

УДК 579.62.

Строїч В. В.*аспірант кафедри ветеринарного акушерства, внутрішньої патології та хірургії,
Заклад вищої освіти «Подільський державний університет»**Кам'янець-Подільський, Україна***E-mail:** stroich@pdatu.edu.ua**ORCID:** 0009-0002-0237-1289**Горюк Ю. В.***доктор ветеринарних наук,**доцент кафедри ветеринарного акушерства, внутрішньої патології та хірургії,
Заклад вищої освіти «Подільський державний університет»**Кам'янець-Подільський, Україна***E-mail:** goruky@ukr.net**ORCID:** 0000-0002-7162-8992

ОЦІНЮВАННЯ НАЯВНИХ БАКТЕРІОФАГОВИХ ПРЕПАРАТІВ НА РИНКУ УКРАЇНИ Й ВИДІЛЕННЯ ФАГІВ СПЕЦИФІЧНИХ ДО ЗБУДНИКІВ ПІОДЕРМІЇ СОБАК

Анотація

Використання фагів з лікувальною метою в медицині – тема не нова, водночас вона була призабута, оскільки ефект від застосування антибіотиків був набагато кращий. Однак із розвитком антибіотикорезистентності в бактерій усе частіше звертають увагу на застосування фагів – літичних до збудників багатьох запальних процесів. Метою роботи було оцінити наявні бактеріофагові препарати на ринку України й виділити фаги, специфічні до збудників піодермії собак. Мікробіологічні дослідження щодо виділення мікрофлори проводили за загальноприйнятими в мікробіологічній практиці методами. Наявні на ринку бактеріофагові препарати «Піофаг», «Інтестіфаг» і розроблений ветеринарний препарат «Фагомаст» не проявляли літичної активності щодо основних збудників піодермії собак: *S. pseudintermedius*, *S. aureus* та *S. schleiferi subsp. coagulans*. Із вогнищ запалення за піодермії виділяються найчастіше фаги, активні до клітин стафілококів видів *S. pseudintermedius* та *S. schleiferi subsp. coagulans*, які використали для розроблення бактеріофагового препарату. Виділено чотири фаги, які літичні до кожного з чотирьох видів стафілококів, зокрема фаг *S.a* 4 активний щодо *S. aureus*; фаг *S.p* 2 літичний щодо *S. pseudintermedius*; фаг *S.she* 3 – щодо *S. schleiferi subsp. coagulans*; фаг *S.e* 5 – щодо *S. epidermidis*. Дослідження спектру літичної активності чотирьох стафілококових фагів виявило переважну їх специфічність щодо конкретного виду бактерій. Отже, для лізису більшої кількості збудників піодермії стафілококової етіології необхідно розробляти фаговий препарат «коктейльного» типу з умістом різних фагів.

Ключові слова: збудники піодермії собак, бактеріофаги, стафілококи, літичні фаги, бактеріофагові препарати.

Вступ. Сьогодні вважається, що настала епоха розвитку антибіотикорезистентності в мікроорганізмів у різних галузях, де застосовують антибактеріальні препарати [4; 19]. Науковці у світі [1; 6; 24] указують, що проблема антибіотикорезистентних штамів мікроорганізмів стала глобальною, потребує нових підходів щодо лікувальних і профілактичних процедур у медицині, ветеринарії та сільському господарстві. Особливо ця проблема гостро стоїть у ветеринарії, адже тваринам переважно застосовують ті самі групи антибактеріальних препаратів, що й людям [3; 8]. Відповідно, у тварин формуються антибіотикорезистентні штами, які за допомогою різних механізмів передачі можуть контамінувати середовище існування людей [13; 27]. Тому все частіше перед науковцями стоїть актуальне завдання щодо розроблення безпечних способів лікування з використанням природних інгредієнтів, які не впливають на формування антибіотикорезистентності в бактерій.

Використання фагів з лікувальною метою в медицині – тема не нова, водночас вона призабута [15; 16], оскільки ефект від застосування антибіотиків набагато кращий. Однак з розвитком антибіотикорезистентності в бактерій у світі все частіше звертають увагу на застосування фагів літичних до збудників багатьох запальних процесів. Сьогодні на ринку України наявні два комерційні препарати бактеріофагів – «Піофаг» та «Інтестіфаг» канадсько-української компанії ТОВ «Неопробіокеар – Україна». Ці два бактеріофагові препарати містять у складі специфічні фаги до декількох умовно-патогенних бактерій, які спричиняють запальні процеси в людей. В обох препаратах наявний у складі фаг – літичний до *S. aureus*. До того ж надано нам для дослідження нещодавно розроблений препарат «Фагомаст», який застосовують для лікування маститу в корів, він містить також фаг активний до *S. aureus*.

У результаті такої ситуації ми здійснили пошук та обґрунтування способу лікування піодермії в собак за допомогою фагів специфічних до основних збудників цього захворювання.

Мета статті – оцінити наявні бактеріофагові препарати на ринку України й виділити фаги специфічні до збудників піодермії собак.

