

ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი  
ზუსტ და საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა ფაკულტეტი

დოქტორანტურის საგანმანათლებლო პროგრამა  
ბიოლოგია

ლიკა ლეშკაშელი

ბაქტერიოფაგები ბეტა-ლაქტამაზა მაკროდუცირებელი  
გრამ-უარყოფითი ბაქტერიების წინააღმდეგ

ბიოლოგიის დოქტორის აკადემიური ხარისხის მოსაპოვებლად  
წარმოდგენილი დისერტაცია

სამეცნიერო ხელმძღვანელი: მზია ქუთათელაძე  
ბიოლ. მეც. დოქტორი

თბილისი  
2022 წელი

Ivane Javakhishvili Tbilisi State University  
Faculty of Exact and Natural Sciences

Doctoral Program: Biology

**Lika Leshkasheli**

**Bacteriophages Against Gram-negative, Beta-lactamase Producing Bacteria**

The thesis work is performed to obtain a PhD academic degree in Biology

Scientific Supervisor: Mzia Kutateladze

PhD

Tbilisi

2022

## აბსტრაქტი

მსოფლიოში ანტიბიოტიკების უკონტროლო და ხშირმა გამოყენებამ გამოიწვია მიკრობთა რეზისტენტული ფორმების ფართოდ გავრცელება. პრობლემა განსაკუთრებით მწვავედ დგას გრამ-უარყოფითი ბაქტერიების შემთხვევაში. ანტიბიოტიკო-რეზისტენტული მიკროორგანიზმები ცნობილია, როგორც ე.წ. სუპერ-ბაქტერიები („superbugs“). ასეთი შტამების გავრცელება გლობალურად ისეთ პრობლემად გადაიქცა, რომელსაც მივყავართ სიცოცხლისათვის საშიშ ინფექციებთან და გაზრდილ სიკვდილიანობასთან. სწორედ ანტიბიოტიკო-რეზისტენტობის ასეთი ფართო და სწრაფი გავრცელების გამო ითვლება, რომ მსოფლიო შედის ანტიბიოტიკების შემდგომ ერაში. მსოფლიო ჯანდაცვის ორგანიზაციის ინფორმაციით, ანტიბიოტიკების შემდგომ ერას მოჰყვება გახშირებული ინფექციები და მათ წინააღმდეგ ანტიბიოტიკების უძლურობის გამო, ორგანიზმის მცირე დაზიანებაც კი შეძლებს გამოიწვიოს სიკვდილი.

ამჟამად, გრამ-უარყოფით, ანტიბიოტიკო-რეზისტენტულ ბაქტერიებს შორის, ყველაზე პრობლემატურ ორგანიზმებს მიეკუთვნებიან *Acinetobacter baumannii* და *Klebsiella*-ს გვარის სხვადასხვა სახეობები. ორივე პათოგენისათვის დამახასიათებელია ფერმენტ ბეტა-ლაქტამაზას სინთეზი, რომელიც ანტიბიოტიკების მიმართ რეზისტენტობის ერთ-ერთი ძირითადი განმსაზღვრელი ფაქტორია.

*A. baumannii* იწვევს კანისა და რბილი ქსოვილების, საშარდე გზების ინფექციებს, მენინგიტს, ბაქტერემიასა და პნევმონიას. იგი საავადმყოფოსშიდა ინფექციების ერთ-ერთი ყველაზე ხშირი გამომწვევია. ჰოსპიტალური ინფექციების გამომწვევია ასევე *Klebsiella* გვარის სახეობები, კერძოდ კი *Klebsiella pneumoniae*. იგი იწვევს ადრეულ და გვიან სტადიის სეფსისს, კონიუნქტივიტს, ჰოსპიტალური წარმოშობის პნევმონიას, საშარდე გზების ინფექციებს და ქირურგიული ჩარევის შემდეგ განვითარებულ ინფექციებს.

*Klebsiella spp.* და *Acinetobacter baumannii* შტამებით გამოწვეული ინფექციების ფატალური მაჩვენებელი საკმაოდ დიდია. ორივე ობიექტი გაერთიანებულია მრავლობით რეზისტენტული ბაქტერიების ჯგუფში - „ESKAPE“ (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*,

*Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacteriaceae*), რაც ხაზს უსვამს მათ წინააღმდეგ ბრძოლის მნიშვნელობას.

ანტიბიოტიკების მიმართ რეზისტენტული სახეობების სწრაფი გავრცელების გამო აქტიურად განიხილება ფაგოთერაპია, როგორც ანტიბიოტიკების ალტერნატიული სამკურნალო გზა. ფაგები, ანუ ბაქტერიოფაგები, ცოცხალ სამყაროში ვირუსების ყველაზე დიდ ჯგუფს წარმოადგენენ. ისინი არიან ბაქტერიების ვირუსები, და შესაბამისად, მათი ბუნებრივი მტრები. ფაგებს, როგორც ანტიმიკრობულ აგენტებს, ანტიბიოტიკებთან შედარებით გააჩნიათ რიგი უპირატესობები: მარტივი და ხელმისაწვდომია მათზე მუშაობა, გამოყენებისას არ აღენიშნებათ გვერდითი ეფექტები, არიან სპეციფიურები სამიზნე ბაქტერიის მიმართ, რის გამოც, არ აზიანებენ ადამიანის ნორმალურ მიკროფლორას.

ჩვენი კვლევის მიზანს წარმოადგენდა, *A. baumannii*-სა და *K. pneumoniae*-ს ბაქტერიების მიმართ აქტიური, სპეციფიური ბაქტერიოფაგების გამოყოფა და მათი ბიოლოგიური და გენეტიკური მახასიათებლების დეტალური შესწავლა.

აღნიშნული სამუშაოს ფარგლებში მოხდა *A. baumannii*-ს და *Klebsiella spp.*-ს შტამების გენოტიპირება, ფერმენტ - ბეტა-ლაქტამაზების სინთეზის უნარისა და ანტიბიოტიკო-მგრძობელობის განსაზღვრა. მიღებული შედეგების მიხედვით, შტამების უმეტესობაში დადასტურდა ბეტა-ლაქტამაზური აქტივობა, ასევე, გამოვლინდა მრავლობით რეზისტენტობა და გენოტიპური მრავალფეროვნება.

გარემოს ნიმუშებიდან, კერძოდ მდინარე მტკვარში ჩამდინარე წყლის სინჯებიდან მოხდა *A. baumannii*-ს და *Klebsiella spp.*-ს შტამების მიმართ აქტიური ბაქტერიოფაგების გამოყოფა. შესწავლილი იქნა ფაგების მორფოლოგია და ბიოლოგიური მახასიათებლები.

ორივე ბაქტერიულ პათოგენზე მოქმედი ფაგები მორფოლოგიურად გადანაწილდა სამ ოჯახში: *Myoviridae*, *Siphoviridae* და *Podoviridae*; დადგინდა, რომ ფაგები ხასიათდებიან გენეტიკური მრავალფეროვნებით.

*A. baumannii*-ს მიმართ აქტიური რვა ფაგიდან სამ ფაგს აღმოაჩნდა ლიზისური აქტივობის ფართო სპექტრი. მათი ლიზისური სპექტრი მოიცავს შესწავლილი

შტამების 80%-95%-ს. *Klebsiella spp.*-ს მიმართ აქტიური ფაგებიდანაც სამ ფაგს (ცხრა ფაგიდან) აღმოაჩნდა ფართო ლიზისური სპექტრი. ამ ფაგების ლიზისური აქტივობა ვრცელდება როგორც *K. pneumoniae*, ასევე *K. oxytoca* ბაქტერიულ შტამებზე. ორივე შემთხვევაში, ფართო სპექტრის მქონე ფაგები წარმოადგენენ *Myoviridae*-ს (*A. baumannii*, *Klebsiella spp.*) ან *Siphoviridae* -ს (*A. baumannii*) მორფოლოგიურ ტიპებს.

ფაგები ეფექტურად კულტივირდებიან მათ მიმართ მგრძობიარე ბაქტერიულ შტამებზე. *A. baumannii*-ს შესწავლილი ფაგები ნეგატიურ კოლონიებს წარმოქმნიან შტამების დაახლოებით 70-80%-ზე. *Klebsiella spp.*-ს მიმართ აქტიური ფაგების შემთხვევაში, ეს რიცხვი მერყეობს 65%-სა და 85%-ს შორის. მიღებული შედეგები მიუთითებენ შესაბამის პატრონ ბაქტერიულ შტამებზე ფაგების წარმატებულ გამრავლების უნარზე.

ორივე პათოგენის მიმართ აქტიური ფაგები ხასიათდებიან სამიზნე ბაქტერიულ უჯრედზე სწრაფი ადსორბციით. ლატენტური პერიოდი ვარიირებს 30-40 წთ-ის ფარგლებში სხვადასხვა ფაგისათვის. ასევე განსხვავებულია ფაგის გამოსავალი ერთი ინფიცირებული ბაქტერიული უჯრედიდან.

*A. baumannii*-ს ფაგების მიმართ დაბალი სიხშირით ხდება რეზისტენტული ბაქტერიული კოლონიების ფორმირება. ამ მხრივ, განსხვავდებიან *Klebsiella*-ს ფაგები, მათ მიმართ საკმაოდ მაღალი სიხშირით ხდება რეზისტენტული მუტანტების ფორმირება, თუმცა რეზისტენტობა სტაბილური არ არის და იკარგება პირველივე კულტივირებისას (მეორე გენერაციაში).

ჩატარებული კვლევების საფუძველზე შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ ჩვენს მიერ გამოყოფილი ფაგები ვირულენტური ფაგებია, ისინი წარმატებით ანადგურებენ სამიზნე პათოგენურ ბაქტერიებს და შესაძლებელია მათი ალტერნატიულ ან დამხმარე სამკურნალო საშუალებად განხილვა.

## Abstract

Uncontrolled and frequent use of antibiotics worldwide has led to the spread of resistant bacteria. The problem is most prominent in case of Gram-negative microorganisms. Antibiotic-resistant microorganisms are also known as "superbugs". Such bacterial strains have become a global problem, which leads to the development and spread of life-threatening infections and consequent increased mortality rate. According to the World Health Organization, we are now entering the post-antibiotic era, which will be followed by increased number of untreatable infections. As a result even minor injuries to the body could lead to death.

Among Gram-negative, antibiotic-resistant microorganisms, the most problematic bacteria are *Acinetobacter baumannii* and different species of *Klebsiella*. Both pathogens are characterized by the synthesis of the enzyme beta-lactamase, which is one of the major determining factors of antibiotic resistance.

*A. baumannii* causes skin and soft tissue infections, urinary tract infections, meningitis, bacteremia and pneumonia. It is one of the most common causes of nosocomial infections. Nosocomial infections are also caused by species of the genus *Klebsiella*, in particular *Klebsiella pneumoniae*. It causes early and late stage sepsis, conjunctivitis, nosocomial pneumonia, urinary tract infections, and infections developed after surgery.

The fatal rate of infections caused by *Klebsiella spp.* and *A. baumannii* strains is quite high. Both these organisms are members of the "ESKAPE" group (represented by *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacteriaceae*).

Due to the rapid spread of antibiotic-resistant species, phage therapy is actively considered as an alternative treatment option of infectious diseases. Bacteriophages (Phages) - are bacterial viruses and they represent the largest group of viruses in the living world. Phages as antibacterial agents, have a number of advantages over antibiotics: they are easy and

affordable to work with, have no side effects, are specific to target bacteria and therefore do not harm the normal human microflora.

The aim of our study was to isolate active, specific bacteriophages against *A. baumannii* and *K. pneumoniae*, to study in detail their biological and genetic characteristics.

*A. baumannii* and *Klebsiella spp.* strains were examined for antibiotic susceptibility and for the ability to synthesize the enzyme - beta-lactamases. Genotyping of these strains was also performed. According to obtained results, beta-lactamase activity was confirmed in most strains, majority of which showed multi-resistance to antibacterials. All examined strains were genotypically diverse.

Active bacteriophages against *A. baumannii* and *Klebsiella spp.* strains were isolated from environmental samples. We studied morphology of the phages and their biological characteristics.

Phages of both bacteria were morphologically classified in three major groups of *Myoviridae*, *Siphoviridae* and *Podoviridae*; according to the studies, isolated phages are genetically diverse.

Three out of eight *A. baumannii* phages are characterized by a wide range of lysis activity. One phage out of these three phages belongs to *Siphoviridae*, and two are *Myoviridae* family representatives. Their spectrum of lytic activity fluctuates between 80% and 95% on the studied strains. Out of nine studied phages active against *Klebsiella spp.*, only three phages (all representatives of *Myoviridae*) are characterized by a wide range of lytic activity. The activity of these phages extends to both *K. pneumoniae* and *K. oxytoca* bacterial strains.

Phages are effectively cultured on strains susceptible to them. Studied *A. baumannii* phages produce phage plaques in approximately 70-80% of susceptible strains. In the case of active phages against *Klebsiella spp.*, this number varies between 65% and 85%. This figure indicates that phages can successfully produce new generation on the susceptible strains.

Phages active against both pathogens are characterized by rapid adsorption. The latent period varies within 30-40 min for different phages. The phage burst size is also different.

Resistant bacterial colonies are formed with low frequency against phages of *A. baumannii*. *Klebsiella* phages are different in this respect, resistant mutants are formed in quite high rate against them, however the resistance is not stable and disappears with the first cultivation of these mutants (second generation).

Based on our research, we can conclude that studied phages are virulent and are able to successfully eliminate their targets. Therefore, we believe that it is possible to consider these phages as treatment options either as alternative to antibiotics or in combination with other antibacterials.



სარჩევი

შესავალი.....1

თავი I ლიტერატურის მიმოხილვა .....4

1.1. დაავადების გამომწვევი გრამ-უარყოფითი მიკროორგანიზმები და მათი რეზისტენტობა ანტიბიოტიკების მიმართ .....4

1.2. ბეტა-ლაქტამური ანტიბიოტიკები და ბაქტერიული ბეტა-ლაქტამაზები .....10

1.3. მიკროორგანიზმის *Acinetobacter baumannii* დახასიათება .....14

1.4. მიკროორგანიზმის *Klebsiella pneumoniae* დახასიათება .....20

1.5. ბაქტერიოფაგები.....25

1.5.1. ფაგოთერაპიის ისტორია.....25

1.5.2. ბაქტერიოფაგების უპირატესობა ანტიბიოტიკებთან შედარებით.....27

1.5.3. ბაქტერიოფაგების კლასიფიკაცია.....28

1.5.4. ბაქტერიოფაგების სასიცოცხლო ციკლი .....29

1.5.5. ფაგო-რეზისტენტობა ბაქტერიებში .....31

1.5.6. *Acinetobacter baumannii*-ს და *Klebsiella pneumoniae*-ს ბაქტერიების მიმართ აქტიური ფაგები .....33

თავი II. მეთოდოლოგია .....37

2.1. კვლევაში გამოყენებული მასალები.....37

2.2. ბაქტერიული შტამები. კულტივირება, ანტიბიოტიკო-მგრძობელობა, ფერმენტული აქტივობა, გენოტიპირება.....39

2.2.1. ბაქტერიული შტამების კულტივირების პირობები.....39

2.2.2. ბაქტერიების მგრძობელობის განსაზღვრა ანტიბიოტიკების მოქმედების მიმართ 39

2.2.3. ბაქტერიული შტამების ბეტა-ლაქტამაზური აქტივობის განსაზღვრა.....40

2.2.4. ბაქტერიული შტამების გენოტიპირება პულსირებადი გელ-ელექტროფორეზის მეთოდით.....40

2.3. ბაქტერიოფაგები: გამოყოფა და ბიოლოგიური მახასიათებლები .....42

2.3.1. ბაქტერიოფაგების გამოყოფა გარემოს ნიმუშებიდან.....42

2.3.2. ბაქტერიოფაგების სუფთა ხაზების მიღება, გამრავლება და კონცენტრირება.....42

2.3.3. ფაგის ვირიონის მორფოლოგიის ელექტრონულ-მიკროსკოპული კვლევა .....44

2.3.4. ბაქტერიოფაგების ლიზისური სპექტრის შესწავლა .....44

2.3.5. ბაქტერიოფაგების კულტივირების ეფექტურობის შესწავლა.....45

2.3.6. ბაქტერიოფაგების რეპროდუქციული ციკლის მახასიათებლების დადგენა .....45

2.3.7. ფაგით ინფიცირებული ბაქტერიების პოპულაციაში ფაგორეზისტენტული მუტანტების წარმოქმნის სიხშირე.....	46
2.4. ბაქტერიოფაგების მოლეკულური მასების დადგენა პულსირებადი გელ - ელექტროფორეზის მეთოდით.....	47
2.5. ბაქტერიოფაგების დნმ-ის გამოყოფა .....	48
2.6. დნმ-ის დამუშავება რესტრიქციული ენდონუკლეაზებით და ჰორიზონტალური გელ-ელექტროფორეზი .....	49
თავი III. მიღებული შედეგები .....	50
3.1. ბაქტერიული შტამების ანტიბიოტიკო-მგრძობელობის შეფასება და ბეტა-ლაქტამაზების პროდუქციის ფენოტიპური გამოვლინება.....	50
3.2. <i>Acinetobacter baumannii</i> -სა და <i>Klebsiella spp.</i> -ს ბაქტერიული შტამების გენოტიპირება 55	
3.3. <i>Acinetobacter baumannii</i> -სა და <i>Klebsiella spp.</i> -ს ბაქტერიული შტამების მიმართ აქტიური ბაქტერიოფაგების გამოყოფა, ფაგების სუფთა ხაზების მიღება.....	61
3.4. ბაქტერიოფაგების ინტაქტური ვირიონის მორფოლოგია .....	63
3.5. ფაგების გენომის ზომების დადგენა და რესტრიქციული ანალიზი.....	66
3.6. ბაქტერიოფაგების ბიოლოგიური თვისებები .....	74
3.6.1. ბაქტერიოფაგების ლიზისური სპექტრი .....	74
3.6.2. ბაქტერიოფაგების კულტივირების ეფექტურობა .....	77
3.6.3. ბაქტერიოფაგების რეპროდუქციული ციკლი მახასიათებლები .....	83
3.6.4. ფაგორეზისტენტული ბაქტერიული მუტანტების წარმოქმნა .....	90
თავი IV. შედეგების განხილვა.....	93
ბიბლიოგრაფია.....	103

## შემოკლებების ჩამონათვალი

- PBP**, პენცილინ დამაკავშირებელი ცილა (Penicillin-binding protein);
- ESBL**, ფართო სპექტრის ბეტა ლაქტამაზები (Extended-spectrum beta-lactamases);
- OMC**, გარე მემბრანული კომპონენტები (Outer Membrane Components);
- MIC**, მინიმალური ინჰიბიტორული კონცენტრაცია (Minimum Inhibitory Concentration);
- LPS**, ლიპოპოლისაქარიდი (Lipopolysaccharide);
- OMP**, გარე მემბრანული ცილები (Outer membrane protein);
- OMV**, გარე მემბრანული ვეზიკულა (Outer Membrane Vesicles);
- MDR**, მრავლობით რეზისტენტობა სამკურნალო საშუალებების მიმართ (Multidrug Resistance);
- XDR**, ფართო რეზისტენტობა სამკურნალო საშუალებების მიმართ (Extensively drug Resistant);
- PDR**, სრულად რეზისტენტობა სამკურნალო საშუალებების მიმართ (Pandrug resistant);
- CDC**, დაავადებების კონტროლისა და პრევენციის ცენტრი (Centers for Disease Control and Prevention);
- WHO**, ჯანდაცვის მსოფლიო ორგანიზაცია (World Health Organization);
- MRSA**, მეტიცილინის მიმართ რეზისტენტული *Staphylococcus aureus* (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*);
- VRE**, ვანკომიცინის მიმართ რეზისტენტული *Enterococci* (Vancomycin-resistant *Enterococci*);
- CRISPR**, კლასტერებად განლაგებული მოკლე პალიდრომული განმეორებები (clustered regularly interspaced short palindromic repeats);
- EUCAST**, ანტიმიკრობული მგრძნობელობის ტესტირების ევროპული კომიტეტი (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing);
- PFGE**, გელ-ელექტროფორეზი პულსირებად ველში (Pulsed field gel electrophoresis);
- kbp**, ათასი წყვილი ნუკლეოტიდი (kilo base pair);
- DNAse**, დნმ-აზა, დეზოქსირიბონუკლეაზა;
- RNAse**, რნმ-აზა, რიბონუკლეაზა;

**EDTA** , ეთილენდიამინ ტეტრაამარმჟავა (Ethylenediaminetetraacetic acid);

**SDS**, ნატრიუმის დოდეცილ სულფატი (Sodium dodecyl sulfate);

**TE**, ტრის-ედტა ბუფერული ხსნარი (Tris-EDTA buffer solution);

**UPMGA**, შეუწონავი წყვილების ჯგუფის მეთოდი არითმეტიკული მნიშვნელობით (unweighted pair group method with arithmetic mean);

**kDa**, კილოდალტონი;

**მლ**, მილილიტრი;

**მკლ**, მიკროლიტრი;

**ნმ**, ნანომეტრი;

**ნკწე**, ფაგის ნეგატიური კოლონიის წარმომქნელი ერთეული,

**წთ**, წუთი.

## შესავალი

ბაქტერიული ვირუსები - ბაქტერიოფაგები ვირუსების ყველაზე დიდ ჯგუფს წარმოადგენენ ცოცხალ სამყაროში. მათი გავრცელების არეალი ფართოა: ჰაერი, ნიადაგი, წყალი, განსაკუთრებით ჩამდინარე წყლები. ფაგები ასევე გვხდება ადამიანისა და ცხოველების კანსა და ორგანიზმის სხვადასხვა ღრუებსა და ნაწლავებში. მათი რაოდენობა ბიოსფეროში აღწევს  $10^{31}$ -ს (Dennehy 2010; Weitz et al. 2013). ბაქტერიოფაგები ათჯერ უფრო მეტია, ვიდრე ბაქტერიები და ისინი მეტ-ნაკლებად არეგულირებენ ბაქტერიულ პოპულაციებს. ფაგები ხასიათდებიან სპეციფიურობით სამიზნე მიკროორგანიზმის მიმართ. სპეციფიურობა შესაძლებელია ვრცელდებოდეს როგორც სახეობის, ასევე ბაქტერიის შტამის დონეზეც (Nobrega et al. 2015). გარემოს ნიმუშიდან თითქმის ყველა სახეობის ბაქტერიის მიმართ არის შესაძლებელი ფაგების გამოყოფა.

მრავალი წელია აქტიურად განიხილება ფაგების თერაპიული მიზნებისათვის გამოყენება, განსაკუთრებით დღეს, როდესაც ანტიბიოტიკების მიმართ რეზისტენტული მიკრობთა სახეობების რაოდენობა თანდათან იზრდება და დიდ საფრთხეს წარმოადგენს ჯანდაცვის სფეროსათვის. ასეთ რეზისტენტულ მიკროორგანიზმებს შორის დიდი მნიშვნელობა ენიჭება *Enterobacteriaceae* ოჯახის წარმომადგენლებს, რომელთა შორისაა *Klebsiella*-ს გვარის ბაქტერიები, ასევე, *Moraxellaceae* ოჯახის ბაქტერიები- *Acinetobacter baumannii* (ცნობილი ასევე, როგორც „ერაყული ბაქტერია“). ორივე პათოგენი წარმოადგენს როგორც საზოგადოებაში გავრცელებულ, ასევე ჰოსპიტალური ინფექციების მნიშვნელოვან გამომწვევს. მათ მიერ გამოწვეული ინფექციების ფატალური მაჩვენებელი საკმაოდ დიდია, განსაკუთრებით კი საავადმყოფოს შიდა გარემოში. ორივე ობიექტი გაერთიანებულია მრავლობით რეზისტენტული ბაქტერიების ჯგუფში - „ESKAPE“ (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *A. baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacteriaceae*).

*A. baumannii* იწვევს კანისა და რბილი ქსოვილების, საშარდე გზების ინფექციებს, მენინგიტს, ბაქტერემიასა და პნევმონიას. *K. pneumoniae* შტამების გავრცელება განსაკუთრებით დიდ პრობლემას წარმოადგენს ნეონატალური

ინტენსიური თერაპიის განყოფილებებში, სადაც, ზოგ შემთხვევაში, სიკვდილიანობა დაახლოებით 70%-ს აღწევს (Morgan, Hart, and Cooke 1984).

*K. pneumoniae*-სა და *A. baumannii*-ს ბაქტერიული უჯრედები აპროდუცირებენ ფერმენტებს - ბეტა-ლაქტამაზებს, რომლებიც განაპირობებენ ბაქტერიების რეზისტენტობას სხვადასხვა ჯგუფის ბეტა-ლაქტამური ანტიბიოტიკების მიმართ, მათ შორის ბოლო თაობის ცეფალოსპორინებისა და კარბაპენემების მიმართაც კი. ბოლო წლების განმავლობაში, ანტიბიოტიკო-რეზისტენტული შტამებით გამოწვეული დაავადებების წინააღმდეგ ბრძოლის საშუალებების შესაძლებლობები თანდათან იწურება და ამიტომ, ფაგოთერაპია მკურნალობის ალტერნატიულ საშუალებად განიხილება.

ფაგებს ანტიბიოტიკებთან შედარებით გააჩნიათ რიგი უპირატესობებისა:

- ✓ გავრცელების ფართო არეალიდან გამომდინარე, შედარებით მარტივი და ხელმისაწვდომია სხვადასხვა წყაროდან მათი გამოყოფა და შესწავლა.
- ✓ ფაგებს ფაქტობრივად არ გააჩნიათ გვერდითი ეფექტები.
- ✓ ფაგები გამოირჩევიან მაღალი სპეციფიურობით სამიზნე (პატრონი) ბაქტერიის მიმართ, სწორედ ამ თვისების გამო, ფაგების გამოყენებისას არ ზიანდება ორგანიზმის ნორმალური მიკროფლორა.
- ✓ ანტიბიოტიკებისაგან განსხვავებით, ფაგებს აქვთ უნარი დაშალონ ბიოფილმების ეგზოპოლისაქარიდის მატრიქსი და მიაღწიონ პლანქტონურ უჯრედებამდე.
- ✓ ფაგების მიმართ დაბალი სიხშირით ხდება რეზისტენტული ბაქტერიების ფორმირება. წარმოქმნილი რეზისტენტული ფორმები კი ხშირ შემთხვევაში მგრძობიარენი რჩებიან სხვა ფაგების მიმართ.
- ✓ დაბალი სპეციფიური აქტივობის შემთხვევაში, შესაძლებელია ფაგების ადაპტირება სამიზნე ბაქტერიის უჯრედებზე.

კვლევის მნიშვნელობა:

*A. baumannii*-ს და *Klebsiella*-ს სახეობების მიკროორგანიზმების გამოვლენას, მათი გენოტიპური და გენოტიპური თვისებების შესწავლას დიდი მნიშვნელობა აქვს მათ წინააღმდეგ ანტიბიოტიკების ალტერნატიული, ეფექტური სამკურნალო საშუალების

შერჩევისათვის. მითუმეტეს, რომ მიკროორგანიზმის სხვადასხვა ქვეყანაში გავრცელებულ პოპულაციებში ფიქსირდება მკვეთრად გამოხატული გენეტიკური მრავალფეროვნება (Baraniak et al. 2013).

დიდი მნიშვნელობა ენიჭება *Klebsiella spp.*-ს და *A. baumannii*-ს სპეციფიური ბაქტერიოფაგების, როგორც ეფექტური სამკურნალო საშუალების დეტალურ შესწავლას. განსაკუთრებით იმ პროცესებისა და მახასიათებლების დადგენას, რომლებიც იწვევენ მათი სამიზნე მიკროორგანიზმების დათრგუნვას.

ჩვენი კვლევის მიზანია *A. baumannii*-ს და *Klebsiella spp.*-ის ბაქტერიების მიმართ აქტიური, სპეციფიური ბაქტერიოფაგების გამოყოფა, მათი ბიოლოგიური და გენეტიკური მახასიათებლების დეტალური შესწავლა, რათა შემდგომში შესაძლებელი გახდეს პოტენციური თერაპიული საშუალების შექმნა აღნიშნული ბაქტერიებით გამოწვეული ინფექციების წინააღმდეგ.

ძირითადი საკვლევი საკითხები:

- ✓ *A. baumannii*-სა და *Klebsiella spp.*-ს შტამების ანტიბიოტიკო-მგრძობელობის განსაზღვრა და ბეტა-ლაქტამაზების სინთეზის ფენოტიპური გამოვლინება; შტამების გენოტიპირება;
- ✓ გარემოს ნიმუშებიდან ბაქტერიოფაგების გამოყოფა;
- ✓ ბაქტერიოფაგების ვირიონების მორფოლოგიის დადგენა;
- ✓ ფაგების გენომის შედარებითი შესწავლა: დნმ-ის რესტრიქციული ანალიზი, გენომის მოლეკულური მასის განსაზღვრა;
- ✓ ფაგების ბიოლოგიური მახასიათებლების შესწავლა: ფაგების ლიზისური სპექტრის და კულტივირების ეფექტურობის შეფასება; რეპროდუქციული ციკლის პარამეტრების დადგენა: ადსორბცია, ლატენტური პერიოდი, ლიზისის დრო და ფაგის გამოსავალი ერთი ინფიცირებული უჯრედიდან;
- ✓ ფაგით ინფიცირებული ბაქტერიების პოპულაციაში ფაგო-რეზისტენტული მუტანტების წარმოქმნის სიხშირის განსაზღვრა;

ნაშრომი შესრულებულია გ. ელიავას ბაქტერიოფაგის, მიკრობიოლოგიისა და ვირუსოლოგიის ინსტიტუტის მოლეკულური ბიოლოგიის ლაბორატორიაში.

## თავი I ლიტერატურის მიმოხილვა

### 1.1. დაავადების გამომწვევი გრამ-უარყოფითი მიკროორგანიზმები და მათი რეზისტენტობა ანტიბიოტიკების მიმართ

გრამ-უარყოფითი ბაქტერიებით გამოწვეული ინფექციები მნიშვნელოვან პრობლემას წარმოადგენს თანამედროვე მსოფლიოსთვის, რაც გამოწვეულია ანტიბიოტიკების მიმართ მათი მაღალი რეზისტენტობისა და, შესაბამისად, ავადობისა და სიკვდილიანობის გაზრდილი მაჩვენებლის გამო. ინფექციების გამომწვევთა შორის ყველაზე მეტად გავრცელებულია გრამ-უარყოფითი ბაქტერიების ორი დიდი ჯგუფი, ესენია *Enterobacteriaceae* ოჯახის წარმომადგენელი ბაქტერიები და გლუკოზა არამაფერმენტებელი ბაქტერიები. არსებობს ასევე, სხვა კლინიკურად მნიშვნელოვანი გრამ-უარყოფითი მიკროორგანიზმებიც, როგორცაა *Neisseria spp.*, *Haemophilus spp.*, *Helicobacter pylori*, *Chlamydia trachomatis* და სხვა.

*Enterobacteriaceae* არის ჰეტეროგენული ჯგუფი, რომელიც ფართოდ არის გავრცელებული ბუნებაში. ისინი შეადგენენ გრამ-უარყოფითი ბაქტერიების დაახლოებით 80%-ს. ეს მიკროორგანიზმები იწვევენ სხვადასხვა ინფექციებს, მათ შორისაა საშარდე გზების ინფექციები, პნევმონია, დიარეა, მენინგიტი, სეფსისი, ენდოტოქსიური შოკი და ბევრი სხვა. ადამიანის ინფექციების ყველაზე ხშირი გამომწვევები პათოგენური *Escherichia coli*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Yersinia*, *Shigella* და *Salmonella*-ს სახეობებია (Oliveira and Reygaert 2021).

გრამ-უარყოფითი ბაქტერიების მეორე ჯგუფი გლუკოზა არამაფერმენტებელი ბაქტერიებია, რომელთა მიერ გამოწვეული ინფექციების სიკვდილიანობის მაჩვენებელი საკმაოდ დიდია, განსაკუთრებით საავადმყოფოს შიდა გარემოში. არამაფერმენტებელი მიკროორგანიზმების ყველაზე მნიშვნელოვანი წარმომადგენლებია: *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas spp.*, *Alcaligenes spp.* და *Moraxella spp.*

გრამ-უარყოფით ბაქტერიებს აქვთ დიდი შესაძლებლობა, რომ შეაღწიონ ადამიანის ორგანიზმის თითქმის ყველა ორგანოში და გამოიწვიონ ისეთი სისტემური დაავადებები, როგორცაა საჭმლის მომნელებელი სისტემის დაავადებები, ნერვული სისტემის დაავადებები, შარდ - სასქესო გზების ინფექციები. მიკროორგანიზმები ახდენენ კოლონიზაციას ნაწლავებში, სასუნთქ გზებში, კანზე, რაც ხელს უწყობს



ადამიანის ორგანიზმის სხვა ორგანოებში მათ გავრცელებას. მწვავე დიარეით მიმდინარე გასტროენტერიტმა შეიძლება გამოიწვიოს გართულება მენინგიტის სახით. მენინგიტი კი პოტენციურად ფატალური ინფექციაა, თუკი დროულად არ მოხდება მისი მკურნალობა.

ინფექციური დაავადებების დროს მკურნალობისათვის, ძირითადად, გამოიყენება ანტიბიოტიკების პრეპარატები. ანტიბიოტიკებს უდიდესი წვლილი მიუძღვით ინფექციებთან ბრძოლაში და მათი გამოყენებით მილიონობით ადამიანის სიცოცხლის გადარჩენა გახდა შესაძლებელი. მე-20 საუკუნის შუა რიცხვებში ანტიბიოტიკი განიხილებოდა როგორც “საოცარი წამალი“, რომლის სამიზნეს წარმოადგენდა ინფექციის გამომწვევი ბაქტერია და ადამიანის ორგანიზმზე საზიანო ეფექტს არ ახდენდა. ამავე პერიოდში არსებობდა რწმენა, რომ გადამდები დაავადებების გავრცელება თითქმის სრულად შეჩერდებოდა. 1950-დან 1970 წლამდე პერიოდი ითვლებოდა ოქროს ეპოქად ანტიბიოტიკების ახალი კლასების აღმოჩენის მხრივ. წლების განმავლობაში მრავალი ანტიბიოტიკი იქნა წარმოებული. გაზრდილი მოთხოვნის გამო ნებადართული იქნა ნაკლებად ძვირი ანტიბიოტიკების ურეცეპტოდ გაცემა. ანტიბიოტიკების დიდი რაოდენობით უპასუხისმგებლოდ გამოყენებამ კი ხელი შეუწყო მათ მიმართ რეზისტენტული შტამების ფართოდ გავრცელებას (Zaman et al. 2017). თანამედროვე „ანტიბიოტიკების ერა“ დაკავშირებულია ალექსანდრ ფლემინგთან და პოლ ელრიხთან. ფლემინგი იყო პირველი, ვინც გამოთქვა მოსაზრება, რომ პენიცილინის ძალიან მცირე დოზებით ან მოკლე დროის განმავლობაში გამოყენება გამოიწვევდა ამ ანტიბიოტიკის მიმართ რეზისტენტობის განვითარებას.

ანტიბიოტიკო-რეზისტენტული გრამ-უარყოფითი ბაქტერიებით გამოწვეული ინფექციების გავრცელება და დაავადებების ეფექტური მკურნალობის სირთულე წარმოადგენს ჯანდაცვის ორგანიზაციების მნიშვნელოვან პრობლემას (Oliveira and Reygaert 2021). ჯანდაცვის მსოფლიო ორგანიზაციამ მიკრობთა ანტიბიოტიკო-რეზისტენტობა აღიარა, როგორც უდიდესი საფრთხე ადამიანის ჯანმრთელობისათვის.

ანტიბიოტიკების მიმართ რეზისტენტობის მატებასთან ერთად ახალი ანტიბიოტიკების აღმოჩენის გზები იჭურება. ზოგიერთ ანტიბიოტიკს, რომელიც

ამოღებული იყო მკურნალობიდან მათი ტოქსიურობის გამო, კვლავ იყენებენ პრაქტიკაში (პოლიმიქსინი, კოლისტინი), თუმცა, რეზისტენტული გენები ამ ანტიბიოტიკების მიმართ უკვე აღმოჩენილია (*mcr-1*) (Zakuan and Suresh 2018). მკურნალობის შესაძლებლობას წარმოადგენს ტიგეციკლინი, თუმცა მის მოხმარებას აქვს სპეციფიური შეზღუდვები - საჭიროა ანტიბიოტიკის დიდი დოზის დანიშვნა, რადგან გამწვანებულია ადამიანის ქსოვილში მისი შეღწევადობა. ფოსფომიცინი, რომელიც ასევე ამოღებული იყო მკურნალობის სქემიდან ტოქსიურობის გამო, კვლავ გამოიყენება ანტიბიოტიკო-რეზისტენტული გრამ-უარყოფითი მიკროორგანიზმებით გამოწვეული საშარდე გზების ინფექციების დროს (Wargo and Edwards 2014). ESBL (ფართო სპექტრის ბეტა ლაქტამაზები) - ფერმენტების მაპროდუცირებელი მიკროორგანიზმებით გამოწვეული მეორადი ინფექციების დროს მკურნალობა ტარდება კარბაპენემებით, თუმცა, კარბაპენემაზების გამოჩენამ ინფექციების ამ ანტიბიოტიკებით მკურნალობა რთული გახადა (Oliveira and Reygaert 2021).

მიკროორგანიზმების ანტიბიოტიკო-რეზისტენტული ფორმების წარმოქმნა პირდაპირ კავშირშია ანტიბიოტიკების არამიზნობრივ გამოყენებასთან. ხანგრძლივი დროით ანტიბიოტიკების გამოყენება ართულებს მარტივი ინფექციების მკურნალობასაც კი. რეზისტენტობა, ძირითადად, თავს იჩენს მკურნალობის არასრული კურსის ჩატარების, ან/და არასწორი დოზირების შემთხვევებში.

ანტიბიოტიკო-რეზისტენტული ბაქტერიების გავრცელების ერთ-ერთი გზაა ეკოსისტემებში ანტიბიოტიკების უკონტროლო გამოყენება. განვითარებულ ქვეყნებში ანტიბიოტიკებს ფართოდ იყენებენ სოფლის მეურნეობაშიც. ცხოველებისა და ადამიანის პოპულაციებს შორის ანტიბიოტიკო-რეზისტენტობის გამავრცელებელ მთავარ გზას კვებითი ჯაჭვი წარმოადგენს (MacGowan and Macnaughton 2017). ცხოველებს, მაგალითად მსხვილფეხა პირუტყვს, პროფილაქტიკის ან ზრდის სტიმულაციის მიზნით ანტიბიოტიკებს აძლევენ საკვებთან და წყალთან ერთად (MacGowan and Macnaughton 2017), რაც ზრდის ბაქტერიებში რეზისტენტობის განვითარების ალბათობას. ამასთან, ადამიანის მიერ ანტიბიოტიკებით გაჯერებული ცხოველური და მცენარეული საკვები პროდუქტების მიღება აძლიერებს მიკრობულ პოპულაციებში ანტიბიოტიკო-რეზისტენტობის განმსაზღვრელი გენების გავრცელებას. შესაბამისად, სოფლის მეურნეობაში ანტიბიოტიკების ფართოდ

გამოყენება არაეფექტურს ხდის ბაქტერიული ინფექციების მკურნალობას ანტიბიოტიკების საშუალებით, მათ მიმართ წარმოქმნილი რეზისტენტობის გამო (Harrison and Svec 1998).

