има предвид фактът, че тези препарати се познават малко сред лекуващите лекари, клинични-

те микробиолози и вирусолози. Също така във времена на все по-често срещани инфекции с висока АМР има нужда от познаване на алтернатива на антибиотиците.



Фиг. 5. Отчитане на 4 сектора с различна добавена концентрация на бактериофаги и контрола на растеж

Нашите експерименти показаха сравнително нисък процент на активност сред всички селективно изследвани бактерии с Пиобактериофаг (ПФОФАГ). При общо направени 50 проби (клинични изолати и храни), чувствителни на бактериофагите се оказаха: 5 бр. *E. coli* (10% от общия брой тествани изолати), 2 бр. *P. aeruginosa* (4%) и 1 бр. *S. pyogenes* (2%). Все още липсват преки доказателства какъв е механизмът на действие на фагите. Най-вероятно фаговете въси, заедно с бактериалните рецептори, играят важна роля на разпознаване между вируса и хазяина [12, 13].

Нашите резултати насочват към това, че преди да бъдат приложени различните комерсиални фагови препарати върху пациенти, те задължително трябва да бъдат проверявани, по описания по-горе алгоритъм, непосредствено преди използването им. С други думи, чувствителността на бактериите да бъде тествана още преди лечението с бактериофаги да е започнало. Винаги трябва да се има предвид и опасността, свързана с употребата на бактериофаги, а именно възможността за пренос на фактори на патогенност и вирулентност от един бактерия на друг, пренос на гени за АМР, както и възможността за нежелани странични реакции по време на употреба на фаговите коктейли.

По отношение на цитотоксичния ефект използваният от нас фагов коктейл, измерен върху мезенхимни стволови клетки с МТТ тест, показва липса на какъвто и да било признак на клетъчен стрес, блокиране на клетъчна пролиферация или клетъчна смърт. Дилемата доколко прилагането на бактериофаги винаги е полезно или по-скоро може да е свързано с някакви рискове, е налице [14], поради което

фаговите коктейли трябва с внимание да се прилагат на пациенти. Не на последно място е и липсата на законова яснота и регулация от страна на контролните институции.

По наши наблюдения използваните комерсиални фаги запазваха литичните си свойства за дълъг период (повече от година), тоест проявяваха стабилност при съхранение. Следва да се отбележи обаче, че тези препарати са труднодостъпни, а транспортирането им (особено при трансграничен транспорт) изисква специална организация и спазване на хладилна верига.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Резистентността към антимикробните лекарствени средства се развива с висока скорост и медицинската общност е изправена пред задачата да намира и прилага алтернативни начини за лечение на бактериални инфекции, в допълнение към антибиотиците. Бактериофагите, еволюционно формирани като „врагове“ на бактериите, са една подобна възможност. Понастоящем обаче липсват клинични проучвания и утвърдена методология за оценка на ефективността на използваните препарати в областта на фаготерапията в България.

Имайки предвид голямата разновидност и наличие на фагови препарати, можем да обобщим, че обхватът на дейност на тези коктейли следва да бъде определян строго индивидуално върху вече изолиран бактериален щам. Настоящото проучване очертава конкретни стъпки и алгоритъм, чрез който различните комерсиални продукти може да бъдат изпитвани и прилагани на пациенти. Само по този начин евентуален терапевтичен подход чрез бактериофаги би дал желан антибактериален резултат.

Библиография

1. Summers C. The strange history of phage therapy. *Bacteriophage*, 2012, 2:130-133.

2. Letarov V. History of early bacteriophage research and emergence of key concepts in virology. *Biochemistry*, 2020, 85, 1093-1112.

3. Kalvatchev N, Khanbabapour T, Sakkeer A et al. The forgotten history of bacteriophages in Bulgaria: an overview and molecular perspective on their role in addressing antibiotic resistance and therapy. *Viruses*, 2026, 18(1), 38.

4. Късовски В. Изолиране, проучване, произвеждане на антраксни бактериофаги и разработването им в диагностиката. Дисертационен труд. Висш военномедицински институт, София, 1969. // Kasovski V. Isolation, Study, and Production of Anthrax Bacteriophages and Their Development for Use in Diagnostics. Dissertation. Higher Military Medical Institute, Sofia, 1969.

5. Кръчмарова-Райчева Е. Изолиране и проучване на бактериофаги *Klebsiella pneumoniae* с оглед приложението им в епидемиологичната практика. Дисертационен труд. Медицинска академия, София, 1973. // Krachmarova-Raycheva E. Isolation and study of *Klebsiella pneumoniae* bacteriophages with a view to their application in epidemiological practice. Dissertation. Medical Academy, Sofia, 1973.

6. Папаркова К. Ентерококови бактериофаги - изолиране, проучване и приложение при диагностиката на ентерококите. Дисертационен труд. Медицинска академия, София, 1976. // Paparkova K. Enterococcal bacteriophages - isolation, study, and application in the diagnosis of Enterococci. Dissertation. Medical Academy, Sofia, 1976.

7. Моллов Д. Фаготипизация на *S. enteritidis* с наш набор от бактериофаги. Дисертационен труд. Медицинска академия, София, 1987. // Mollov D. Phage typing of *S. enteritidis* using our set of bacteriophages. Dissertation. Medical Academy, Sofia, 1987.

8. Kizheva Y, Dimova T, Pandova M et al. Characterization of wastewater-derived bacteriophages infecting *Enterococcus faecalis* in Bulgaria: insights into the novel phage vB_SEF_8. *Frontiers in Microbiology*, 2025, 16, 1674800.

9. Fokine A, Rossmann M. Molecular architecture of tailed double-stranded DNA phages. *Bacteriophage*, 2014, 4, e28281.

10. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 1983, 65(1-2), 55-63.

11. Plumb J. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. In: Langdon, S.P. (eds). *Cancer Cell Culture. Methods in Molecular Medicine*, vol 88. Humana Press, 2004.

12. Filik K, Szermer-Olearnik B, Oleksy S et al. Bacteriophage tail proteins as a tool for bacterial pathogen recognition - a literature review. *Antibiotics*, 2022, 11, 555.

13. Abedon S, Kuhl S, Blasdel G et al. Phage treatment of human infections. *Bacteriophage*, 2011, 1, 66-85.

14. Podlacha M, Węgrzyn G, Węgrzyn A. Bacteriophages – Dangerous Viruses Acting Incognito or Underestimated Saviors in the Fight against Bacteria? *Inter. Jour. of Mol. Sci.*, 2024, 25(4), 2107.

✉ Адрес за кореспонденция:
Гл. ас. д-р Николай Кълвачев, дм
e-mail: nkalvat@yahoo.com