Матеріал і методика дослідження. Дослідження проведено в ЗВО «Подільський державний університет». Змиви зі шкіри здорових і хворих на піодермію собак відбирали за допомогою одноразового стерильного тампону в приватних клініках ветеринарної медицини. Відібрані змиви відправляли в мікробіологічну лабораторію для виділення й ідентифікації мікробіоти. Мікробіологічні дослідження щодо виділення мікрофлори проводили за загальноприйнятими в мікробіологічній практиці методами [20; 21]. Ідентифікацію виділених культур мікроорганізмів здійснювали згідно з визначником Берджі [14] і за допомогою тест-систем «STARHY-test 16». Виділяли, ідентифікували й отримували стафілококові бактеріофаги за стандартною методикою [17].

Статистичну обробку отриманих даних проводили з використанням програми Statistica 9.0 (StatSoft Inc., USA). Визначали середнє арифметичне (m), стандартну похибку середньої величини ($M \pm m$). Різниця між величинами вважалася вірогідною за p не нижче 0,05.

Виклад основного матеріалу дослідження. З огляду на те що збудниками піодермії в собак, за нашими даними [21], в основному є стафілококи, провели дослідження щодо ефективності літичної дії Піофагу, Інтестіфагу й Фагомасту на клітини *S. aureus*, *S. pseudintermedius*, *S. schleiferi subsp. coagulans* та *S. Epidermidis*, виділені від хворих собак, у лабораторних умовах за методом «стікаючої краплі» (таблиця 1).

Таблиця 1. Чутливість стафілококів, виділених зі шкіри собак, до бактеріофагових препаратів, $M \pm m$, $n=5$

Виділені культури	Кількість культур	Бактеріофагові препарати		
		Піофаг	Інтестіфаг	Фагомаст
<i>S. aureus</i>	21	–	–	–
<i>S. pseudintermedius</i>	37	–	–	–
<i>S. schleiferi subsp. coagulans</i>	18	–	–	–
<i>S. epidermidis</i>	23	–	–	–
<i>S. aureus</i> (музейний штам ATCC 6538)	3	100%	100%	–

Примітка: «–» – відсутність літичної дії.

Серед узятих у дослід коагулазопозитивних і коагулазонегативних видів стафілококів, виділених від собак, жодна культура не лізувалася бактеріофаговими препаратами «Піофаг», «Інтестіфаг» і «Фагомаст» (таблиця 1). Очевидно, відсутність літичного ефекту цих препаратів щодо збудників піодермії пов'язана з біотипами золотистого стафілококу. Препарати «Піофаг» та «Інтестіфаг» містять у складі специфічні фаги до золотистого стафілококу біотипу людини (*S. aureus var. hominis*), а препарат «Фагомаст» – до біотипу великої рогатої худоби (*S. aureus var. bovis*). Наші збудники виділені від собак, тобто золотистий стафілокок належить до біотипу собаки (*S. aureus var. canis*), власне цим пояснюється неактивність цих препаратів. Це підтверджує також те, що «Піофаг» та «Інтестіфаг» у 100% проявляли літичну активність щодо музейного штаму *S. aureus ATCC 6538*.

Отже, результати досліджень указують, що для розроблення схеми лікування піодермії собак із використанням бактеріофагових препаратів необхідно застосовувати фаги, які літичні до стафілококів з біотопу шкіри собак. Наявні препарати фагів на українському фармацевтичному ринку в основному сконструйовані з використанням клітин-господарів стафілококів, виділених з біотопу людини («Піофаг», «Інтестіфаг»), розроблено ветеринарний препарат «Фагомаст», як клітини господарів використано золотистий стафілокок від хворих маститом корів.

Тому ми як клітини-господарі для розмноження фагових частин використали виділені культури коагулазопозитивних (далі – КПС) і коагулазонегативних (далі – КНС) стафілококів, які наявні на шкірі хворих собак за піодермії. Для цього після виділення й ідентифікації культур стафілококів проведено їх культуральну, тинкторіальну, морфологічну, біохімічну тощо характеристику. Зокрема, КПС: *S. aureus*, *S. pseudintermedius* та *S. schleiferi subsp. coagulans* – мали біле забарвлення колоній, продукували бета-гемолізину, швидко коагулювали плазму кроля (протягом 12 годин), водночас за молекулярно-біохімічними властивостями вони відрізнялися між собою, що дало змогу їх розрізнити.

Результати досліджень змивів зі шкіри здорових і хворих на піодермію собак на наявність літичних фагів наведено в таблиці 2.