ბაქტერიების მიერ ანტიბიოტიკების მიმართ რეზისტენტობის შექმნას და გავრცელებას ხელს უწყობს გენეტიკური მასალის გადატანა ერთი ბაქტერიული უჯრედიდან ამავე, ან სხვა სახეობის ბაქტერიულ უჯრედში. ანტიბიოტიკების მიმართ რეზისტენტობის განმსაზღვრელი გენები ხშირად განთავსებულია მობილურ გენეტიკურ ელემენტებში, როგორცაა პლაზმიდები (ქრომოსომისაგან დამოუკიდებელი, წრიული ფორმის, ორმაგ-ჯაჭვიანი დნმ-ის მოლეკულა), ან ტრანსპოზონები (ე.წ. მხტუნავი გენები), რომლებიც წარმოადგენენ დნმ-ს გარკვეულ ნუკლეოტიდურ თანმიმდევრობას გენომში სხვადასხვა პოზიციაზე გადაადგილების უნარით. უჯრედებს შორის გენების გადატანა ხდება სხვადასხვა გზით:

- კონიუგაცია - უჯრედების პირდაპირი კონტაქტი, როდესაც ხდება პლაზმიდის გადატანა;
- ტრანსდუქცია - ბაქტერიული დნმ-ს გადატანა ბაქტერიოფაგის მეშვეობით;
- ტრანსფორმაცია - გარემოდან „შიშველი“ დნმ-ს აღება;

ხშირად, ერთი ანტიბიოტიკით ხდება არაერთი ანტიბიოტიკის მიმართ რეზისტენტული უჯრედების სელექცია. რეზისტენტობა შესაძლებელია განვითარდეს სხვა, სტრუქტურულად მსგავსი, იმავე კლასის ანტიბიოტიკების მიმართაც. მაგალითად, რეზისტენტობა ტეტრაციკლინის მიმართ ნიშნავს, რომ შესაძლოა ბაქტერიულმა უჯრედებმა რეზისტენტობა გამოავლინონ ოქსიტეტრაციკლინის, ქლოროტეტრაციკლინის, დოქსიციკლინის და მინოციკლინის მიმართაც. სხვადასხვა ანტიბიოტიკის მიმართ ბაქტერიების რეზისტენტობის განმაპირობებელი მექანიზმები წარმოდგენილია ცხრილში (Zaman et al. 2017):

ანტიბიოტიკების მიმართ ბაქტერიული შტამების რეზისტენტობის მექანიზმები

(Zaman et al. 2017)

<u>ანტიბიოტიკის კლასი</u>	<u>რეზისტენტობის მექანიზმები</u>
ბეტა-ლaktამები	ჰიდროლიზი, ეფლუქსი, ანტიბიოტიკის სამიზნე საიტების შეცვლა
ამინოგლიკოზიდები	ფოსფორილირება, აცეტილირება, ნუკლეოტიდების დელეცია, ეფლუქსი, ანტიბიოტიკის სამიზნე საიტების შეცვლა
გლიკოპეპტიდები	პეპტიდოგლიკანის რეპროგრამირებული სინთეზი
ტეტრაციკლინები	მონოქსიგენაცია, ეფლუქსი, ანტიბიოტიკის სამიზნე საიტების შეცვლა
მაკროლიდები	ჰიდროლიზი, გლიკოზილირება, ფოსფორილირება, ეფლუქსი, ანტიბიოტიკის სამიზნე საიტების შეცვლა
ლინკოზამიდები	ნუკლეოტიდების დელეცია, ეფლუქსი, ანტიბიოტიკის სამიზნე საიტების შეცვლა
სტრეპტოგრამინები	ნახშირბადისა და ჟანგბადის ბმის დამშლელი ლიაზა, აცეტილირება, ეფლუქსი, ანტიბიოტიკის სამიზნე საიტების შეცვლა
ოქსაზოლიდინონები	ეფლუქსი, ანტიბიოტიკის სამიზნე საიტების შეცვლა
ფენიკოლები	აცეტილირება, ეფლუქსი, ანტიბიოტიკის სამიზნე საიტების შეცვლა
ქუინოლონები	აცეტილირება, ეფლუქსი, ანტიბიოტიკის სამიზნე საიტების შეცვლა
პირიმიდინები	ეფლუქსი, ანტიბიოტიკის სამიზნე საიტების შეცვლა
სულფონამიდები	ეფლუქსი, ანტიბიოტიკის სამიზნე საიტების შეცვლა
რიფამპიცინები	ADP-რიბოზილირება, ეფლუქსი, ანტიბიოტიკის სამიზნე საიტების შეცვლა
ლიპოპეპტიდები	ანტიბიოტიკის სამიზნე საიტების შეცვლა
კათიონური პეპტიდები	ეფლუქსი, ანტიბიოტიკის სამიზნე საიტების შეცვლა

ანტიბიოტიკო-რეზისტენტული მიკროორგანიზმები ცნობილია როგორც ე.წ., სუპერ-ბაქტერიები („superbugs“). ეს ფენომენი უკვე არა მხოლოდ ლაბორატორიული შეხედულებაა, არამედ გადაიქცა ისეთ გლობალურ პრობლემად, რომელსაც მივყავართ გაზრდილ სიკვდილიანობასთან და სიცოცხლისათვის საშიშ ინფექციებთან. მსოფლიო ჯანდაცვის ორგანიზაციის ინფორმაციით, თუ ვერ ვიმოქმედებთ მიკრობთა ანტიბიოტიკო-რეზისტენტობის წინააღმდეგ, ანტიბიოტიკების შემდგომ ერას მოჰყვება გახშირებული ინფექციები და ორგანიზმის მცირე დაზიანებებმაც კი შეძლება გამოიწვიოს სიკვდილი (World Health Organization 2020). აღსანიშნავია, რომ ჯანდაცვის მსოფლიო ორგანიზაციის ევროპის რეგიონის წევრ 29 ქვეყანაში ყოველწლიურად დაახლოებით 25.000 ადამიანი იღუპება ნოზოკომიური ინფექციებისგან, რომლებიც გამოწვეულია რეზისტენტული ბაქტერიებით (MacGowan and Macnaughton 2017). 2019 წლის მონაცემებით, მხოლოდ აშშ-ში ყოველწლიურად მინიმუმ 2.8 მილიონი ადამიანი ინფიცირდება ანტიბიოტიკო-რეზისტენტული ბაქტერიებით ან სოკოთი და მათგან 35.000-ზე მეტი იღუპება (Centers for Disease Control and Prevention 2019). მეცნიერები ვარაუდობენ, რომ 2050 წლისათვის ანტიბიოტიკო-რეზისტენტული ბაქტერიებით გამოწვეული ინფექციებით გარდაცვალებულთა რიცხვმა მსოფლიოში შესაძლოა ათ მილიონსაც კი გადააჭარბოს (Ventola 2015). ბრძოლა ბაქტერიების ანტიბიოტიკო-რეზისტენტული ფორმების გავრცელებასთან შედარებულია „ჩუმი ცუნამის“ შეჩერების მცდელობასთან (Cox 2015).

## 1.2. ბეტა-ლექტამური ანტიბიოტიკები და ბაქტერიული ბეტა-ლექტამაზები

გრამ-უარყოფითი ბაქტერიებით გამოწვეული ინფექციების სამკურნალოდ ყველაზე ხშირად გამოიყენება ბეტა-ლექტამური ანტიბიოტიკები (Babic, Hujer, and Bonomo 2006).

ბიოქიმიური თვალსაზრისით, ამ კლასის ანტიბიოტიკებს აქვთ მსგავსი, წრიული სრუქტურა, რომელიც შედგება 3-ნახშირბადის და 1-აზოტის ატომისაგან (ბეტა-ლექტამის რგოლი). ანტიბიოტიკების ეს კლასი მოიცავს შემდეგი ანტიბიოტიკის ჯგუფებს, ესენია: პენიცილინები, ცეფალოსპორინები, კარბაპენემები, მონობაქტამები.

მონობაქტამების გარდა, ყველა ანტიბიოტიკი გამოიყენება, როგორც გრამ-უარყოფითი, ასევე გრამ-დადებითი მიკროორგანიზმების წინააღმდეგ. მონობაქტამები კი ეფექტურნი არიან მხოლოდ გრამ-უარყოფითი მიკროორგანიზმების მიმართ.

გრამ-უარყოფითი და გრამ-დადებითი მიკროორგანიზმებისათვის პეპტიდოგლიკანი/მურეინი, რომელიც არის ბაქტერიული უჯრედის კედლის კომპონენტი, სასიცოცხლოდ მნიშვნელოვანია ბაქტერიისათვის (Massova and Mobashery 1998). ეს კომპონენტი უზრუნველყოფს ბაქტერიული უჯრედის კედლის მექანიკურ სტაბილურობას არახელსაყრელ გარემოში. პეპტიდოგლიკანის შრე გრამ-დადებით ბაქტერიებში გაცილებით სქელია (10 შრეზე მეტი), ვიდრე გრამ-უარყოფით ბაქტერიებში (1-2 შრე). რაც შეეხება პეპტიდოგლიკანის სტრუქტურას, იგი შედგება გლიკანური ბმისგან, რომელიც თავის მხრივ, შექმნილია N-აცეტილგლუკოზამინისა და N-აცეტილმურამის მჟავას დი-საქარიდის სუბერთეულისაგან. ბეტა-ლექტამური ანტიბიოტიკების სამიზნეებია პენიცილინის დამაკავშირებელი ცილები (PBP).

ანტიბიოტიკის ლექტამური ბმები მსგავსია უჯრედული N-აცეტილგლუკოზამინის შემადგენლობაში შემავალი ბმებისა. ბეტა-ლექტამური ანტიბიოტიკები აფერხებენ პეპტიდოგლიკანის სინთეზს ბოლო საფეხურზე. უჯრედის პეპტიდოგლიკანის შრის სინთეზის დროს, პენიცილინის დამაკავშირებელი ცილები „შეცდომით“ იყენებენ ბეტა-ლექტამის რგოლს, როგორც უჯრედის კედლის სამშენებლო მასალას. შედეგად ხდება ტრანსპეპტიდაზას აცილირება ჯვარედინი დამაკავშირებელი პეპტიდოგლიკანის წარმოქმნით. ეს

შეკავშირება, თავის მხრივ, წყვეტს ტერმინალური ტრანსპეპტიდაციის პროცესს და იწვევს უჯრედის სიცოცხლისუნარიანობის დაკარგვას. რადგანაც უჯრედის კედლის სინთეზი ნელ-ნელა ჩერდება, გრძელდება ძირითადი პეპტიდოგლიკანების აუტოლიზისი. მურეინის შრის დარღვევა იწვევს უჯრედის კედლის გამტარობის გაზრდას. ამგვარად, ბეტა-ლაქტამით განხორციელებული ტრანსპეპტიდაციის ინჰიბირება იწვევს უჯრედის ლიზისს (Bayles 2000).

გრამ-უარყოფითი ბაქტერიების ბეტა-ლაქტამური ანტიბიოტიკების მიმართ რეზისტენტობის განმსაზღვრელი ფაქტორი არის ბეტა-ლაქტამაზების სინთეზი. აღნიშნული ფერმენტები ახდენენ ბეტა-ლაქტამური ანტიბიოტიკის სტრუქტურაში შემავალი ატომური ბმების გახლეჩვას და ამგვარად, ანტიბიოტიკს ეკარგება ანტიბაქტერიული მოქმედების უნარი.

ბეტა-ლაქტამაზების კლასიფიკაციის ორი მთავარი სქემა არსებობს: ამბლერის კლასიფიკაცია (A, B, C და D კლასის ფერმენტები), რომელიც დაფუძნებულია ამინომჟავების თანმიმდევრობის ჰომოლოგიაზე და მეორე, ბუშ-ჯაკობი-მედიროს კლასიფიკაცია (1, 2, 3, და 4 ჯგუფის ფერმენტები), რომელიც დაფუძნებულია სუბსტრატისა და ინჰიბიტორის პროფილებზე (Ambler et al. 1991).

A კლასის ფართო სპექტრის ბეტა-ლაქტამაზები (ESBL):

ბეტა-ლაქტამაზების დიდმა მრავალფეროვნებამ *E. coli*-სა და *K. pneumoniae*-ს წარმომადგენლებში განაპირობა ფართო სპექტრის ანტიბიოტიკების-ცეფალოსპორინების, კარბაპენემის, ცეფამიცილის და მონობაქტამის შემუშავება. 1980-იან წლებში ეს ანტიბიოტიკები საკმაოდ ეფექტურნი იყვნენ მრავალი ბეტა-ლაქტამ რეზისტენტული ბაქტერიების წინააღმდეგ ბრძოლაში. ფართო სპექტრის ბეტა-ლაქტამაზები ახდენენ პენიცილინის, ვიწრო და ფართო სპექტრის ცეფალოსპორინების და მონობაქტამ აზტრეონამის ჰიდროლიზს. ეს ფერმენტები ვერ ახდენენ ცეფამიცილის, კარბაპენემის და ბეტა-ლაქტამაზების ინჰიბიტორების ჰიდროლიზს.

პირველი ESBL-ების აღწერის შემდეგ, ბაქტერიებში 200-ზე მეტი სხვადასხვა ფერმენტი იქნა აღმოჩენილი, რომლებიც წარმოადგენენ მნიშვნელოვან რისკს როგორც საზოგადოებრივი ჯანდაცვისთვის, ასევე ჰოსპიტალების და ინტენსიური

თერაპიის განყოფილებებში. ESBL-ფერმენტების უმრავლესობას წარმოადგენს SHV, TEM, და CTX-M ფერმენტების ოჯახები (Nagano et al. 2000).

A კლასის სერინ კარბაპენემაზები:

ეს კლასი მოიცავს არამეტალოკარბაპენემაზებს, როგორებიცაა NMC-A, IMI, SME და KPC. ამ ჯგუფის ბეტა-ლაქტამაზები ახდენენ კარბაპენემის, ასევე ცეფალოსპორინების, პენიცილინის და აზტრეონამის ჰიდროლიზს. ისინი პირველად აღმოაჩინეს *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* და *K. pneumoniae* ბაქტერიულ უჯრედებში (Nordmann, Cuzon, and Naas 2009).

B კლასის მეტალო ბეტა-ლაქტამაზები:

ეს ფერმენტები არიან თუთია დამოკიდებული ბეტა-ლაქტამაზები და გააჩნიათ ჰიდროლიზური აქტივობის განსხვავებული მექანიზმები (Bush, Jacoby, and Medeiros 1995). მიკროორგანიზმები, რომლებიც ასინთეზირებენ აღნიშნულ ფერმენტებს, არიან რეზისტენტულნი პენიცილინის, ცეფალოსპორინების, კარბაპენემის და კლინიკურად ხელმისაწვდომი ბეტა-ლაქტამაზა ინჰიბიტორების მიმართ (Walsh et al. 2005). *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* და *A. baumannii* ბაქტერიები ახდენენ B კლასის ფერმენტების სინთეზს, რაც კოდირებულია მობილური გენეტიკური ელემენტებით (Hujer et al. 2006).

C კლასის სერინ ცეფალოსპორინაზები:

AmpC ფერმენტების კლასი მოიცავს CMY-2, P99, ACT-1, და DHA-1-ს. ფერმენტები კოდირებულია *bla* გენით, რომელიც ლოკალიზებულია ბაქტერიის ქრომოსომაში. აღსანიშნავია ისიც, რომ თანდათან უფრო ფართო გავრცელება პოვა პლაზმიდით კოდირებულმა AmpC ფერმენტებმაც (Philippon, Arlet, and Jacoby 2002). მიკროორგანიზმები, რომელთა უჯრედებშიც ხდება აღნიშნული ფერმენტების სინთეზი, რეზისტენტულნი არიან პენიცილინის, ბეტა-ლაქტამაზა+ინჰიბიტორის კომბინაციის და ცეფალოსპორინების (ცეფოქსიმი, ცეფოტეტანი, ცეფტრიაქსონი, ცეფოტაქსიმი) მოქმედების მიმართ. AmpC ფერმენტები არაეფექტურად ახდენენ ცეფეპიმის ჰიდროლიზს და ინჰიბირდებიან კლოქსაცილინით, ოქსაცილინით და აზტრეონამით (Bush, Jacoby, and Medeiros 1995). *Enterobacteriaceae* ოჯახის



წარმომადგენლები, როგორცაა *Enterobacter spp.* და *Citrobacter spp.*, არიან AmpC ბეტალაქტამაზა მაპროდუცირებელი და ავლენენ რეზისტენტობას კლავულანის მჟავასა და სულბაქტამების მიმართ.

D კლასისი სერინ ოქსაცილინაზები:

ამ ტიპის ფერმენტებს აქვთ უნარი მოახდინონ ოქსაცილინის ჰიდროლიზი და შესაბამისად, ცნობილი არიან როგორც „ოქსაცილინაზები“. ბაქტერიებში OXA ბეტალაქტამაზები განაპირობებენ რეზისტენტობას პენიცილინის, ცეფალოსპორინის, ფართო სპექტრის ცეფალოსპორინების და კარბაპენემის მიმართ. OXA ტიპის ფერმენტები რეზისტენტულნი არიან კლავულანის, სუბალქტამისა და ტაზობაქტამის ინჰიბიტორული თვისებების მიმართ. თუმცა, არის გამონაკლისებიც. მაგალითად, OXA-2 და OXA-32 ფერმენტები ინჰიბირდებიან ტაზობაქტამით, OXA-53 კი კლავულანით (Drawz and Bonomo 2010). საინტერესოა, რომ ნატრიუმის ქლორიდი კონცენტრაციით 50-75 მილიმოლი, აინჰიბირებს ზოგიერთ კარბაპენემ-მაჰიდროლიზირებელ ოქსაცილინაზებს (OXA-25 and OXA-26) (Afzal-Shah, Woodford, and Livermore 2001). OXA ტიპის ფერმენტების სინთეზი ძირითადად ხდება *A. baumannii*-სა (OXA-23 და OXA-24/40) და *P. aeruginosa*-ს ბაქტერიულ უჯრედებში.

### 1.3. მიკროორგანიზმის *Acinetobacter baumannii* დახასიათება

*Acinetobacter spp.* გლუკოზა არამაფერმენტებელი, კატალაზა-დადებითი, ოქსიდაზა-უარყოფითი, აერობული, გრამ-უარყოფითი მიკროორგანიზმია. იგი მიეკუთვნება *Gammaproteobacteria* კლასს, *Pseudomonadales* რიგს, *Moraxellacea* - ოჯახს. *Acinetobacter*-ის გვარიდან სახეობებს შორის *Acinetobacter baumannii* ასოცირებულია საავადმყოფოს შიდა ინფექციებთან (M.-F. Lin et al. 2014). ამ ბაქტერიებს მოიხსენიებენ, როგორც ე.წ. „ერაყის“ ბაქტერიებს, რადგან ინფექციის მრავალი შემთხვევა დაფიქსირებულ იქნა ერაყისა და ავღანეთის ომის დროს დაჭრილ ჯარისკაცებში (Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 2004). სამოქალაქო კლინიკებში ანტიბიოტიკების მიმართ რეზისტენტული *A. baumannii*-ს გავრცელება გამოიწვია ომის ზონიდან გადმოყვანილმა სამხედრო პაციენტებმა (Peleg, Seifert, and Paterson 2008). ევროპისა და აფრიკის რეგიონში, ინტენსიური თერაპიის განყოფილებებში აღრიცხული ჰოსპიტალური ინფექციების დროს, *A. baumannii*-თ გამოწვეული ინფექციების წილი 25%-ს აღწევდა (Ayobami et al. 2019).

გლობალური კვლევის მიხედვით, რომელიც მოიცავს ხუთი კონტინენტის სამოცდათხუთმეტ ქვეყანას, *A. baumannii* შედის იმ ბაქტერიების ხუთეულში, რომლებიც იწვევენ ნოზოკომიურ ინფექციებს ინტენსიური თერაპიის განყოფილებებში (Boucher et al. 2009).

*A. baumannii* იწვევს კანისა და რბილი ქსოვილების, საშარდე გზების ინფექციებს, მენინგიტს, ბაქტერემიასა და პნევმონიას (Morris et al. 2019). საავადმყოფოს შიდა ინფექციები ყველაზე ხშირად გვხვდება მძიმე პაციენტებში. *A. baumannii*-ს ინფექციის განვითარების განსაკუთრებული რისკ-ფაქტორებია: ხანგრძლივი ჰოსპიტალიზაცია, იმუნური სუპრესია, თანდაყოლილი დაავადებების არსებობა, ტრავმა ან დამწვრობები, ანტიბიოტიკების ხანგრძლივი გამოყენება, ინვაზიური პროცედურები, კათეტერები ან მექანიკური ვენტილაცია.

საზოგადოებაში შექმნილი ინფექციები, როგორც მძიმე კლინიკური სინდრომი, გვხვდება ცხელი და ტენიანი კლიმატის მქონე ქვეყნებში. ეს ინფექციები, როგორც წესი, გვხვდება პაციენტებში, რომლებიც დაავადებულნი არიან შაქრიანი დიაბეტით და ფილტვების ქრონიკული ობსტრუქციული დაავადებებით, მწველებში და ალკოჰოლზე დამოკიდებულ პირებში. საზოგადოებაში შექმნილი

*A. baumannii*-ით გამოწვეული ინფექციების სიკვდილიანობის მაჩვენებელი 64%-ს აღწევს (Morris et al. 2019).

*A. baumannii* შტამების ვირულენტობას განსაზღვრავს რამდენიმე ფაქტორი: გარე მემბრანული კომპონენტები (OMC), კაფსულის წარმოქმნა, ფოსფოლიპაზები, გარემომემბრანული ვეზიკულები (OMV), მეტალის ათვისების (შეზოჭვის) სისტემები, ცილის სეკრეციის სისტემები და პენიცილინ-დამაკავშირებელი ცილები (Antunes et al. 2011; McConnell, Actis, and Pachón 2013). განვიხილოთ თითოეული მათგანი:

გარე მემბრანული ცილები დაკავშირებულია უჯრედის გამტარობასთან. OmpA ცილა ყველაზე უხვადაა წარმოდგენილი უჯრედის მემბრანაზე. *A. baumannii*-ის შემთხვევაში, OmpA შესწავლილია *in vitro* მოდელებში და კარგად დახასიათებული ვირულენტობის ფაქტორია, სხვადასხვა მნიშვნელოვანი ბიოლოგიური შესაძლებლობებით (Morris et al. 2019). ორგანიზმში მიკრობის შეჭრისას ეს ცილა უკავშირდება მასპინძელი ორგანიზმის ეპითელურ უჯრედებს, სადაც მის სამიზნეს წარმოადგენს მიტოქონდრიები და ბირთვი (Morris et al. 2019). მიტოქონდრიაზე მისი გადასვლისას ხდება ციტოქრომი c-ს და აპოპტოზის ფაქტორის გააქტიურება, რაც იწვევს უჯრედების სიკვდილს (Choi et al. 2005). მეორეს მხრივ, OmpA ცილის ბირთვზე გადასვლა იწვევს მასპინძელი უჯრედის დნმ-ის დეგრადაციას (Choi et al. 2007). ფიბრონექტინთან ურთიერთქმედებით OmpA მნიშვნელოვან როლს ასრულებს ეპითელურ უჯრედებზე ადჰეზიასა და ინვაზიაში (Choi et al. 2008). იგი უკავშირდება ადამიანის შრატის H ფაქტორს, რომელიც საშუალებას აძლევს მიკრობს თავი აარიდოს კომპლემენტის სისტემით განპირობებულ ინაქტივაციას (Kim et al. 2009). გარდა ამისა, OmpA ცილა ჩართულია *A. baumannii*-ს შტამების ანტიბიოტიკო-რეზისტენტობის განვითარებაში. *ompA* გენის დესტრუქცია მნიშვნელოვნად ამცირებს რამდენიმე ანტიბიოტიკის (ქლორამფენიკოლის, აზრეტონამის და ნალიდიქსიდის მჟავას) მინიმალურ ინჰიბიტორულ კონცენტრაციას (MIC), რაც იმის მაჩვენებელია, რომ OmpA მონაწილეობს პერიპლაზმური სივრციდან ანტიბიოტიკების გამოდევნის პროცესში. OmpA ცილა მონაწილეობს ბიოფილმის წარმოქმნაში, რითაც ხელს უწყობს ინფიცირების არეალში პათოგენის ხანგრძლივ გადარჩენას/არსებობას (McConnell, Actis, and Pachón 2013).

*A. baumannii* შტამების ვირულენტობის კიდევ ერთ ფაქტორს წარმოადგენს პორინი - 33-36 kDa ზომის ცილა პორინი (Omp33-36), რომელიც მოქმედებს როგორც წყლის გამტარი არხი და დაკავშირებულია *A. baumannii*-ის ციტოტოქსიურობასთან (Rumbo et al. 2014). omp33-36 გენების დელეციის მქონე შტამში მნიშვნელოვნად შემცირებულია ბაქტერიის ციტოტოქსიურობა, ადჰეზიისა და ადამიანის ფილტვის ეპითელიურ ქსოვილში ინვაზიის უნარი. პორინი ასევე ჩართულია ანტიბიოტიკორეზისტენტობის ჩამოყალიბებაში. *A. baumannii*-ს შტამი JC10/01 რეზისტენტულია იმიპენემისა და მეროპენემის მიმართ. როდესაც ეს შტამი კარგავს Omp33-36 ცილას, მინიმალური მაინჰიბირებელი კონცენტრაცია მეროპენემისა და იმიპენემის მიმართ შესამჩნევად მცირდება (Lee et al. 2017).

*A. baumannii*-ს პათოგენობის კიდევ ერთი განმსაზღვრელი ფაქტორია კაფსულის წარმოქმნა, კერძოდ, მისი შემადგენელი კომპონენტების - კაფსულის პოლისაქარიდისა და ლიპოპოლისაქარიდის ექსპრესია. *A. baumannii*-ს ბევრი იზოლატი შეიცავს გენების კონსერვატიულ კლასტერს, სახელწოდებით K ლოკუსი, რომლის ფუნქციას წარმოადგენს კაფსულის პოლისაქარიდის წარმოქმნა. კაფსულის პოლისაქარიდი განაპირობებს ბაქტერიული შტამების რეზისტენტობას სხვადასხვა ანტიბიოტიკის მიმართ (Geisinger and Isberg 2015). კაფსულის პოლისაქარიდს მოკლებულ მუტანტებს ახასიათებთ დაბალი დოზით რეზისტენტობა პეპტიდური ანტიბიოტიკების მიმართ. გარდა ამისა, ანტიბიოტიკების არსებობა იწვევს კაფსულის პოლისაქარიდის ჰიპერპროდუქციას, რაც, შესაბამისად, ზრდის რეზისტენტობას მასპინძელი ორგანიზმის იმუნური სისტემის მიმართ (Geisinger and Isberg 2015). ანტიბიოტიკის ზემოქმედების შედეგად კაფსულის წარმოქმნა დამოკიდებულია K ლოკუსის გენის გაზრდილ ექსპრესიაზეც, რაც, თავის მხრივ, რეგულირდება BfmRS ორ კომპონენტიანი სისტემით (Geisinger and Isberg 2015). BfmS არის ვირულენტობის ფაქტორი, რომელიც მნიშვნელოვან როლს ასრულებს ბიოფილმების წარმოქმნაში და ეუკარიოტულ უჯრედებზე ადჰეზიაში (Liou et al. 2014). BfmR გენის არსებობა განაპირობებს რეზისტენტობას იმუნური სისტემის კომპონენტის - კომპლემენტის და კლინიკურად მნიშვნელოვანი ანტიბიოტიკების, მეროპენემისა და კოლისტინის მიმართ (Lee et al. 2017).

*A. baumannii*-ს შტამების ვირულენტობის განვითარებაში მნიშვნელოვან როლს ასრულებს ლიპოპოლისაქარიდი (LPS). იგი გრამ-უარყოფითი ბაქტერიების უჯრედგარე მემბრანის მთავარი კომპონენტია და შედგება ენდოტოქსიური ლიპიდისაგან - ლიპიდი A, ოლიგოსაქარიდისაგან და მასთან დაკავშირებული O-ანტიგენისაგან (Geisinger and Isberg 2015). ამ ცილის სხვადასხვა მოდიფიკაციები ხელს უწყობს მიკრობის ისეთი ანტიმიკრობული საშუალებების მიმართ რეზისტენტობას, როგორცაა კოლისტინი.

*A. baumannii* შტამები ასინთეზირებენ ფოსფოლიპაზებს - ფერმენტებს, რომლებიც მნიშვნელოვანია ფოსფოლიპიდური მეტაბოლიზმისათვის და, იმავდროულად, წარმოადგენენ ვირულენტობის ფაქტორს ბევრი ბაქტერიისათვის, როგორებიცაა *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella monocytogenes* და *Clostridium perfringens*. ცილის ჰიდროლიზის მიხედვით ანსხვავებენ სამი კლასის ფოსფოლიპაზებს: PLA, PLC და PLD. მათგან *A. baumannii*-სათვის დამახასიათებელია PLC და PLD ფერმენტების სინთეზი (Lee et al. 2017).

*A. baumannii*-ს პათოგენეზში ჩართულია სფერული ფორმის, 10-300 ნმ დიამეტრის ზომის გარე მემბრანული ვეზიკულები (OMV). ისინი წარმოიქმნებიან გრამ-უარყოფითი პათოგენური ბაქტერიების გარე მემბრანის საშუალებით (Roier et al. 2016). მათ შემადგენლობაში შედის ლიპოპოლისაქარიდები, უჯრედგარე მემბრანა, პერიპლაზმური ცილები, ზოგიერთ შემთხვევაში დნმ და რნმ, ფოსფოლიპიდები, ენდოტოქსინები. OMV-ს გადააქვს სხვადასხვა ვირულენტობის ფაქტორი მასპინძელ უჯრედში და საშუალებას აძლევს პათოგენს, რომ დააზიანოს მასპინძელი უჯრედი ახლო კონტაქტის გარეშე (Lee et al. 2017). შტამი, რომელიც უხვად წარმოქმნის ვეზიკულებს, გაცილებით ვირულენტური და ციტოტოქსიურია, ვიდრე შტამი, რომელიც შედარებით მცირე რაოდენობის ვეზიკულებს წარმოქმნის. აღსანიშნავია, რომ ვეზიკულები ასევე დაკავშირებულნი არიან ანტიბიოტიკო-რეზისტენტობასთან და ასევე განაპირობებენ OXA-24 კარბაპენემაზა გენების ჰორიზონტალურ გადაცემას (Lee et al. 2017).

მიუხედავად იმისა, რომ რკინა უხვადაა გარემოსა და ბიოლოგიურ სისტემებში, სამვალენტო რკინა მიუწვდომელია ბაქტერიებისათვის მისი ცუდი ხსნადობის გამო აერობულ და ნეიტრალური pH-ის პირობებში. აერობული

ბაქტერიები რკინის დეფიციტის შესავსებად ასინთეზირებენ სიდეროფორებს - დაბალი მოლეკულური წონის ნაერთებს (400–1,000 kDa), რომელთაც ახასიათებთ ინტენსიური სწრაფვა რკინასთან დასაკავშირებლად (Lee et al. 2017). *A. baumannii* შტამები ასინთეზირებენ აცინეტობაქტინს, რომელიც წარმოადგენს ვირულენტობის ერთ-ერთ ფაქტორს და ყველაზე კარგად დახასიათებული შერეული ტიპის სიდეროფორია (McConnell, Actis, and Pachón 2013). აცინეტობაქტინის ბიოსინთეზის და სატრანსპორტო ფუნქციის დაქვეითება მნიშვნელოვნად ამცირებს *A. baumannii* ATCC 19606 მიკრობის ეპითელურ უჯრედებში გადარჩენის შესაძლებლობას და მის უნარს გამოიწვიოს უჯრედის დაზიანება ან მასპინძელი ორგანიზმის სიკვდილი (Gaddy et al. 2012).

ასევე ცნობილია, რომ რკინის დეფიციტის დროს იზრდება PLC ფოსფოლიპაზების პროდუქცია, რის შედეგადაც იზრდება მიკრობის ჰემოლიზური აქტივობა (Fiester et al. 2016).

ადამიანის ორგანიზმი შეიცავს კალპროტექტინს, ცილას რომელიც არის თანდაყოლილი იმუნიტეტის შემადგენელი ნაწილი. იგი ხელს უშლის ბაქტერიების ზრდას ორგანიზმში თუთიისა და მანგანუმის იონების შებოჭვის, ანუ ჩელაციის გზით (Lee et al. 2017). მიუხედავად ამისა, *A. baumannii*-ს შტამებს *in vivo* შეუძლიათ გამოიწვიონ დაავადება ამ იმუნური ცილის არსებობის შემთხვევაშიც კი.

თუთიის შეზღუდულ რაოდენობასთან გასამკლავებლად, *A. baumannii* იყენებს თუთიის ათვისების სისტემას (ZnuABC), რომელიც რეგულირდება გარემოში Zn-ის კონცენტრაციის მიხედვით. თუთიის ლიმიტირება ამცირებს იმიპენემის მინიმალურ ინჰიბიტორულ კონცენტრაციას, რადგან კარბაპენემების უმრავლესობა მეტალო-დამოკიდებული ფერმენტებია და საჭიროებენ თუთიას ჰიდროლიზური აქტივობისათვის (Lee et al. 2017). ZnuABC სისტემის გარდა, *A. baumannii* შტამებში აღმოჩენილი და შესწავლილია ახალი თუთიის მეტალოკაპერონი ZigA, რომელიც მჭიდროდ ურთიერთქმედებს თუთიასთან. ZigA თუთიის დეფიციტის პირობებში მნიშვნელოვან როლს ასრულებს ინფექციის გავრცელებაში (Lee et al. 2017).

პათოგენური ბაქტერიების, მათ შორის *A. baumannii*-ის უჯრედების მემბრანაზე განლაგებულია ცილოვანი კომპლექსები სპეციფიური ცილების სეკრეციისთვის, რომლებიც ფუნქციონირებენ როგორც ვირულენტობის ფაქტორები

(Lee et al. 2017). ეს კომპლექსები მონაწილეობენ პერიპლაზმური სივრციდან უჯრედგარე სივრცეში ცილების გადატანის პროცესში, დნმ-ის კონიუგაციაში, ბიოფილმების ფორმირების პროცესებში (Lee et al. 2017).

პენიცილინ-დამაკავშირებელი ცილები (PBP) განაპირობებენ ბაქტერიული უჯრედის რეზისტენტობას ბეტა-ლაქტამური ანტიბიოტიკების მიმართ. PBP7/8 ცილა წარმოადგენს *A. baumannii*-ს ვირულენტობის ერთ-ერთ ფაქტორს და იგი კოდირებულია *pbpG* გენის მიერ. დადგენილია, რომ PBP7/8-ის დაკარგვა გავლენას ახდენს ბაქტერიული უჯრედის პეპტიდოგლიკანის სტრუქტურაზე, რამაც შეიძლება გამოიწვიოს მგრძობელობის გაზრდა მასპინძლის იმუნური თავდაცვის ფაქტორების მიმართ (Lee et al. 2017).

#### 1.4. მიკროორგანიზმის *Klebsiella pneumoniae* დახასიათება

*Enterobacteriaceae* ოჯახის წარმომადგენელი გრამ-უარყოფითი, კაფსულა წარმომქმნელი, ლაქტოზა-მაფერმენტებელი *Klebsiella*-ს გვარის სახეობები ფართოდ არიან გავრცელებულნი ნიადაგში, ჩამდინარე წყლებში, მცენარეებზე, ასევე მუშუმწოვრების - ცხენის, ღორის - ლორწოვან გარსებზე. ისინი ასევე გვხვდება ჯანმრთელი ადამიანის საჭმლის მომწოდებელ ტრაქტში, რესპირატორულ და შარდ-სასქესო სისტემებში (Podschun and Ullmann 1998).

*Klebsiella*-ს გვარი *Gammaproteobacteria* კლასის წარმომადგენელია, მიეკუთვნება *Enterobacteriales*-ს რიგს, *Enterobacteriaceae* ოჯახს და მოიცავს კლინიკური მნიშვნელობის ოთხ სახეობას. მათგან ყველაზე ფართოდ გავრცელებული სახეობა არის *Klebsiella pneumoniae*.

*K. pneumoniae* არის როგორც საზოგადოებაში გავრცელებული პნევმონიისა და ბაქტერიემიის, ასევე ჰოსპიტალური ინფექციების მნიშვნელოვანი გამომწვევი (დაახლოებით 56%) (<https://www.canada.ca/en/public-health/services/laboratory-biosafety-biosecurity/pathogen-safety-data-sheets-risk-assessment/klebsiella.html>). ეს პათოგენი განსაკუთრებით დიდ პრობლემას წარმოადგენს ნეონატალური ინტენსიური თერაპიის განყოფილებებში, სადაც, ზოგ შემთხვევაში, სიკვდილიანობა 70%-ს აღწევს. *K. pneumoniae* იწვევს ადრეული და გვიანი სტადიის სეფსისს, კონიუნქტივიტს, ჰოსპიტალური წარმოშობის პნევმონიას, საშარდე გზების ინფექციებს და ქირურგიული ჩარევის შედეგად განვითარებულ ინფექციებს (Podschun and Ullmann 1998).

*K. pneumoniae*-ს ინფექციებთან დაკავშირებული ზოგიერთი ეპიდემიოლოგიური რისკ-ფაქტორი მოიცავს ისეთ სოციო-დემოგრაფიულ ფაქტორებს, როგორცაა სქესი, ასაკი, ჰოსპიტალიზაციის სტატუსი, ადგილობრივი წყალი (მდინარე, წვიმა, წყლის მილები), არასწორი კვება, სარეცხი საშუალებების და ანტისეპტიკების ხშირი და არასწორი გამოყენება (Effah et al. 2020).

მიკრობთა გენომის ბოლოდროინდელმა კვლევებმა აჩვენა, რომ *Klebsiella*-ს ვირულენტური და მრავლობით რეზისტენტული (MDR-მრავლობით რეზისტენტობა სამკურნალო საშუალებების მიმართ) კლონები შეიცავენ ვირულენტობისა და ანტიმიკრობული რეზისტენტობის გენების მრავალფეროვნებას. ამ გენებს in vivo



იოლად შეუძლიათ ბაქტერიული უჯრედიდან უჯრედზე გადასვლა და ხელს უწყობენ უკიდურესად რეზისტენტული, ჰიპერვირულენტური *K. pneumoniae*-ს კლონების წარმოქმნას. ასეთი შტამები ჯანმრთელ ადამიანებშიც კი ძნელად სამკურნალო ინფექციებს იწვევენ. შესაბამისად, აშშ-ს დაავადებების კონტროლისა და პრევენციის ცენტრი (CDC)-ს და ჯანმრთელობის მსოფლიო ორგანიზაციის (WHO) მიერ MDR *K. pneumoniae* მოიხსენიება, როგორც "გადაუდებელი საფრთხე ადამიანის ჯანმრთელობისთვის" (Bengoechea 2016).

ევროპასა და შეერთებულ შტატებში ჩატარებული კვლევის შედეგების მიხედვით, ანტიბიოტიკების მიმართ *K. pneumoniae*-ს შტამების რეზისტენტობის დიაპაზონი ფართოა და მოიცავს პრეპარატებს: ცეფტაზიდიმი (92-95%), ცეფტრიაქსონი (96-98%), ცეფოტაქსიმი (96%), პიპერაცილინ-ტაზობაქტამი (90-97%), იმიპენემი (98-100%), გენტამიცინი (95-96%), ამიკაცინი (98-99%), ტრიმეთოპრიმ-სულფამეტოქსაზოლი (88-90%). ამასთან, ინდოეთის სუბ-კონტინენტზე, ინტენსიური თერაპიის განყოფილებებიდან გამოყოფილია *K. pneumoniae* შტამების პან-რეზისტენტული (ყველა ჯგუფის ანტიბიოტიკის მიმართ რეზისტენტული ბაქტერია) იზოლატები (Kumarasamy et al. 2010). ზოგიერთი ანტიმიკრობული პრეპარატი, მაღალი ტოქსიკურობისა და სერიოზული გვერდითი მოვლენების გამო, ამოღებულია ინფექციების სამკურნალო თერაპიის სქემიდან. შედეგად, კიდევ უფრო შემცირდა იმ ანტიბიოტიკების რაოდენობა, რომელთა გამოყენება წარმატებითაა შესაძლებელი *Klebsiella*-ს წინააღმდეგ. ამ მდგომარეობას ართულებს ის ფაქტიც, რომ მსოფლიოში აღინიშნება ფართო სპექტრის ბეტა-ლაქტამაზების (ESBL) მაპროდუცირებელი *K. pneumoniae*-ს შტამების გავრცელება (Bengoechea 2016).