З таблиці 2 відмічається частіше виявлення фагів КПС зі змивів зі шкіри хворих на піодермію тварин, ніж від здорових, що, очевидно, пов'язано переважанням їх у запальному вогнищі. Серед трьох КПС найбільше проб було з умістом літичних фагів до клітин *S. pseudintermedius* – 21,7% у змивах зі здорової шкіри, 28,6% у змивах від хворих тварин. Змивів, у яких були літичні фаги до *S. Aureus*, було 8,7% і 14,3%, відповідно, також частіше в 1,8 раза виділялися фаги з вогнищ запалень, які лізували клітини *S. schleiferi subsp. coagulans*. Водночас зі здорової шкіри собак частіше в 1,4 раза виділялися фаги літичні до КНС *S. epidermidis*, ніж зі шкіри за піодермії.

Отже, з вогнищ запалення за піодермії виділяються найчастіше фаги активні до клітин стафілококів видів *S. pseudintermedius* та *S. schleiferi subsp. coagulans*, які можна використати в препараті для лікування цього захворювання. Тому, ураховуючи такі результати, перспективним є конструювання фагового коктейлю з фагів літичних до різних видів стафілококів. Для цього ми відібрали по 4 колоній фагів літичних до кожного з чотирьох видів

Таблиця 2. Виявлення літичних фагів активних до стафілококів різних видів, виділених зі шкіри собак, $M \pm m$, $n=44$

Досліджені культури	Кількість зразків, у яких виявляли активні фаги щодо виділених культур стафілококів			
	змиви зі шкіри здорових собак, $n=23$		змиви зі шкіри хворих собак на піодермію, $n=21$	
	n	%	n	%
<i>S. aureus</i>	2	8,7	3	14,3*
<i>S. pseudintermedius</i>	5	21,7	6	28,6*
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>	3	13,0	5	23,8*
<i>S. epidermidis</i>	6	26,0	4	19,0*

Примітка: * – $p \leq 0,05$ порівняно зі здоровою шкірою.

стафілококів, зокрема фаг *S.a 4* активний щодо *S. aureus*; фаг *S.p 2* літичний щодо *S. pseudintermedius*; фаг *S.she 3* – щодо *S. schleiferi* subsp. *coagulans*; фаг *S.e 5* – щодо *S. epidermidis*.

Досліджено спектр літичної активності виділених зі шкіри собак стафілококових фагів до представників КПС і КНС мікробіоти шкіри. Дані результати наведено в таблиці 3.

Таблиця 3. Літична дія стафілококових фагів, виділених зі шкіри собак, на різні види роду *Staphylococcus*, $M \pm m$, $n=71$

Виділені фаги	Види стафілококів			
	<i>S. aureus</i> , $n=13$	<i>S. pseudintermedius</i> , $n=25$	<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i> , $n=17$	<i>S. epidermidis</i> , $n=16$
Фаг <i>S.a 4</i>	100%	52,0%	17,6%	0
Фаг <i>S.p 2</i>	53,8%	100%	23,5%	0
Фаг <i>S.she 3</i>	0	8,0%	100%	12,5%
Фаг <i>S.e 5</i>	0	0	0%	100%

Дослідження спектру літичної активності чотирьох стафілококових фагів виявило переважну їх специфічність щодо конкретного виду бактерій (таблиця 3). Зокрема, Фаг *S.a 4* у 100% випадків лізував клітини *S. aureus*, 52,0% – бактерій виду *S. pseudintermedius*, 17,6% – *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, водночас не проявляв літичної активності до бактерій виду *S. epidermidis*. Такий спектр літичної активності можна пояснити, очевидно, тим, що фаг *S.a 4* діяв на найбільш споріднені між собою види КПС. Вид *S. pseudintermedius* колись не ідентифікувався як самостійний вид, а входив до виду *S. aureus*, утім у результаті розвитку молекулярно-генетичних методів виявлено деякі відмінності між цими видами бактерій, тому в 52% випадків він лізувався фагом *S.a 4*. У меншій кількості руйнувалися цим фагом клітини виду *S. schleiferi* subsp. *coagulans* через більшу їх віддаленість від золотистого стафілококу.

Спектр літичної активності фагу *S.p 2* був аналогічний, як фагу *S.a 4*, зокрема він у 100% руйнував клітини виду *S. pseudintermedius*, у 53,8% – *S. aureus*, найменше *S. schleiferi* subsp. *coagulans* – 23,5%, не діяв на *S. epidermidis*.

Фаг *S.she 3* лізував у 100% випадків на бактерії свого господаря, водночас не лізував *S. aureus* і проявляв слабку специфічність лізису на клітини видів *S. pseudintermedius* та *S. epidermidis* – 8,0% і 12,5% відповідно.

Фаг *S.e 5* діяв тільки на свої клітини мішені, тобто свого виду *S. epidermidis*.

Отже, для лізису більшої кількості збудників піодермії стафілококової етіології необхідно розробляти фаговий препарат «коктейльного» типу з умістом різних фагів.

Фаготерапія належить до актуального й перспективного способу лікування багатьох запальних процесів із мікробним чинником. Основною запорукою позитивного лікувального ефекту є використання високолітичних фагів, наявність фагів у вогнищі запалення специфічних до цих збудників, висока концентрація фагів у середовищі дії та відсутність лізогенного процесу у фагів [12; 14]. Тому для підтримання активної літичної фагової індукції на конкретному біотопі найдоцільніше є виділення із цього вогнища специфічних фагів до збудників, які викликають запальний процес. Це чітко проглядається з результатів наших досліджень, які виявили, що коагулазопозитивні й коагулазонегативні види стафілококів, які виділені від собак, не лізувалися бактеріофовими препаратами, призначеними для лікування людей – «Піофаг», «Інтестіфаг», і препаратом для лікування маститу корів – «Фагомаст». Водночас препарати «Піофаг» та «Інтестіфаг» лізували музейний штам *S. aureus* ATCC 6538. Таку літичну дію фагів можна пояснити наявністю різних біотипів коагулазопозитивних стафілококів у природі: *S. aureus* var. *hominis*, *S. aureus* var. *bovis*, *S. aureus* var. *canis*, *S. aureus* var. *canis* [2; 10; 20]. Тому, урахувавши специфічність літичних фагів до КПС навіть у межах біологічного походження, ми для створення бактеріофового препарату, активного до основних збудників (стафілококів) піодермії собак, провели дослідження з виділення фагів зі шкіри здорових і хворих на піодермію собак. Установлено частіше виявлення фагів КПС зі змивів зі шкіри хворих на піодермію тварин, ніж від здорових. При цьому найбільше проб було з умістом літичних фагів

до клітин *S. pseudintermedius* – 21,7% у змивах зі здорової шкіри, 28,6% у змивах від хворих тварин. Змивів, у яких наявні літичні фаги до *S. Aureus*, було 8,7% і 14,3% відповідно, також частіше в 1,8 раза виділялися фаги з вогнищ запалень, які лізували клітини *S. schleiferi subsp. coagulans*. Водночас зі здорової шкіри собак частіше в 1,4 раза виділяли фаги літичні до КНС *S. epidermidis*, ніж зі шкіри за піодермії. Отримані результати узгоджуються з думкою дослідників [22; 26], що під час створення фагового препарату доцільніше використовувати композицію фагів специфічних до декількох збудників, які вважаються етіологічним фактором розвитку запалення. У нашому випадку ми пропонуємо у фаговий препарат для лікування піодермії собак використати чотири ізольовані й ідентифіковані фаги, такі як *S.a 4* активний щодо *S. aureus*; *фаг S.p 2* літичний щодо *S. pseudintermedius*; *фаг S.she 3* – щодо *S. schleiferi subsp. coagulans*; *фаг S.e 5* – щодо *S. Epidermidis*, адже, за даними багатьох дослідників [5; 11], з уражених ділянок шкіри за поверхневої й глибокої піодермії собак найчастіше виділяються коагулазопозитивні стафілококи видів *S. pseudintermedius*, *S. schleiferi subsp. coagulans*, *S. aureus*. Тому в подальших дослідженнях важливо з'ясувати, чи проявляють літичну активність ізольовані нами чотири фаги до виділених видів стафілококів з уражених ділянок за піодермії, оскільки у фаговий препарат можна відбирати тільки високолітичні фаги, які не перебувають у лізігенному стані [23; 25].

Установлено, що виділені чотири фаги *S.a 4*, *S.p 2*, *S.she 3* й *S.e 5* проявляли 100% активність щодо лізису клітин своїх господарів. У межах 50% спостерігалася перехресна літична дія фагів *S.a 4*, *S.p 2* на види *S. aureus* та *S. Pseudintermedius*, у середньому 20% вони лізували клітини виду *S. schleiferi subsp. coagulans*. У фагів *S.she 3* та *S.e 5* перехресна літична активність щодо інших видів стафілококів була менш виражена. У дослідженнях [7] наводяться дані про високу специфічність стафілококового фагу *Phage SAвB14* щодо збудника маститу *S. aureus* та його слабка літична активність відносно інших стафілококів. Під час розроблення фагового препарату для профілактики сальмонельозів у птиці дослідники [18] виявили, що бактеріофаговий коктейль, який складався з кількох фагів, був більш ефективним щодо лізису *Salmonella spp.*, ніж один фаг. До того ж коктейль, отриманий із *Salmonella enterica* серовар *Enteritidis* і серовар *Typhimurium*, також був здатний сприяти лізису інших сероварів *Salmonella*. Це узгоджується з нашими даними, що навіть у межах одного роду й виду бактерій існує велика специфічність щодо дії літичних фагів на цільові клітини. Тому під час розроблення препаратів фагів необхідно проводити ґрунтовний аналіз літичних властивостей виділених бактеріофагів і підбирати ті, які проявляють широкий спектр лізису різних видів цільових бактерій.

Отже, отримані дані вказують, що фаготерапія може бути ефективною щодо збудників піодермії собак, за якої місцево застосовують антибактеріальні мазі на основі антибіотиків. Виділені чотири стафілококові фаги проявляли добру літичну активність щодо своїх клітин-господарів і навіть перехресну активність між видами КПС. Такі результати є обнадійливими щодо можливого використання ізольованих нами стафілококових фагів *S.a 4*, *S.p 2*, *S.she 3* й *S.e 5* у препараті для лікування стафілококової піодермії в собак.