ევროპაში მეტადაა გავრცელებული SHV-5 ტიპის ბეტა-ლაქტამაზა მაპროდუცირებელი, ცეფტაზიდიმ-რეზისტენტული *K. pneumoniae*-ს შტამები. ხოლო TEM-10 და TEM-12 ტიპის ფერმენტების პროდუქცია კი ახასიათებთ შტამებს, რომლებიც ძირითადად ამერიკის შეერთებულ შტატებში ცირკულირებენ. ESBL ფერმენტების მაპროდუცირებელი გენები ძირითადად პლაზმიდითაა კოდირებული. რადგანაც პლაზმიდების გადაცემა *Enterobacteriaceae* ოჯახის სახეობებში საკმაოდ ხშირია, შესაბამისად, მაღალია რეზისტენტული გენების შემცველი შტამების რიცხვიც. ESBL მაპროდუცირებელი იზოლატები რეზისტენტულნი არიან სხვადასხვა

კლასის ანტიბიოტიკების მიმართ. 1997 წლის მონაცემებით ESBL მაპროდუცირებელი *Klebsiella*-ს შტამები მგრძნობიარენი იყვნენ ისეთ კარბაპენემებზე, როგორცაა იმიპენემი ან მეროპენემი, თუმცა მოგვიანებით გამოჰყვეს იმიპენემ-რეზისტენტული შტამებიც, რომლებიც შეიცავენ პლაზმიდით კოდირებულ AmpC ტიპის ბეტა-ლაქტამაზებს (Bradford et al. 1997).

*Klebsiella*-ს ვირულენტობის ძირითადი განმსაზღვრელი ფაქტორია კაფსულა, კერძოდ კაფსულის პოლისაქარიდი (K ანტიგენი). კაფსულის შემადგენელი ერთეულები, რომლებიც წარმოადგენენ 4-6 შაქრის მოლეკულებს და ხშირად შარდმჟავას, შეიძლება კლასიფიცირდენ 77 სეროლოგიურ ტიპად (Ørskov and Ørskov 1984). კაფსულა შექმნილია ფიბრილური სტრუქტურების სქელი კონებისაგან, რომელიც ფარავს ბაქტერიის ზედაპირს. კაფსულა იცავს ბაქტერიას პოლიმორფულბირთვიანი გრანულოციტების ფაგოციტოზისაგან და მასპინძელი ორგანიზმის ანტიბაქტერიული შრატის ბაქტერიოციდული მოქმედებისაგან (Williams et al. 1983). 77 სეროლოგიურ ჯგუფს შორის K1, K2, K4 და K5 კაფსულის სეროტიპის *Klebsiella*-ს შტამები განსაკუთრებული ვირულენტობით გამოირჩევიან.

ინფექციური პროცესის პირველი ნაბიჯია მიკროორგანიზმის მაქსიმალურად მიახლოება მასპინძელი ორგანიზმის ლორწოვან ზედაპირთან და შემდგომ მასზე ადჰეზია. *Enterobacteriaceae* ოჯახის წარმომადგენლების ადჰეზიური შესაძლებლობები განპირობებულია სხვადასხვა ტიპის პილების არსებობით. მათი სიგრძე დაახლოებით 10 მმ-ია, ხოლო დიამეტრი - 1-დან 11 ნმ-მდე (Ofek, Sharon, and Abraham 2006). პილები ახდენენ ერთროციტების აგლუტინაციას. *Enterobacteriaceae* ოჯახის სახეობებში სხვადასხვა ტიპის პილებია აღწერილი. მათგან, *Klebsiella*-ს სახეობებში დომინანტურია ორი ტიპი: ტიპი I და ტიპი III. I ტიპის პილები არიან მანოზა-სენსიტიური და ასრულებენ მნიშვნელოვან როლს მასპინძელ ორგანიზმში კოლონიზაციის პროცესში. ასეთი შტამები ძირითადად ჩართულნი არიან საშარდე გზების ინფექციებში და პიელონეფრიტის პათოგენეზში. III ტიპის პილები არიან მანოზა-რეზისტენტულნი. *K. pneumoniae*-ს შტამები, რომლებიც ახდენენ III ტიპის პილების ექსპრესიას, ემაგრებიან მასპინძელი ორგანიზმის ენდოთელიარულ უჯრედებზე, სასუნთქი გზების ეპითელიუმზე და უროეპითელიარულ უჯრედებზე.

მიკროოგანიზმი *Klebsiella*-ს ვირულენტობის განმსაზღვრელ კიდევ ერთ ფაქტორს წარმოადგენს ლიპოპოლისაქარიდი (LPS). ბევრ ორგანიზმს, მათ შორის ადამიანებს, აქვთ LPS-ის ამომცნობი სისტემა, რომელიც წარმოადგენს ანტიმიკრობული იმუნიტეტის მნიშვნელოვან ნაწილს. ამ სისტემაში შედის ადამიანის კომპლემენტის სისტემა. არსებობს ორი ჰიპოთეზა იმის შესახებ, თუ როგორ შეიძლება მოახერხოს ბაქტერიამ *Klebsiella*- კომპლემენტის სისტემისაგან თავდაცვა. პირველი ჰიპოთეზის მიხედვით, ლიპოპოლისაქარიდის შენიღბვა ხდება მისი კაფსულის პოლისაქარიდით დაფარვის გზით. ამის გამო LPS შეუმჩნეველი ხდება კომპლემენტისათვის (ანუ არ ხდება კომპლემენტის აქტივაცია). მეორე ჰიპოთეზის თანახმად, LPS-ის O გვერდითი ჯაჭვი შეიძლება მოხვდეს კაფსულის შრეებს შორის, რასაც კვლავ იმ შედეგამდე მივყავართ, რომ ლიპოპოლისაქარიდი ვეღარ ააქტიურებს კომპლემენტს (Podschun and Ullmann 1992).

მასპინძელ ქსოვილში ბაქტერიების ზრდის შეფერხება ხდება არა მხოლოდ მასპინძელი ორგანიზმის თავდაცვის მექანიზმებით, არამედ მისი უნარით კონკურენცია გაუწიოს მიკრობს ხელმისაწვდომი რკინის იონების ათვისებაში. რკინა წარმოადგენს ბაქტერიების ზრდის მნიშვნელოვან ფაქტორს, რომელიც მონაწილეობს ჟანგბადისა და ელექტრონების სატრანსპორტო პროცესში. მასპინძელ ორგანიზმში რკინა გვხვდება ისეთი ნაერთების შემადგენლობაში, როგორებიცაა ჰემოგლობინი, ფერიტინი, ჰემოსიდერინი, მიოგლობინი, ლაქტოფერინი და ტრანსფერინი. შესაბამისად, ბაქტერიებისთვის ადვილად ხელმისაწვდომი რკინის იონები მხოლოდ დაბალი კონცენტრაციითაა წარმოდგენილი.

იმისათვის, რომ მიკრობმა კონკურენცია გაუწიოს მასპინძელ ორგანიზმს რკინის იონების ათვისებაში, ბაქტერია ახდენს სპეციალური დაბალმოლეკულური ნაერთების - ჩელატორი-სიდეროფორის სინთეზს, რომელთაც შეუძლიათ მასპინძელი ორგანიზმიდან რკინის გამოდევნა და მიერთება. *Klebsiella*-ს სახეობებში ორი ტიპის სიდეროფორები გვხვდება: ფენოლატის ტიპის და ჰიდროქსამატის ტიპის. მათგან უფრო გავრცელებულია ფენოლატის ტიპის სიდეროფორები, კონკრეტულად ენტერობაქტინი, რომელიც ასევე ცნობილია, როგორც ენტეროჩელინი. თუმცა, უფრო მნიშვნელოვან სიდეროფორებად მიიჩნევა ფერიქრომი, ფერიოქსამინი და აერობაქტინი. აერობაქტინთან შედარებით, ენტერობაქტინი უფრო ძლიერად

იკავშირებს სამვალენტთან რკინის იონს, მაგრამ მრავალი ფიზიკური უპირატესობის გამო, როგორებიცაა სტაბილურობა და უკეთესი ხსნადობა, აერობაქტინი გაცილებით ეფექტურია, ვიდრე ენტერობაქტინი. მეტიც, აერობაქტინი, მას შემდეგ რაც რკინას სრულად მიაწვდის მიკრობულ უჯრედს, ჰიდროლიზდება ესტერაზას მიერ, ხოლო ენტერობაქტინის ხელახლა გადამუშავება ხდება ყოველ ჯერზე რკინის ტრანსპორტირებისას. *Klebsiella*-ს ის სახეობები, რომლებიც არ ასინთეზირებენ ენტერობაქტინს, არიან ისეთივე ვირულენტურები, როგორც ის იზოლატები, რომლებსაც აქვთ ამ სიდეროფორის სინთეზის უნარი (Podschun and Ullmann 1992).

## 1.5. ბაქტერიოფაგები

### 1.5.1. ფაგოთერაპიის ისტორია

ანტიბიოტიკების მიმართ ბაქტერიების რეზისტენტობის გლობალურმა გავრცელებამ და მრავლობით ანტიბიოტიკო-რეზისტენტულ ბაქტერიულ შტამებზე მოქმედი ახალი კლასის ანტიბიოტიკების შემუშავების სირთულემ წარმოშვა ბაქტერიული ინფექციების მკურნალობისათვის ახალი, ანტიბიოტიკებისაგან განსხვავებული, ალტერნატივის ძიების აუცილებლობა. ამ თვალსაზრისით, ბაქტერიოფაგების თერაპიული გამოყენება წარმოადგენს საიმედო და უსაფრთხო ალტერნატიულ სტრატეგიას; განსაკუთრებით, MDR ბაქტერიებთან ასოცირებული ინფექციების შემთხვევაში.

ფაგოთერაპიის ფუძემდებლად ითვლება კანადური წარმოშობის ფრანგი მეცნიერი ფელიქს დერელი. დერელამდე რამდენიმე წლით ადრე, ინგლისელმა მეცნიერმა, ერნესტ ჰანკინმა 1896 წელს ინდოეთის ერთ-ერთ მდინარეში აღმოაჩინა ბიოლოგიური „ორგანიზმები“, რომლებსაც ქოლერის გამომწვევი ბაქტერიების საწინააღმდეგო ანტიბაქტერიული თვისებები გააჩნდათ (Taati Moghadam et al. 2020). მოგვიანებით, მსგავსი ფენომენი აღწერა ფრედერიკ ტუორტმა (1915). მან ბაქტერიების კულტივირებისას შეამჩნია, რომ ბაქტერიას ანადგურებდა გამჭვირვალე, მცირე ზომის „ორგანიზმი“ (Twort 1936). ორი წლის შემდგომ (1917), ფელიქს დერელმა თავის ექსპერიმენტებში აღწერა „ანტიშიგელური მიკრობი“, რომელიც გამოყო *Shigella*-თი დაავადებული პაციენტის ფეკალური მასიდან. დერელი დაინტერესდა „ორგანიზმით“, რომელიც ახდენდა ბაქტერიის ლიზისს და წამოაყენა ჰიპოთეზა, რომ ეს შესაძლოა ყოფილიყო ბაქტერიის ვირუსი - „ბაქტერიის მჭამელი“ (Taati Moghadam et al. 2020). მოგვიანებით, აღნიშნული ჰიპოთეზა დადასტურდა. მე-20 საუკუნის დასაწყისში დერელმა დაიწყო ბაქტერიის ვირუსებით პაციენტების მკურნალობა. ამის შესახებ მან ცნობები გამოაქვეყნა არაერთ ნაშრომში. 1931 წელს, დერელმა რეკომენდაცია გაუწია ინვაზიური ინფექციების ინტრავენური ფაგებით მკურნალობას (D’Herelle 2007). ამის შემდგომ ფაგებით მკურნალობამ დიდი ინტერესი გამოიწვია, მაგრამ ძალიან მცირე ინფორმაცია იყო თავისთავად ფაგის ბუნების შესახებ ცნობილი. ელექტრონული მიკროსკოპის გამოგონებამ შესაძლებელი

გახდა ფაგის ვიზუალიზაცია. გერმანელი ექიმი ჰელმატ რუსკა იყო პირველი, რომელმაც 1940 წელს ნახა ბაქტერიოფაგის ვირიონის მორფოლოგია. აღწერილი იქნა ფაგის მიერ ბაქტერიული უჯრედის ლიზისის სხვადასხვა სტადიები, ადსორბციიდან დაწყებული, ახლადწარმოქნილი ფაგური ნაწილაკების რაოდენობის განსაზღვრის ჩათვლით (Burrowes et al. 2011; Wittebole, De Roock, and Opal 2014). ანტიბიოტიკების აღმოჩენამ და გამოყენებამ ინფექციების წინააღმდეგ შეაფერხა ფაგოთერაპიის წინსვლა. ანტიბიოტიკების წარმატებამ გარკვეულწილად გადაფარა ფაგოთერაპიის საჭიროება. მრავალი კვლევა გამოქვეყნდა ბაქტერიოფაგების გამოყენების და მათი სარგებლის შესახებ. მაგრამ, ანტიბიოტიკების მაღალი ეფექტურობის, ასევე ფაგების არასაკმარისი შესწავლის გამო, გამოქვეყნებულმა შრომებმა ვერ დაარწმუნა მსოფლიო ფაგის ეფექტურობასა და უსაფრთხოებაში.

ფაგების მიმართ ინტერესის განახლება გამოიწვია მსოფლიოში ანტიბიოტიკების მიმართ რეზისტენტული შტამების ფართოდ გავრცელებამ. მას შემდეგ, რაც ფართოდ გავრცელდა MDR (Multidrug Resistance - მრავლობით რეზისტენტული სამკურნალო საშუალებების მიმართ), XDR (Extensively drug Resistant- ფართოდ რეზისტენტული სამკურნალო საშუალებების მიმართ) და PDR (Pandrug resistant-სრულად რეზისტენტული სამკურნალო საშუალებების მიმართ) ბაქტერიები, ფაგების გამოყენება თერაპიული თვალსაზრისით კვლავ აქტუალური გახდა (Taati Moghadam et al. 2020).

### 1.5.2. ბაქტერიოფაგების უპირატესობა ანტიბიოტიკებთან შედარებით

ბაქტერიოფაგებს გარკვეული უპირატესობა გააჩნიათ ანტიბიოტიკებთან შედარებით:

- ბაქტერიოფაგები არიან ბუნებრივი ანტიბაქტერიული თვისების მქონე საშუალებები, რომლებიც წარმატებით ებრძვიან როგორც გრამ-დადებით, ასევე გრამ-უარყოფით ბაქტერიებს.

- მათი გავრცელების არეალი ფართოა და გარემოდან მათი გამოყოფა არ არის დაკავშირებული დიდ ფინანსურ ხარჯებთან.

- ფაგებს ფაქტობრივად არ გააჩნიათ გვერდითი ეფექტები, რადგან მათი გავრცელების გამო ადამიანს ყოველდღიურად შეხება აქვს ფაგებთან, შესაბამისად, ისინი არ წარმოადგენენ „უცხო“ სხეულს ადამიანის ორგანიზმისათვის (Pabary et al. 2016).

- ფაგების გამოყენებისას გვერდითი მოვლენების არარსებობა ასევე გამოწვეულია მათი სპეციფიურობით სამიზნე მიკროორგანიზმის მიმართ. სპეციფიურობა შესაძლებელია ვრცელდებოდეს როგორც სახეობის, ასევე შტამის დონეზეც. განსხვავებით ანტიბიოტიკისგან, ფაგის სპეციფიურობის გამო არ ზიანდება ნორმალური მიკროფლორა (Nobrega et al. 2015).

- სამიზნე პათოგენის არსებობის დროს, ფაგის გამრავლებისას ხდება ფაგის კონცენტრაციის მატება, რაც ხელს უშლის პათოგენის გავრცელებას.

- ფაგი ადვილად აღწევს და გადაადგილდება ორგანიზმში, განსაკუთრებით ისეთ ორგანოებში, რომლებიც სხვა პრეპარატებისათვის ადვილად ხელმისაწვდომი არ არის, რაც აიოლებს ინფექციების მკურნალობას (Taati Moghadam et al. 2020).

- ფაგების კიდევ ერთ უპირატესობას წარმოადგენს ის, რომ ანტიბიოტიკების მიმართ ბაქტერიების რეზისტენტობა არ ახდენს გავლენას ფაგო-მგრძნობელობაზე.

- ისევე, როგორც ანტიბიოტიკების, ფაგების მიმართაც ხდება რეზისტენტობის განვითარება. თუმცა, განსხვავებით ანტიბიოტიკისგან, ბაქტერია მგრძნობიარე რჩება სხვა ფაგის მიმართ, რომელიც უჯრედის ზედაპირზე განსხვავებულ რეცეპტორს უკავშირდება (Nobrega et al. 2015).

- მედიცინისათვის დიდ პრობლემას წარმოადგენს ბაქტერიების მიერ ბიოფილმების წარმოქმნის უნარი. ამ მხრივაც ფაგს აქვს მეტი უპირატესობა, რადგან

მას აქვს უნარი, დაშალოს ბიოფილმების ეგზოპოლისაქარიდის მატრიქსი და მიაღწიოს პლანქტონურ უჯრედამდე. ასევე, ზოგიერთი ფაგის წანაზარდზე ასოცირებული დეპოლიმერაზები წარმატებით ახდენენ ბიოფილმების მატრიქსის დეგრადაციას (Luong, Salabarria, and Roach 2020).

### 1.5.3. ბაქტერიოფაგების კლასიფიკაცია

ბაქტერიოფაგები ვირუსების ყველაზე ფართო ჯგუფს შეადგენენ ცოცხალ სამყაროში. მათი გავრცელების არეალი ფართოა: ჰაერი, ნიადაგი, წყალი, განსაკუთრებით ჩამდინარე წყლები.

მრავალი წლის განმავლობაში მეცნიერები ცდილობდნენ ფაგების კლასიფიკაციას სხვადასხვა ნიშნის მიხედვით. 1948 წელს, ფრენსის ოლივერ ჰოლმსის მიერ ბაქტერიოფაგების პირველ კლასიფიკაციას საფუძვლად დაედო პატრონი ბაქტერიული უჯრედების წრე და მათ მიერ გამოწვეული დაავადებების სიმპტომები.

1967 წელს ბრედლიმ ფაგები დაყო 6 ჯგუფად: ფაგები კუმშვადი წანაზარდით, მოკლე წანაზარდიანი ფაგები, კუბური ფორმის ფაგები, ერთძაფიანი დნმ-ის შემცველი ფაგები, რნმ-ის შემცველი ფაგები და ძაფისებრი (ფილამენტური) ფაგები.

1969 წელს ბრედლიმ, ორჯაჭვიანი დნმ-ის შემცველი წანაზარდიანი ფაგები დაყო სამ ჯგუფად წანაზარდის მორფოლოგიური მახასიათებლების მიხედვით:

1. *Myoviridae* - ბაქტერიული ვირუსები გრძელი, კომპლექსური, კუმშვადი წანაზარდით.
2. *Podoviridae* - ფაგები მოკლე წანაზარდით.
3. *Siphoviridae* - ფაგები გრძელი, არაკუმშვადი წანაზარდით.

1983 წელს, აკერმანმა ბაქტერიოფაგები განაღვა 190 ტაქსონომიურ ერთეულში, რომლებიც მოიცავს 2000 ფაგს (H. W. Ackermann and Eisenstark 1974; H.-W. Ackermann 2003). ეს კლასიფიკაცია არ იყო სრული, რადგან ცალკეული ფაგები თუ ფაგების ჯგუფები მხოლოდ ძალიან მარტივი მახასიათებლის მიხედვით იქნა ჩათვლილი სახეობებად.



ბაქტერიული ვირუსების თანამედროვე კლასიფიკაციის მნიშვნელოვან კრიტერიუმს წარმოადგენს ნუკლეინის მჟავას ტიპი და მოლეკულური მასა; ვირიონის ულტრასტრუქტურა; ბინარული სიმეტრია, კუბური, ჰელიკალური, ფილამენტური ან პლეომორფული; ანტიგენური თვისებები; პატრონი უჯრედების სპექტრი და რეპროდუქციის პირობები.

ახალი მონაცემებით, ტერმინი „ფაგი“ ჩანაცვლებულია ტერმინი „ვირუსით“ (Lefkowitz et al. 2018). ბაქტერიების მაინფიცირებელი ვირუსების კლასიფიკაციის სტრუქტურაში შეტანილი ცვლილებების თანახმად (Krupovic et al. 2021), ბაქტერიოფაგები გაერთიანებულია *Caudovirales* რიგში, რომელიც 2021 წლის რატიფიცირებული (MSL#36) კლასიფიკაციის მიხედვით მოიცავს 14 ოჯახს (<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>).

*Caudovirales* რიგის ბაქტერიოფაგები ხასიათდებიან - ბინარული სიმეტრიის მქონე კუბური ან იკოსაედრული ფორმის თავით, რომელშიც სუპერსპირალურად განთავსებულია ორძაფიანი დნმ-ის მაკრომოლეკულა; კუმშვადი ან უკუმშვადი წანაზარდით; ბაზალური ფირფიტით; კუდის ფიბრილებით; ტერმინალური მორჩები და სხვ.

#### 1.5.4. ბაქტერიოფაგების სასიცოცხლო ციკლი

ფაგები სასიცოცხლო ციკლის მიხედვით იყოფა ორ ჯგუფად: ვირულენტური და ზომიერი ფაგები. ფაგების რეპროდუქციული ციკლის პარამეტრები განსაზღვრულია ფაგის გენომით. ზომიერი ფაგები არ წარმოადგენს სასურველ კადიდატს ფაგოთერაპიისათვის, რადგან მათი გენომი შეიცავს ლიზოგენურობასთან დაკავშირებულ გენებს: ინტეგრაზებს, ბაქტერიულ ვირულენტურ ფაქტორებს, ტოქსინებისა და ანტიბიოტიკების მიმართ რეზისტენტობის განმსაზღვრელ გენებს (Luong, Salabarria, and Roach 2020).

ვირულენტური ფაგის რეპროდუქციული ციკლი მოიცავს რამდენიმე თანმიმდევრულ ეტაპს (Kellenberger 1961): ა) თავისუფალი ფაგური ნაწილაკების დიფუზია და ინფიცირებისათვის მგრძობიარე, სამიზნე ბაქტერიის ძიება; ბ) ვირიონის ადსორბცია ბაქტერიული უჯრედის სპეციფიურ რეცეპტორზე;

რეცეპტორების რიცხვი და ბუნება, რომლებზედაც ხდება ფაგების ადსორბირება, სხვადასხვა ფაგებისათვის განსხვავებულია. ბაქტერიულ უჯრედზე შეიძლება ადსორბირდეს ფაგის რამდენიმე ასეული ნაწილაკი, თუმცა ფაგის გამრავლებისა და მასპინძელი ბაქტერიული უჯრედის ლიზისისათვის საკმარისია ერთი ვირიონის წარმატებული დაკავშირება. გ) უჯრედში შეჭრა - ფაგის გენომის გადატანა ბაქტერიული უჯრედის ციტოპლაზმაში; დ) ეკლიპსის პერიოდი, როდესაც სინთეზირდება ფაგის ცილები და ნუკლეინის მჟავა, მაგრამ არ არის ჯერ წარმოქმნილი ფაგის ნაწილაკები. ეკლიპსის პერიოდი გრძელდება ინფიცირებულ უჯრედში პირველი მომწიფებული ვირიონის წარმოქმნამდე; ე) ვირიონების სტრუქტურის აწყობა და ფაგების მომწიფებული ახალი თაობის ჩამოყალიბება, რომელიც მთავრდება უჯრედის ლიზისით და ფაგების ახალი თაობის გამოთავისუფლებით. წარმოქმნილი ფაგური ნაწილაკები ახდენენ ახალი ბაქტერიული უჯრედების ინფიცირებას და იმეორებენ სასიცოცხლო ციკლს.

ფაგის გამრავლების პროცესში „ლატენტური პერიოდი“ მოიცავს ეკლიპსის პერიოდს და გრძელდება ბაქტერიული უჯრედიდან მომწიფებული ფაგების გამოსვლამდე (Abedon, et al. 2001). რეპროდუქციის თანმიმდევრული ეტაპების ერთობლიობა შეადგენს ფაგის ლიზისის დროს, რომელიც ერთ ინფიცირებულ უჯრედში მომწიფებული ფაგების რაოდენობასთან ერთად („ფაგის გამოსავალი“) განსაზღვრავს ფაგის გამრავლების ციკლს.

### 1.5.5. ფაგო-რეზისტენტობა ბაქტერიებში

მიკროორგანიზმებს შემუშავებული აქვთ მთელი რიგი თავდაცვითი მექანიზმები ფაგების საწინააღმდეგოდ: რესტრიქცია-მოდიფიკაციის სისტემები, კლასტერებად განლაგებული მოკლე პალინდრომული განმეორებები (CRISPR), კაფსულის წარმოქმნა, პროფაგთან ასოცირებული ცილები, მეთილირება, აბორტული სისტემები და ა.შ. რეზისტენტობის ეს ფორმები განსხვავებულია ანტიბიოტიკების მიმართ განვითარებული რეზისტენტობისგან.

ფაგების მიმართ განვითარებული რეზისტენტობის ერთ-ერთ მექანიზმს წარმოადგენენ რესტრიქცია-მოდიფიკაციის სისტემაში ჩართული ენდონუკლეაზები, რომლებიც ახდენენ ბაქტერიულ უჯრედში შეჭრილი ვირუსული ნუკლეინის მჟავას ფრაგმენტირებას. ამით ხელს უშლიან ფაგის დნმ-ის რეპლიკაციას და შესაბამისად, ვირუსის ახალი თაობის ფორმირებას.

გარდა რესტრიქცია-მოდიფიკაციის სისტემებისა, ბაქტერიებმა ფაგების მიმართ განვითარეს იმუნიტეტი, რომელიც ცნობილია CRISPR (კლასტერებად განლაგებული მოკლე პალინდრომული განმეორებები) სისტემის სახელით. ეს სისტემაც პასუხისმგებელია ბაქტერიის მიერ ამოცნობილი ფაგური დნმ-ის განადგურებაზე (Rohde et al. 2018; Drulis-Kawa et al. 2012).

ზოგიერთ ბაქტერიულ სახეობას, იმის მიხედვით თუ რომელი ბიოლოგიური ნიშა უკავია, სჭირდება კაფსულის წარმოქმნა, რათა თავი გადაირჩინოს გარემოს არახელსაყრელ პირობებში. წარმოქმნილი კაფსულა ფარავს უჯრედის კედლის ზედაპირზე არსებულ რეცეპტორებს, რომელთაც ფაგის ადსორბციული აპარატი ვეღარ ამოიცნობს და ვეღარ უკავშირდება (Labrie, Samson, and Moineau 2010; Sekulovic et al. 2015). ზოგჯერ, უჯრედის კედლის ზედაპირზე რეცეპტორის წარმოქმნის პროცესი ძალიან ნელა მიმდინარეობს, რაც ასევე ხელს უწყობს ფაგების მიმართ რეზისტენტული ფორმების ჩამოყალიბებას (Chapman-McQuiston and Wu 2008).

ბაქტერიების ციტოპლაზმაში აკუმულირებულია ისეთი ცილები, რომლებიც ხელს უშლიან ფაგის დნმ-ის უჯრედში შეჭრას. ზოგჯერ ეს ცილები დაკავშირებულნი არიან პროფაგთან (პროფაგი არის ბაქტერიოფაგის გენომი, რომელიც ინტეგრირებულია წრიულ ბაქტერიულ დნმ-ის ქრომოსომაში ან არსებობს ექსტრაქრომოსომული პლაზმიდის სახით), რომელიც ამავე ბაქტერიულ უჯრედშია.

ბაქტერია, რომელიც ზომიერი ფაგის მატარებელია, რეზისტენტული ხდება სხვა ფაგით ინფიცირების მიმართ (Labrie, Samson, and Moineau 2010).

ერთ-ერთი მექანიზმი, რომელსაც ბაქტერია იყენებს ფაგებისაგან თავდასაცავად არის ბაქტერიული დნმ-ის იმ უბნების მეთილირება, სადაც უნდა მომხდარიყო ფაგური დნმ-ის ინტეგრირება. მეთილირებულ დნმ-ს ფაგის დნმ ვეღარ უკავშირდება და ამ გზით ხდება ფაგური დნმ-ის რეპლიკაციის ბლოკირება (Bhushan 2018).

აბორტულ სისტემას ბაქტერია იყენებს იმისთვის, რომ შეამციროს ფაგით ინფიცირება ბაქტერიულ პოპულაციაში (Chopin, Chopin, and Bidnenko 2005). ამ მექანიზმით ხდება ბაქტერიული უჯრედის ნაადრევი ლიზისი ფაგით ინფიცირების დროს. ბაქტერიის ლიზისთან ერთად წყდება ფაგის გამრავლების პროცესიც, რითაც ხდება სხვა ბაქტერიული უჯრედების დაცვა ვირუსით ინფიცირებისგან (Chopin, Chopin, and Bidnenko 2005).

მიუხედავად ზემოთ ჩამოთვლილი ფაქტორებისა, ფაგებს შეუძლიათ გადალახონ მათ მიმართ განვითარებული რეზისტენტობის მექანიზმები. მაგალითად, ბაქტერიის რესტრიქცია-მოდიფიკაციური სისტემის მიმართ ფაგს განვითარებული აქვს ე.წ. ანტირესტრიქციული სტრატეგია (პასიური და აქტიური მექანიზმები). როდესაც ფაგის დნმ შეაღწევს ბაქტერიულ უჯრედში, მას იცავს ე.წ. პასიური მექანიზმები, ხდება ფაგური გენომის მოდიფიცირება, მანამ ვიდრე მოხდება მისი ამოცნობა რესტრიქტაზების მიერ. აქტიური მექანიზმის დროს ფაგის დნმ-თან ერთად უჯრედში შედის ისეთი ცილები, რომლებიც ნიღბავენ ფაგის დნმ-ის იმ საიტებს, რომლებსაც ამოიცნობს მასპინძლის რესტრიქცია-მოდიფიკაციის სისტემა (Taati Moghadam et al. 2020). როდესაც მასპინძელი ბაქტერია რეცეპტორის შეცვლის გზით ცდილობს თავიდან აიცილოს ფაგით ინფიცირება, ფაგი ამოიცნობს შეცვლილ რეცეპტორს და მისი ადსორბციული აპარატი ცდილობს მოერგოს შეცვლილ რეცეპტორს. როდესაც ბაქტერია კავსულის წარმოქმნით ან სხვა ეგზოპოლისაქარიდის საშუალებით „მაღავს“ რეცეპტორს რათა თავი დააღწიოს ვირუსს, ბაქტერიოფაგი ახდენს ამ ბარიერების ჰიდროლიზს სხვადასხვა ფერმენტების საშუალებით (ენდოსიალიდაზა, ჰიალურონანლიაზა, ეგზოპოლისაქარიდის მადეგრადირებელი ფერმენტები).

### 1.5.6. *Acinetobacter baumannii*-ს და *Klebsiella pneumoniae*-ს ბაქტერიების

#### მიმართ აქტიური ფაგები

*A. baumannii*-ს და *K. pneumoniae*-ს მიმართ აქტიური ბაქტერიოფაგები გამოყოფილია გარემოს სხვადასხვა წყაროდან, როგორცაა ჩამდინარე წყლები, ზღვის წყალი, ადამიანის ნაწლავური მიკროფლორა.

ორივე პათოგენის მიმართ აქტიური ფაგები გაერთიანებულნი არიან *Caudovirales* რიგში, რომელიც შედგება, წანაზარდიანი ფაგებისაგან - იკოსაედრული თავითა და ორმაგ ჯაჭვიანი დნმ-ით.

დღეისათვის ლიტერატურაში აღწერილი, *Acinetobacter baumannii*-ის სპეციფიური ფაგების უმრავლესობა მიეკუთვნება *Podoviridae* (N.-T. Lin et al. 2010; Huang et al. 2013; Merabishvili et al. 2014; Xu et al. 2020) და *Myoviridae* ოჯახებს (Gordillo Altamirano et al. 2021; Merabishvili et al. 2014; Jeon, Park, and Yong 2019; Cha et al. 2018). 1994 წელს აკერმანმა მოახდინა იმ დროისათვის არსებული *Acinetobacter*-ის საწინააღმდეგო რვა ვირუსის კლასიფიცირება (H. W. Ackermann, Brochu, and Emadi Konjin 1994). აღსანიშნავია, რომ *A. baumannii*-ის მაინფიცირებელი *Podoviridae* ფაგები ხასიათდებიან ვიწრო ლიზისური სპექტრით (N.-T. Lin et al. 2010; Xu et al. 2020).

1992 წელს სუთილმა, პირველმა მოახდინა *Acinetobacter*-ის საწინააღმდეგო ბაქტერიოფაგის დადებითი თერაპიული ეფექტის დემონსტრირება (Soothill 1992). *A. baumannii*-ის მაინფიცირებელი ვირუსების გამოყენებით *in vivo* ცდები ჩატარებულია თავგების მოდელებზე, როგორც ლოკალური ქრილობების, ასევე, ფილტვების და სისტემური ინფექციების შემთხვევაში (Yin et al. 2017; Hua et al. 2018; Kusradze et al. 2016). აღწერილია ექსპერიმენტები *Galleria mellonella*-ს მოდელებზეც, მაგალითად, გამოქვეყნებულია ნაშრომი *Myoviridae* ფაგის (Bφ-R2096) დადებითი ეფექტის შესახებ, *A. baumannii*-ით გამოწვეული ინფექციის სამკურნალოდ (Jeon, Park, and Yong 2019).

*A. baumannii*-ის შემთხვევაში ნაჩვენებია ფაგის სინერგიზმი ანტიბიოტიკებთანაც, მაგალითად, აღწერილია ამ პათოგენის vB\_AbaM\_PhT2 ფაგის და ანტიბიოტიკი კოლისტინის სინერგიული ეფექტი (Styles et al. 2020). სინერგიული ეფექტი ნანახია *A. baumannii*-ის მიმართ აქტიური ფაგის - KARL-1-ისა და ანტიბიოტიკების, მეროპენემთან და კოლისტინთან ერთად (Jansen et al. 2018). *ex vivo*

ექსპერიმენტებში, ფაგი AGC01 საგრძნობლად ამცირებს *A. baumannii*-ის ბაქტერიების რაოდენობას ადამიანის ინაქტივირებული პლაზმური სისხლის მოდელებში. ამ ფაგმა ასევე გამოავლინა სინერგიული მოქმედება ანტიბიოტიკ ციპროფლოქსაცინთან და მეროპენემთან (Grygorcewicz et al. 2020). კოქტეილი, რომელიც შეიცავდა MDR *A. baumannii* -ის Aba-1, Aba-2, Aba-3, Aba-4 და Aba-6 ფაგებს თანაბარი პროპორციით, წარმატებით გამოიყენეს ანტიბიოტიკებთან ერთად (ციპროფლოქსაცინი, ლევოფლოქსაცინი, ტრიმეტოპრიმი/სულფამეთოქსაზოლი, გენტამიცინი, ამიკაცინი, ტობრამიცინი, კოლისტინი, იმიპენემი და მეროპენემი) ადამიანის შარდში ბაქტერიული ბიოფილმების განადგურებისათვის (Grygorcewicz et al. 2021).

როგორც ცნობილია, ფაგები უმკლავდებიან არა მხოლოდ პლანქტონურ ბაქტერიებს, არამედ მათ მიერ წარმოქმნილ ბიოფილმებსაც. ამის მაგალითია ფაგი vB\_AbaM-IME-AB2, რომელიც ეფექტურად ახდენს *Acinetobacter baumannii*-ის მიერ წარმოქმნილი ბიოფილმების ინჰიბირებას და დაშლას (Liu et al. 2016). *in vitro* ცდებით ნაჩვენებია, რომ ფაგი Abp9 ეფექტურად უმკლავდება *A. baumannii*-ის ბიოფილმებს და ასევე ამცირებს სიკვდილიანობას ინფიცირებულ თაგვის მოდელებში (Jiang et al. 2020).

მეცნიერები თვლიან, რომ ფაგების კოქტეილის გამოყენება თერაპიაში უფრო ეფექტურია, ვიდრე მონოფაგების. კვლევებით დადგენილია, რომ ფაგების ნარევის გამოყენება გაცილებით შედეგიანია კარბაპენემების მიმართ რეზისტენტული *A. baumannii*-ით (CRAB) გამოწვეული ინფექციების წინააღმდეგ. ხუთი ფაგისაგან შემდგარი პრეპარატით CRAB-ით ინფიცირებული ჭრილობების მკურნალობამ მოახდინა ინფექციის გავრცელების აღმოფხვრა (Regeimbal et al. 2016). მრავალკომპონენტური ფაგების პრეპარატის შექმნის დროს მნიშვნელოვანია ფაგების სწორად შერჩევა რათა ფაგებს გადამფარავი მოქმედება ჰქონდეთ. მრავალკომპონენტური პრეპარატის გამოყენების დროს მისი მოქმედების დიაპაზონი ფართოა, მაგალითად CRAB-ის მიმართ აქტიური ოთხი ფაგისაგან შემდგარი პრეპარატის დიაპაზონი გაიზარდა 85% მდე (Hua et al. 2018). ფაგური კოქტეილის გამოყენების დროს ფაგების მიმართ წარმოქმნილი რეზისტენტობა თითქმის გამორიცხულია (Nilsson 2014).

რაც შეეხება *K. pneumoniae*-ს მიმართ აქტიურ ბაქტერიოფაგებს, ლიტერატურაში აღწერილი ფაგები მორფოლოგიური თავისებურების მიხედვით გაერთიანებულნი არიან *Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae* და *Ackermannviridae* ოჯახებში. გამოქვეყნებული ინფორმაციის მიხედვით, *Klebsiella*-ს ფაგებიდან 36 მიეკუთვნება *Myoviridae* ოჯახს, 58 – *Podoviridae*-ს, 52 – *Siphoviridae*-ს, ხოლო 2-*Ackermannviridae* ოჯახს (Herridge et al. 2020).

*Klebsiella*-ს ფაგებს გააჩნიათ არასპეციფიური ლიზისის უნარი, კერძოდ მათ შეუძლიათ დააინფიცირონ არა მხოლოდ *K. pneumoniae*-ს, არამედ *E. coli*-ს შტამებიც (Verma, Harjai, and Chhibber 2009a).