Висновки. Отже, на основі викладеного вище можемо підсумувати таке:

1. Наявні на ринку бактеріофагові препарати «Піофаг», «Інестіфаг» і розроблений ветеринарний препарат «Фагомаст» не проявляли літичної активності щодо основних збудників піодермії собак: *S. pseudintermedius*, *S. aureus*, та *S. schleiferi subsp. coagulans*.

2. З вогнищ запалення за піодермії собак виділено й ідентифіковано чотири літичні стафілококові фаги, зокрема *фаг S.a 4* активний щодо *S. aureus*; *фаг S.p 2* літичний щодо *S. pseudintermedius*; *фаг S.she 3* – щодо *S. schleiferi subsp. coagulans*; *фаг S.e 5* – щодо *S. epidermidis*.

3. Дослідження спектру літичної активності чотирьох стафілококових фагів виявило переважну їх специфічність щодо конкретного виду бактерій. Отже, для лізису більшої кількості збудників піодермії стафілококової етіології необхідно розробляти фаговий препарат «коктейльного» типу з умістом різних фагів.

Перспективи подальших досліджень полягають у розробленні фагового препарату активного щодо збудників піодермії собак.

Список використаних джерел

1. Видовий склад бактерій роду *enterococcus* молока сирого та сиру кисломолочного «домашнього» виробництва, їх чутливість до антибактеріальних препаратів / Y.V. Horyuk та ін. *Scientific messenger of LNU of veterinary medicine and biotechnology*. 2016. Т. 18, № 3 (70). С. 44–49. URL: <https://doi.org/10.15421/nvvet7011>.
2. Поширення основних збудників маститу корів на молочних фермах західного регіону України / Y.V. Horiuk та ін. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies*. 2018. Т. 20. № 83. С. 115–119. URL: <https://doi.org/10.15421/nvvet8322>.
3. Antimicrobial drug resistance profile of isolated bacteria in dogs and cats with urologic problems at Chiang Mai University Veterinary Teaching Hospital, Thailand (2012–2016) / C. Amphaiphan et al. *Zoonoses and Public Health*. 2021. Vol. 68. № 5. P. 452–463. URL: <https://doi.org/10.1111/zph.12832>.
4. Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies / C. de la Fuente-Núñez et al. *Current Opinion in Microbiology*. 2013. Vol. 16. № 5. P. 580–589. URL: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.06.013>.
5. Banovic F., Linder K., Olivry T. Clinical, microscopic and microbial characterization of exfoliative superficial pyoderma-associated epidermal collarettes in dogs. *Veterinary Dermatology*. 2016. Vol. 28. № 1. P. 107–123. URL: <https://doi.org/10.1111/vde.12352>.

6. Characteristics of antibiotic sensitivity of *Staphylococcus aureus* isolated from dairy farms in Ukraine / O.M. Berhilevych et al. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2017. Vol. 8. № 4. P. 559–563. URL: <https://doi.org/10.15421/021786>.
7. Characteristics of bacteriophages of the *Staphylococcus aureus* variant bovis / Y. Horiuk et al. *Veterinárni Medicína*. 2020. Vol. 65. № 10. P. 421–426. URL: <https://doi.org/10.17221/55/2020-vetmed>.
8. Coagulase-positive staphylococci in dogs and their antimicrobial resistance (systematic review) / M. Shevchenko et al. *Naukovij visnik veterinárnoï medicini*. 2021. № 1 (165). P. 104–118. URL: <https://doi.org/10.33245/2310-4902-2021-165-1-104-118>.
9. Garrity G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Low G + C Gram Positives (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd Edition)*. 2nd ed. Springer, 2008. 1330 p.
10. Horiuk Y.V. Lytic Activity of Staphylococcal Bacteriophage on Different Biotypes of *Staphylococcus aureus*. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies*. 2019. Vol. 21. № 94. P. 115–120. URL: <https://doi.org/10.32718/nvlvet9421>.
11. Investigation of In Vitro Susceptibility and Resistance Mechanisms in Skin Pathogens: Perspectives for Fluoroquinolone Therapy in Canine Pyoderma / S. Azzariti et al. *Antibiotics*. 2022. Vol. 11. № 9. P. 1204. URL: <https://doi.org/10.3390/antibiotics11091204>.
12. Isolation and Characterization of Two Lytic Bacteriophages Infecting a Multi-Drug Resistant *Salmonella* Typhimurium and Their Efficacy to Combat Salmonellosis in Ready-to-Use Foods / A. Esmael et al. *Microorganisms*. 2021. Vol. 9. № 2. P. 423. URL: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020423>.
13. Kempf M., Rolain J.-M. Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2012. Vol. 39. № 2. P. 105–114. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.10.004>.
14. Phage cocktail SalmoFREE® reduces *Salmonella* on a commercial broiler farm / V. Clavijo et al. *Poultry Science*. 2019. Vol. 98. № 10. P. 5054–5063. URL: <https://doi.org/10.3382/ps/pez251>.
15. Phage Therapy: Past, Present and Future / ed. by S.T. Abedon et al. *Frontiers Media SA*, 2017. URL: <https://doi.org/10.3389/978-2-88945-251-4>.
16. Phage-Antibiotic Synergy via Delayed Lysis / M. Kim et al. *Applied and Environmental Microbiology*. 2018. Vol. 84. № 22. P. 1–14. URL: <https://doi.org/10.1128/aem.02085-18>.
17. Quality-Controlled Small-Scale Production of a Well-Defined Bacteriophage Cocktail for Use in Human Clinical Trials / M. Merabishvili et al. *PLoS ONE*. 2009. Vol. 4. № 3. P. e4944. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004944>.
18. Significance of the Bacteriophage Treatment Schedule in Reducing *Salmonella* Colonization of Poultry / C. Bardina et al. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012. Vol. 78. № 18. P. 6600–6607. URL: <https://doi.org/10.1128/aem.01257-12>.
19. Species composition of circulation microflora and its resistance to antibacterial drugs in the conditions of the impulse veterinary clinic of the city of Lviv / Y. Kisera et al. *Naukovij visnik veterinárnoï medicini*. 2021. № 2 (168). P. 65–71. URL: <https://doi.org/10.33245/2310-4902-2021-168-2-65-71>.
20. *Staphylococcus aureus* of raw cow's milk / M.D. Kukhtyn et al. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies*. 2021. Vol. 23. № 102. P. 53–59. URL: <https://doi.org/10.32718/nvlvet10208>.
21. Stroich V.V., Horiuk Y.V. Identification of the skin microbiota of healthy dogs and those with pyoderma. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies*. 2023. Vol. 25. № 110. P. 46–53. URL: <https://doi.org/10.32718/nvlvet11008>.
22. Tagliaferri T.L., Jansen M., Horz H.-P. Fighting Pathogenic Bacteria on Two Fronts: Phages and Antibiotics as Combined Strategy. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2019. Vol. 9. P. 1–11. URL: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00022>.
23. Temperate bacteriophages as regulators of host behavior / T. Argov et al. *Current Opinion in Microbiology*. 2017. Vol. 38. P. 81–87. URL: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.05.002>.
24. The effect of antimicrobial agents on planktonic and biofilm forms of bacteria that are isolated from chronic anal fissures / I.M. Kozlovska et al. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2017. Vol. 8. № 4. P. 577–582. URL: <https://doi.org/10.15421/021789>.
25. The influence of external factors on bacteriophages—review / E. Jończyk et al. *Folia Microbiologica*. 2011. Vol. 56. № 3. P. 191–200. URL: <https://doi.org/10.1007/s12223-011-0039-8>.
26. Vasylykiv O., Kukhtyn M. Isolation and characterization of bacteriophages *Salmonella* spp. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies*. 2023. Vol. 25. № 111. P. 48–53. URL: <https://doi.org/10.32718/nvlvet11108>.
27. Virulence-related traits of epidemic *Acinetobacter baumannii* strains belonging to the international clonal lineages I–III and to the emerging genotypes ST25 and ST78 / M. Giannouli et al. *BMC Infectious Diseases*. 2013. Vol. 13. № 1. P. 1–10. URL: <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-282>.

Stroich V. V.

Postgraduate student of the Department of Veterinary Obstetrics, Internal Pathology and Surgery,
Higher Educational Institution "Podillia State University"

Kamianets-Podilskyi, Ukraine

E-mail: stroich@pdatu.edu.ua

ORCID: 0009-0002-0237-1289

Horiuk Yu. V.

Doctor of Veterinary Sciences,

Associate Professor at the Department of Veterinary Obstetrics, Internal Pathology and Surgery,
Higher Educational Institution "Podillia State University"

Kamianets-Podilskyi, Ukraine

E-mail: goruky@ukr.net

ORCID: 0000-0002-7162-8992

EVALUATION OF AVAILABLE BACTERIOPHAGE PREPARATIONS ON THE MARKET OF UKRAINE AND SELECTION OF PHAGES SPECIFIC TO CAUSATIVE AGENTS OF CANINE PYODERMA