ფაგების თერაპიული ეფექტების შესასწავლად, როგორც *Acinetobacter baumannii*-ს მიმართ აქტიური ფაგების შემთხვევაში, *K. pneumoniae*-ს საწინააღმდეგო ფაგების შემთხვევაშიც, უმეტესწილად იყენებენ თავის მოდელებს. ეს მოდელები იძლევა ფაგის მოქმედების ეფექტის შეფასების შესაძლებლობას ჭრილობის და რბილი ქსოვილების ინფექციების, პნევმონიის, ღვიძლის აბსცესების და ბაქტერიემიის დროს. *K. pneumoniae*-ს შტამებით ინფიცირებული ცხოველების მკურნალობის ბევრი წარმატებული შემთხვევაა აღწერილი, როგორც მონოფაგებით, ასევე ფაგური კოქტეილებით (Chhibber, Kaur, and Kumari 2008; Gu et al. 2012; Chadha, Katare, and Chhibber 2016). მეცნიერთა ერთმა ჯგუფმა შექმნა *K. pneumoniae* მიმართ აქტიური, სამი, განსხვავებული ლიზისური სპექტრის მქონე ვირულენტური ფაგისაგან შემდგარი კოქტეილი. კვლევების შედეგად დაადგინეს, რომ სამი ფაგისაგან შემდგარი კოქტეილის მიმართ გაცილებით დაბალი დოზით ხდებოდა ფაგორეზისტენტული ფორმების წარმოქმნა, ვიდრე თითოეული ფაგის შემთხვევაში. თავის მოდელებში ჩატარებული ცდების დროსაც გადარჩენის მაჩვენებელი უფრო მაღალი იყო მაშინ, როდესაც მკურნალობა ტარდებოდა ფაგური კოქტეილით, ვიდრე როდესაც თავგებს მკურნალობდნენ მონოფაგებით (Gu et al. 2012). მსგავსი შედეგები იქნა აღწერილი მეცნიერ ჩადას ნაშრომშიც. მან ფაგი გამოიყენა *K. pneumoniae* ბაქტერიებით გამოწვეული დამწვრობის ინფექციების სამკურნალოდ. ფაგური კოქტეილი შედგებოდა ხუთი ბაქტერიოფაგისაგან. ბაქტერიის რაოდენობა გაცილებით მეტად იყო შემცირებული ფაგების ნარევის გამოყენების შემთხვევაში, ვიდრე ცალკეული ფაგების გამოყენების დროს (Chadha, Katare, and Chhibber 2016).

ასევე, ნანახია დადებითი სამკურნალო ეფექტი *K. pneumoniae*-ს ბიოფილმების წინააღმდეგ ფაგი-ანტიბიოტიკის კომბინაციის დროს (Verma, Harjai, and Chhibber 2009b). ფაგი-ციპროფლასაცილის კომბინაცია იქნა გამოყენებული *K. pneumoniae*-ს ბიოფილმების წინააღმდეგ. გარდა იმისა, რომ მოხდა ბიოფილმის ეფექტური განადგურება, ექსპერიმენტის დროს არც ფაგო-რეზისტენტული და არც ანტიბიოტიკო-რეზისტენტული ფორმები არ ჩამოყალიბებულა.

ლიტერატურაში აღწერილია რამოდენიმე კლინიკური შემთხვევა *A. baumannii*-ის საწინააღმდეგო ბაქტერიოფაგების წარმატებული თერაპიული გამოყენების შესახებ ადამიანებში (Schooley et al. 2017; LaVergne et al. 2018; Tan et al. 2021; Wu et al. 2021). ასევე, წარმატებული თერაპიული ეფექტი იქნა მიღწეული მრავლობით-რეზისტენტული *K. pneumoniae*-ს წინააღმდეგ მომზადებული ინდივიდუალიზებული ფაგური პრეპარატით მკურნალობის დროსაც (Corbellino et al. 2020; Eskenazi et al. 2022).



## თავი II. მეთოდოლოგია

### 2.1. კვლევაში გამოყენებული მასალები

წარმოდგენილ კვლევაში გამოყენებულია გ.ელიავას სახელობის, ბაქტერიოფაგიის, მიკრობიოლოგიისა და ვირუსოლოგიის ინსტიტუტის მოლეკულური ბიოლოგიის ლაბორატორიის კოლექციაში დაცული *A. baumannii* და *Klebsiella*-ს გვარის ბაქტერიული შტამები. ექსპერიმენტებში გამოყენებულია სხვადასხვა მწარმოებლის მიერ მოწოდებული საკვები არეები და რეაქტივები:

1. Luria-Bertani (LB) ბულიონი/აგარი (Liofilchem);
2. Endo აგარი (Liofilchem);
3. Herella აგარი (Liofilchem);
4. მიულერ-ჰინტონი (MHA) აგარი (Liofilchem);
5. ანტიბიოტიკის დისკები-ამპიცილინი (10  $\mu$ g), ამპიცილინი+სულბაქტამი (10/10  $\mu$ g), ამოქსიცილინი (25  $\mu$ g), ამოქსიცილინი+კლავულანის მჟავა (20/10  $\mu$ g), პიპერაცილინი (30  $\mu$ g), პიპერაცილინი+ტაზობაქტამი (30/6  $\mu$ g), ტიკარცილინი (75  $\mu$ g), ტიკარცილინი+კლავულანის მჟავა (75/10  $\mu$ g), ცეფეპიმი (30  $\mu$ g), ცეფეპიმი+კლავულანის მჟავა (30/10  $\mu$ g), ცეფოტაქსიმი (30  $\mu$ g), ცეფოტაქსიმი+კლავულანის მჟავა (30/10  $\mu$ g), ცეფტაზიდიმი (10  $\mu$ g), ცეფტაზიდიმი+კლავულანის მჟავა (30/10  $\mu$ g), ცეფტრიაქსონი (30  $\mu$ g); ცეფუროქსიმი (30  $\mu$ g), ერთაპენემი (10  $\mu$ g), იმიპენემი (10  $\mu$ g), მეროპენემი (10  $\mu$ g), მეროპენემი+EDTA (10/930  $\mu$ g), ლევოფლოქსაცინი (5  $\mu$ g), გენტამიცინი (10  $\mu$ g), ტობრამიცინი (10  $\mu$ g) (BIO-RAD, Liofilchem);
6. აგაროზა Standard low –mr (BIO-RAD); აგაროზა LF PFGE (LIFE SCIENCE VWR);
7. პროტეინაზა K (NEB BioLabs);
8. Tris-HCl (Sigma);
9. EDTA-Ethylenediamine tetraacetic acid (Sigma)
10. ნატრიუმის ქლორიდი NaCl (LabChem);
11. Deoxycholic acid (Sigma);
12. N-Lauroylsarcosine (Sigma);

13. რესტრიქციული ენდონუკლეაზები: EcoRI, EcoRV, HindIII, HpaII, MspI, RsaI, Sau3A, PvuII, HaeIII, SspI, BglII, XbaI, SmaI (NEB BioLabs);
14. სტანდარტული დნმ მარკერები: Lambda HindIII digested, ΦX174 DNA HaeIII (NEB BioLabs); Pulse Marker TM 50-1000kb (Sigma);
15. ფენოლი (Sigma);
16. ქლოროფორმი (Fisher Scientific);
17. ეთიდიუმის ბრომიდი (Sigma);
18. DNase და RNase (NEB BioLabs);

## 2.2. ბაქტერიული შტამები. კულტივირება, ანტიბიოტიკო-მგრძობელობა, ფერმენტული აქტივობა, გენოტიპირება

### 2.2.1. ბაქტერიული შტამების კულტივირების პირობები

კვლევაში გამოყენებულია კლინიკური ნიმუშებიდან გამოყოფილი *A. baumannii* და *Klebsiella*-ს გვარის ბაქტერიული შტამები. კლინიკური შტამების ნაწილი გამოყოფილი და იდენტიფიცირებულია „ბაქტერიოფაგის ანალიტიკურ-დიაგნოსტიკურ ცენტრში - „დიაგნოზი 90“, ხოლო დანარჩენი შტამები მიღებულია სხვადასხვა ქვეყნებიდან (შვეიცარია, ბულგარეთი, ერაყი, გერმანია, ვიეტნამი).

ბაქტერიული შტამების კულტივირება ხდება 37°C-ზე 18-24 საათის განმავლობაში, Luria-Bertani (LB) საკვებ არეში. გამოყენებულია სელექტიური არეები - Herella აგარი, რომელზეც *A. baumannii*-ის შტამები იზრდებიან იისფერი კოლონიების სახით, ასევე Endo აგარი, რომელზეც *Klebsiella*-ს გვარის ბაქტერიები წარმოქმნიან ვარდისფერ ლორწოვან კოლონიებს.

### 2.2.2. ბაქტერიების მგრძობელობის განსაზღვრა ანტიბიოტიკების მოქმედების მიმართ

ბაქტერიული შტამების ანტიბიოტიკო-მგრძობელობის განსაზღვრისათვის გამოყენებულია დისკების დიფუზიის მეთოდი (Boron, Peterson, and Finegold 1994). LB თხევად საკვებ არეში კულტივირებული და 0,5 McFarland სტანდარტის შესაბამისი კონცენტრაციის მქონე ბაქტერიული სუსპენზია თანაბრად ნაწილდება მიულერ-ჰინტონის მყარ საკვებ არეზე (MHA- Mueller-Hinton Agar). ბაქტერიულ გაზონზე თავსდება ანტიბიოტიკის დისკები. 37°C-ზე 18 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ, ხდება დისკის ირგვლივ ინჰიბირების ზონის დიამეტრის აღრიცხვა, ხოლო შედეგების ინტერპრეტირებისათვის გამოყენებულია ანტიმიკრობული მგრძობელობის ტესტირების, ევროპული კომიტეტის (EUCAST-ის) მიერ გრამ-უარყოფითი მიკროორგანიზმებისათვის მიღებული შეფასების სისტემა (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing 2022).

### 2.2.3. ბაქტერიული შტამების ბეტა-ლექტამაზური აქტივობის განსაზღვრა

ბაქტერიული შტამების მიერ ბეტა-ლექტამაზების სინთეზის უნარის ფენოტიპური გამოვლენისათვის გამოყენებულია დისკ-დიფუზიის მეთოდი. ექსპერიმენტები ჩატარებულია კლინიკური და ლაბორატორიული სტანდარტების ინსტიტუტის (CLSI) რეკომენდაციების მიხედვით (Paterson and Bonomo 2005). კვლევაში გამოყენებულია ამოქსიცილინის, ცეფოტაქსიმის, ცეფტაზიდიმის ანტიბიოტიკების დისკები და იგივე ანტიბიოტიკების კომბინაცია კლავულანის მჟავასთან. ფინჯნები მიულერ-ჰინტონის მყარი საკვები არით, მათზე დატანილი ბაქტერიული გაზონით და ანტიბიოტიკის დისკებით ინკუბირდება 37<sup>0</sup> C-ზე. 18 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ აღირიცხება დისკების ირგვლივ ინჰიბირების ზონა და ფასდება ბაქტერიული შტამის მიერ ბეტა-ლექტამაზების სინთეზის უნარი. ფენოტიპური გამოვლინების დასტურად ითვლება ანტიბიოტიკის დისკისა და იგივე ანტიბიოტიკის/კლავულანის მჟავას კომბინაციის შემცველი დისკის გარშემო წარმოქმნილ ინჰიბირების ზონებს შორის 5მმ-იანი და მეტი განსხვავება.

### 2.2.4. ბაქტერიული შტამების გენოტიპირება პულსირებადი გელ-ელექტროფორეზის მეთოდით

კლინიკური ბაქტერიული შტამების ქრომოსომური დნმ-ის რესტრიქციული ფრაგმენტების ანალიზისათვის გამოყენებულია პულსირებადი ველში გელ-ელექტროფორეზის მეთოდი (PFGE - Pulsed-Field Gel Electrophoresis).

დნმ-ის შემცველი აგაროზას ნიმუშების დამუშავება ხდება 1 მგ/მლ კონცენტრაციის ლიზოციმისა და 100 მკგ/მლ პროტეინაზა K-ს შემცველი მალიზირებელი ბუფერით (6 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 M NaCl; 100 mM EDTA, pH 8.0; 0.2 % deoxycholate; 0.5 % N-Lauroylsarcosine) (Durmaz et al. 2009).

*A. baumannii*-ის შტამების ინტაქტური დნმ-ს ფრაგმენტირებისათვის გამოყენებულია რესტრიქციული ენდონუკლეაზა SmaI (NEB BioLabs), ხოლო *Klebsiella spp.*-ისათვის XbaI (NEB BioLabs).

დნმ-ს ფრაგმენტების ანალიზისთვის გამოყენებულია პულსირებადი გელ-ელექტროფორეზის აპარატი Gene Navigator™ System (Amersham). გელ-

ელექტროფორეზი ჩატარებულია 1% აგაროზას გელში, შესაბამისი ელექტროფორეზის ბუფერის (0.5 x Tris-Borate-EDTA) გამოყენებით. ელექტროფორეზის პროცესში (14°C, 18 სთ) პულსირების პარამეტრები შეესაბამებოდა: 10-50 წამი, 200 ვოლტი (6 V/სმ).

დნმ-ფრაგმენტების ვიზუალიზაციისათვის გამოყენებულია ეთიდიუმის ბრომიდის ხსნარი (0.5 მგ/მლ). 20 წუთიანი ექსპოზიციის შემდეგ, ფრაგმენტების აღრიცხვა ხდება გელის დოკუმენტაციის სისტემის (Axygen) გამოყენებით.

რესტრიქციული ფრაგმენტების ანალიზისათვის გამოყენებულია Freetree და treeview კომპიუტერული პროგრამები.

## 2.3. ბაქტერიოფაგები: გამოყოფა და ბიოლოგიური მახასიათებლები

### 2.3.1. ბაქტერიოფაგების გამოყოფა გარემოს ნიმუშებიდან

ბაქტერიოფაგების გამოყოფის მიზნით გარემოს ნიმუშების (ჩამდინარე წყალი) 90 მლ-ს ემატება 10 მლ 10-ჯერადი კონცენტრაციის LB თხევადი საკვები არე და 1 მლ შერჩეული ბაქტერიული შტამების  $10^9$  უჯრედი/მლ კონცენტრაციის სუსპენზია.  $37^{\circ}$  C-ზე 18 საათიანი ინკუბირების შემდეგ სინჯები ცენტრიფუგირდება  $9.000$  ბრუნ/წთ-ში (rpm) 20 წუთი (ცენტრიფუგა Bekman Allegra) და იფილტრება  $0.22 \mu\text{m}$  ზომის ფორებიან ფილტრში. ფილტრატებში აქტიური ფაგების შემცველობის განსაზღვრისათვის ნიმუშის 10 მკლ დატანა ხდება ინდიკატორული ბაქტერიული შტამის გაზონზე.  $37^{\circ}$  C-ზე 18-24 საათიანი ინკუბირების შემდეგ, ბაქტერიულ ნაზარდზე წვეთის დატანის ადგილას ლიზისური ზონის არსებობა მიუთითებს საკვლევ ნიმუშში სპეციფიური ბაქტერიოფაგის არსებობაზე.

ფაგის შემცველი სინჯის შემადგენელი კომპონენტების ანალიზისათვის გამოყენებულია ორშრიანი აგარის მეთოდი (Adams 1959): ნიმუშის ათჯერადი სერიული განზავებებიდან თითო მლ-ს ემატება მასპინძელი ბაქტერიული შტამის სუსპენზიის 0.1 მლ ( $10^9$  უჯრედი/მლ) და 3 მლ ნახევრად თხიერ (0.5 %) LB აგარი. ნარევი ნაწილდება მყარი, 1.5 %-იანი LB აგარის შემცველ პეტრის ფინჯანზე.  $37^{\circ}$  C ტემპერატურაზე 18-24 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ აღირიცხება ფაგის მიერ წარმოქმნილი ნეგატიური კოლონიების მორფოლოგია და რაოდენობა.

### 2.3.2. ბაქტერიოფაგების სუფთა ხაზების მიღება, გამრავლება და კონცენტრირება

ბაქტერიოფაგის სუფთა ხაზის მისაღებად საწყისი ფაგოლიზატის 10-ჯერადი განზავებები კულტივირდება სამიზნე ბაქტერიულ შტამთან ერთად ორშრიანი აგარის მეთოდით (Adams 1959). 18-24 საათის შემდეგ აგარის ფენიდან ამოღებული, მორფოლოგიურად განსხვავებული ცალკეული ნეგატიური კოლონია  $37^{\circ}$  C-ზე 15-30 წუთის განმავლობაში ინკუბირდება 50 მკლ ქლოროფორმის შემცველ 1 მლ LB თხევად არეში. ნიმუშები ზავდება სერიულად და ნახევრად თხიერ აგართან ერთად

ნაწილდება 1.5 % LB აგარის შემცველ პეტრის ფინჯანზე. ინკუბირების შემდეგ ხდება სუსპენზიაში ფაგის ტიტრის (კონცენტრაციის) დადგენა და ნეგატიური კოლონიების მორფოლოგიის შეფასება. გადარჩევის ასეთი პროცედურები ჩატარებულია ბაქტერიოფაგების სუფთა ხაზების მიღებამდე (უმეტესად 5-6 ციკლი თითოეული ფაგისათვის).

ბაქტერიოფაგების კონცენტრაცია ფასდება სუსპენზიის 1 მლ-ში ნეგატიური კოლონიის წარმოქმნილი ფაგური ნაწილაკების რაოდენობით (Plaque forming unit/mL, PFU/mL).

ფაგის მაღალი კონცენტრაციის მქონე პრეპარატის მისაღებად გამოყენებულია ორშრიანი აგარის მეთოდი. ბაქტერიების და ფაგების შემცველ სუსპენზიას ემატება 3 მლ 0.5 % LB აგარი და ნაწილდება 1.5 % მყარი აგარის შემცველ პეტრის ფინჯანზე. 37° C ტემპერატურაზე 18-20 სთ ინკუბირების შემდეგ ნახევრადთხიერი აგარის ზედა - თხელი ფენა - გროვდება და ცენტრიფუგირდება 9.000 ბრუნი/წთ-ში სიჩქარეზე, 20 წთ-ის განმავლობაში. ცენტრიფუგირების შემდეგ ხდება ნალექზედა ფრაქციის შეგროვება.

ფაგების კონცენტრაციის (ტიტრის) განსაზღვრისათვის სტერილურ საკვებ არეში მზადდება საკვლევი ფაგის საწყისი სუსპენზიის ათჯერადი განზავებები ( $10^{-1}$  - დან  $10^{-10}$ -მდე). თითოეული განზავებიდან 1 მლ სუსპენზიას ემატება 0.1 მლ ბაქტერიული შტამი და 3 მლ ნახევრად-თხიერი (0.5 %) აგარი. ნარევი მთლიანად ნაწილდება 1.5 % აგარიან პეტრის ფინჯანზე და გამყარების შემდეგ ინკუბირდება 37° C ტემპერატურაზე, 18-24 საათით. ფაგის საწყისი სუსპენზიის ტიტრის აღრიცხვა ხდება ფინჯანებზე წარმოქმნილი ნეგატიური კოლონიების რაოდენობის მიხედვით და განზავების ფაქტორის გათვალისწინებით.

ფაგის პრეპარატის შემდგომი კონცენტრირება/გაწმენდისათვის გამოყენებულია თანმიმდევრული დიფერენციული ცენტრიფუგირება, +4° C ტემპერატურაზე (3.500 g, 20 წთ და 20.000 g 1.5 სთ). მიღებული ნალექის რესუსპენდირება ხდება საწყისი მოცულობის 1/10 ბუფერში (1 X SSC, pH 7.0.).

### 2.3.3. ფაგის ვირონის მორფოლოგიის ელექტრონულ-მიკროსკოპული

#### კვლევა

ბაქტერიოფაგის ინტაქტური ნაწილაკების მორფოლოგიის შესწავლისათვის გამოყენებულია ტრანსმისიული ელექტრონული მიკროსკოპი JEOL 100- SX (Jeol, Akishima-Shi, Tokyo, Japan). პარლოდიონის ამილაცეტატის აპკზე ხდება 50 მკლ  $10^9$ - $10^{10}$  ნაწ/მლ კონცენტრაციის საკვლევი ფაგის სუსპენზიის დატანა. დისტილირებული წყლის მიმართ 24 საათიანი დიალიზის შემდეგ, პრეპარატი თავსდება ნახშირბადით დაფარულ სპილენძის ბადეებზე. კონტრასტირებისათვის გამოყენებულია ურანილ-აცეტატი. პრეპარატში ფაგის ნაწილაკების მორფოლოგიის ვიზუალიზაციისათვის გამოყენებულია ნიმუშების  $\times 40.000$ -ჯერადი გადიდება.

### 2.3.4. ბაქტერიოფაგების ლიზისური სპექტრის შესწავლა

ბაქტერიოფაგის ლიზისური, ანტიბაქტერიული მოქმედების სპექტრის განსაზღვრის მიზნით გამოყენებულია ბაქტერიულ გაზონზე ფაგის პრეპარატის დაწვეთების მეთოდი (Spot Lysis assay) (Clokier and Kropinski 2009). 1.5 % მყარი აგარის შემცველ LB საკვებ არეზე გათესილი ბაქტერიების გაზონზე ხდება  $1-5 \times 10^7$  ნაწილაკი/მლ (PFU/mL) კონცენტრაციის ფაგის 10 მკლ მოცულობის სუსპენზიის დატანა და ინკუბირება  $37^{\circ} \text{C}$ -ზე, 18 საათით. ვირუსის პრეპარატის დატანის არეში წარმოქმნილი გამჭვირვალე ზონა საკვლევ უჯრედებზე ფაგის გამრავლების მაჩვენებელია. ამასთან, ფაგის აქტივობის შეფასების დროს გასათვალისწინებელია, რომ თითოეული ფაგის მიმართ სხვადასხვა შტამი შესაძლოა ამჟღავნებდეს განსხვავებული მგრძობელობას, რაც შესაბამისად გამოიხატება ლიზისის ზონის ხარისხით. ბაქტერიოფაგების ანტიბაქტერიული აქტივობის ხარისხის შესაფასებლად გამოყენებულია შემდეგი აღნიშვნები:

- CL - ფაგი ახდენს ბაქტერიების სრულ ლიზისს;
- SCL - ფაგი ახდენს სრულ ლიზისს, მაგრამ ლიზისურ ზონაში აღინიშნება ერთეული ბაქტერიული კოლონიები;
- OL – ფაგი არ ახდენს ბაქტერიების სრულ ლიზისს და წვეთის ზონაში მეორადი ბაქტერიული ნაზარდია;



- R - ბაქტერიული შტამი რეზისტენტულია ფაგის მოქმედების მიმართ.

### 2.3.5. ბაქტერიოფაგების კულტივირების ეფექტურობის შესწავლა

ბაქტერიოფაგის კულტივირების ეფექტურობის განსაზღვრისათვის ხდება პატრონ ბაქტერიულ შტამზე გამრავლებული ფაგის ტიტრის შედარება იგივე ფაგის ტიტრთან, რომელიც გამრავლებულია საკვლევ ბაქტერიულ შტამებზე (Clokier and Kropinski 2009). თითოეულ ბაქტერიულ შტამზე ფაგის ტიტრის დასადგენად გამოყენებულია ორშრიანი აგარის მეთოდი (Adams 1959).

ბაქტერიოფაგის კულტივირების ეფექტურობა გამოითვლება ფორმულით:

$$E = \frac{T}{T_0}$$

სადაც E არის კულტივირების ეფექტურობა, T - ფაგის ტიტრი საკვლევ მიკროორგანიზმზე, T<sub>0</sub> - ფაგის ტიტრი მასპინძელ შტამზე.

### 2.3.6. ბაქტერიოფაგების რეპროდუქციული ციკლის მახასიათებლების დადგენა

ფაგის მასპინძელ ბაქტერიულ უჯრედთან ურთიერთქმედების ფაზებისა და უჯრედშიდა განვითარების ერთჯერადი ციკლის პარამეტრების განსაზღვრისათვის გამოყენებულია სტანდარტული მეთოდოლოგია (Adams 1959).

წინასწარ დგინდება საკვლევ ფაგისა და მასპინძელი ბაქტერიული უჯრედების სასურველი კონცენტრაციის მქონე პრეპარატები. მზადდება ცდისეული სუსპენზია, რომელშიც ფაგი/ბაქტერია თანაფარდობა შეესაბამება 1/10-ს.

ფაგების მასპინძელ ბაქტერიულ უჯრედზე ადსორბციის სიჩქარე და ხარისხი შესწავლილია არაადსორბირებული ფაგური ნაწილაკების აღრიცხვის მეთოდით. ფაგი/ბაქტერიის ნარევი თავსდება წყლის აბაზანაში 37<sup>0</sup> C-ზე და გარკვეული ხუთ წუთიანი ინტერვალებით ხდება 0.1 მლ მოცულობის სინჯის აღება, რომელიც 100-ჯერადად ზავდება 0.4 მლ ქლოროფორმის შემცველ 9.9 მლ ცივ თხევად საკვებ არეში. +4<sup>0</sup> C-ზე 10-წუთიანი დაყოვნების და დამატებითი ათჯერადი განზავების შემდეგ,

სინჯის დატანა ხდება ორშრიანი აგარის მეთოდით. ფორმირებული ნეგატიური კოლონიების რაოდენობით, რომელიც შეესაბამება არაადსორბირებული ფაგური ნაწილაკების რაოდენობას საწყის ცდისეულ ნარევეში, გამოითვლება ადსორბირებული ფაგური ნაწილაკების პროცენტი. დროის მონაკვეთი, დაწყებული ინფიცირებიდან იმ მომენტამდე, როდესაც ცდისეულად ფიქსირდება არაადსორბირებული ფაგების მინიმალური რაოდენობა, წარმოადგენს ფაგის მასპინძელ ბაქტერიაზე ადსორბციის დროს.

კვლევაში გამოყენებული ფაგებისათვის ადსორბციის კონსტანტა გამოთვლილია ფორმულით (Clokier and Kropinski 2009):

$$K = \frac{2,3}{BT} \log \frac{P_0}{P_t}$$

სადაც **K** არის ადსორბციის მუდმივა მლ/წუთში, **B** არის ბაქტერიული უჯრედების კონცენტრაცია, **T** არის დრო, როდესაც ფაგის საწყისი რაოდენობა (**P<sub>0</sub>**) მცირდება **P<sub>t</sub>**-მდე.

ადსორბციის უკვე დადგენილი პერიოდის გასვლის შემდეგ ცდისეულ სუსპენზიაში ფაგის რაოდენობის განსაზღვრისათვის სინჯები 5-10 წუთიანი ინტერვალით იტიტრება ორშრიანი აგარის მეთოდით. მიღებული შედეგებით დგინდება ფაგის უჯრედშიდა განვითარების ერთჯერადი ციკლის პარამეტრები, როგორცაა ლატენტური პერიოდის ხანგრძლივობა და ვირუსული ნაწილაკების გამოსავალი ერთი ინფიცირებული უჯრედის ლიზირებისას.

### 2.3.7. ფაგით ინფიცირებული ბაქტერიების პოპულაციაში

#### ფაგორეზისტენტული მუტანტების წარმოქმნის სიხშირე

1.5 %-ან მყარ LB საკვებ არეზე თანაბრად ნაწილდება 0.2 მლ ფაგის სუსპენზია ტიტრით 10<sup>8</sup>-10<sup>9</sup> ფაგური ნაწილაკი/ მლ. სითხის შეშრობის შემდეგ პეტრის ფინჯანზე ხდება 0.1 მლ ბაქტერიული შტამის სუსპენზიის დატანა, რომლის კონცენტრაცია შეადგენს 10<sup>7</sup>-10<sup>8</sup> კოლონიის წარმომქმნელი ერთეული/მლ-ში. 37° C-ზე 18 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ ფინჯნებზე აღირიცხება ფორმირებული ფაგორეზისტენტული ბაქტერიული მუტანტების რაოდენობა (Чанишвили and Капанадзе 1967). მუტაციის სიხშირის გამოსათვლელად გამოყენებულია ფორმულა:

$$a = \frac{Kr}{N}$$

სადაც  $a$  მუტაციის სიხშირეა;  $K$ -მუდმივი რიცხვია და ტოლია 0.3;  $r$  - წარმოქმნილი ფაგო-რეზისტენტული მუტანტების რიცხვი;  $N$  - ცდამი გამოყენებული ბაქტერიული უჯრედების საწყისი რაოდენობა.

#### 2.4. ბაქტერიოფაგების მოლეკულური მასების დადგენა პულსირებადი გელ - ელექტროფორეზის მეთოდით

ფაგების გენომის ზომის შესაფასებლად გამოყენებულია გელ-ელექტროფორეზი პულსირებად ველში. ბაქტერიოფაგების კონცენტრირებული ( $10^{10}$  ნაწ/მლ) სუსპენზიიდან ტოტალური დნმ-ის ექსტრაქცია ხდება 1 % აგაროზას გელში (Agarose LF, VWR): 0.05 მლ ფაგის სუსპენზიას ემატება 0.45 მლ  $50^{\circ}$  C ტემპერატურამდე გამლღვალ 1 %-იანი აგაროზა, შემდგომ ნარევის ჩაყალიბება ხდება სპეციალურ ფორმებში. გამყარების შემდეგ სინჯები თავსდება ლიზისის ბუფერში (0.5 M EDTA, pH 8.0; 10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1% SDS; 0.2 მგ/მლ პროტეინაზა K) და ინკუბირდება  $55^{\circ}$  C-ზე 18 საათის განმავლობაში. ინკუბირების შემდეგ ფაგის შემცველი გელი ირეცხება TE ბუფერით (10 mM Tris-HCl, pH 7.4; 1 mM EDTA, pH 8.0) (Lingohr, Frost, and Johnson 2009).

ფაგური დნმ-ს შემცველი მცირე ზომის გელის ნაწილი თავსდება 1 %-იან აგაროზას გელში; ელექტროფორეზი ტარდება შესაბამის ბუფერში (5 x Tris-Borate-EDTA), Gene Navigator™ System (Amersham) აპარატში. ფაგის გენომის მოლეკულური მასის შესაფასებლად გამოყენებულია მარკერი - Pulse Marker TM 50-1000 kb (Sigma). პულსირებად ველში ჩატარებული ელექტროფორეზის პარამეტრებია: 10-50 წამი, 200 ვოლტი (6V/cm) 20 საათი,  $14^{\circ}$ C.

## 2.5. ბაქტერიოფაგების დნმ-ის გამოყოფა

ბაქტერიოფაგის დნმ-ის გამოსაყოფად გამოყენებულია დიფერენციული ცენტრიფუგირებით კონცენტრირებული და გაწმენდილი პრეპარატები 1 x SSC ბუფერში, ტიტრით  $10^9$ - $10^{10}$  ნაწილაკი/მლ. ფაგების დნმ-ის ექსტრაქცია ჩატარებულია ფენოლ/ქლოროფორმით დეპროტეინიზაციის მეთოდით (Sambrook and Russell 2001).

ფაგის სუსპენზია  $37^{\circ}$  C-ზე 1 სთ განმავლობაში მუშავდება DNase და RNase ფერმენტებით (საბოლოო კონცენტრაცია 10-10 მკგ/მლ). შემდეგ ემატება საწყისი მოცულობის 1/10 ლიზისურ ბუფერი (1% SDS, 10 mM EDTA, pH 8.0) და ინკუბაცია ხდება ოთახის ტემპურატურაზე 10 წუთის განმავლობაში.

სინჯების სრული დეპროტეინიზაციისათვის ტარდება სამი თანმიმდევრული ექსტრაქცია თანაბარი მოცულობის ქიმიური რეაგენტით: 1) ფენოლი (pH 8.0); 2) ფენოლი/ქლოროფორმი/იზოამილის სპირტის ნარევი (25/24/1 თანაფარდობით) და 3) ქლოროფორმი/იზოამილის სპირტი (24/1 თანაფარდობით). ექსტრაქციის სამივე ეტაპის შემდეგ, სინჯები ცენტრიფუგირდება 10 წუთის განმავლობაში 10.000 გ რეჟიმში და გროვდება დნმ-ის შემცველი ნალექზედა ფრაქცია. ექსტრაქციის ბოლო საფეხურის სუპერნატანტს ემატება მოცულობის 1/50 ოდენობის 5 M NaCl-ის ხსნარი, 2 მოცულობა ეთილის სპირტი (96 %) და თავსდება  $-20^{\circ}$  C-ზე დნმ-ის მაქსიმალური პრეციპიტაციისათვის, რის შემდეგაც კვლავ ცენტრიფუგირდება (10 წუთი, 10.000 გ). გამოლექილ დნმ-ს ემატება 1 მლ 70 %-იან ეთანოლი, ცენტრიფუგირდება იგივე რეჟიმში, ოთახის ტემპურატურაზე გაშრობის შემდეგ ხდება სუსპენდირება TE ბუფერში (10 mM Tris-HCl, pH 7.4; 1 mM EDTA, pH 8.0). პრეპარატები ინახება  $+4^{\circ}$  C ტემპურატურაზე. პრეპარატებში დნმ-ის კონცენტრაციის შეფასებისათვის გამოყენებულია გელ-ელექტროფორეზის მეთოდი და ფლორომეტრის (Qubit 2.0) მონაცემები.

## 2.6. დნმ-ის დამუშავება რესტრიქციული ენდონუკლეაზებით და

### ჰორიზონტალური გელ-ელექტროფორეზი

ბაქტერიოფაგების დნმ-ის შედარებითი რესტრიქციული ანალიზისათვის გამოყენებულია სხვადასხვა რესტრიქციული ენდონუკლეაზები (EcoRI, EcoRV, HindIII, HpaII, MspI, RsaI, Sau3A, PvuII, HaeIII, SspI, Bgl II (NEB BioLabs)).

დნმ-ის პრეპარატის დამუშავება რესტრიქციული ფერმენტებით ხდება მწარმოებელი ფირმის მიერ მითითებულ სარეაქციო არეში. სინჯების ინკუბაცია მიმდინარეობდა 37<sup>0</sup> C- ზე 2 საათის განმავლობაში. რესტრიქციის შედეგად მიღებული დნმ-ის ფრაგმენტები შეფასებულია ჰორიზონტალური ელექტროფორეზის მეშვეობით 0,8-1 % აგაროზას გელში (Sigma).

### თავი III. მიღებული შედეგები

ჩვენი კვლევის მიზანს წარმოადგენდა გრამ-უარყოფითი, ანტიბიოტიკო-რეზისტენტული, სხვადასხვა ინფექციური დაავადების გამომწვევი ბაქტერიების - *A. baumannii* და *Klebsiella*-ს სხვადასხვა სახეობის კლინიკური შტამების მიმართ სპეციფიური, აქტიური, ვირულენტური ბაქტერიოფაგების გამოყოფა და დეტალური დახასიათება. ორივე პათოგენი წარმოადგენს როგორც საზოგადოებაში გავრცელებული, ასევე ჰოსპიტალური ინფექციების მნიშვნელოვან გამომწვევს მაღალი ფატალური შედეგით. ანტიბიოტიკების მიმართ ბაქტერიების რეზისტენტული სახეობების სწრაფი გავრცელების გამო აქტიურად განიხილება ფაგოთერაპია, როგორც ბაქტერიული ინფექციების კონტროლისა და მკურნალობის ალტერნატიული საშუალება. ჩვენს მიერ ჩატარებული სამუშაოები ემსახურება ანტიბიოტიკო-რეზისტენტული, ბეტა-ლაქტამაზა მაპროდუცირებელი კლინიკური შტამების მიმართ აქტიური ბაქტერიოფაგების გამოყოფას გარემოს ნიმუშებიდან, მათი თერაპიული გამოყენების მიზნით.

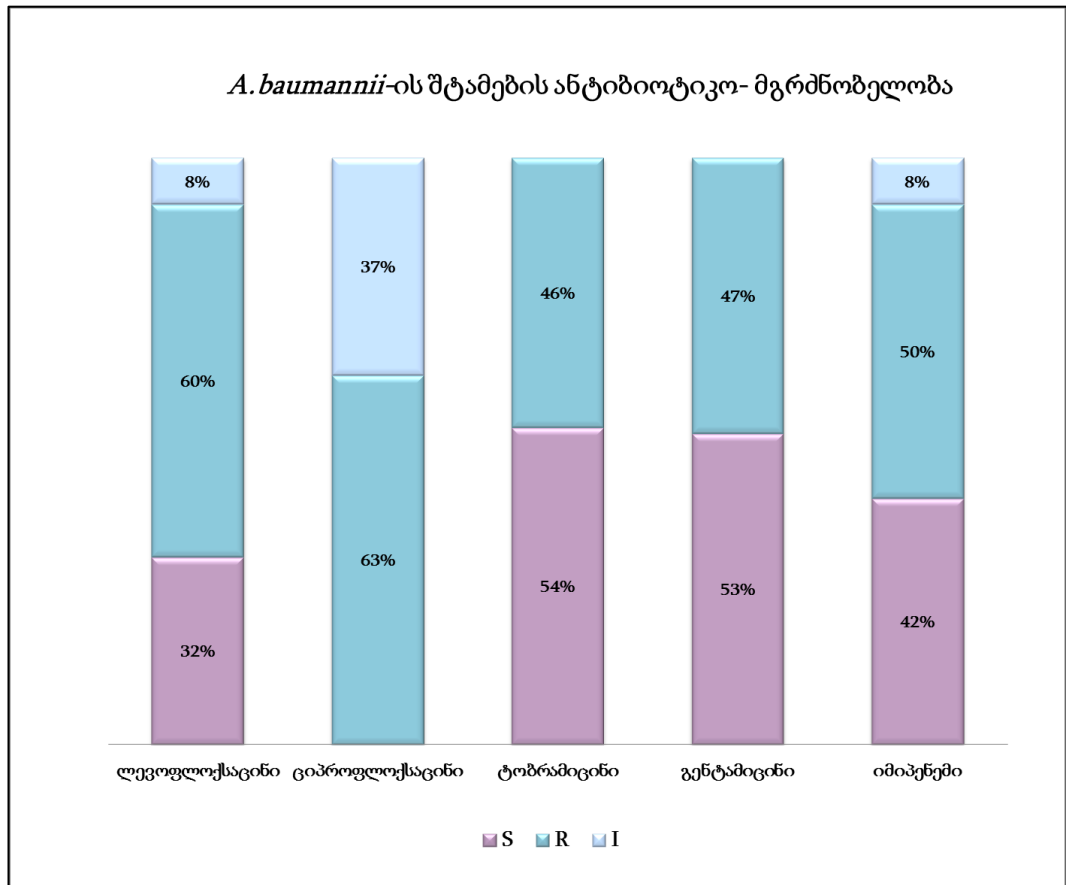
#### 3.1. ბაქტერიული შტამების ანტიბიოტიკო-მგრძობელობის შეფასება და ბეტა-ლაქტამაზების პროდუქციის ფენოტიპური გამოვლინება

კვლევაში გამოყენებული *A. baumannii*-ს 120 კლინიკური შტამიდან 18 შტამი გამოყოფილი და იდენტიფიცირებული იყო „ბაქტერიოფაგის ანალიტიკურ-დიაგნოსტიკურ ცენტრში - „დიაგნოზი 90“, ხოლო 112 შტამი მიღებულია სხვადასხვა ქვეყნიდან (შვეიცარია, ბულგარეთი, ერაყი, გერმანია, ვიეტნამი). მათგან ყველაზე მეტი (58) შტამი მიღებულია შვეიცარიიდან, კერძოდ, ლოზანის უნივერსიტეტიდან. შესწავლილი *Klebsiella*-ს სხვადასხვა სახეობის 100 ბაქტერიული შტამიდან 88 (72 - *Klebsiella pneumoniae*; 16 - *Klebsiella oxytoca*) შტამი გამოყოფილია სხვადასხვა კლინიკური მასალიდან სადიაგნოსტიკო ცენტრში, ხოლო 12 შტამი მიღებულია ლოზანის უნივერსიტეტიდან.