Abstract

The use of phages for therapeutic purposes in medicine is not a new topic, but at the same time it was forgotten because the effect of using antibiotics was much better. However, with the development of antibiotic resistance in bacteria, more and more attention is paid to the use of phages, which are lytic to the causative agents of many inflammatory processes. The aim of the work was to evaluate the available bacteriophage preparations on the market of Ukraine and to identify phages specific to the causative agents of canine pyoderma. Microbiological studies on the isolation of microflora were carried out according to methods generally accepted in microbiological practice. Bacteriophage preparations available on the market "Piofag", "Intestifag" and the developed veterinary drug "Fagomast" did not show lytic activity against the main causative agents of pyoderma in dogs: *S. pseudintermedius*, *S. aureus*, and *S. schleiferi* subsp. *coagulans*. Phages active against cells of staphylococci species *S. pseudintermedius* and *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, which were used to develop a bacteriophage preparation. Four phages were isolated that were lytic to each of the four types of staphylococci, in particular, phage S.a 4 is active against *S. aureus*; phage S.p 2 is lytic against *S. pseudintermedius*; phage S.she 3 – in relation to *S. schleiferi* subsp. *coagulans*; phage S.e 5 – for *S. epidermidis*. The study of the spectrum of the lytic activity of four staphylococcal phages revealed their predominant specificity for a specific type of bacteria. Therefore, for the lysis of a larger number of causative agents of pyoderma of staphylococcal etiology, it is necessary to develop a phage preparation of the "cocktail" type with the content of various phages.

Key words: causative agents of canine pyoderma, bacteriophages, staphylococci, lytic phages, bacteriophage preparations.

References

1. Horyuk, Y., Kukhtyn, M., Perkiy, Y., Horyuk, V., & Semenyuk, V. (2016). Vydovyi sklad bakterii rodu enterococcus moloka syroho ta syru kyslomolochnoho «domashnoho» vyrobnytstva, yikh chutlyvist do antybakterialnykh preparativ [Identification of enterococcus isolated from raw milk and cottage cheese «home» production and study of their sensitivity to antibiotics]. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*, 18(3(70)), 44–48. <https://doi.org/10.15421/nvlvet7011> [in Ukrainian].
2. Horiuk, Y., Kukhtyn, M., Perkiy, Y., & Horiuk, V. (2018). Poshyrennia osnovnykh zbudnykiv mastytu koriv na molochnykh fermakh zakhidnoho rehionu Ukrainy [Distribution of main pathogens of mastitis in cows on dairy farms in the western region of Ukraine]. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*, 20(83), 115–119. <https://doi.org/10.15421/nvlvet8322> [in Ukrainian].
3. Amphaiphan, C., Yano, T., Som-in, M., Kungwong, P., Wongsawan, K., Pusoonthornthum, R., Salman, M. D., & Tangtrongsup, S. (2021). Antimicrobial drug resistance profile of isolated bacteria in dogs and cats with urologic problems at Chiang Mai University Veterinary Teaching Hospital, Thailand (2012–2016). *Zoonoses and Public Health*, 68(5), 452–463. <https://doi.org/10.1111/zph.12832>.
4. de la Fuente-Núñez, C., Reffuveille, F., Fernández, L., & Hancock, R. E. (2013). Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. *Current Opinion in Microbiology*, 16(5), 580–589. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.06.013>.
5. Banovic, F., Linder, K., & Olivry, T. (2017). Clinical, microscopic and microbial characterization of exfoliative superficial pyoderma-associated epidermal collarettes in dogs. *V Advances in Veterinary Dermatology* (c. 122–132). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119278368.ch5.3>.
6. Berhilevych, O.M., Kasianchuk, V.V., Kukhtyn, M.D., Lotskin, I.M., Garkavenko, T.O., & Shubin, P.A. (2017). Characteristics of antibiotic sensitivity of *Staphylococcus aureus* isolated from dairy farms in Ukraine. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 8(4), 559–563. <https://doi.org/10.15421/021786>.
7. Horiuk, Y., Kukhtyn, M., Horiuk, V., Kernychnyi, S., & Tarasenko, L. (2020). Characteristics of bacteriophages of the *Staphylococcus aureus* variant bovis. *Veterinárni Medicina*, 65 (10), 421–426. <https://doi.org/10.17221/55/2020-vetmed>.
8. Shevchenko, M., Savcheniuk, M., Yarchuk, B., Sakhniuk, N., & Tsarenko, T. (2021). Coagulase-positive staphylococci in dogs and their antimicrobial resistance (systematic review). *Naukoviy visnik veterinárnoï medicini*, (1(165)), 104–118. <https://doi.org/10.33245/2310-4902-2021-165-1-104-118>.

9. Garrity, G. (2008). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Low G + C Gram Positives* (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd Edition) (2-ге вид.). Springer.
10. Horiuk, Y.V. (2019). Lytic Activity of Staphylococcal Bacteriophage on Different Biotypes of *Staphylococcus aureus*. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies*, 21 (94), 115–120. <https://doi.org/10.32718/nvlvet9421/>
11. Azzariti, S., Bond, R., Loeffler, A., Zendri, F., Timofte, D., Chang, Y.-M., & Pelligand, L. (2022). Investigation of In Vitro Susceptibility and Resistance Mechanisms in Skin Pathogens: Perspectives for Fluoroquinolone Therapy in Canine Pyoderma. *Antibiotics*, 11(9), 1204. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11091204/>
12. Esmael, A., Azab, E., Gobouri, A.A., Nasr-Eldin, M.A., Moustafa, M.M.A., Mohamed, S.A., Badr, O.A. M., & Abdelatty, A.M. (2021). Isolation and Characterization of Two Lytic Bacteriophages Infecting a Multi-Drug Resistant *Salmonella Typhimurium* and Their Efficacy to Combat Salmonellosis in Ready-to-Use Foods. *Microorganisms*, 9 (2), 423. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020423>.
13. Kempf, M., & Rolain, J.-M. (2012). Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 39(2), 105–114. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.10.004>.
14. Clavijo, V., Baquero, D., Hernandez, S., Farfan, J.C., Arias, J., Arévalo, A., Donado-Godoy, P., & Vives-Flores, M. (2019). Phage cocktail SalmoFREE® reduces *Salmonella* on a commercial broiler farm. *Poultry Science*, 98 (10), 5054–5063. <https://doi.org/10.3382/ps/pez251>.
15. Abedon, S.T., García, P., Mullany, P., & Aminov, R. (Ред.). (2017). Phage Therapy: Past, Present and Future. *Frontiers Media SA*. <https://doi.org/10.3389/978-2-88945-251-4>.
16. Kim, M., Jo, Y., Hwang, Y.J., Hong, H.W., Hong, S.S., Park, K., & Myung, H. (2018). Phage-Antibiotic Synergy via Delayed Lysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 84 (22). 1–14. <https://doi.org/10.1128/aem.02085-18>.
17. Merabishvili, M., Pirnay, J.-P., Verbeken, G., Chanishvili, N., Tediashvili, M., Lashkhi, N., Glonti, T., Krylov, V., Mast, J., Van Parys, L., Lavigne, R., Volckaert, G., Mattheus, W., Verween, G., De Corte, P., Rose, T., Jennes, S., Zizi, M., De Vos, D., & Vanechoutte, M. (2009). Quality-Controlled Small-Scale Production of a Well-Defined Bacteriophage Cocktail for Use in Human Clinical Trials. *PLoS ONE*, 4 (3), e4944. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004944>.
18. Bardina, C., Spricigo, D.A., Cortés, P., & Llagostera, M. (2012). Significance of the Bacteriophage Treatment Schedule in Reducing *Salmonella* Colonization of Poultry. *Applied and Environmental Microbiology*, 78 (18), 6600–6607. <https://doi.org/10.1128/aem.01257-12>.
19. Kiserá, Y., Bozhyk, L., Grynevych, N., & Martyniv, Y. (2021). Species composition of circulation microflora and its resistance to antibacterial drugs in the conditions of the impulse veterinary clinic of the city of Lviv. *Naukovij visnik veterinarnoї medicini*, 2 (168), 65–71. <https://doi.org/10.33245/2310-4902-2021-168-2-65-71>.
20. Kukhtyn, M.D., Horiuk, Y.V., Salata, V.Z., Klymyk, V.T., Vorozhbit, N.M., & Rushchinskaya, T.M. (2021). *Staphylococcus aureus* of raw cow's milk. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies*, 23 (102), 53–59. <https://doi.org/10.32718/nvlvet10208>.
21. Stroich, V.V., & Horiuk, Y.V. (2023). Identification of the skin microbiota of healthy dogs and those with pyoderma. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies*, 25(110), 46–53. <https://doi.org/10.32718/nvlvet11008>.
22. Tagliaferri, T.L., Jansen, M., & Horz, H.-P. (2019). Fighting Pathogenic Bacteria on Two Fronts: Phages and Antibiotics as Combined Strategy. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00022>.
23. Argov, T., Azulay, G., Pasechnek, A., Stadnyuk, O., Ran-Sapir, S., Borovok, I., Sigal, N., & Herskovits, A.A. (2017). Temperate bacteriophages as regulators of host behavior. *Current Opinion in Microbiology*, 38, 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.05.002>.
24. Kozlovska, I.M., Romanjuk, N.Y., Romanjuk, L.M., Kukhtyn, M.D., Horiuk, Y.V., & Karpyk, G.V. (2017). The effect of antimicrobial agents on planktonic and biofilm forms of bacteria that are isolated from chronic anal fissures. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 8 (4), 577–582. <https://doi.org/10.15421/021789>.
25. ończyk, E., Kłak, M., Międzybrodzki, R., & Górski, A. (2011). The influence of external factors on bacteriophages-re-view. *Folia Microbiologica*, 56 (3), 191–200. <https://doi.org/10.1007/s12223-011-0039-8>.
26. Vasylkiv, O., & Kukhtyn, M. (2023). Isolation and characterization of bacteriophages *Salmonella* spp. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies*, 25(111), 48–53. <https://doi.org/10.32718/nvlvet11108>.
27. Giannouli, M., Antunes, L. C., Marchetti, V., Triassi, M., Visca, P., & Zarrilli, R. (2013). Virulence-related traits of epidemic *Acinetobacter baumannii* strains belonging to the international clonal lineages I–III and to the emerging genotypes ST25 and ST78. *BMC Infectious Diseases*, 13 (1). 1–10. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-282>.