*A. baumannii*-ს შტამების ანტიბიოტიკო-მგრძობელობის პროფილის შესაფასებლად გამოყენებული გვაქვს ხუთი ანტიბიოტიკი: იმიპენემი (10 µg);

ლევოფლოქსაცინი (5 µg); ციპროფლოქსაცინი (5 µg); გენტამიცინი (10 µg) და ტობრამიცინი (10 µg);

მიღებული შედეგების მიხედვით რეზისტენტობის ყველაზე მაღალი მაჩვენებელი დაფიქსირდა ლევოფლოქსაცინის (60 %) და ციპროფლოქსაცინის (63 %) მიმართ. *A. baumannii*-ს შტამების 50 %-მა რეზისტენტობა გამოავლინა იმიპენემის მიმართ (სურ. 1).



**სურათი 1.** *A. baumannii*-ის შტამების ანტიბიოტიკო-მგრძობელობის მაჩვენებლები. კონკრეტული ანტიბიოტიკის მიმართ რეზისტენტული ან მგრძობიარე შტამების რაოდენობა გამოხატულია პროცენტებში.

აღნიშვნები: S - მგრძობიარე, R - რეზისტენტული, I - საშუალოდ მგრძობიარე.

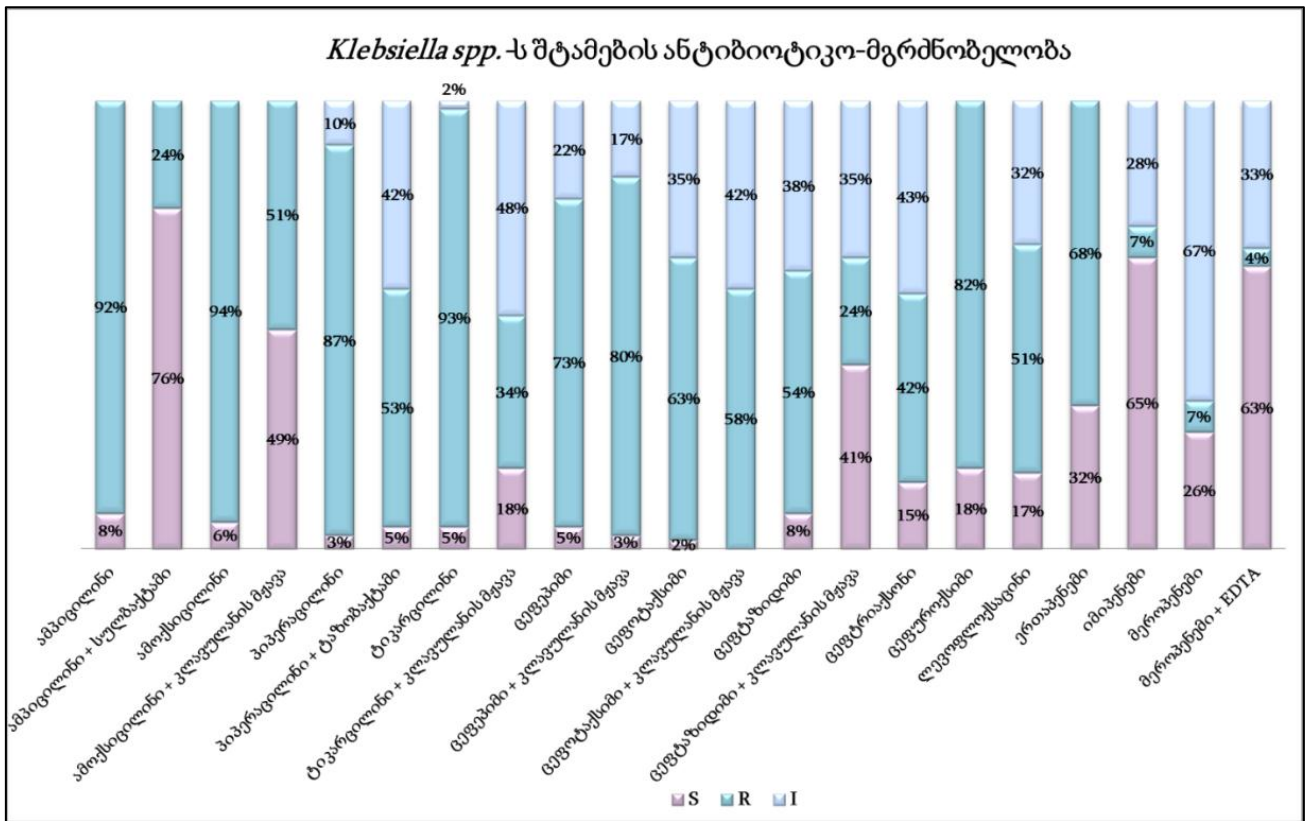
ბაქტერიული შტამების ანტიბიოტიკო-მგრძობელობის განსაზღვრის შედეგების თანახმად, *A. baumannii*-ს 120 შტამიდან 35 (29 %) შტამი გამოვლინდა როგორც სრულად რეზისტენტული (PDR - Pandrug resistant).

*Klebsiella spp.*-ს ანტიბიოტიკო-მგრძობელობის პროფილის შესასწავლად გამოვიყენეთ 21 ანტიბიოტიკი: ამპიცილინი (10 µg); ამპიცილინი + სულბაქტამი (10/10

μg); ამოქსიცილინი (25 μg); ამოქსიცილინი+კლავულანის მჟავა (20/10 μg);  
პიპერაცილინი (30 μg); პიპერაცილინი+ტაზობაქტამი (30/6 μg); ტიკარცილინი (75 μg);  
ტიკარცილინი+კლავულანის მჟავა (75/10 μg); ცეფეპიმი (30 μg);  
ცეფეპიმი+კლავულანის მჟავა (30/10 μg); ცეფოტაქსიმი (30 μg);  
ცეფოტაქსიმი+კლავულანის მჟავა (30/10 μg); ცეფტაზიდიმი (10 μg);  
ცეფტაზიდიმი+კლავულანის მჟავა (30/10 μg); ცეფტრიაქსონი (30 μg);  
ცეფუროქსიმი (30 μg); ერთაპენემი (10 μg); იმიპენემი (10 μg); მეროპენემი (10 μg);  
მეროპენემი+EDTA (10/930 μg); ლევოფლოქსაცინი (5 μg);

დისკების დიფუზიის მეთოდით ბაქტერიული შტამების ანტიბიოტიკო-  
მგრძობელობის განსაზღვრის ექსპერიმენტული მონაცემების თანახმად,  
გამოკვლეული *Klebsiella spp.*-ს შტამების 90 %-ზე მეტი ავლენს რეზისტენტობას  
პენიცილინის ჯგუფის ანტიბიოტიკების, კერძოდ, ამპიცილინის, ამოქსიცილინის,  
პიპერაცილინის და ტიკარცილინის მიმართ. ცეფალოსპორინების ჯგუფის  
ანტიბიოტიკების მიმართ რეზისტენტობის მაჩვენებელი 42 % დან 82 %-მდე  
მერყეობს. რეზისტენტობის ყველაზე დაბალი მაჩვენებელი გამოვლინდა  
კარბაპენემების ჯგუფის ანტიბიოტიკების მიმართ (იმიპენემის - 7 %; მეროპენემი -  
7 %; მეროპენემი+EDTA - 4 %). რაც შეეხება ერთაპენემს, ამ შემთხვევაში  
რეზისტენტობის საკმაოდ მაღალი მაჩვენებელი დაფიქსირდა - 68 %. *Klebsiella spp.*-ს  
ბაქტერიული შტამების დამოკიდებულება ანტიბიოტიკების მოქმედების მიმართ,  
დიაგრამის სახით წარმოდგენილია სურათზე 2.





**სურათი 2.** *Klebsiella spp.*-ის შტამების ანტიბიოტიკო-მგრძობელობის მონაცემები. კონკრეტული ანტიბიოტიკის მიმართ რეზისტენტული ან მგრძობიარე შტამების რაოდენობა გამოხატულია პროცენტებში.

აღნიშვნები: S - მგრძობიარე, R - რეზისტენტული, I - საშუალოდ მგრძობიარე.

*Klebsiella spp.*-ის შტამების შემთხვევაში 100 შტამიდან *K. pneumoniae*-ს მხოლოდ ოთხი (4%) შტამი აღმოჩნდა კვლევაში გამოყენებული ყველა ანტიბიოტიკის მიმართ რეზისტენტული (PDR - Pandrug resistant).

ბეტა-ლაქტამაზების სინთეზის ფენოტიპური გამოვლენის მიზნით კვლევაში გამოვიყენეთ სამი ანტიბიოტიკი და მათი კომბინაცია კლავულანის მჟავასთან: ცეფოტაქსიმი (30 მკგ), ცეფოტაქსიმი+კლავულანის მჟავა (30/10 მკგ), ამოქსიცილინი (25 მკგ), ამოქსიცილინი+კლავულანის მჟავა (20/10 მკგ), ცეფტაზიდიმი (10 მკგ), ცეფტაზიდიმი+კლავულანის მჟავა (30/10 მკგ).

კვლევაში გამოყენებული *A. baumannii*-ს 120 შტამიდან ბეტა-ლაქტამაზების აქტივობა გამოვლინდა 46 შტამში (38 %), ხოლო 74 შტამში (62 %) ბეტა-ლაქტამაზური აქტივობა არ გამოჩნდა.

ჩატარებული ექსპერიმენტების მიხედვით, ბეტა-ლაქტამაზა ფერმენტის სინთეზი ფენოტიპურად დადასტურდა *Klebsiella*-ს 100 შტამიდან 93 შტამში. 7 შტამის შემთხვევაში ფერმენტის აქტივობა არ დაფიქსირებულა.

მიღებული შედეგებიდან გამომდინარე, *A. baumannii*-ს შემთხვევაში ბეტა-ლაქტამაზური აქტივობა აღინიშნება შტამების 38%-ში; ხოლო *Klebsiella*-ს შტამების უმრავლესობაში დადასტურებულ იქნა ბეტა-ლაქტამაზების სინთეზი. იმ შტამების შემთხვევაში, რომლებმაც არ გამოამჟღავნეს ფერმენტის სინთეზი, ვერ ვიმსჯელებთ ბეტა-ლაქტამაზების არსებობა-არარსებობაზე, რადგან ლიტერატურულ მონაცემებზე (Drawz and Bonomo 2010) დაყრდნობით, შეიძლება ეს შტამები ასინთეზირებდნენ ისეთი ტიპის ფერმენტებს, რომლებიც რეზისტენტულნი არიან კლავულანის მჟავას ინჰიბიტორული მოქმედების მიმართ.

### 3.2. *Acinetobacter baumannii*-სა და *Klebsiella spp.*-ს ბაქტერიული შტამების გენოტიპირება

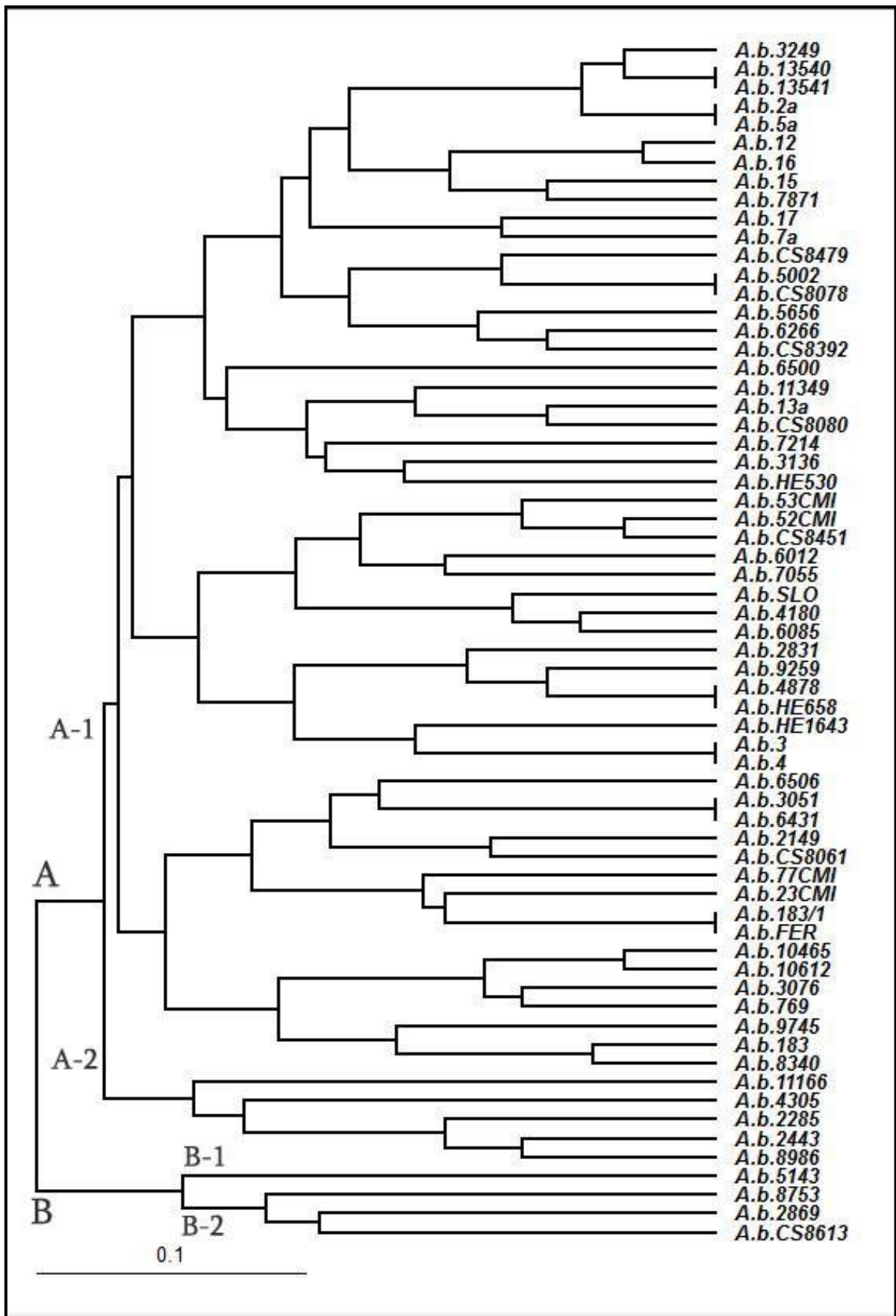
კლინიკური ბაქტერიული შტამების ქრომოსომული დნმ-ის პოლიმორფიზმის დადგენის მიზნით ჩატარებულია გელ-ელექტროფორეზი პულსირებად ველში (PFGE - Pulsed-Field Gel Electrophoresis).

ექსპერიმენტებისთვის გამოყენებული *A. baumannii*-ს 120 და *Klebsiella spp.*-ის 100 შტამიდან პათოგენების მხოლოდ 64-64 შტამი დაექვემდებარა გენოტიპირებას, დანარჩენი შტამების დნმ-ები SmaI და XbaI ენდონუკლეაზებით არ ფრაგმენტირდა და, შესაბამისად, დენდროგრამის აგების დროს უგულვებელვყავით.

*A. baumannii* და *Klebsiella spp.* შტამების გენოტიპირებისათვის გამოყენებული გვაქვს UPMGA (unweighted pair group method with arithmetic means) მეთოდი. დენდროგრამა აგებულია მიკროორგანიზმების გენოტიპებს შორის მსგავსების კოეფიციენტის გამოთვლის გზით. ორივე პათოგენის შემთხვევაში ახლომონათესავე გენომის მქონე შტამები გაერთიანდა კლასტერებად (A და B). იდენტურად ჩაითვალა იმ შტამების გენოტიპი, რომელთა დნმ-ის ფრაგმენტების მსგავსების კოეფიციენტი უდრიდა 100-ს. ჩატარებული ანალიზის მიხედვით ორივე პათოგენი ხასიათდება გენეტიკური მრავალფეროვნებით. მიღებული ექსპერიმენტული მონაცემების საფუძველზე აგებული დენდროგრამები *A. baumannii* და *Klebsiella spp.* შტამებისათვის მოცემულია სურათებზე 3 და 4.

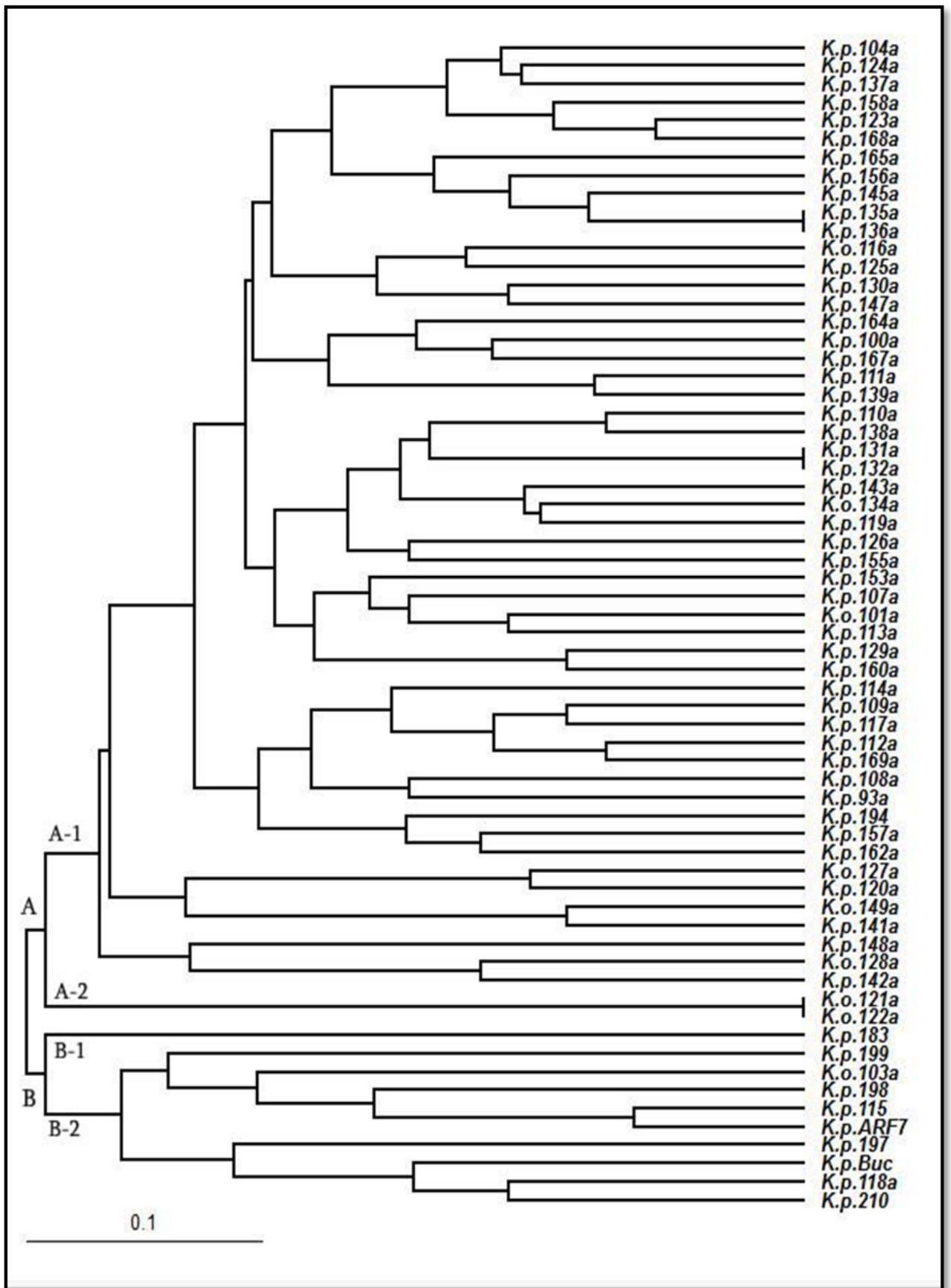
*A. baumannii* 64 ბაქტერიული შტამი განლაგდა ორ კლასტერში (A და B)(სურ.3). A კლასტერში მოთავსდა შტამების უმრავლესობა, ხოლო B კლასტერი შემოიფარგლება ერთმანეთისგან საკმაოდ განსხვავებული ოთხი შტამით. თავის მხრივ, A კლასტერი დაიყო ორ ქვეკლასტერად. A-1 ქვეკლასტერი ჰეტეროგენურობით ხასიათდება და მასში მოთავსებულია 55 შტამი, ხოლო A-2 კლასტერი მოიცავს *A.baumannii*-ის გენეტიკურად ერთმანეთისგან ნაკლებად განსხვავებულ 5 შტამს (სურ.3). ექსპერიმენტში გამოყენებული შტამების უმრავლესობა შვეიცარიიდან მიღებული შტამებია, რომლებიც ხასიათდებიან გენეტიკური ჰეტეროგენულობით. აღსანიშნავია, რომ გენეტიკურად იდენტური შტამები, ძირითადად ერთსა და იმავე წელსაა გამოყოფილი, თუმცა გამოყოფის წყარო დაუზუსტებელია. ბულგარეთიდან მიღებული შტამები (*A.b.13540* და

*A.b.13541*) ერთი და იმავე გენოტიპის ქვეშ გაერთიანდა, ასევე მოხდა საქართველოში გამოყოფილი ორი (*A.b.2a* და *A.b.5a*) და ერაყიდან მიღებული ორი (*A.b.3* და *A.b.4*) შტამის შემთხვევაში.



სურათი 3. *A. baumannii*-ის შტამების გენოტიპირების ამსახველი დენდროგრამა.

უფრო მეტად მრავალფეროვნებით გამოირჩევა *Klebsiella spp.* შტამები (სურ. 4). ამ შემთხვევაშიც შტამები დაიყო A და B კლასტერებად. თავის მხრივ, ორივე კლასტერი დაიყო ქვეკლასტერად (სურ. 4). A-1 ქვეკლასტერი წარმოდგენილია შტამების უმრავლესობით და გენოტიპთა მრავალფეროვნებით, A-2 კლასტერი კი მოიცავს მხოლოდ ორ იდენტურ შტამს. B კლასტერი აერთიანებს 10 განსხვავებული გენოტიპის მქონე შტამს, აქედან B-1 ქვეკლასტერი წარმოდგენილია მხოლოდ ერთი-*K.p.183a* შტამით. აღსანიშნავია *Klebsiella oxytoca*-ს შტამების განაწილება დენდროგრამაზე - კვლევაში გამოყენებული 9 შტამიდან ორი შტამი *K.o.121a* და *K.o.121a*, ერთმანეთის მსგავსია და A-2 კლასტერი სწორედ ამ ორ შტამს აერთიანებს. *K.o.103a* მოთავსებულია B-2 ქვეკლასტერში, ხოლო დანარჩენი შტამები განლაგებულია A-1 ქვეკლასტერში (სურ. 4). თითოეული კლასტერში გაერთიანებულია დროის სხვადასხვა პერიოდში, სხვადასხვა პაციენტების კლინიკური მასალიდან იდენტიფიცირებული შტამები. იდენტური გენოტიპით ხასიათდებიან მხოლოდ ის შტამები, რომლებიც ერთი და იმავე პაციენტის განსხვავებული კლინიკური მასალიდანაა გამოყოფილი (*K.p.135a* და *K.p.136a*; *K.p.131a* და *K.p.132a*; *K.o.121a* და *K.o.121a*).



სურათი 4. *Klebsiella* spp.-ის შტამების გენოტიპირების ამსახველი დენდროგრამა.

წარმოდგენილი მონაცემებიდან გამომდინარე კვლევაში გამოყენებული ორივე პათოგენის შტამები ხასიათდება მრავალფეროვნებით. *A. baumannii* და *Klebsiella spp.*ს გენეტიკურად განსხვავებული, ანტიბიოტიკო-რეზისტენტული ბაქტერიული შტამებიდან შეირჩა შტამები, რომლებიც გამოყენებული იქნა, გარემოს ნიმუშებიდან აქტიური ბაქტერიოფაგების გამოსაყოფად.



### 3.3. *Acinetobacter baumannii*-სა და *Klebsiella spp.*-ს ბაქტერიული შტამების მიმართ აქტიური ბაქტერიოფაგების გამოყოფა, ფაგების სუფთა ხაზების მიღება

კვლევის მთავარ მიზანს წარმოადგენდა, ანტიბიოტიკების მიმართ რეზისტენტული, ბეტა-ლაქტამაზა მაპროდუცირებელი *A. baumannii*-ს და *Klebsiella spp.*-ის ბაქტერიების მიმართ აქტიური ბაქტერიოფაგების გამოყოფა.

*A. baumannii*-ს შტამების მიმართ აქტიური ბაქტერიოფაგების გამოყოფისათვის კვლევაში გამოვიყენეთ 25 გენეტიკურად დანსხვავებული შვეიცარიული კლინიკური შტამი. შტამები შეირჩა ანტიბიოტიკო-მგრძნობელობის პროფილის მიხედვით და დაჯგუფდა 5 ვარიანტად, თითოეულ ჯგუფში შევიდა ოთხი ანტიბიოტიკო-რეზისტენტული და ერთი, ანტიბიოტიკების მიმართ მგრძნობიარე შტამი. ფაგების ლიზისური აქტივობის გამოსავლენად გამოვიყენეთ დაწვეთების მეთოდი (Spot Lysis assay). ფაგების გამოსაყოფად ჩატარებულ ექსპერიმენტებში, საკვლევ სინჯებში ლიზისური რეაქცია გამოვლინდა *A. baumannii*-ს 25-დან 18 შტამზე. ფაგის ნეგატიური კოლონიების ფორმირება მოხდა მხოლოდ ექვსი ბაქტერიული შტამის გაზონზე. სწორედ აღნიშნული ექვსი შტამი გამოვიყენეთ როგორც ფაგების მასპინძელი ბაქტერიული შტამები: *A.b.* 52CMI; *A.b.* 53CMI; *A.b.* 77CMI; *A.b.* SLO; *A.b.* CS8061; *A.b.* 11349.

*Klebsiella spp.*-ის მიმართ აქტიური ბაქტერიოფაგების გამოყოფის მიზნით გამოვიყენეთ 12 შტამი. ფილტრატების ლიზისის უნარი გამოვლინდა მხოლოდ რვა შტამის გაზონზე. აღნიშნული რვა შტამიდან ფაგის ნეგატიური კოლონიების ფორმირება მოხდა ხუთ შტამზე: *K.p.* 199; *K.p.* 213; *K.p.* 197; *K.p.* 198; *K.p.* 210. შესაბამისად, აღნიშნული შტამები გამოვიყენეთ როგორც მასპინძელი შტამები *Klebsiella*-ს სპეციფიური ბაქტერიოფაგებისათვის.

ფაგის სუფთა ხაზის შემცველი პრეპარატის მისაღებად, მოვახდინეთ ფაგოლიზატის ნიმუშებში განსხვავებული მორფოლოგიის მქონე ნეგატიური კოლონიების ერთმანეთისგან განცალკევება.

საბოლოოდ მივიღეთ *A. baumannii*-ს სპეციფიური შვიდი სუფთა ხაზის ფაგი, მათგან ორი ფაგის საერთო მასპინძელი ბაქტერია არის *A.b.* 11349, ხოლო დანარჩენი ხუთის ინდივიდუალური მასპინძლებია *A.b.* 52CMI, *A.b.* 53CMI, *A.b.* 77CMI, *A.b.* SLO

და *A. b.* CS8061. კვლევებში გამოვიყენეთ ასევე ბაქტერიოფაგი vB\_Aba M3090, რომლის გამოყოფაც მოგვიანებით მოხდა (შვეიცარიაში). ამ ფაგის მასპინძელი ბაქტერია არის *A. b.* CS8451.

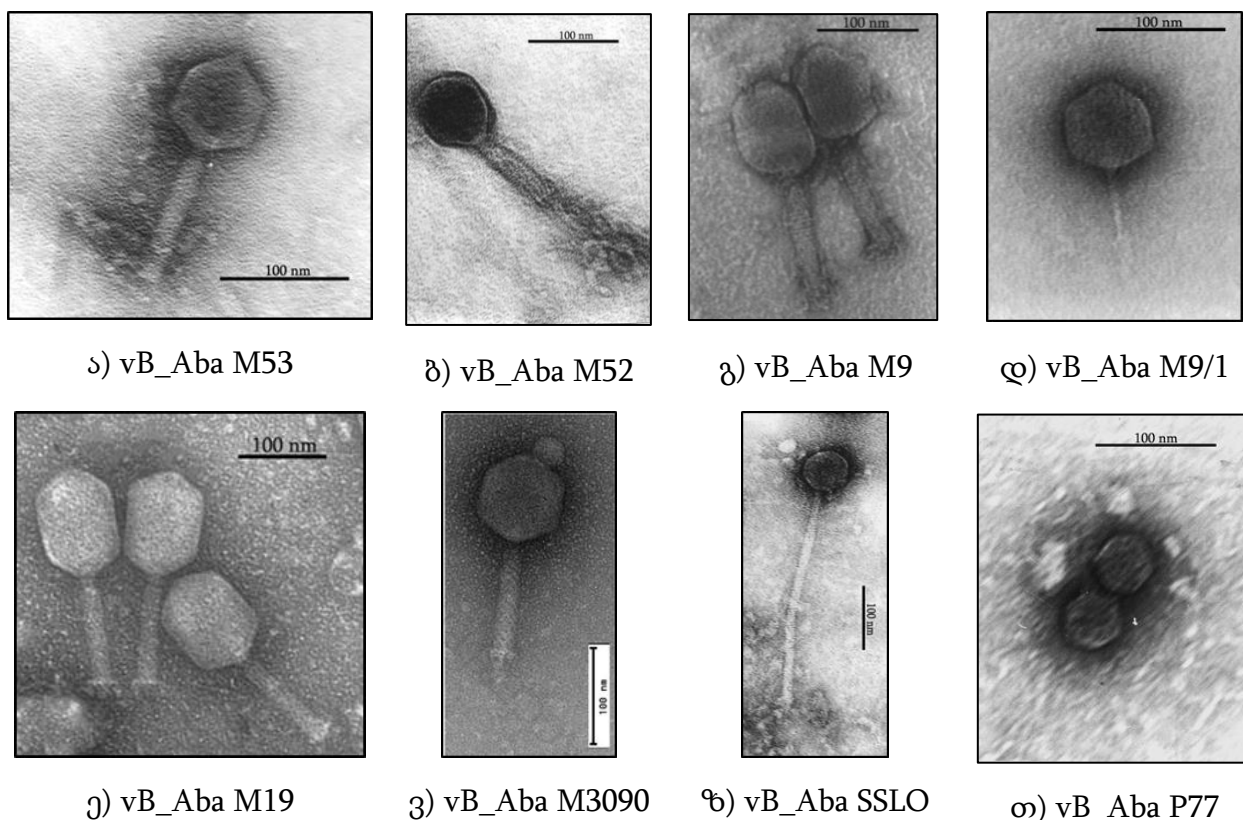
*K. pneumoniae*-ს მიმართ აქტიური ბაქტერიოფაგების ნარევიდან მივიღეთ შვიდი სუფთა ხაზის ფაგი. მათგან სამი ფაგი - vB\_Kp M210, vB\_Kp P213 და vB\_Kp P197 მრავლდება ინდივიდუალურ მასპინძელ ბაქტერიებზე, ორი ფაგის - vB\_Kp M198 და vB\_Kp S198 მასპინძელს წარმოადგენს *K. p.* 198 და დარჩენილი ორი - vB\_Kp M199 და vB\_Kp P199 - *K. p.* 199. ექსპერიმენტებში გამოვიყენეთ *K. pneumoniae*-ს მიმართ აქტიური ორი ფაგი vB\_Kp M93 და vB\_Kp M104, რომლებიც წარმატებულად იქნა გამოყენებული თერაპიაში.

საერთაშორისოდ მიღებული ნომენკლატურის მოთხოვნების მიხედვით ფაგებს სახელები მივანიჭეთ მასპინძელი ბაქტერიული უჯრედისა და ვირიონის მორფოლოგიის გათვალისწინებით (Kropinski, Prangishvili, and Lavigne 2009).

### 3.4. ბაქტერიოფაგების ინტაქტური ვირიონის მორფოლოგია

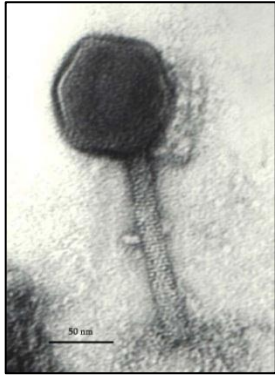
ელექტრონულ-მიკროსკოპიული კვლევების შედეგად დადგინდა გამოყოფილი ბაქტერიოფაგების მორფოლოგია და სტრუქტურული ერთეულების ზომები. ყველა გამოყოფილი ფაგი მიეკუთვნება *Caudovirales* რიგს.

*A. baumannii*-ს მიმართ სპეციფიური რვა ფაგიდან ექვსი მიეკუთვნება *Myoviridae*, ერთი - *Siphoviridae* და ერთი - *Podoviridae* მორფოლოგიურ ოჯახს. *A. baumannii* ფაგების მორფოლოგია წარმოდგენილია სურათზე 5, ხოლო ვირიონის თავის და წანაზარდის ზომები მოყვანილია ცხრილში 2.

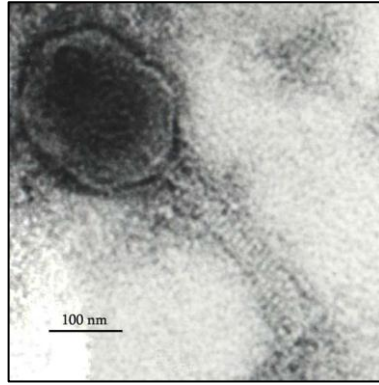


**სურათი 5.** *A. baumannii*-ს სპეციფიური ბაქტერიოფაგების ელექტრონულ-მიკროსკოპიული გამოსახულება (ბარი =100 ნმ).

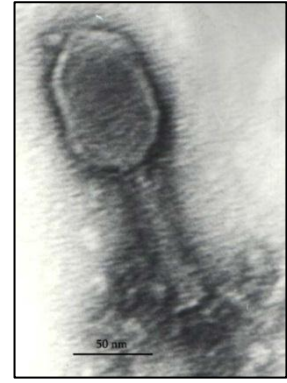
*Klebsiella*-ს ბაქტერიული უჯრედების მიმართ სპეციფიური ფაგებიდან ხუთი ფაგი მიეკუთვნება *Myoviridae*-ს, ერთი ფაგი - *Siphoviridae*-ს და სამი ფაგი - *Podoviridae*-ს მორფოლოგიურ ოჯახს (სურ.6). სტრუქტურული ერთეულების ზომები წარმოდგენილია ცხრილში 2.



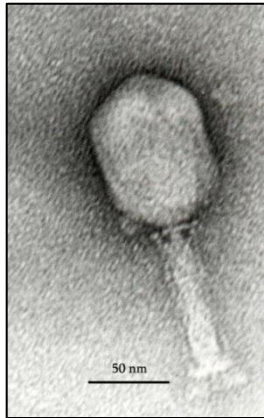
ა) vB\_Kp M210



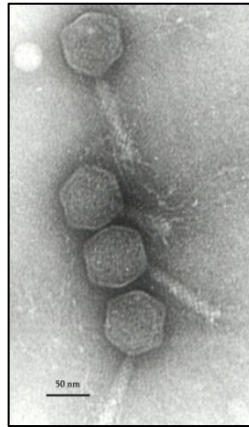
ბ) vB\_Kp M198



გ) vB\_Kp M199



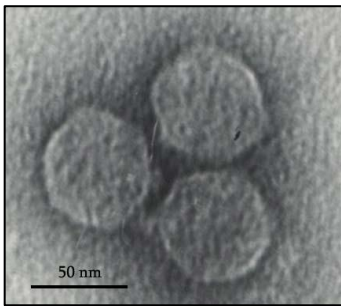
დ) vB\_Kp M93



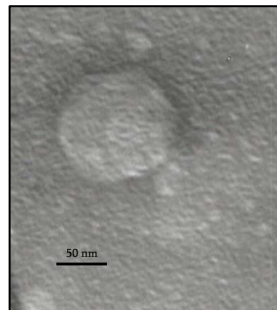
ე) vB\_Kp M104



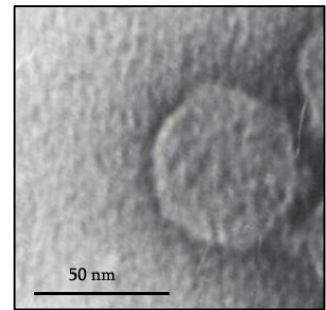
ვ) vB\_Kp S198



ზ) vB\_Kp P197



თ) vB\_Kp P213



ი) vB\_Kp P199

სურათი 6. *Klebsiella*-ს სპეციფიური ბაქტერიოფაგების ელექტრონულ-მიკროსკოპული გამოსახულება (ბარი = 50 ნმ).

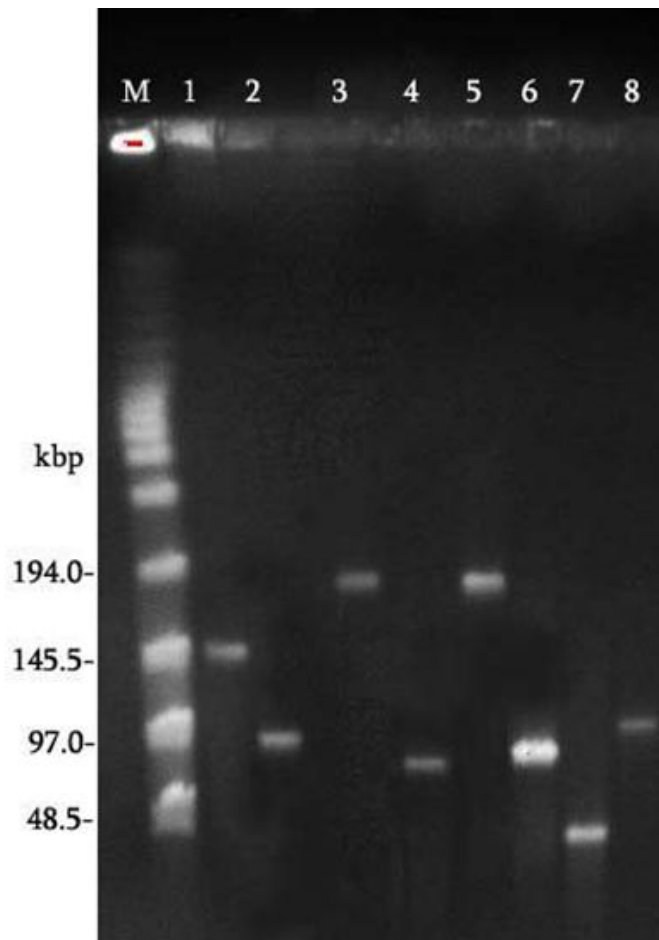
*A. baumannii*-ს და *Klebsiella*-ს შტამების მიმართ აქტიური ბაქტერიოფაგების ვირიონის მორფოლოგია და სტრუქტურული ერთეულების ზომები

	ბაქტერიოფაგის დასახელება	მორფოლოგიური ოჯახი	თავისა და წანაზარდის ზომები
<i>A. baumannii</i> -ს მიმართ აქტიური ბაქტერიოფაგები	vB_Aba M53	<i>Myoviridae</i>	თავი 76x76 ნმ წანაზარდი 102x18 ნმ
	vB_Aba M52	<i>Myoviridae</i>	თავი 76x80 ნმ წანაზარდი 89x27 ნმ
	vB_Aba M9	<i>Myoviridae</i>	თავი 93x71 ნმ წანაზარდი 111x22 ნმ
	vB_Aba M9/1	<i>Myoviridae</i>	თავი 71x71 ნმ წანაზარდი 57x4 ნმ
	vB_Aba M19	<i>Myoviridae</i>	თავი 120x84 ნმ წანაზარდი 102x18 ნმ
	vB_Aba M3090	<i>Myoviridae</i>	თავი 113x108 ნმ წანაზარდი 130x13 ნმ
	vB_Aba SSLO	<i>Siphoviridae</i>	თავი 62x62 ნმ წანაზარდი 338x13 ნმ
	vB_Aba P77	<i>Podoviridae</i>	თავი 48x48 ნმ
<i>Klebsiella spp.</i> -ს მიმართ აქტიური ბაქტერიოფაგები	vB_Kp M210	<i>Myoviridae</i>	თავი 100x100 ნმ წანაზარდი 160x17 ნმ
	vB_Kp M198	<i>Myoviridae</i>	თავი 93x71 ნმ წანაზარდი 110x17 ნმ
	vB_Kp M199	<i>Myoviridae</i>	თავი 97x84 ნმ წანაზარდი 100x17 ნმ
	vB_Kp M93	<i>Myoviridae</i>	თავი 122,7x 86 ნმ წანაზარდი 109,1x 22 ნმ
	vB_Kp M104	<i>Myoviridae</i>	თავი 90x90 ნმ წანაზარდი 120x18 ნმ
	vB_Kp S198	<i>Siphoviridae</i>	თავი 66x66 ნმ წანაზარდი 310x8.8 ნმ
	vB_Kp P197	<i>Podoviridae</i>	თავი 57x53 ნმ
	vB_Kp P213	<i>Podoviridae</i>	თავი 120x120 ნმ
	vB_Kp P199	<i>Podoviridae</i>	თავი 53x53 ნმ

### 3.5. ფაგების გენომის ზომების დადგენა და რესტრიქციული ანალიზი

ფაგების მორფოლოგიის დადგენის შემდგომ, შევაფასეთ მათი გენომის ზომები გელ-ელექტროფორეზით პულსირებად ველში (PFGE) (სურ. 7, 8).

ჩვენს მიერ ჩატარებული კვლევებით დადგინდა, რომ *A. baumannii*-ის სპეციფიური ფაგების მოლეკულური ზომები 41 ათასი ნუკლეოტიდური წყვილიდან 166 ათას ნუკლეოტიდურ წყვილს შორის დიაპაზონშია (სურ. 7, ცხრილი 3). აქედან ორი ფაგის (vB\_Aba M9 და vB\_Aba M19) გენომის ზომა დაახლოებით ერთნაირია და შეადგენს 166 ათასს ნუკლეოტიდურ წყვილს. დანარჩენი ფაგები, რომლებიც ერთ მორფოლოგიურ ჯგუფს წარმოადგენენ, გენომის ზომებით განსხვავდებიან ერთმანეთისგან.



**სურათი 7.** *A. baumannii*-ს ფაგების გენომის ანალიზი პულსირებადი გელ-ელექტროფორეზით:

მარკერი - Pulse Marker (Sigma)

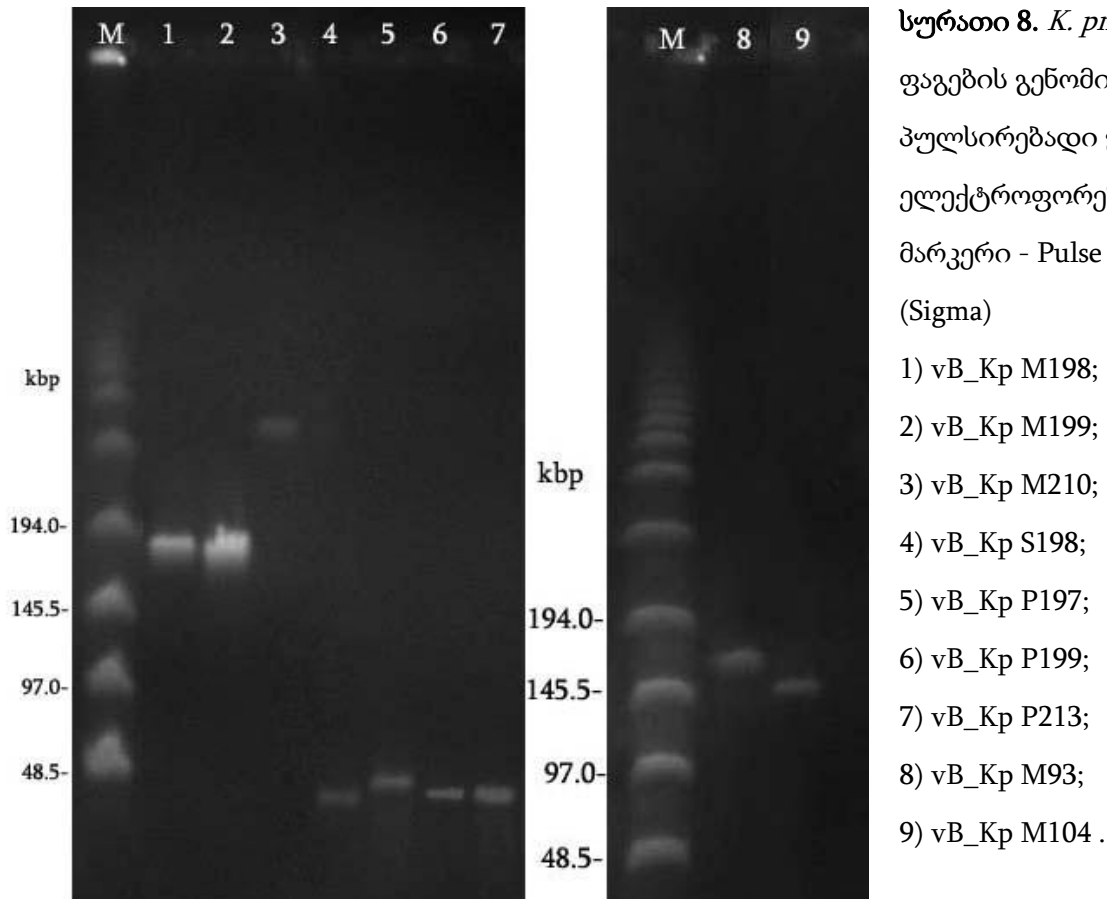
1) vB\_Aba M52; 2) vB\_Aba M53;

3) vB\_Aba M9; 4) vB\_Aba M9/1;

5) vB\_Aba M19; 6) vB\_Aba SSLO;

7) vB\_Aba P77; 8) vB\_Aba M3090.

*K. pneumoniae*-ს *Myoviridae* ოჯახის წარმომადგენელი ფაგების დნმ-ების მოლეკულური ზომა 147 ათასი ნუკლეოტიდური წყვილიდან 293 ათას ნუკლეოტიდურ წყვილამდეა. ხოლო *Podoviridae* და *Siphoviridae* ფაგების დნმ-ების მოლეკულური ზომები შეადგენს 35-45 ათას ნუკლეოტიდურ წყვილს (სურ. 8, ცხრილი 3). *Klebsiella*-ს ფაგების შემთხვევაშიც ორ ფაგს - vB\_Kp M198 და vB\_Kp M199, აქვთ იდენტური ზომის დნმ (18000 ნუკლეოტიდური წყვილი).



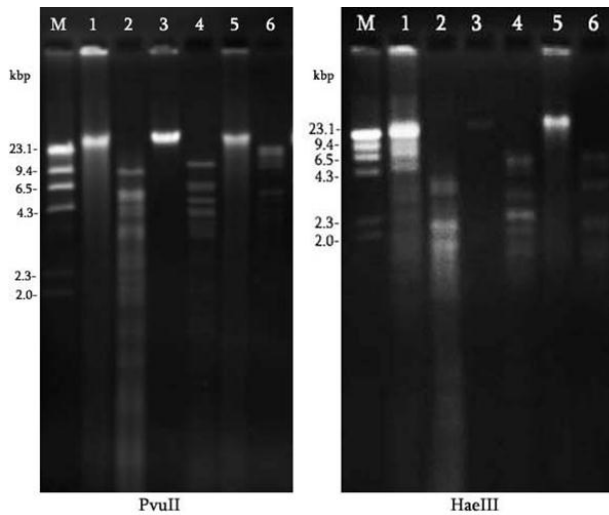
## ფაგების დნმ-ის მოლეკულური ზომა

	ფაგი	მორფოლოგიური ოჯახი	დნმ-ის ზომა (ფუძე-წყვილი)
<i>A. baumannii</i> -ს ფაგები	vB_Aba M52	<i>Myoviridae</i>	142.000
	vB_Aba M53	<i>Myoviridae</i>	82.000
	vB_Aba M9	<i>Myoviridae</i>	166.000
	vB_Aba M19	<i>Myoviridae</i>	166.000
	vB_Aba M9/1	<i>Myoviridae</i>	78.000
	vB_Aba M3090	<i>Myoviridae</i>	100.000
	vB_Aba SSLO	<i>Siphoviridae</i>	80.000
	vB_Aba P77	<i>Podoviridae</i>	41.000
<i>K. pneumoniae</i> -ს ფაგები	vB_kp M198	<i>Myoviridae</i>	180.000
	vB_kp M199	<i>Myoviridae</i>	180.000
	vB_kp M210	<i>Myoviridae</i>	255.000
	vB_Kp M93	<i>Myoviridae</i>	166.000
	vB_Kp M104	<i>Myoviridae</i>	147.000
	vB_kp S198	<i>Siphoviridae</i>	38.000
	vB_kp P197	<i>Podoviridae</i>	35.000
	vB_kp P199	<i>Podoviridae</i>	45.000
	vB_kp P213	<i>Podoviridae</i>	35.000



ერთი მორფოლოგიური ჯგუფის ქვეშ გაერთიანებული ფაგების ერთმანეთთან შესადარებლად ჩატარებულია დნმ-ის რესტრიქციული ანალიზი. ექსპერიმენტში გამოყენებულია შემდეგი რესტრიქციული ენდონუკლეაზები: EcoRI (G/AATTC), EcoRV (GAT/ATC), HindIII (A/AGCTT), HpaII (C/CGG), MspI (C/CGG), RsaI (GT/AC), Sau3A (/GATC), PvuII (CAG/CTG), HaeIII (GG/CC), BglII (A/GATCT), SspI (AAT/ATT). რესტრიქციული ფერმენტები დნმ-ის ჰიდროლიზს ახდენენ იმ შემთხვევაში, როდესაც დნმ შეიცავს იმ ოლიგონუკლეოტიდურ თანმიმდევრობას, რომელსაც კონკრეტული ფერმენტი ამოიცნობს.

*Acinetobacter*-ის ფაგებიდან გამოყოფილი დნმ-ის რესტრიქციული ანალიზის შედეგად გამოვლინდა, რომ *Myoviridae* ოჯახის წარმომადგენელი ექვსივე ფაგის დნმ-ის თანმიმდევრობაში არ აღმოჩნდა შვიდი რესტრიქციული ენდონუკლეაზას (EcoRI, EcoRV, HindIII, HpaII, MspI, RsaI, Sau3A) ამოსაცნობი საიტი, ხოლო PvuII და HaeIII ენდონუკლეაზებით დამუშავების შედეგად, აღნიშნული ფაგების დნმ-ები სხვადასხვა ზომის ფრაგმენტებად დაიყო (სურ.9). გამონაკლისია ორი ფაგი vB\_Aba M9 და vB\_Aba M19, რომელთა დნმ-ები PvuII და HaeIII ფერმენტების მიმართაც მდგრადი აღმოჩნდა. vB\_Aba SSLO ფაგის დნმ ფრაგმენტირდა EcoRV, HindIII, Sau3A და RsaI ფერმენტებით (სურ.10). გამოყენებული ენდონუკლეაზებიდან, მხოლოდ Sau3A და HaeIII-მა მოახდინა *Podoviridae* ოჯახის წარმომადგენელი ფაგის- vB\_Aba P77-ის დნმ-ის ჰიდროლიზი (სურ.11).

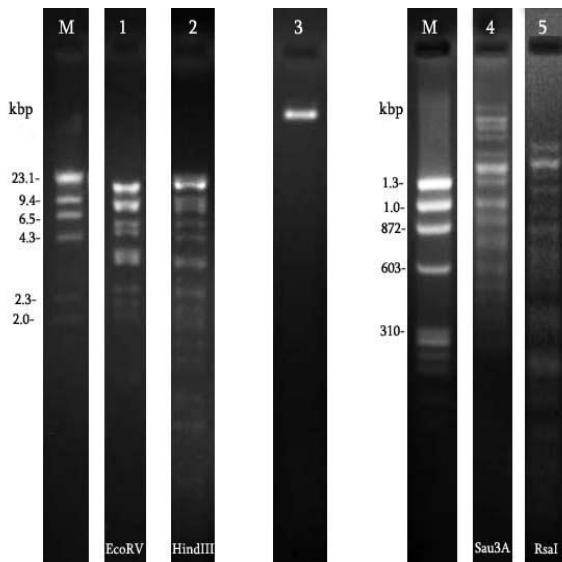


სურათი 9.

*A. baumannii*-ს *Myovoridae* ფაგების დნმ-ის რესტრიქციული ანალიზი PvuII და HaeIII ფერმენტებით:

მარკერი- Lambda HindIII digested (Neb. BioLabs)

- 1) vB\_Aba M52; 2) vB\_Aba M53;
- 3) vB\_Aba M9; 4) vB\_Aba M9/1;
- 5) vB\_Aba M19; 6) vB\_Aba M309

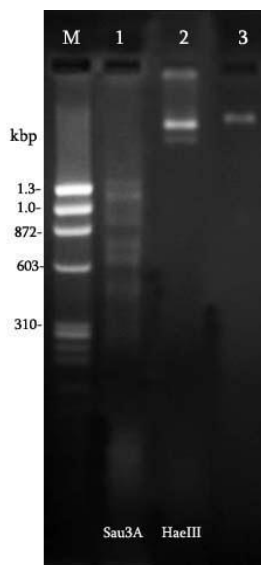


სურათი 10.

*A. baumannii*-ს *Siphoviridae* ფაგი - vB\_Aba SSLO დნმ-ის რესტრიქციული ანალიზი.

მარკერი 1- Lambda HindIII digested (Neb. BioLabs)

- მარკერი 2-ΦX174 DNA HaeIII (Neb. BioLabs)  
 ფაგის დნმ დამუშავებულია ფერმენტებით:
- 1) EcoRV; 2) Hind III;
  - 3) ნატურული დნმ; 4) Sau3A; 5) RsaI;



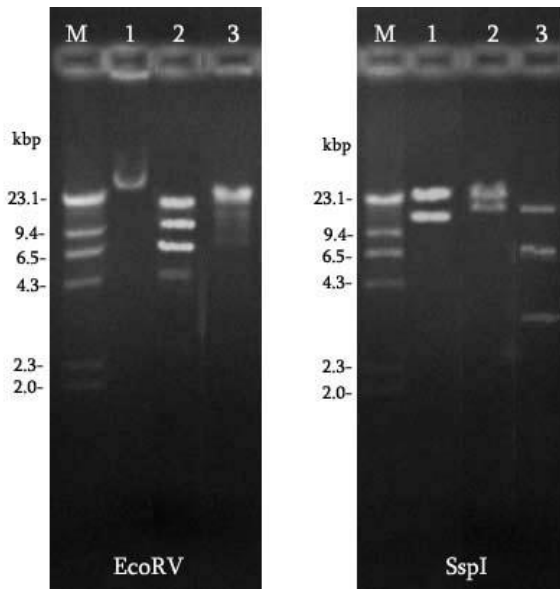
სურათი 11.

*A. baumannii*-ს *Podoviridae* ფაგი - vB\_Aba P77 დნმ-ის რესტრიქციული ანალიზი.

მარკერი-ΦX174 DNA HaeIII (Neb. BioLabs)

- ფაგის დნმ დამუშავებულია ფერმენტებით:
- 1) Sau3A; 2) HaeIII; 3) ნატურული დნმ.

*Klebsiella*-ს ბაქტერიოფაგების დნმ-ების SspI და EcoRV ენდონუკლეაზებით დამუშავების შედეგად დადგინდა, რომ *Podoviridae* ოჯახის ფაგების დნმ-ები ერთმანეთისაგან განსხვავებულად ფრაგმენტირდა (სურ.12). ამ ორი ფერმენტის მოქმედების მიხედვით *Myoviridae* ფაგებიც განსხვავდებოდა ერთმანეთისაგან (სურ.13). ფაგების vB\_kp M93, vB\_kp M104 და vB\_kp M210-ის დნმ-ებში არ აღმოჩნდა ფერმენტების - EcoRV და BglIII სამიზნე ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობა. ასევე, vB\_kp M93 და vB\_kp M104 ფაგების დნმ-ები არც SspI-ით დამუშავების შედეგად ჰიდროლიზდა. რაც შეეხება *Siphoviridae* ფაგს vB\_Kp S198, კვლევაში გამოყენებულმა ყველა ფერმენტმა მოახდინა მისი დნმ-ის ფრაგმენტირება (სურ.14).

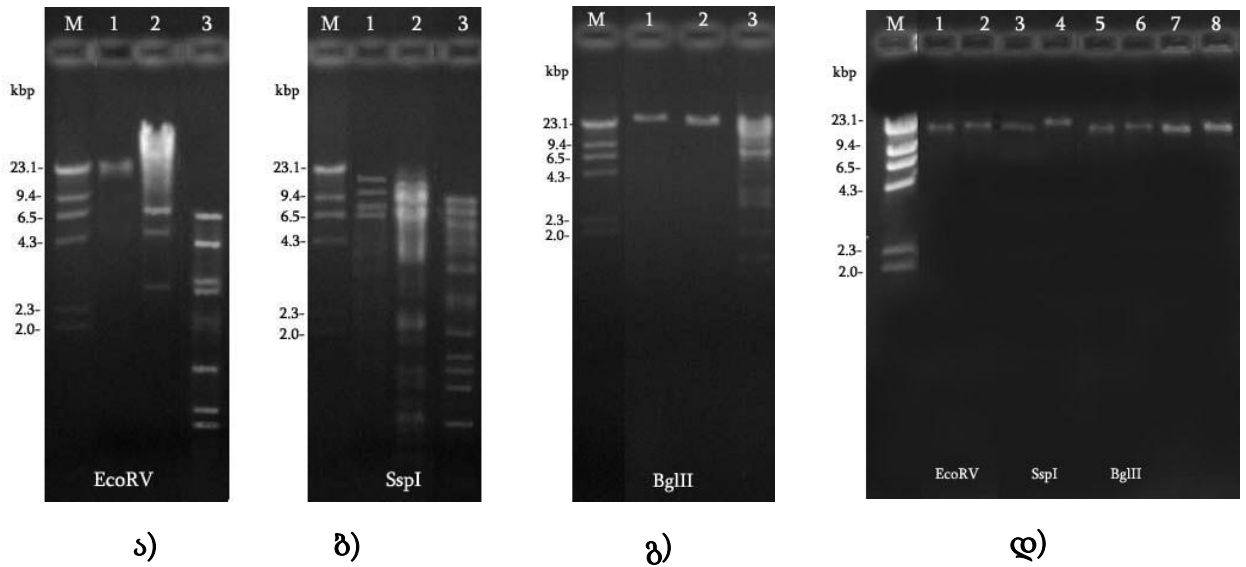


**სურათი 12.**

*Klebsiella*-ს *Podoviridae* ფაგების დნმ-ის რესტრიქციული ანალიზი EcoRV და SspI ფერმენტებით:

მარკერი- Lambda HindIII digested (Neb. BioLabs)

1) vB\_Kp P197; 2) vB\_Kp P213; 3) vB\_Kp P199



**სურათი 13.** *Klebsiella*-ს *Myoviridae* ფაგების დნმ-ის რესტრიქციული ანალიზი:

მარკერი- Lambda HindIII digested (Neb. BioLabs)

ა-1) vB\_kp M210; 2) vB\_kp M198 3) vB\_kp M199; ფაგის დნმ-ები დამუშავებული EcoRV

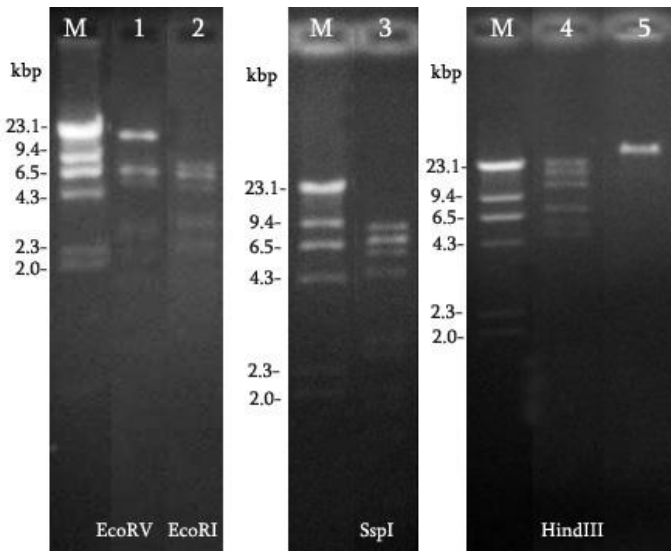
ბ-1) vB\_kp M210; 2) vB\_kp M198 3) vB\_kp M199; ფაგის დნმ-ები დამუშავებული SspI

გ-1) vB\_kp M210; 2) vB\_kp M198 3) vB\_kp M199; ფაგის დნმ-ები დამუშავებული BglIII

დ-1) vB\_kp M93; 2) vB\_kp M104 ფაგის დნმ-ები დამუშავებული EcoRV

3) vB\_kp M93; 4) vB\_kp M104 ფაგის დნმ-ები დამუშავებული SspI

5) vB\_kp M93; 6) vB\_kp M104 ფაგის დნმ-ები დამუშავებული BglIII



**სურათი 14.**

*Klebsiella*-ს *Siphoviridae* ფაგის-  
vB\_Kp S198 დნმ-ის რესტრიქციული  
ანალიზი:

მარკერი- Lambda HindIII digested  
(Neb. BioLabs)

ფაგის დნმ დამუშავებულია  
ფერმენტებით:

1) EcoRV; 2) EcoRI; 3) SspI;

4) Hind III; 5) ნატური დნმ.

ამრიგად, ჩატარებული რესტრიქციული ანალიზის საფუძველზე დადგენილია, რომ *A. baumannii*-ის ორი *Myoviridae* ფაგის- vB\_Aba M9 და vB\_Aba M19 და *K. pneumoniae*-ს ორი *Myoviridae* ფაგის- vB\_kp M93 და vB\_kp M104 დნმ-ები ხასიათდებიან მკვეთრად გამოხატული მდგრადობით გამოყენებული რესტრიქციული ენდონუკლეაზების მიმართ. ხოლო დანარჩენი *Myoviridae*, *Podoviridae* და *Siphoviridae* ფაგების დნმ-ები კი ჰიდროლიზდა განსხვავებული ამოსაცნობი საიტის მქონე ფერმენტებით.

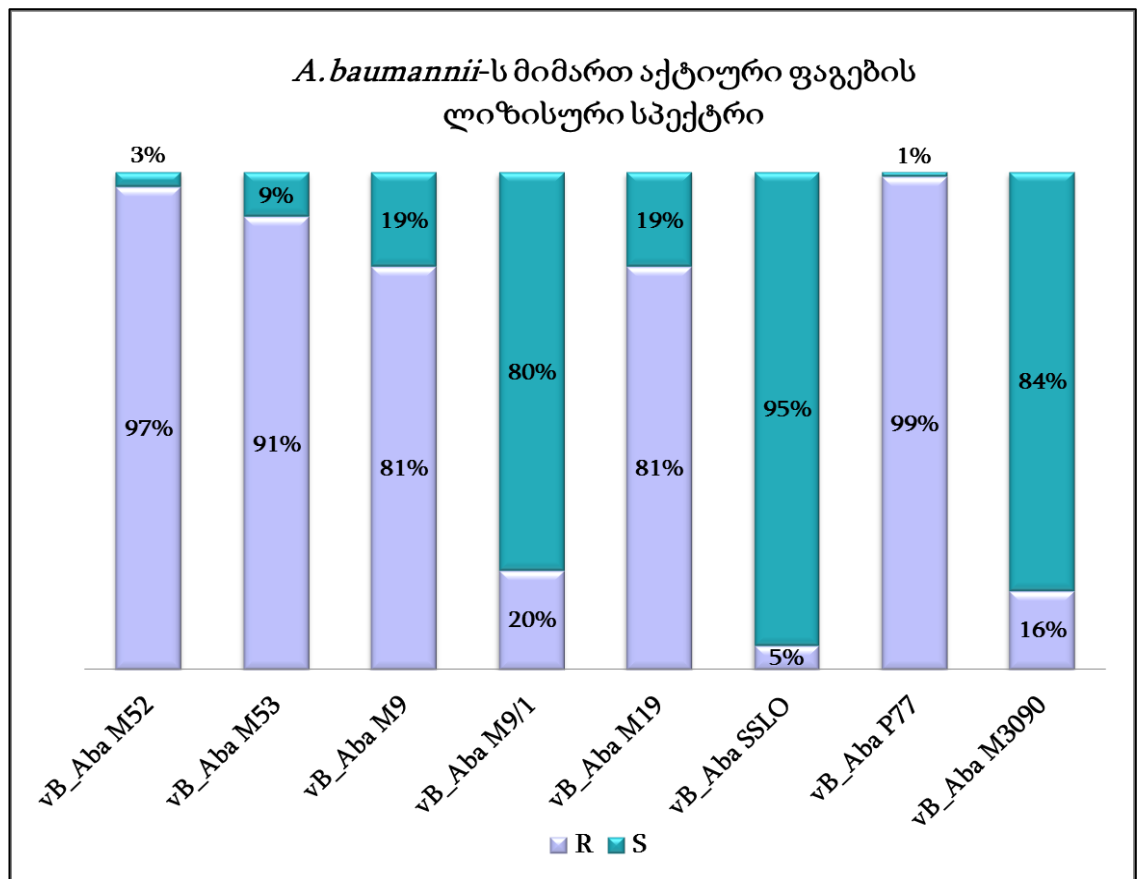
მიღებული შედეგები ადასტურებს, რომ *A. baumannii*-ის ბაქტერიული შტამების მიმართ აქტიური *Myoviridae* ფაგები, ასევე *K. pneumoniae*-ს მიმართ აქტიური *Myoviridae* და *Podoviridae* ოჯახის წარმომადგენელი ფაგები გენეტიკურად განსხვავდებიან ერთმანეთისაგან.

### 3.6. ბაქტერიოფაგების ბიოლოგიური თვისებები

ფაგების მორფოლოგიის და გენომის შესწავლის შედეგად დადგინდა, რომ ორივე სახეობის მიმართ აქტიური, ახლადგამოყოფილი ბაქტერიოფაგები სამივე მორფოლოგიური ჯგუფის: *Myoviridae*, *Siphoviridae* და *Podoviridae* წარმომადგენლები არიან. კვლევების შემდგომ ეტაპზე შევისწავლეთ ამ ფაგების ლიზისური სპექტრი, რის საფუძველზეც შევარჩიეთ აქტიური და ლიზისური სპექტრით ერთმანეთისგან განსხვავებული ფაგები მათი ბიოლოგიური მახასიათებლების დეტალური შესწავლისათვის.

#### 3.6.1. ბაქტერიოფაგების ლიზისური სპექტრი

ბაქტერიოფაგის უნარი მოახდინოს ბაქტერიული შტამების ლიზისი არის კონკრეტული ბაქტერიული ვირუსის ერთ-ერთი მთავარი ბიოლოგიური მახასიათებელი. ბაქტერიოფაგების ლიზისური სპექტრი განვსაზღვრეთ ე.წ. დაწვეთების მეთოდით. ფაგების ლიზისური სპექტრის შესწავლის შედეგად დადგინდა, რომ *A. baumannii*-ს შტამების მიმართ განსაკუთრებული აქტივობით გამოირჩევა *Siphoviridae* ოჯახის წარმომადგენელი ფაგი (vB\_Aba SSL0). მისი ლიზისური სპექტრი მოიცავს შემოწმებული შტამების 95%-ს (114 შტამი 120-იდან), *Podoviridae* ოჯახის წარმომადგენელი ფაგი - vB\_Aba P77, პატრონი ბაქტერიის გარდა აღიზიერებს მხოლოდ ერთ შტამს. ორი ფაგი - vB\_Aba M9/1 და vB\_Aba M3090, რომლებიც მიეკუთვნებიან *Myoviridae* ოჯახს, ხასიათდებიან ფართო ლიზისური სპექტრით - მათ შეუძლიათ გამოიწვიონ შტამების 80% და 85%-ის ლიზისი შესაბამისად. *A. baumannii*-ს შტამების მიმართ აქტიური ფაგების ლიზისური აქტივობის ამსახველი პროცენტული მაჩვენებლები წარმოდგენილია სურათზე 15.



**სურათი 15.** *A. baumannii*-ს შტამების მიმართ სპეციფიური ბაქტერიოფაგების ლიზისური აქტივობა.

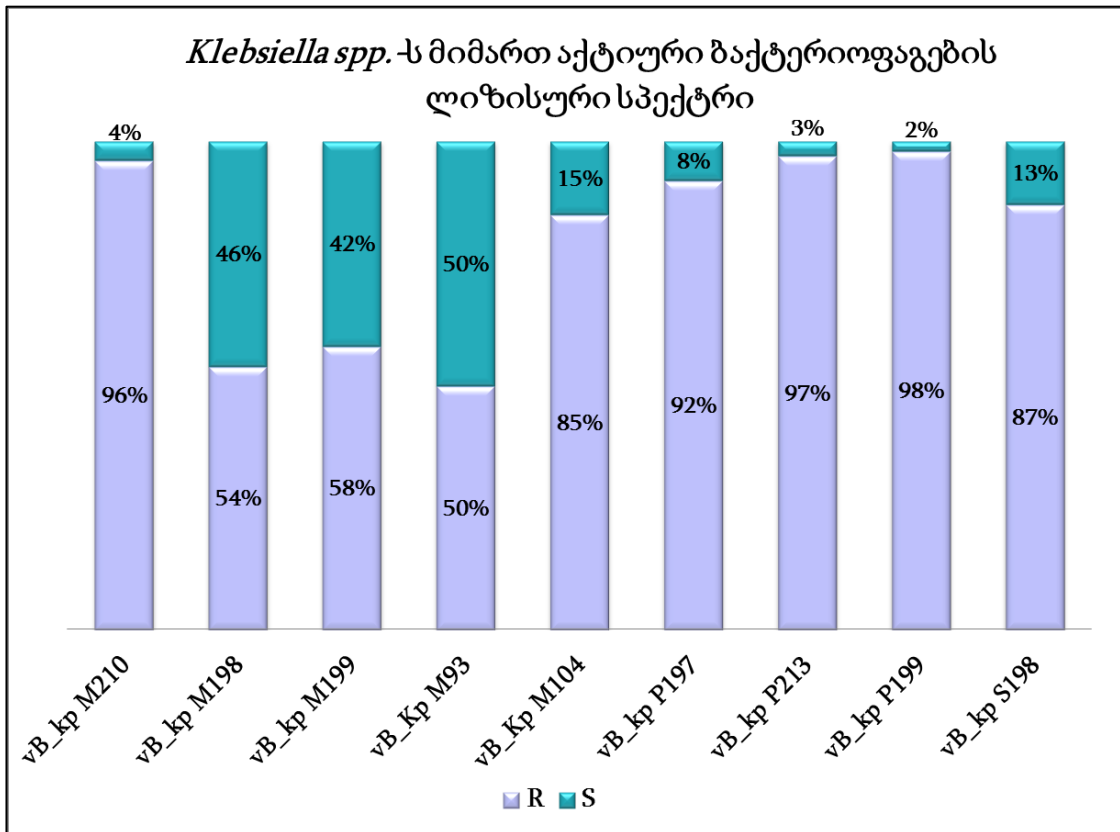
აღნიშვნები: S-ფაგის მოქმედების მიმართ მგრძობიარე შტამები;

R-ფაგის მოქმედების მიმართ რეზისტენტული შტამები.

*A. baumannii*-ის სამი ფაგის - vB\_Aba SSLO, vB\_Aba M9/1 და vB\_Aba M3090-ის მიმართ მგრძობიარე შტამები, გენოტიპირების მიხედვით არ მიეკუთვნებიან მხოლოდ ერთ ჯგუფს, არამედ განაწილებულნი არიან როგორც A, ასევე B კლასტერებში (სურ.3). ეს მიუთითებს შესწავლილი ფაგების ფართო ლიზისურ სპექტრზე, რომელიც ვრცელდება გენეტიკურად მრავალფეროვან შტამებზე.

*Klebsiella*-ს სახეობების მიმართ აქტიური ფაგების შემთხვევაში ფართო ლიზისური აქტივობით გამოირჩევიან *Myoviridae* ოჯახის წარმომადგენლები, კერძოდ სამი ფაგი vB\_kp M198, vB\_kp M199 და vB\_Kp M93. მათი ლიზისური აქტივობა ვრცელდება როგორც *K. pneumoniae*-ს ასევე, *K. oxytoca* ბაქტერიულ შტამების მიმართ. გენოტიპირების მიხედვით ამ სამი ფაგის მიმართ მგრძობიარე შტამები განაწილებულია როგორც A, ასევე B კლასტერებში (სურ.4). *Podoviridae*

ოჯახის ფაგები (vB\_Kp P213, vB\_Kp P199 და vB\_Kp P197) მხოლოდ *K. pneumoniae*-ს შტამების ლიზისს ახდენენ და მათი აქტივობა შემოიფარგლება 2 - 8%-ით. *Siphoviridae* ოჯახის ფაგი (vB\_Kp S198) ხასიათდება საკმაოდ ვიწრო ლიზისური სპექტრით. ფაგების ლიზისური აქტივობის პროცენტული მაჩვენებლები წარმოდგენილია სურათზე 16.



**სურათი 16.** *Klebsiella*-ს ბაქტერიული შტამების მიმართ სპეციფიური ბაქტერიოფაგების ლიზისური აქტივობა.

აღნიშვნები: S-ფაგის მოქმედების მიმართ მგრძობიარე შტამები;

R-ფაგის მოქმედების მიმართ რეზისტენტული შტამები.

აღსანიშნავია, რომ ორივე პათოგენის მიმართ აქტიური ბაქტერიოფაგები წარმატებულად ახდენენ ბეტა-ლაქტამაზა მაპროდუცირებელი, ანტიბიოტიკების მიმართ რეზისტენტული შტამების ლიზისს.



### 3.6.2. ბაქტერიოფაგების კულტივირების ეფექტურობა

ბაქტერიოფაგის ერთ-ერთი თვისებაა დაუკავშირდეს მიკრობულ უჯრედს და მოახდინოს მისი ლიზისი შთამომავლობის წარმოქმნის გარეშე (აბორტული ინფექცია/„ლიზისი გარედან“). შესაბამისად, მნიშვნელოვანია შემოწმდეს ფაგის კულტივირების ეფექტურობა მის მიმართ მგრძობიარე ბაქტერიულ შტამებზე. კულტივირების ეფექტურობა არის ფაგის ტიტრი საკვლევ ბაქტერიულ უჯრედზე, შედარებული ამავე ფაგის ტიტრთან, რომელსაც იძლევა მასპინძელ ბაქტერიულ უჯრედზე.

ლიზისური სპექტრის და დნმ-ს რესტრიქციული ანალიზის მონაცემების საფუძველზე შეირჩა ორივე პათოგენის მიმართ აქტიური ფაგები შემდგომი კვლევებისთვის.

ფაგების კულტივირების ეფექტურობა შევისწავლეთ *A. baumannii*-ს ხუთი აქტიური ფაგისათვის: vB\_Aba M9/1, vB\_Aba SSLO, vB\_Aba M9, vB\_Aba M19 და vB\_Aba M3090. აქედან სამი ფაგი (vB\_Aba M9/1, vB\_Aba SSLO და vB\_Aba M3090) ფართო ლიზისური აქტივობით ხასიათდება, ხოლო ორი ფაგის (vB\_Aba M9 და vB\_Aba M19) ლიზისური სპექტრი მოიცავს შტამების მხოლოდ 19%-ს.

ექსპერიმენტისათვის შერჩეულ შტამებზე ფაგების გამრავლების მაჩვენებელი 0.001-დან 1-მდე მერყეობს. დეტალური მონაცემები მოყვანილია ცხრილში 4 და 5. მიუხედავად იმისა, რომ ფაგები vB\_Aba M9 და vB\_Aba M19 ფართო ლიზისური სპექტრით არ გამოირჩევიან და მათი აქტივობა ვრცელდება მხოლოდ შტამების 19 %-ზე, ორივე ფაგი ეფექტურად გამრავლდა შერჩეულ შტამებზე. ფაგების კულტივირების ეფექტურობა მათ მიმართ მგრძობიარე შტამებზე ვარირებს 0.0005-დან 1-ის ფარგლებში (ცხრილი 5).

მიღებული მონაცემების მიხედვით ბაქტერიოფაგები მკვეთრად განსხვავდებიან ერთმანეთისგან, თუმცა ხასიათდებიან გადამფარავი სპექტრით, რაც ზრდის მათ ეფექტურობას.

*A. baumannii*-ს მიმართ აქტიური ფაგების კულტივირების ეფექტურობის მაჩვენებელი

<i>A. baumannii</i> -ს შტამები	ბაქტერიოფაგების კულტივირების ეფექტურობა		
	vB_Aba M9/1	vB_Aba M3090	vB_Aba SSLO
<i>A.b.</i> 11349	1	--	0.06
<i>A.b.</i> CS8451	0.005	1	0.003
<i>A.b.</i> SLO	--	R	1
<i>A.b.</i> 3249	0.001	0.4	0
<i>A.b.</i> 52CMI	1	0.4	0
<i>A.b.</i> FER	0.15	0.06	0.006
<i>A.b.</i> 7133	0.2	--	0.01
<i>A.b.</i> 6085	0.1	--	0.3
<i>A.b.</i> 8568	0.01	0	0.2
<i>A.b.</i> 4305	R	0.4	--
<i>A.b.</i> 11166	0.2	0.6	--
<i>A.b.</i> 10612	0.1	0.006	--
<i>A.b.</i> 183/1	0.01	0.6	0
<i>A.b.</i> 242	0.01	0.2	--
<i>A.b.</i> 104	0.01	0.016	0
<i>A.b.</i> 5a	0.02	--	0.01
<i>A.b.</i> 13543	1	0	--
<i>A.b.</i> 13373	0.4	--	--
<i>A.b.</i> 3076	0	0.4	0.003
<i>A.b.</i> 865	0.4	0	0.06
<i>A.b.</i> 16	--	--	0.02
<i>A.b.</i> 5143	0.4	0	--
<i>A.b.</i> 3	--	0	0.003
<i>A.b.</i> 8340	--	0.006	--
<i>A.b.</i> 769	0.5	--	--

<i>A. b.</i> 867	--	--	0.001
<i>A. b.</i> 1	R	0.6	0.03
<i>A. b.</i> 1ICU	--	0.4	--
<i>A. b.</i> 9259	0.1	--	--
<i>A. b.</i> CS8080	--	1	R
<i>A. b.</i> 2869	0	0.2	0.3
<i>A. b.</i> 2443	0	--	0.03
<i>A. b.</i> 10465	0	0	0.03
<i>A. b.</i> 9310	--	--	0.003

**აღნიშვნები:** **0** ფაგი არ გამრავლდა შტამზე; **R** ფაგის მოქმედების მიმართ რეზისტენტული შტამი;

-- შტამი არ არის გამოყენებული კონკრეტული ფაგისთვის;

### ცხრილი 5.

*A. baumannii*-ს მიმართ აქტიური ფაგების კულტივირების ეფექტურობის მაჩვენებელი

<i>A. baumannii</i> -ს შტამები	ბაქტერიოფაგების კულტივირების ეფექტურობა	
	vB_Aba M9	vB_Aba M19
<i>A. b.</i> 11349	1	R
<i>A. b.</i> CS8061	R	1
<i>A. b.</i> 52CMI	0.07	R
<i>A. b.</i> 7133	0.1	R
<i>A. b.</i> 3136	R	0.1
<i>A. b.</i> 6085	0.04	R
<i>A. b.</i> 8568	0.07	--
<i>A. b.</i> 2149	R	0.4
<i>A. b.</i> 6266	R	0.1
<i>A. b.</i> 11166	0.4	R
<i>A. b.</i> 6a	R	1
<i>A. b.</i> 2285	R	0.3
<i>A. b.</i> 53CMI	0.01	R
<i>A. b.</i> CS8080	0.1	R

<i>A. b.</i> 1	R	0.06
<i>A. b.</i> 13543	0.0005	R
<i>A. b.</i> 13373	1	R
<i>A. b.</i> 7871	R	0.01
<i>A. b.</i> 7055	R	0.01
<i>A. b.</i> 3076	0.3	R
<i>A. b.</i> CS8078	1	1
<i>A. b.</i> 9745	1	0
<i>A. b.</i> 3051	R	0.05
<i>A. b.</i> 5002	0.1	R
<i>A. b.</i> 7a	R	0.09
<i>A. b.</i> 6012	0	--

**ღნიშვნები:** **0** ფაგი არ გამრავლდა შტამზე; **R** ფაგის მოქმედების მიმართ რეზისტენტული შტამი;  
 -- შტამი არ არის გამოყენებული კონკრეტული ფაგისთვის;

*Klebsiella*-ს ფაგების შემთხვევაში ექსპერიმენტში გამოვიყენეთ მხოლოდ ის სამი ფაგი, რომელთა ლიზისური სპექტრი თითქმის 50%- იყო (vB\_Kp M93, vB\_kp M198 და vB\_kp M199). სამივე ფაგი *Myoviridae* ოჯახის წარმომადგენელია. თითოეული მათგანისათვის შერჩეულ მგრძნობიარე შტამებზე კულტივირების ეფექტურობის სიდიდე მაღალია. მიღებული მონაცემები ასახულია ცხრილში 6.

ცხრილი 6.

*Klebsiella*-ს მიმართ აქტიური ფაგების კულტივირების ეფექტურობის მაჩვენებელი

<i>Klebsiella</i> -ს შტამები	ბაქტერიოფაგების კულტივირების ეფექტურობა		
	vB_Kp M93	vB_Kp M198	vB_Kp M199
<i>K.p.93a</i>	1	--	R
<i>K.p.198</i>	R	1	--
<i>K.p.199</i>	R	R	1
<i>K.p.100a</i>	0	0.015	R
<i>K.p.102a</i>	R	0.5	0.01
<i>K.o.103a</i>	R	1	0.01
<i>K.o.105a</i>	1	0	0.01
<i>K.p.106a</i>	R	0	0.1
<i>K.p.107a</i>	R	0.02	R
<i>K.p.112a</i>	0.05	R	R
<i>K.p.113a</i>	0.05	1	R
<i>K.p.118a</i>	0.15	--	R
<i>K.o.121a</i>	0	--	0.005
<i>K.p.128a</i>	--	0.05	0.05
<i>K.p.129a</i>	0	0.003	R
<i>K.p.130a</i>	0.15	R	R
<i>K.p.131a</i>	--	0.5	R
<i>K.p.148a</i>	0	0.15	R
<i>K.o.151a</i>	0.5	1	1
<i>K.p.152a</i>	--	0.0003	0.15
<i>K.p.153a</i>	0.5	1	0
<i>K.p.154a</i>	0.5	1	R
<i>K.p.157a</i>	0.5	R	R
<i>K.p.158a</i>	0.025	--	0
<i>K.p.159a</i>	--	0.5	R

<i>K.p.191a</i>	0.0025	R	0
<i>K.p.111a</i>	0.05	1	0.015
<i>K.p.161a</i>	0.05	0.5	0.02
<i>K.p.164a</i>	0	0.25	R
<i>K.p.170a</i>	0	0	1
<i>K.p.171a</i>	R	R	0.05
<i>K.p.177a</i>	0	0	0.005
<i>K.p.183a</i>	R	R	0.5
<i>K.p.194a</i>	R	--	1

**აღნიშვნები:** 0 ფაგი არ გამრავლდა შტამზე; R ფაგის მოქმედების მიმართ რეზისტენტული შტამი;

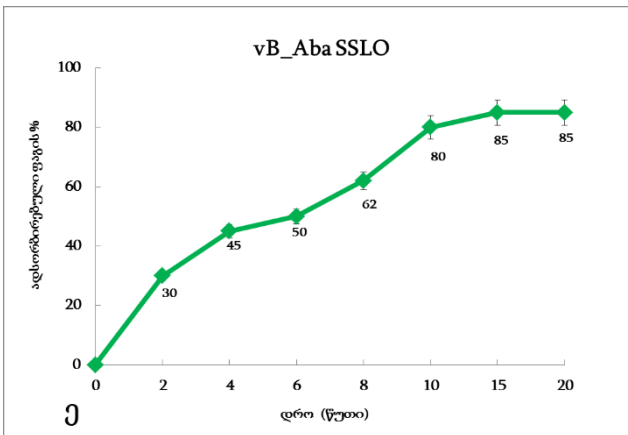
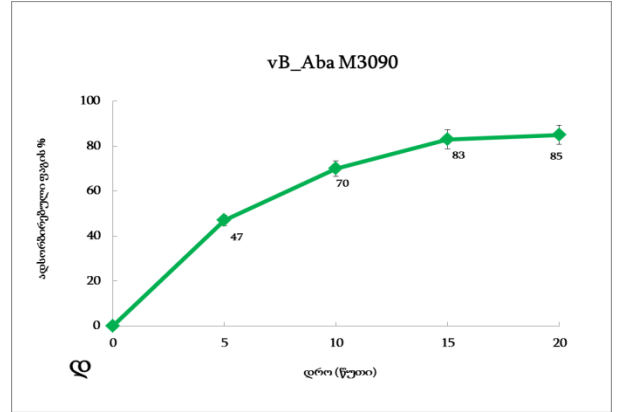
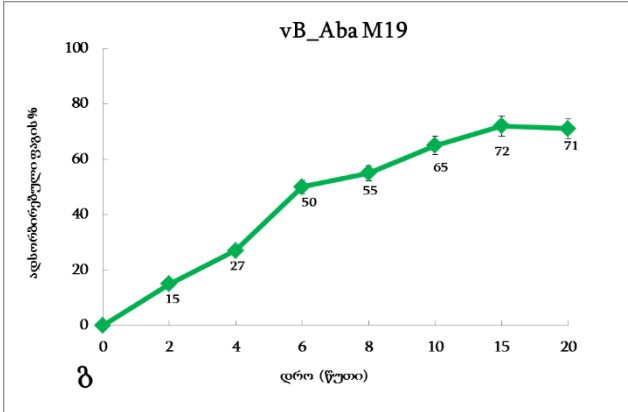
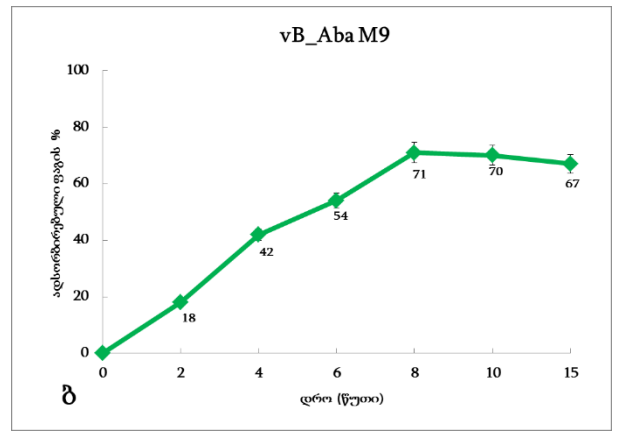
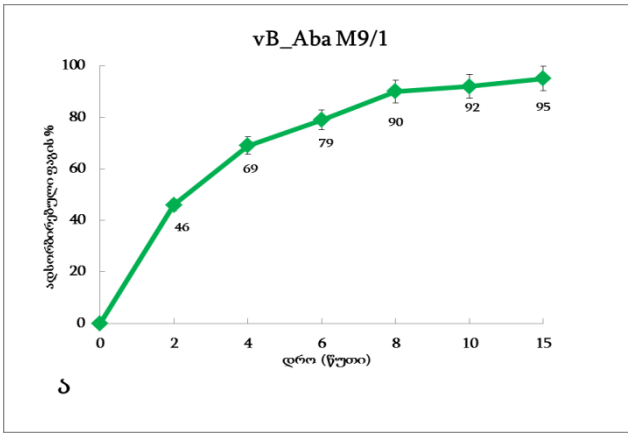
-- შტამი არ არის გამოყენებული კონკრეტული ფაგისთვის;

ორივე, *A. baumannii*-ს და *Klebsiella spp.*-ს საწინააღმდეგო ფაგებისათვის დამახასიათებელია გამრავლების საკმაოდ მაღალი ეფექტურობა. შედეგებიდან გამომდინარე შეიძლება ჩაითვალოს, რომ ფაგები უმეტეს შემთხვევაში არ ახდენენ ბაქტერიული უჯრედების ლიზირებას გამრავლების გარეშე. შეიძლება ვივარაუდოთ, რომ შესწავლილი ფაგები საკმაოდ ეფექტურად ახერხებენ თავი აარიდონ მასპინძლის თავდაცვის სისტემას და წარმატებით წარმოქმნიან შთამომავლობას.

### 3.6.3. ბაქტერიოფაგების რეპროდუქციული ციკლი მახასიათებლები

ფაგების ბიოლოგიური მახასიათებლები, კერძოდ ადსორბცია პატრონ ბაქტერიულ უჯრედზე ჩატარებულია იმ ბაქტერიოფაგებისთვის, რომლებიც მაღალი აქტივობით გამოირჩეოდნენ კვლევაში გამოყენებული შტამების მიმართ. *A. baumannii*-ს ფაგების შემთხვევაში ექსპერიმენტში გამოვიყენეთ ხუთი (vB\_Aba SSLO, vB\_Aba M9/1, vB\_Aba M9, vB\_Aba M3090 და vB\_Aba M19), ხოლო *Klebsiella*-ს ფაგებიდან კი სამი ბაქტერიოფაგი (vB\_Kp M93, vB\_kp M198 და vB\_kp M199).

მიღებული ექსპერიმენტული შედეგებით გამოვლინდა, რომ *A. baumannii*-ს ხუთივე ფაგი სხვადასხვა დროის მონაკვეთში და განსხვავებული ეფექტურობით ადსორბირდება სამიზნე ბაქტერიულ უჯრედზე. მათ შორის, *Myoviridae* vB\_Aba M9/1 ფაგის 92% პატრონ ბაქტერიულ უჯრედზე ადსორბირდება 10 წუთის განმავლობაში (სურ. 17 ა). *Myoviridae* ოჯახის წარმომადგენელი დანარჩენი ორი ფაგისათვის (vB\_Aba M9 და vB\_Aba M19) ადსორბირებული ფაგების მაქსიმალური პროცენტი შეესაბამება 71% -ს რვა წუთის განმავლობაში ფაგი vB\_Aba M9-თვის, ხოლო 72%-ს 15 წუთის განმავლობაში ფაგი vB\_Aba M19-თვის (სურ. 17 ბ,გ). 15 წუთს ანდომებს 83%-იანი ადსორბირებისათვის ფაგი vB\_Aba M3090 (სურ. 17 დ). რაც შეეხება *Siphoviridae* ოჯახის წარმომადგენელ ფაგ vB\_Aba SSLO-ს, იგი 85%-ით ადსორბირდება პატრონ ბაქტერიაზე 15 წუთის განმავლობაში (სურ. 17 ე).

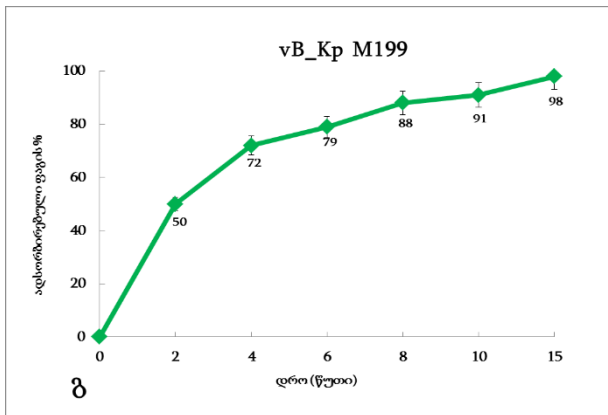
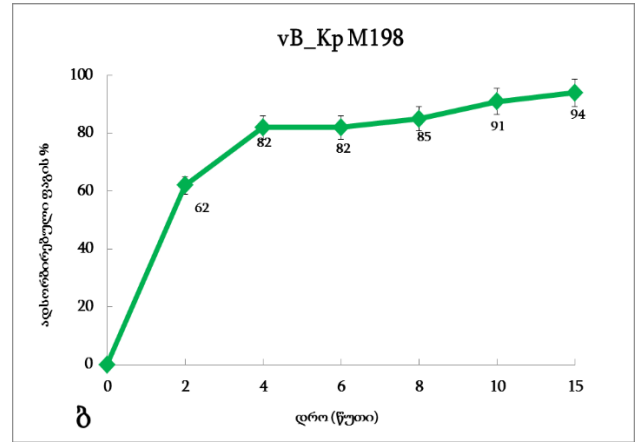
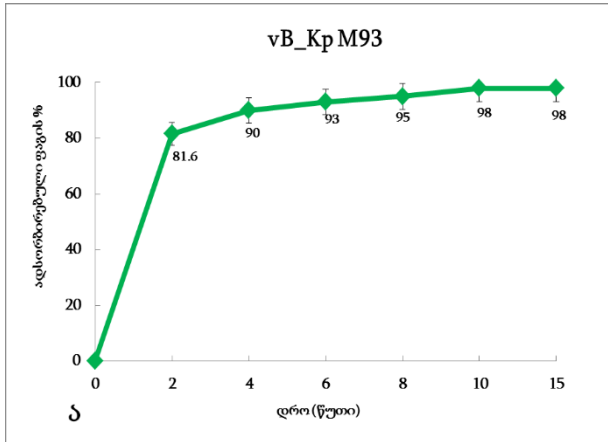


**სურათი 17.**

*A. baumannii*-ს სპეციფიური ფაგების ადსორბციის პროცენტული მაჩვენებლები. X ღერძზე გამოსახულია ადსორბირებული ფაგების რაოდენობის პროცენტული მაჩვენებელი, ხოლო Y ღერძზე - ადსორბციის დრო წუთებში.



*Klebsiella*-ს სპეციფიური ფაგებიდან ადსორბციის ყველაზე მაღალი მაჩვენებელი vB\_Kp M93 ფაგს აღმოაჩნდა (10 წთ, 98%) (სურ. 18 ა). დანარჩენი ორი ფაგის იგივე პარამეტრები შეესაბამება 91% 10 წუთის განმავლობაში (სურ. 18 ბ,გ).



**სურათი 18.**

*Klebsiella*-ს სპეციფიური ფაგების ადსორბციის პროცენტული მაჩვენებლები. X ღერძზე გამოსახულია ადსორბირებული ფაგების რაოდენობის პროცენტული მაჩვენებელი, ხოლო Y ღერძზე - ადსორბციის დრო წუთებში.

თითოეული ფაგი/ბაქტერიის წყვილისათვის გამოვთვალეთ ადსორბციის კონსტანტა. შედეგები წარმოდგენილია ცხრილში 7:

**ცხრილში 7.**

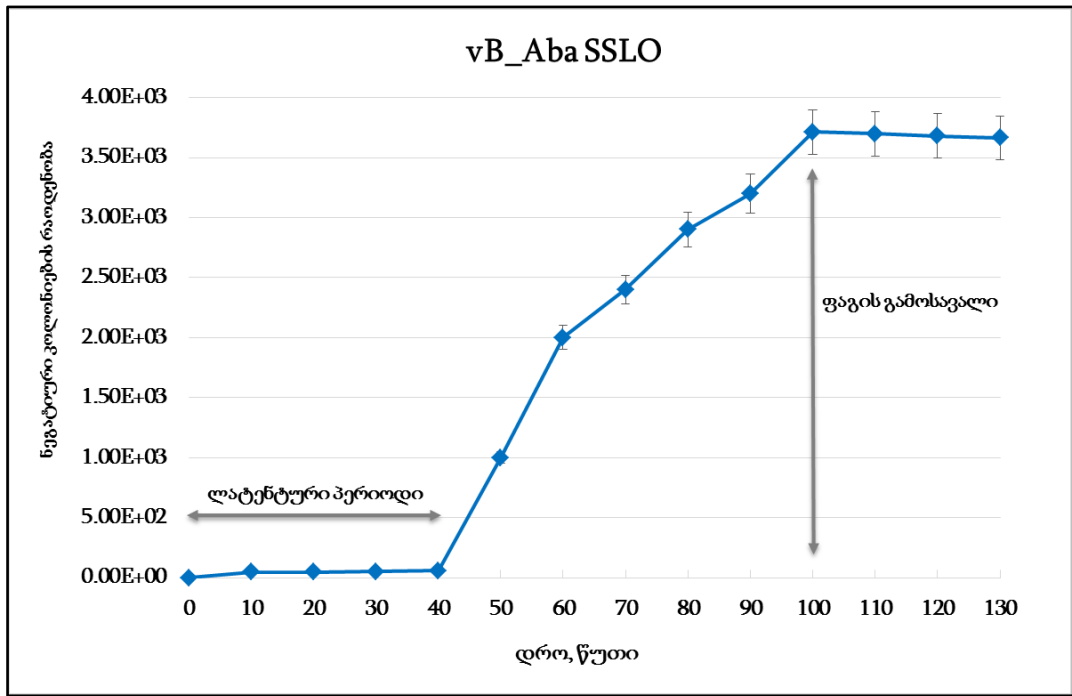
*A. baumannii* და *K. pneumoniae* შტამების მიმართ აქტიური ბაქტერიოფაგების ადსორბციის კონსტანტა

ბაქტერიოფაგი	პატრონი ბაქტერია	ადსორბციის კონსტანტა
vB_Aba M9/1	<i>A. baumannii</i> 11349	$2.5 \times 10^{-8}$ მლ/წთ
vB_Aba M3090	<i>A. baumannii</i> CS8451	$1 \times 10^{-9}$ მლ/წთ
vB_Aba M9	<i>A. baumannii</i> 11349	$1.5 \times 10^{-9}$ მლ/წთ
vB_Aba M19	<i>A. baumannii</i> CS8061	$7 \times 10^{-10}$ მლ/წთ
vB_Aba SSLO	<i>A. baumannii</i> SLO	$1.6 \times 10^{-9}$ მლ/წთ
vB_Kp M93	<i>K. pneumoniae</i> 93a	$5 \times 10^{-9}$ მლ/წთ
vB_Kp M198	<i>K. pneumoniae</i> 198	$1.7 \times 10^{-9}$ მლ/წთ
vB_Kp M199	<i>K. pneumoniae</i> 199	$1.4 \times 10^{-9}$ მლ/წთ

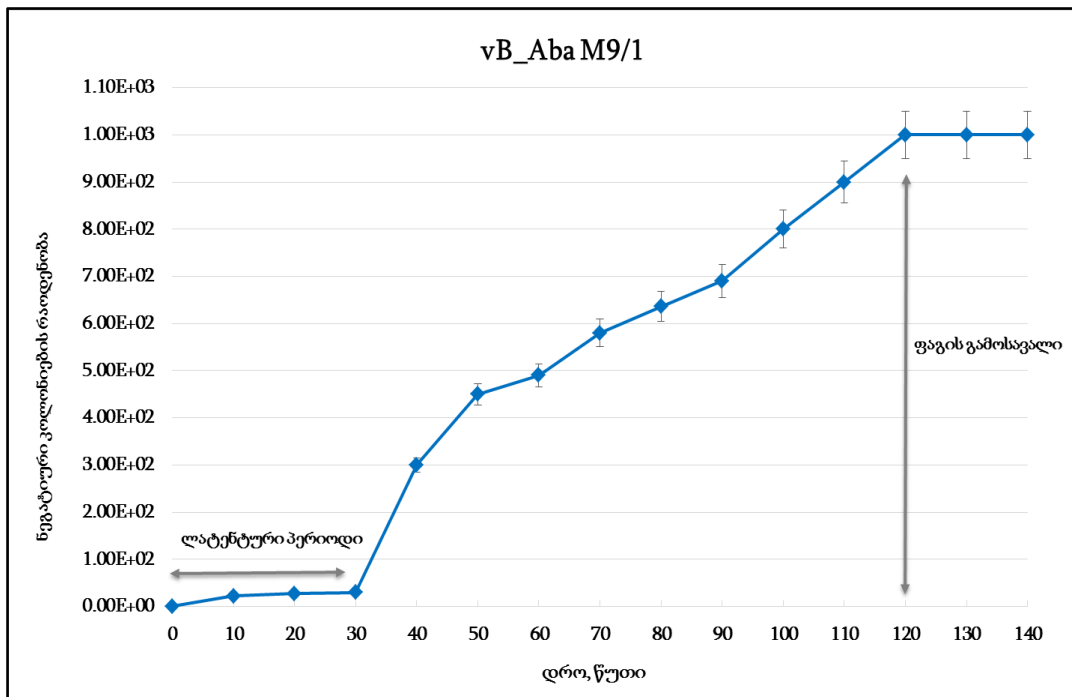
ჩვენს მიერ მიღებული შედეგებიდან გამომდინარე, ფაგი vB\_Aba M19 ადსორბციას მეტ დროს ანდომებს, დაბალია მისი ადსორბციის პროცენტული მაჩვენებელი და შესაბამისად ადსორბციის კონსტანტაც. აქვე უნდა აღინიშნოს, რომ *A. baumannii*-ის სპეციფიურ ამ ხუთ ფაგს შორის, ლიზისური აქტივობის ფართო სპექტრით გამოირჩევა ფაგები vB\_Aba SSLO, vB\_Aba M9/1 და vB\_Aba M3090, რაც ლოგიკურ თანხვედრაშია მათ ადსორბციის პარამეტრებთან.

*Klebsiella*-ს სპეციფიური ფაგების შემთხვევაში, ადსორბციის კონსტანტა მეტ-ნაკლებად ერთნაირია და ასევე კორელირებს ფაგების ლიზისურ აქტივობასთან.

შემდგომი კვლევები მიზნად ისახავდა ბაქტერიოფაგების გამრავლების ერთჯერადი ციკლის პარამეტრების დადგენას. ლატენტური პერიოდი და ერთი ინფიცირებული უჯრედიდან ფაგის გამოსავალი განსაზღვრულია *A. baumannii*-ის მიმართ აქტიური ორი ფაგისათვის - vB\_Aba SSLO (სურ.19ა) და vB\_Aba M9/1 (სურ.19 ბ). ფაგები შერჩეულია ანტიბაქტერიული მოქმედების დიაპაზონისა და ადსორბციის პარამეტრების მიხედვით.



ა)



ბ)

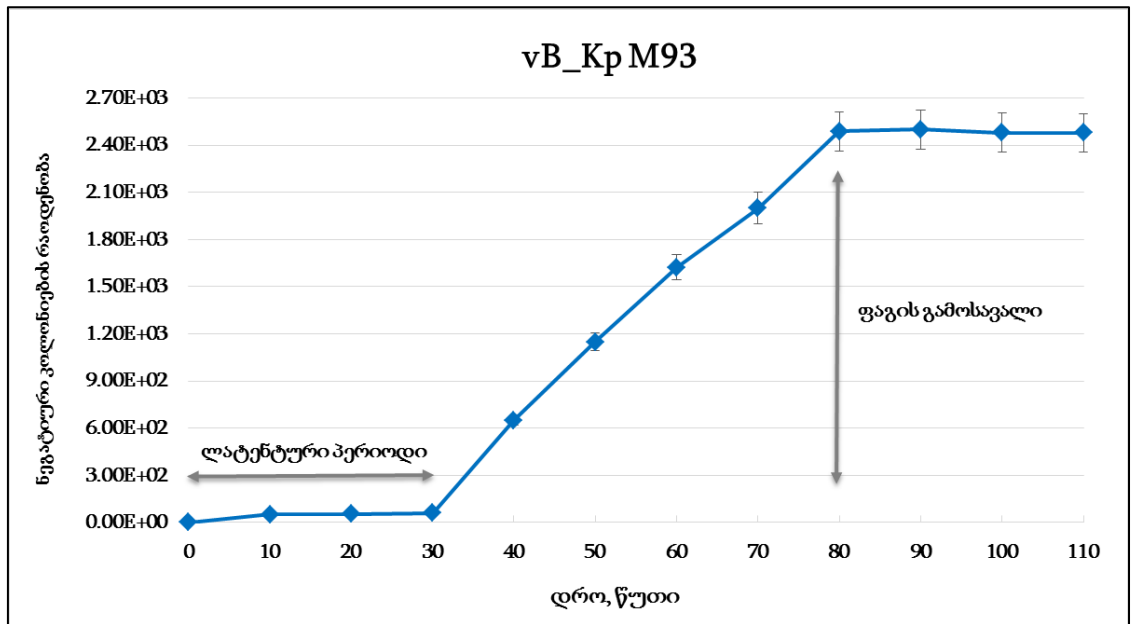
**სურათი 19.** *A. baumannii*-ის მიმართ აქტიური ფაგების ერთჯერადი გამრავლების ციკლი. ა) ფაგი vB\_Aba SSLO; ბ) vB\_Aba M9/1.

X ღერძზე გამოსახულია წარმოქმნილი ნეგატიური კოლონიების რაოდენობა, ხოლო Y ღერძზე ფაგის გამრავლების დროს წუთებში.

მიღებული ექსპერიმენტული მონაცემების თანახმად, *A.baumannii*-ის მიმართ აქტიური vB\_Aba SSLO ფაგისათვის დამახასიათებელია 40 წუთიანი ლატენტური პერიოდი. ამ პერიოდს მოსდევს ფაგის გამრავლების ფაზა, რომელიც გრძელდება 60 წუთი. ინფიცირებიდან დაახლოებით 100 წუთში ბაქტერიული უჯრედი ლიზირდება. ფაგის გამოსავალი ერთი ინფიცირებული უჯრედიდან შეადგენს 55-60 ნეგატიური კოლონიის წარმომქმნელ ფაგურ ნაწილაკს (სურ.19ა).

*A.baumannii*-ის მიმართ აქტიური vB\_Aba M9/1 ფაგის ლატენტური პერიოდი მხოლოდ 30 წუთი გრძელდება და ფაგური ნაწილაკების მაქსიმალური რაოდენობა 120 წუთის შემდეგ წარმოიქმნება. ამ შემთხვევაში ფაგის გამოსავალი vB\_Aba SSLO-ს იგივე მაჩვენებლისაგან განსხვავებულია და შეადგენს 15-20 ნეგატიური კოლონიის წარმომქმნელ ნაწილაკს (სურ.19 ბ).

*Klebsiella*-ს მიმართ აქტიური ფაგების შემთხვევაში გამრავლების ერთჯერადი ციკლის პარამეტრები განსაზღვრულია vB\_Kp M93 ფაგისათვის (სურ.20), რომელიც ხასიათდება ბაქტერიულ უჯრედზე შედარებით სწრაფი ადსორბციით. აღსანიშნავია, რომ ეს ფაგი წარმატებით იყო გამოყენებული თერაპიული მიზნებისათვის (Corbellino et al. 2020). vB\_Kp M93 ფაგის ლატენტური პერიოდიც 30 წუთს გრძელდება. ამ ფაგის შემთხვევაში შედარებით მოკლე დროში ხდება მაქსიმალური რაოდენობის შთამომავლობის მიღება (80 წუთი) და მათი რიცხვი შეადგენს 35-40 ნეგატიური კოლონიის წარმომქმნელ ნაწილაკს (სურ.20).



სურათი 20. ფაგი vB\_Kp M93 ერთჯერადი გამრავლების ციკლი.

X დერძზე გამოსახულია წარმოქმნილი ნეგატიური კოლონიების რაოდენობა, ხოლო Y დერძზე ფაგის გამრავლების დროს წუთებში.

გამრავლების ციკლის მონაცემების თანახმად ჩვენს მიერ შესწავლილი *A.baumannii*-ის და *Klebsiella* ბაქტერიოფაგები ხასიათდებიან გამრავლების პროდუქტიული ციკლით.

### 3.6.4. ფაგორეზისტენტული ბაქტერიული მუტანტების წარმოქმნა

მასპინძელი ბაქტერიული უჯრედებს შორის ფაგორეზისტენტული მუტანტების წარმოქმნის სიხშირე ერთ-ერთი მთავარი დამახასიათებელია თერაპიულად მნიშვნელოვანი ფაგებისათვის. განსაზღვრულია მასპინძელ ბაქტერიულ პოპულაციაში ფაგორეზისტენტული მუტანტების წარმოქმნის სიხშირე, ჩვენს მიერ გამოყოფილი, *A. baumannii*-ს შტამების მიმართ შერჩეული აქტიური ხუთი ფაგისათვის: vB\_Aba M9/1, vB\_Aba M9, vB\_Aba SSLO და vB\_Aba 19. მიღებული შედეგები წარმოდგენილია ცხრილში 8.

#### ცხრილი 8.

*A. baumannii*-ს ფაგების მიმართ მასპინძელი ბაქტერიული შტამის ფაგო-რეზისტენტული მუტანტების წარმოქმნის სიხშირე

ბაქტერიოფაგი	ბაქტერიული უჯრედების საწყისი რაოდენობა (კწე/მლ) N	წარმოქმნილი ფაგო-რეზისტენტული მუტანტების რიცხვი (კწე/მლ) r	მუტაციის სიხშირე a
vB_Aba M9/1	$2 \times 10^8$	$4 \times 10^2$	$6 \times 10^{-7}$
vB_Aba M9	$1 \times 10^8$	$4 \times 10^2$	$6 \times 10^{-6}$
vB_Aba SSLO	$2 \times 10^8$	$4 \times 10^4$	$2 \times 10^{-5}$
vB_Aba M19	$2 \times 10^8$	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^{-5}$
vB_Aba M3090	$1 \times 10^8$	$4 \times 10^4$	$2 \times 10^{-5}$

როგორც ცხრილიდან ჩანს, ბაქტერიებში ფაგო-რეზისტენტული მუტაციის სიხშირე *A. baumannii*-ს ფაგების მიმართ საკმაოდ დაბალია ( $1 \times 10^{-5}$  –  $6 \times 10^{-7}$ ). რეზისტენტული მუტანტების ყველაზე დაბალი მაჩვენებელი გამოვლინდა vB\_AbaM9/1 ფაგის მიმართ. მიღებული შედეგები არაპირდაპირ მეტყველებს ამ ფაგების ვირულენტურ ბუნებაზე.

მეორეს მხრივ, მნიშვნელოვანია იმის გარკვევა, თუ რამდენად ინარჩუნებენ რეზისტენტობას წარმოქმნილი რეზისტენტული ბაქტერიები. ამისათვის, მიღებული

რეზისტენტული მუტანტების კოლონიებიდან მოვახდინეთ მათი კულტივირება საკვებ არეში და განმეორებით განვსაზღვრეთ მათი მგრძობელობა ფაგების მოქმედების მიმართ. შედეგად მივიღეთ, რომ ფაგი vB\_Aba SSLO-ს მიმართ წარმოქმნილმა რეზისტენტულმა ბაქტერიულმა მუტანტმა არ შეინარჩუნა რეზისტენტობა აღნიშნული ფაგის მიმართ ერთ გენერაციაშიც კი. vB\_Aba M9/1, vB\_Aba M9 და vB\_Aba M3090 ფაგებზე განვითარებულმა რეზისტენტულმა ფორმებმა, კულტივაციის შემდგომ შეინარჩუნეს რეზისტენტობა საწყისი ფაგების მიმართ, მაგრამ, შეეცვალათ მგრძობელობა იმ ფაგების მიმართ, რომელზედაც რეზისტენტობას ავლენდნენ. მიუხედავად იმისა, რომ vB\_Aba M19 ფაგის ხასიათდება ვიწრო ლიზისური სპექტრით (19%), მის მიმართ რეზისტენტული მუტანტის გამოყოფა ვერ მოხერხდა, რადგან რეზისტენტული კოლონიის სითხეში კულტივირებისას ხდებოდა ბაქტერიების თვით-ლიზისი, რაც მიუთითებს მის მაღალ აქტივობაზე მგრძობიარე შტამების მიმართ.

რაც შეეხება *Klebsiella*-ს ფაგებს, ექსპერიმენტში გამოვიყენეთ *Myoviridae* ოჯახის წარმომადგენელი სამი ფართო ლიზისური სპექტრის მქონე ფაგი: vB\_Kp M93, vB\_Kp M198 და vB\_Kp M199 (ცხრილი 9). *Acinetobacter*-ის ფაგებისგან განსხვავებით, მათ მიმართ უფრო მაღალი სიხშირით დაფიქსირდა ფაგო-რეზისტენტული ბაქტერიული კოლონიების ფორმირება ( $2 \times 10^{-3}$  –  $4 \times 10^{-3}$ ). თუმცა, ბაქტერიების წარმოქმნილი ფაგო-რეზისტენტული ფორმები ვერ ინარჩუნებდნენ შემენილ რეზისტენტობას და პირველივე კულტივაციისას კვლავ მგრძობიარენი იყვნენ საწყისი ფაგების მიმართ.

ცხრილი 9.

*Klebsiella spp.* ფაგების მიმართ მასპინძელი ბაქტერიული შტამის ფაგო-რეზისტენტული მუტანტების წარმოქმნის სიხშირე

ბაქტერიოფაგები	ბაქტერიული უჯრედების საწყისი რაოდენობა (კწე/მლ) N	წარმოქმნილი ფაგო-რეზისტენტული მუტანტების რიცხვი (კწე/მლ) r	მუტაციის სიხშირე a
vB_Kp M93	$2 \times 10^8$	$4 \times 10^6$	$4 \times 10^{-3}$
vB_Kp M198	$1 \times 10^9$	$1 \times 10^8$	$4 \times 10^{-2}$
vB_Kp M199	$1 \times 10^9$	$5 \times 10^6$	$2 \times 10^{-3}$

მიღებული შედეგები, კიდევ ერთხელ მეტყველებს ფაგის ვირულენტურ ბუნებაზე და წარმოაჩენს მათ შესაძლო კანდიდატებად თერაპიული გამოყენებისათვის.



#### თავი IV. შედეგების განხილვა

მრავლობით ანტიბიოტიკო-რეზისტენტული ბაქტერიული შტამების ფართოდ გავრცელებამ და მათ საწინააღმდეგოდ მოქმედი ანტიბიოტიკების ახალი კლასების შემუშავების სირთულემ წარმოშვა ბაქტერიული ინფექციების კონტროლისა და მკურნალობისათვის ახალი, ანტიბიოტიკებისაგან განსხვავებული ალტერნატივის ძიების საჭიროება. ამ თვალსაზრისით ბაქტერიოფაგების თერაპიული გამოყენება წარმოადგენს საიმედო, უსაფრთხო ალტერნატიულ სტრატეგიას, განსაკუთრებით MDR ბაქტერიებთან ასოცირებული ინფექციების შემთხვევაში. ბოლო წლებში, მსოფლიოს მრავალ ქვეყანაში შესამჩნევია ინფექციური დაავადებების წინააღმდეგ ბაქტერიოფაგებით მკურნალობის შემთხვევების ზრდა. ფაგოთერაპიის გამოყენების ზრდასთან ერთად, ნელ-ნელა მკვიდრდება თერაპიული დანიშნულების ფაგების კოლექციების შექმნის პრაქტიკა (Gibson et al. 2019; Yerushalmy et al. 2020). ვირულენტური ფაგების კოლექციის შექმნის წინაპირობას კი შესაბამისი ბაქტერიების მრავალფეროვანი კოლექციის არსებობა წარმოადგენს. ელიავას სახელობის ბაქტერიოფაგის, მიკრობიოლოგიისა და ვირუსოლოგიის ინსტიტუტის, მოლეკულური ბიოლოგიის ლაბორატორია რეგულარულად ღებულობს სხვადასხვა კლინიკური მასალიდან გამოყოფილ ბაქტერიულ შტამებს. გარდა ადგილობრივი პაციენტების კლინიკური მასალისა, ლაბორატორიის ბაქტერიული შტამების კოლექცია ივსება სხვადასხვა ქვეყნიდან მიღებული შტამებითაც (შვეიცარია, ბულგარეთი, ერაყი, გერმანია, ვიეტნამი და ა.შ.). წარმოდგენილ კვლევაში გამოყენებულია სწორედ ლაბორატორიის ბაქტერიული შტამების კოლექციიდან შერჩეული შტამები, კერძოდ *A. baumannii*-ს 120 და *Klebsiella*-ს სხვადასხვა სახეობის 100 შტამი. კვლევაში გამოყენებულ კლინიკურ შტამებს განსხვავებული გეოგრაფიული წარმომავლობა აქვთ.

პირველ ეტაპზე შესწავლი იქნა კვლევისათვის შერჩეული 220 (*A. baumannii*-ს 120 და *Klebsiella spp.*-ის 100) შტამის ანტიბიოტიკების მიმართ მგრძობელობა. ანტიბიოტიკებისადმი მდგრადობის შეფასების საერთაშორისო კრიტერიუმების მიხედვით, მრავლობით რეზისტენტულად (MDR- Multidrug resistant) ითვლება შტამი, რომელიც რეზისტენტულია სამი ან მეტი კლასის მინიმუმ ერთი წარმომადგენლის მიმართ. ფართოდ რეზისტენტულად (XDR- Extensively drug

resistant) ითვლება ის ბაქტერიული შტამი, რომელიც რეზისტენტობას ავლენს ორი ან ნაკლები კლასის ანტიბიოტიკების მინიმუმ ერთი წარმომადგენლის მიმართ, ხოლო ბაქტერია კლასიფიცირდება პან რეზისტენტულად (PDR - Pandrug resistant), თუ ის რეზისტენტობას ავლენს ანტიბიოტიკების ყველა კლასის ყველა წარმომადგენლის მიმართ (Magiorakos et al. 2012). ამ კლასიფიკაციის მიხედვით კვლევაში გამოყენებული ბაქტერიები გადანაწილდნენ სამივე ჯგუფში. *A. baumannii*-ს კლინიკური შტამების ანტიბიოტიკო-მგრძობელობის პროფილის შეფასებისთვის EUCAST-ის რეკომენდაციის მიხედვით გამოყენებულია ხუთი ანტიბიოტიკი. შედეგებიდან გამომდინარე, კვლევაში გამოყენებული *A. baumannii*-ს 120 კლინიკური შტამიდან 35 შტამი აღმოჩნდა რეზისტენტული ყველა გამოყენებული ანტიბიოტიკის მიმართ. ეს კი გვაძლევს იმის ვარაუდის საშუალებას, რომ აღნიშნული შტამები არიან პან რეზისტენტულნი (PDR). *A. baumannii*-ს დანარჩენი შტამებიდან 32 შტამი მგრძობიარეა ყველა ანტიბიოტიკის მიმართ, 21 შტამის შემთხვევაში დაფიქსირდა მრავლობით რეზისტენტობა (MDR), ხოლო 32 შტამმა გამოავლინა ფართოდ რეზისტენტობა (XDR) (ცხრილი 10).

*A. baumannii*-ს შტამების წარმომავლობა და ანტიბიოტიკო-მგრძობელობა

<i>A. baumannii</i> -ს შტამების რაოდენობა	წარმომავლობა (ქვეყანა)	ანტიბიოტიკო-მგრძობელობა
58	შვეიცარია	11- PDR 7- MDR 8- XDR 32- მგრძობიარე
7	ბულგარეთი	3- PDR 4- MDR
10	ერაყი	4- PDR 2- MDR 4- XDR
18	საქართველო	5- PDR 4- MDR 9- XDR
7	გერმანია	4- PDR 1-MDR 2-XDR
20	ვიეტნამი	8- PDR 3- MDR 9-XDR

*Klebsiella spp.*-ის შტამების ანტიბიოტიკო-მგრძობელობის შეფასების მიხედვით შეგვიძლია ვთქვათ, რომ *Klebsiella spp.*-ის წარმომადგენელი 33 შტამი არის ფართოდ რეზისტენტული (XDR), 63 შტამი - მრავლობით რეზისტენტული (MDR), ხოლო 4 შტამი - პან რეზისტენტული (PDR).

ბეტა-ლაქტამაზების სინთეზის გამოსავლენად ჩატარებული ექსპერიმენტების შედეგად, ბეტა-ლაქტამაზების წარმოქმნა მოხდა *A. baumannii*-ს მხოლოდ 46 შტამის მიერ. *Klebsiella*-ს შტამების შემთხვევაში, შტამების უმრავლესობაში (93 შტამი) ფენოტიპურად დადასტურდა ამ ფერმენტების სინთეზი. ჩვენს ექსპერიმენტებში ტესტი ბეტა-ლაქტამაზების გამოსავლენად ეფუძნებოდა კლავულანის მჟავას მიმართ

მდგრადობის შემოწმებას. შესაბამისად, იმ შტამების შემთხვევაში, რომლებისთვისაც არ დადასტურებულა ბეტა-ლაქტამაზური აქტივობა, ვერ ვიმსჯელებთ ამ ფერმენტის არარსებობაზე, რადგან შეიძლება ეს შტამები ასინთეზირებდნენ C კლასის სერინ ცეფალოსპორინაზების ტიპის ფერმენტებს, რომლებიც რეზისტენტულნი არიან კლავულანის მჟავას ინჰიბიტორული მოქმედების მიმართ (Drawz and Bonomo 2010).

კვლევების შემდგომ ეტაპზე ჩატარებულია შტამების გენოტიპირება გელ-ელექტროფორეზის მეთოდით პულსირებად ველში. ექსპერიმენტული მონაცემების და შემდგომ UPMGA კლასტერიზაციის შესაბამისად, ორივე პათოგენის წარმომადგენელი შტამები ხასიათდებიან გენოტიპთა მრავალფეროვნებით (სურ.3 და 4). კორელაცია შტამების კლასტერიზაციასა და მათ ანტიბიოტიკო- ან ფაგო-მგრძობელობას შორის არ გამოვლენილა.

ბაქტერიული შტამების ანტიბიოტიკო-რეზისტენტობის და ბეტა-ლაქტამაზური აქტივობის შესწავლის, ასევე მათი გენოტიპირების პარალელურად, ჩვენს მიერ გამოყოფილია *A. baumannii* და *Klebsiella* შტამების მიმართ აქტიური ბაქტერიოფაგები. კვლევის ფარგლებში ჩამდინარე წყლის ნიმუშებიდან თითოეული პათოგენის წინააღმდეგ გამოყოფილია რამოდენიმე ფაგი. კვლევაში ასევე ჩავრთეთ თერაპიული მიზნებისათვის ლაბორატორიაში მომზადებული, *Klebsiella*-ს მიმართ აქტიური ბაქტერიოფაგი პაციენტის პერსონალური მოხმარებისთვის (აუტოფაგი). აღნიშნულ ნაშრომში წარმოდგენილია *A. baumannii*-ის რვა და *Klebsiella*-ს ცხრა ფაგის დახასიათება.

ელექტრონულ-მიკროსკოპული კვლევებით დადგენილია, რომ *A. baumannii*-ს სპეციფიური რვა ფაგიდან ექვსი ფაგი *Myoviridae* მორფოლოგიური ჯგუფის წარმომადგენელია, ერთი ფაგი- *Siphoviridae*-ს ჯგუფის, ხოლო ერთი ფაგი მიეკუთვნება *Podoviridae* მორფოლოგიურ ჯგუფს (სურ.5). *Klebsiella*-ს ცხრა ფაგიდან, ხუთი ფაგი მიეკუთვნება *Myoviridae* მორფოლოგიურ ჯგუფს, სამი ფაგი *Podoviridae*-ს, ხოლო ერთი *Siphoviridae* ოჯახს (სურ.6). ფაგების გენომების მასები დადგენილია გელ-ელექტროფორეზით პულსირებად ველში.

დნმ-ის რესტრიქციული ანალიზის საფუძველზე გამოვლენილია, რომ *Myoviridae* ოჯახის წარმომადგენელი ფაგების დნმ-ების რესტრიქციული პროფილები განსხვავებულია როგორც *Klebsiella*-ს, ასევე *Acinetobacter*-ის ფაგების

შემთხვევაში. განსხვავებული რესტრიქციული პროფილით ხასიათდებიან ასევე *Klebsiella*-ს *Podoviridae* ჯგუფის წარმომადგენელი ფაგებიც.

ექსპერიმენტების შემდგომი ეტაპი მოიცავდა ამ ფაგების ლიზისური სპექტრის შესწავლას, რის საფუძველზეც შევარჩიეთ აქტიური და ლიზისური სპექტრით ერთმანეთისგან განსხვავებული ფაგები მათი ბიოლოგიური მახასიათებლების დეტალური შესწავლისათვის.

ბაქტერიოფაგის უნარი, გარდა მასპინძელი მიკროორგანიზმისა მოახდინოს სხვა ბაქტერიული შტამების ლიზისი, არის კონკრეტული ბაქტერიული ვირუსის ერთ-ერთი მთავარი ბიოლოგიური მახასიათებელი. ჩვენს მიერ განსაზღვრულია ლიზისური აქტივობის სპექტრი კვლევაში ჩართული ყველა ბაქტერიოფაგისათვის. მიღებული ექსპერიმენტული მონაცემების თანახმად, *A. baumannii*-ის სპეციფურ რვა ფაგს შორის ყველაზე ფართო სპექტრით გამოირჩეოდნენ ფაგები vB\_Aba SSLO, vB\_Aba M3090 და vB\_Aba M9/1 (სურ.15). მათი ლიზისური სპექტრი მოიცავდა შემოწმებული შტამების 95%, 84% და 80%-ს, შესაბამისად. აღსანიშნავია, რომ ფაგები გადამფარავად მოქმედებდნენ *A. baumannii*-ის ყველა კლინიკურ შტამზე. უნდა ითქვას, რომ კვლევაში გამოყენებული შტამებიდან მხოლოდ ოთხი შტამი (120 შტამიდან) აღმოჩნდა სრულად რეზისტენტული ყველა ფაგის მიმართ. რაც შეეხება ფაგს vB\_Aba P77, რომელიც *Podoviridae* ოჯახის წარმომადგენელია, ხასიათდებოდა ყველაზე ვიწრო სპეციფიურობით; იგი მასპინძელი ბაქტერიის გარდა ახდენდა *A. baumannii*-ის მხოლოდ ერთი შტამის ლიზისს. ცნობილია *A. baumannii*-ის სხვა სპეციფიური ფაგების შესახებაც, რომლებიც ასევე *Podoviridae* მორფოლოგიურ ჯგუფს მიეკუთვნებიან და ვიწრო ლიზისური სპექტრით ხასიათდებიან (N.-T. Lin et al. 2010; Huang et al. 2013; Merabishvili et al. 2014).

ჩვენს მიერ მიღებული მონაცემების თანახმად, *Klebsiella*-ს ფაგებიდან შედარებით ფართო ლიზისური აქტივობით ხასიათდებიან *Myoviridae* ოჯახის წარმომადგენლები. კერძოდ, ამ ოჯახის წარმომადგენელი სამი ფაგი vB\_kp M198, vB\_kp M199 და vB\_Kp M93 არ ავლენს მაღალ სპეციფიურობას; ამ ფაგების ლიზისური აქტივობა ვრცელდებოდა როგორც *K. pneumoniae*, ასევე *K. oxytoca* ბაქტერიულ შტამებზე. განსხვავებით *Myoviridae* ოჯახის წარმომადგენლებისაგან, *Podoviridae* ოჯახის ფაგების ლიზისური სპექტრი მოიცავს მხოლოდ *K. pneumoniae*-ს

შტამებს და არ აღემატება 2-8%-ს. საკმაოდ ვიწრო ლიზისური სპექტრით ხასიათდება ასევე *Siphoviridae* ოჯახის წარმომადგენელი ფაგი vB\_Kp S198. განსხვავებით *A. baumannii*-ს შტამებისაგან, *Klebsiella*-ს შემთხვევაში საქმე გვექონდა შედარებით მკვეთრად გამოხატულ ფაგო-რეზისტენტობასთან: 100 შტამიდან 22 შტამი (22%) რეზისტენტულია ყველა ფაგის მიმართ.

აღსანიშნავია, რომ ორივე პათოგენის მიმართ აქტიური ბაქტერიოფაგები, მიუხედავად ზოგ შემთხვევაში აქტივობის ვიწრო სპექტრისა, წარმატებულად ახდენენ ბეტა-ლაქტამაზა მაპროდუცირებელი, გენეტიკურად განსხვავებული შტამების ლიზისს. მასპინძელი ბაქტერიული შტამების დიაპაზონი არის მნიშვნელოვანი ფაქტორი, რის საფუძველზეც ვირულენტური ბაქტერიოფაგი განიხილება, როგორც პოტენციური თერაპიული აგენტი ბაქტერიული ინფექციების წინააღმდეგ (Rawy 2020).

კვლევების შემდგომი ეტაპისათვის, რომელიც მოიცავს ფაგების ბიოლოგიური მახასიათებლების დეტალურ შესწავლას, შევარჩიეთ ერთმანეთისაგან გენეტიკურად განსხვავებული, ლიზისური აქტივობის ფართო დიაპაზონის მქონე ფაგები.

ზოგადად, ბაქტერიოფაგები განსხვავებული ლითიური აქტივობით ხასიათდებიან. ისინი სხვადასხვა ხარისხით ალიზირებენ ბაქტერიულ უჯრედებს, შესაბამისად, ფაგის გამრავლების ინტენსივობა, წარმოქმნილი ახალი ფაგური ნაწილაკების რაოდენობა (ფაგის ტიტრი) განსხვავებულია. ზოგიერთ შემთხვევაში, ფაგს შეუძლია დაუკავშირდეს მიკრობულ უჯრედს და მოახდინოს მისი ლიზისი შთამომავლობის წარმოქმნის გარეშე (აბორტული ინფექცია/„ლიზისი გარედან“). ბაქტერიულ უჯრედში არსებული ვირუსისგან დაცვის (მაგ. რესტრიქცია-მოდულიზაციის) სისტემების გამო, ფაგს აქვს უნარი მოახდინოს ნეგატიური კოლონიის ფორმირება სამიზნე ბაქტერიის გაზონზე, მაგრამ შესამჩნევად დაბალი ტიტრით. ამ შემთხვევაში, შეგვიძლია ვთქვათ, რომ გამრავლდნენ მხოლოდ ის ფაგები, რომლებმაც სხვადასხვა მექანიზმებით გვერდი აუარეს მასპინძლის რესტრიქციულ სისტემას. ამდენად, მნიშვნელოვანია განისაზღვროს ცალკეული ბაქტერიოფაგის კულტივირების ეფექტურობა მის მიმართ მგრძობიარე ბაქტერიულ შტამებზე. ჩვენს მიერ ჩატარებული ექსპერიმენტების შედეგად ვნახეთ, რომ გამრავლების ეფექტურობა ორივე სახეობის პათოგენის მიმართ აქტიური

ფაგებისათვის ზოგიერთ შემთხვევაში მაღალი მაჩვენებლით დაფიქსირდა. *A. baumannii*-ს ფაგების კულტივირების ეფექტურობა 0.0005-დან 1-ის ფარგლებში ვარირებს. მიუხედავად იმისა, რომ ფაგები vB\_Aba M19 და vB\_Aba M9 ვიწრო ლიზისური სპექტრით ხასიათდებიან, მათ ეფექტურად მოახერხეს მგრძნობიარე შტამებზე გამრავლება. რაც შეეხება აღნიშნულ კვლევაში გამოყენებულ *Klebsiella*-ს სამ ფაგს - vB\_kp M198, vB\_kp M199 და vB\_Kp M93, ფაგების კულტივირების ეფექტურობა სამიზნე ბაქტერიებზე 0.0003-დან 1-მდე ვარირებს. მიღებული შედეგებიდან გამომდინარე შეიძლება ვივარაუდოთ, რომ უმეტეს შემთხვევაში, ფაგები ეფექტურად მრავლდებიან არამასპინძელ ბაქტერიებზე, რაც ვირულენტური ფაგების ერთ-ერთი მახასიათებელია, აქედან გამომდინარე, შესაძლებელია ვთქვათ, რომ ჩვენს მიერ გამოყოფილი და შესწავლილი ფაგები ვირულენტურ ფაგებს მიეკუთვნებიან.

გამრავლების ციკლის პარამეტრები, კერძოდ, ადსორბცია პატრონ ბაქტერიულ უჯრედებზე შევისწავლეთ *A. baumannii*-ს იმ ხუთ ფაგზე, რომლებიც ხასიათდებოდნენ ფართო ლიზისური სპექტრით დანარჩენ სამ ფაგთან შედარებით. ამ ხუთი ფაგიდან მასპინძელ ბაქტერიის უჯრედზე ყველაზე მაღალი პროცენტით ადსორბირდებოდა *Myoviridae*-ს ჯგუფის წარმომადგენელი ფაგი vB\_Aba M9/1 – ადსორბირებული ფაგის 92% 10 წუთის განმავლობაში. დანარჩენი *Myoviridae* ჯგუფის ფაგებისათვის ადსორბციის პარამეტრები მერყეობდა 72 %-დან 85 % მდე 15 წუთის განმავლობაში. რაც შეეხება *Siphoviridae* ფაგს - vB\_Aba SSLO, მისთვის ადსორბციის მონაცემია, ფაგების 85 % 15 წუთში.

ადსორბციის კონსტანტა - ადსორბციის სიჩქარის მუდმივა, არის ერთი ფაგის ადსორბციის ალბათობა ერთ ბაქტერიაზე. მრავალი ფაქტორი ახდენს გავლენას ადსორბციის კონსტანტაზე, მათ შორის, ბაქტერიული ზრდის ფაზა, თხევად არეში მარილების კონცენტრაცია, ორგანული შენაერთების არსებობა, ტემპერატურა, უჯრედის ზომა და სპეციფიური რეცეპტორების რიცხვი და ბუნება. მაგალითად, ლიტერატურული მონაცემების თანახმად, ცნობილია, რომ ფაგი T4-ის შემთხვევაში, რომელიც ასობით სხვადასხვა რეცეპტორს ამოიცნობს უჯრედის ზედაპირზე, ადსორბციის მუდმივა, ანუ  $K$  ტოლია  $2.4 \times 10^9$  მლ/წთ-ის მეორეს მხრივ, ფილამენტური ფაგის M13 იგივე მახასიათებელი (ფაგი, რომელიც უჯრედის

ზედაპირის მხოლოდ 3 რეცეპტორს უკავშირდება), საკმაოდ დაბალია და შეადგენს  $3 \times 10^{-11}$  მლ/წთ-ს (Kasman et al. 2002). ჩვენს მიერ შესწავლილი ფაგების შემთხვევაში, ადსორბციის კონსტანტა  $2.5 \times 10^{-8}$  -  $5 \times 10^{-9}$  მლ/წთ-ის ფარგლებშია. გამონაკლისია vB\_Aba M19 ფაგი, რომლისთვისაც ეს მაჩვენებელი ყველაზე დაბალია და შეადგენს  $7 \times 10^{-10}$  მლ/წთ-ს. მოქმედების ფართო ლიზისური სპექტრისა და ადსორბციის მაღალი მაჩვენებლის გამო, შევისწავლეთ *A. baumannii*-ს მიმართ აქტიური ფაგების - vB\_Aba SSLO და vB\_Aba M9/1 პატრონ უჯრედზე რეპროდუქციის დანარჩენი მონაცემები, კერძოდ ლატენტური პერიოდი და ფაგის გამოსავლიანობა. ექსპერიმენტების შედეგად დადგინდა, რომ ფაგი vB\_Aba SSLO-სათვის დამახასიათებელია 40 წუთიანი ლატენტური პერიოდი, რომლის შემდეგაც 100 წუთის განმავლობაში ხდება მაქსიმალური რაოდენობით შთამომავლობის გამოთავისუფლება. ფაგის გამოსავალი ერთი ინფიცირებული უჯრედიდან 55-60 ნეგატიური კოლონიის წარმომქნელ ფაგურ ნაწილაკს შეადგენს. ფაგი vB\_Aba M9/1-ის ლატენტური პერიოდი მხოლოდ 30 წუთს გრძელდება, ლიზისის დრო კი შედარებით ხანგრძლივია (120 წუთი). ფაგის გამოსავალი ამ შემთხვევაში 15-20 ნეგატიური კოლონიის წარმომქნელი ფაგური ნაწილაკია. ეს მაჩვენებლები არც ისე მაღალია, თუმცა, ლიტერატურაში აღწერილია მსგავსი შემთხვევები, როდესაც ფაგის გამოსავალი შედარებით მცირეა და ზოგიერთ შემთხვევაში ათსაც კი არ აღემატება. ამის მიუხედავად მეცნიერები ამ ფაგებს განიხილავენ, როგორც შესაფერის კანდიდატებს თერაპიული გამოყენებისათვის (Gordillo Altamirano et al. 2021; Gibson et al. 2019).

*Klebsiella*-ს სპეციფიური ფაგების შემთხვევაშიც ადსორბციის კონსტანტა კორელირებს ფაგების ლიზისურ აქტივობასთან. ამ ფაგებიდან გამრავლების ერთჯერადი ციკლის პარამეტრები მხოლოდ vB\_Kp M93-ის შემთხვევაშია შესწავლილი, რადგან *Klebsiella*-ს სხვა ფაგებთან შედარებით, იგი ხასიათდება სწრაფი ადსორბციით, და რაც ყველაზე მნიშვნელოვანია გამოყენებულია ფაგოთერაპიაში პაციენტის სამკურნალოდ (Corbellino et al. 2020). მიუხედავად ფაგის სწრაფი ადსორბციისა, უჯრედშიდა რეპროდუქციის ლატენტური პერიოდი მაინც ხანგრძლივია და 30 წუთი გრძელდება. სამაგიეროდ, ფაგი ხასიათდება შედარებით



მოკლე ლიზისის პერიოდით (80 წუთი), ფაგის გამოსავალი კი შეადგენს 35-40 ნეგატიური კოლონიის წარმოქმნელ ნაწილაკს ერთი ინფიცირებული უჯრედიდან.

ჩვენს მიერ ჩატარებული ექსპერიმენტული მონაცემების თანახმად, შესწავლილი ფაგები ხასიათდებიან გამრავლების პროდუქტიული ციკლით, რაც კიდევ ერთხელ ხაზს უსვამს მათ ვირულენტურ ბუნებას.

შესწავლილია კვლევაში ჩართული ფაგების მიმართ რეზისტენტული ბაქტერიების წარმოქმნის შესაძლებლობაც. ექსპერიმენტებით დადგინდა, რომ *A. baumannii*-ს ფაგების მიმართ ძალიან დაბალი სიხშირით ხდება რეზისტენტული ბაქტერიული უჯრედების წარმოქმნა. ზოგიერთ შემთხვევაში ახლად-წარმოქმნილი ფაგო-რეზისტენტული მუტანტები რეზისტენტობას ვერ ინარჩუნებენ რამოდენიმე გენერაციაში, იმ შემთხვევაში კი, როდესაც ბაქტერიული უჯრედი მყარად რეზისტენტულია ფაგის მიმართ, მას ეცვლება მგრძობელობა იმ ფაგების მიმართ, რომლებზედაც რეზისტენტობას ავლენდა. რაც შეეხება *Klebsiella*-ს სპეციფიური ფაგებს, მათ მიმართ შესამჩნევად მაღალი სიხშირით წარმოიქმნება რეზისტენტული ფორმები, მაგრამ, ამ შემთხვევაშიც ამას მხოლოდ ერთჯერადი გამოვლინება აქვს - პირველივე კულტივირების შემდეგ ბაქტერიები კვლავ მგრძობიარეა ფაგების მიმართ. საბოლოოდ, ფაგი-ბაქტერიის ურთიერთობისას ვღებულობთ სასურველ შედეგს, რასაც ბაქტერიის ლიზისი ჰქვია და რაც განსაკუთრებით მნიშვნელოვანია ფაგო-თერაპიისათვის.

ექსპერიმენტების შედეგად მიღებული მონაცემები, გვაძლევს საშუალებას ვივარაუდოთ, რომ კვლევაში გამოყენებული ფაგები ხასიათდებიან ვირულენტური ბუნებით, რაც დადასტურებულია მათი მოქმედების ფართო ლიზისური სპექტრით, აღნიშნულ ფაგებს აქვთ უნარი გადალახონ მასპინძელი ბაქტერიის თავდაცვის სისტემები, წარმოქმნან ათეულობით შთამომავლობა (Kęsik-Szeloch et al. 2013). რომლებიც ასევე წარმატებით აღიზიარებენ ბეტა-ლაქტამაზა მაპროდუცირებელ, ანტიბიოტიკო-რეზისტენტულ მიკროორგანიზმებს - ყოველივე ეს კი გვაძლევს საშუალებას აღნიშნული ფაგები განვიხილოთ, როგორც ალტერნატიული ან დამხმარე თერაპიული საშუალება.

## დასკვნები:

- ✓ დადგენილია, რომ გარემოს ნიმუშებიდან გამოყოფილი *A. baumannii*-ს შტამების მიმართ აქტიური რვა და *Klebsiella spp.*-ს შტამების მიმართ აქტიური ცხრა ახალი ბაქტერიოფაგის ლიზისური სპექტრი მოიცავს ანტიბიოტიკო-რეზისტენტულ, ბეტა-ლაქტამაზა მაპროდუცირებელ და გენეტიკურად მრავალფეროვან ბაქტერიულ შტამებს.
- ✓ კვლევებით დადასტურებულია, რომ *A. baumannii*-ს სპეციფიური ფაგებიდან ფართო ლიზისური სპექტრით ხასიათებიან *Siphoviridae* (vB\_Aba SSLO) და *Myoviridae* (vB\_Aba M9/1 და vB\_Aba M3090) მორფოლოგიური ჯგუფის ფაგები, ხოლო *Klebsiella spp.*-ს ფაგებიდან ფართო დიაპაზონით გამოირჩევიან *Myoviridae* ფაგები (vB\_Kp M93, vB\_Kp M198 და vB\_Kp M199).
- ✓ *A. baumannii*-ს სპეციფიური სამი (vB\_Aba M9/1, vB\_Aba M3090 და vB\_Aba SSLO) და *Klebsiella spp.*-ს მიმართ აქტიური სამი ფაგი (vB\_Kp M93, vB\_Kp M198 და vB\_Kp M199) ვირულენტური ბუნებისაა. ამას ადასტურებს ფაგების ფართო ლიზისური სპექტრი, უჯრედშიდა გამრავლების პროდუქტიული ციკლი და რეზისტენტული მუტანტების წარმოქმნის დაბალი სიხშირე.
- ✓ ჩატარებული სამუშაოების შედეგად შექმნილია კოლექცია, რომელიც საშუალებას იძლევა შეირჩეს ფაგი თერაპიული გამოყენებისათვის.

## ბიბლიოგრაფია

- Ackermann, H. W., G. Brochu, and H. P. Emadi Konjin. 1994. "Classification of Acinetobacter Phages." *Archives of Virology* 135 (3–4): 345–54.  
<https://doi.org/10.1007/BF01310019>.
- Ackermann, H. W., and A. Eisenstark. 1974. "The Present State of Phage Taxonomy." *Intervirology* 3 (4): 201–19. <https://doi.org/10.1159/000149758>.
- Ackermann, H.-W. 2003. "Bacteriophage Observations and Evolution." *Research in Microbiology* 154 (4): 245–51. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(03\)00067-6](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(03)00067-6).
- Adams, M.H. 1959. *Bacteriophages. Appendix: Methods of Study of Bacterial Viruses*. An Interscience Reprint. Interscience Publishers.
- Afzal-Shah, M., N. Woodford, and D. M. Livermore. 2001. "Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, Molecular Class D Beta-Lactamases Associated with Carbapenem Resistance in Clinical Isolates of Acinetobacter Baumannii." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45 (2): 583–88.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.45.2.583-588.2001>.
- Ambler, R P, A F W Coulson, J M Frère, J M Ghuysen, B Joris, M Forsman, R C Levesque, G Tiraby, and S G Waley. 1991. "A Standard Numbering Scheme for the Class A  $\beta$ -Lactamases." *Biochemical Journal* 276 (1): 269–70. <https://doi.org/10.1042/bj2760269>.
- Antunes, Luísa C. S., Francesco Imperi, Alessandra Carattoli, and Paolo Visca. 2011. "Deciphering the Multifactorial Nature of Acinetobacter Baumannii Pathogenicity." Edited by Ben Adler. *PLoS ONE* 6 (8): e22674.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022674>.
- Ayobami, Olaniyi, Niklas Willrich, Thomas Harder, Iruka N. Okeke, Tim Eckmanns, and Robby Markwart. 2019. "The Incidence and Prevalence of Hospital-Acquired (Carbapenem-Resistant) *Acinetobacter Baumannii* in Europe, Eastern Mediterranean and Africa: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Emerging Microbes & Infections* 8 (1): 1747–59. <https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1698273>.
- Babic, M, A Hujer, and R Bonomo. 2006. "What's New in Antibiotic Resistance? Focus on Beta-Lactamases." *Drug Resistance Updates* 9 (3): 142–56.  
<https://doi.org/10.1016/j.drug.2006.05.005>.

- Baraniak, A., R. Izdebski, J. Fielt, E. Sadowy, A. Adler, M. Kazma, J. Salomon, et al. 2013. "Comparative Population Analysis of Klebsiella Pneumoniae Strains with Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases Colonizing Patients in Rehabilitation Centers in Four Countries." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57 (4): 1992–97. <https://doi.org/10.1128/AAC.02571-12>.
- Bayles, K. W. 2000. "The Bactericidal Action of Penicillin: New Clues to an Unsolved Mystery." *Trends in Microbiology* 8 (6): 274–78. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(00\)01762-5](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(00)01762-5).
- Bengoechea, José A. 2016. "Klebsiella Sweet Deadly Kiss." *Virulence* 7 (7): 742–44. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1204509>.
- Bhushan, Kul. 2018. "Bacteriophage EXclusion (BREX): A Novel Anti-phage Mechanism in the Arsenal of Bacterial Defense System." *Journal of Cellular Physiology* 233 (2): 771–73. <https://doi.org/10.1002/jcp.25973>.
- Boron, E.J., L.R. Peterson, and S.M. Finegold. 1994. *In Diagnostic Mikrobiology, Bacterial Disk Diffusion Methods*. Mosby-Year Book, Inc.
- Boucher, Helen W., George H. Talbot, John S. Bradley, John E. Edwards, David Gilbert, Louis B. Rice, Michael Scheld, Brad Spellberg, and John Bartlett. 2009. "Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America." *Clinical Infectious Diseases* 48 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1086/595011>.
- Bradford, P. A., C. Urban, N. Mariano, S. J. Projan, J. J. Rahal, and K. Bush. 1997. "Imipenem Resistance in Klebsiella Pneumoniae Is Associated with the Combination of ACT-1, a Plasmid-Mediated AmpC Beta-Lactamase, and the Foss of an Outer Membrane Protein." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41 (3): 563–69. <https://doi.org/10.1128/AAC.41.3.563>.
- Burrowes, Ben, David R Harper, Joseph Anderson, Malcolm McConville, and Mark C Enright. 2011. "Bacteriophage Therapy: Potential Uses in the Control of Antibiotic-Resistant Pathogens." *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 9 (9): 775–85. <https://doi.org/10.1586/eri.11.90>.

- Bush, K., G. A. Jacoby, and A. A. Medeiros. 1995. "A Functional Classification Scheme for Beta-Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39 (6): 1211–33. <https://doi.org/10.1128/aac.39.6.1211>.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2019. "Biggest Threats and Data." <https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest-threats.html>.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2004. "Acinetobacter Baumannii Infections among Patients at Military Medical Facilities Treating Injured U.S. Service Members, 2002-2004." *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report* 53 (45): 1063–66.
- Cha, Kyoungun, Hynu K. Oh, Jae Y. Jang, Yunyeol Jo, Won K. Kim, Geon U. Ha, Kwan S. Ko, and Heejoon Myung. 2018. "Characterization of Two Novel Bacteriophages Infecting Multidrug-Resistant (MDR) Acinetobacter Baumannii and Evaluation of Their Therapeutic Efficacy in Vivo." *Frontiers in Microbiology* 9 (April): 696. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00696>.
- Chadha, Parul, Om Prakash Katare, and Sanjay Chhibber. 2016. "In Vivo Efficacy of Single Phage versus Phage Cocktail in Resolving Burn Wound Infection in BALB/c Mice." *Microbial Pathogenesis* 99 (October): 68–77. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.08.001>.
- Chapman-McQuiston, E., and X.L. Wu. 2008. "Stochastic Receptor Expression Allows Sensitive Bacteria to Evade Phage Attack. Part I: Experiments." *Biophysical Journal* 94 (11): 4525–36. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.120212>.
- Chhibber, Sanjay, Sandeep Kaur, and Seema Kumari. 2008. "Therapeutic Potential of Bacteriophage in Treating Klebsiella Pneumoniae B5055-Mediated Lobar Pneumonia in Mice." *Journal of Medical Microbiology* 57 (Pt 12): 1508–13. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.2008/002873-0>.
- Choi, Chul Hee, Sung Hee Hyun, Ji Young Lee, Jun Sik Lee, Yong Seok Lee, Soon Ae Kim, Jeong-Pil Chae, Seung Min Yoo, and Je Chul Lee. 2007. "Acinetobacter Baumannii Outer Membrane Protein A Targets the Nucleus and Induces Cytotoxicity." *Cellular Microbiology* 0 (0): 070907125921001-??? <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.01041.x>.

- Choi, Chul Hee, Eun Young Lee, Yoo Chul Lee, Tae In Park, Hwa Jung Kim, Sung Hee Hyun, Soon Ae Kim, Seong-Kyu Lee, and Je Chul Lee. 2005. "Outer Membrane Protein 38 of *Acinetobacter Baumannii* Localizes to the Mitochondria and Induces Apoptosis of Epithelial Cells." *Cellular Microbiology* 7 (8): 1127–38. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00538.x>.
- Choi, Chul Hee, Jun Sik Lee, Yoo Chul Lee, Tae In Park, and Je Chul Lee. 2008. "Acinetobacter Baumannii Invades Epithelial Cells and Outer Membrane Protein A Mediates Interactions with Epithelial Cells." *BMC Microbiology* 8 (1): 216. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-216>.
- Chopin, Marie-Christine, Alain Chopin, and Elena Bidnenko. 2005. "Phage Abortive Infection in Lactococci: Variations on a Theme." *Current Opinion in Microbiology* 8 (4): 473–79. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.06.006>.
- Clokier, Martha R.J., and Andrew M. Kropinski, eds. 2009. *Bacteriophages*. Vol. 501. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6>.
- Corbellino, Mario, Nicolas Kieffer, Mzia Kutateladze, Nana Balarjishvili, Lika Leshkasheli, Lia Askilashvili, George Tsertsvadze, et al. 2020. "Eradication of a Multidrug-Resistant, Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolate Following Oral and Intra-Rectal Therapy with a Custom Made, Lytic Bacteriophage Preparation." *Clinical Infectious Diseases* 70 (9): 1998–2001. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz782>.
- Cox, David. 2015. "Antibiotic Resistance: The Race to Stop the 'silent Tsunami' Facing Modern Medicine."
- Dennehy, John J. 2010. "*Bacteriophage Ecology: Population Growth, Evolution, and Impact of Bacterial Viruses*. Advances in Molecular and Cellular Microbiology, Volume 15." *The Quarterly Review of Biology* 85 (1): 109–109. <https://doi.org/10.1086/650260>.
- D'Herelle, Felix. 2007. "On an Invisible Microbe Antagonistic toward Dysenteric Bacilli: Brief Note by Mr. F. D'Herelle, Presented by Mr. Roux. 1917." *Research in Microbiology* 158 (7): 553–54. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.07.005>.

- Drawz, Sarah M., and Robert A. Bonomo. 2010. "Three Decades of  $\beta$ -Lactamase Inhibitors." *Clinical Microbiology Reviews* 23 (1): 160–201. <https://doi.org/10.1128/CMR.00037-09>.
- Drulis-Kawa, Zuzanna, Grazyna Majkowska-Skrobek, Barbara Maciejewska, Anne-Sophie Delattre, and Rob Lavigne. 2012. "Learning from Bacteriophages - Advantages and Limitations of Phage and Phage-Encoded Protein Applications." *Current Protein and Peptide Science* 13 (8): 699–722. <https://doi.org/10.2174/138920312804871193>.
- Durmaz, Riza, Baris Otlu, Fatih Koksak, Salih Hosoglu, Recep Ozturk, Yasemin Ersoy, Elif Aktas, Nafia Canan Gursoy, and Ahmet Caliskan. 2009. "The Optimization of a Rapid Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocol for the Typing of *Acinetobacter Baumannii*, *Escherichia Coli* and *Klebsiella Spp.*" *Japanese Journal of Infectious Diseases* 62 (5): 372–77.
- Effah, Clement Yaw, Tongwen Sun, Shaohua Liu, and Yongjun Wu. 2020. "Klebsiella Pneumoniae: An Increasing Threat to Public Health." *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 19 (1): 1. <https://doi.org/10.1186/s12941-019-0343-8>.
- Eskenazi, Anaïs, Cédric Lood, Julia Wubbolts, Maya Hites, Nana Balarjishvili, Lika Leshkasheli, Lia Askilashvili, et al. 2022. "Combination of Pre-Adapted Bacteriophage Therapy and Antibiotics for Treatment of Fracture-Related Infection Due to Pandrug-Resistant *Klebsiella Pneumoniae*." *Nature Communications* 13 (1): 302. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27656-z>.
- Geisinger, Edward, and Ralph R. Isberg. 2015. "Antibiotic Modulation of Capsular Exopolysaccharide and Virulence in *Acinetobacter Baumannii*." Edited by David Weiss. *PLOS Pathogens* 11 (2): e1004691. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004691>.
- Gibson, Shelley B., Sabrina I. Green, Carmen Gu Liu, Keiko C. Salazar, Justin R. Clark, Austen L. Terwilliger, Heidi B. Kaplan, Anthony W. Maresso, Barbara W. Trautner, and Robert F. Ramig. 2019. "Constructing and Characterizing Bacteriophage Libraries for Phage Therapy of Human Infections." *Frontiers in Microbiology* 10 (November): 2537. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02537>.

- Gordillo Altamirano, Fernando, John H. Forsyth, Ruzeen Patwa, Xenia Kostoulias, Michael Trim, Dinesh Subedi, Stuart K. Archer, et al. 2021. "Bacteriophage-Resistant *Acinetobacter Baumannii* Are Resensitized to Antimicrobials." *Nature Microbiology* 6 (2): 157–61. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-00830-7>.
- Grygorcewicz, Bartłomiej, Marta Roszak, Piotr Golec, Daria Śleboda-Taront, Natalia Łubowska, Martyna Górka, Joanna Jursa-Kulesza, Rafał Rakoczy, Bartosz Wojciuk, and Barbara Dołęgowska. 2020. "Antibiotics Act with VB\_AbaP\_AGC01 Phage against *Acinetobacter Baumannii* in Human Heat-Inactivated Plasma Blood and *Galleria Mellonella* Models." *International Journal of Molecular Sciences* 21 (12): 4390. <https://doi.org/10.3390/ijms21124390>.
- Grygorcewicz, Bartłomiej, Bartosz Wojciuk, Marta Roszak, Natalia Łubowska, Piotr Błażejczak, Joanna Jursa-Kulesza, Rafał Rakoczy, Helena Masiuk, and Barbara Dołęgowska. 2021. "Environmental Phage-Based Cocktail and Antibiotic Combination Effects on *Acinetobacter Baumannii* Biofilm in a Human Urine Model." *Microbial Drug Resistance* 27 (1): 25–35. <https://doi.org/10.1089/mdr.2020.0083>.
- Gu, Jingmin, Xiaohe Liu, Yue Li, Wenyu Han, Liancheng Lei, Yongjun Yang, Honglei Zhao, et al. 2012. "A Method for Generation Phage Cocktail with Great Therapeutic Potential." *PloS One* 7 (3): e31698. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031698>.
- Harrison, J. W., and T. A. Svec. 1998. "The Beginning of the End of the Antibiotic Era? Part I. The Problem: Abuse of the 'Miracle Drugs.'" *Quintessence International (Berlin, Germany: 1985)* 29 (3): 151–62.
- Herridge, Warren P., Preetha Shibu, Jessica O'Shea, Thomas C. Brook, and Lesley Hoyles. 2020. "Bacteriophages of *Klebsiella* Spp., Their Diversity and Potential Therapeutic Uses." *Journal of Medical Microbiology* 69 (2): 176–94. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001141>.
- Hua, Yunfen, Tingting Luo, Yiqi Yang, Dong Dong, Rui Wang, Yanjun Wang, Mengsha Xu, Xiaokui Guo, Fupin Hu, and Ping He. 2018. "Phage Therapy as a Promising New Treatment for Lung Infection Caused by Carbapenem-Resistant *Acinetobacter Baumannii* in Mice." *Frontiers in Microbiology* 8 (January): 2659. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02659>.



- Huang, Guangtao, Shuai Le, Yizhi Peng, Yan Zhao, Supeng Yin, Lin Zhang, Xinyue Yao, Yinling Tan, Ming Li, and Fuquan Hu. 2013. "Characterization and Genome Sequencing of Phage Abp1, a New PhiKMV-Like Virus Infecting Multidrug-Resistant *Acinetobacter Baumannii*." *Current Microbiology* 66 (6): 535–43. <https://doi.org/10.1007/s00284-013-0308-7>.
- Hujer, Kristine M., Andrea M. Hujer, Edward A. Hulten, Saralee Bajaksouzian, Jennifer M. Adams, Curtis J. Donskey, David J. Ecker, et al. 2006. "Analysis of Antibiotic Resistance Genes in Multidrug-Resistant *Acinetobacter* Sp. Isolates from Military and Civilian Patients Treated at the Walter Reed Army Medical Center." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50 (12): 4114–23. <https://doi.org/10.1128/AAC.00778-06>.
- Jansen, Mathias, Adam Wahida, Simone Latz, Alex Krüttgen, Helga Häfner, Eva Miriam Buhl, Klaus Ritter, and Hans-Peter Horz. 2018. "Enhanced Antibacterial Effect of the Novel T4-like Bacteriophage KARL-1 in Combination with Antibiotics against Multi-Drug Resistant *Acinetobacter Baumannii*." *Scientific Reports* 8 (1): 14140. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32344-y>.
- Jeon, Jongsoo, Jong-Hwan Park, and Dongeun Yong. 2019. "Efficacy of Bacteriophage Treatment against Carbapenem-Resistant *Acinetobacter Baumannii* in *Galleria Mellonella* Larvae and a Mouse Model of Acute Pneumonia." *BMC Microbiology* 19 (1): 70. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1443-5>.
- Jiang, Lingli, Jingjie Tan, Yi Hao, Qi Wang, Xiaorui Yan, Dali Wang, Li Tuo, Zairong Wei, and Guangtao Huang. 2020. "Isolation and Characterization of a Novel Myophage Abp9 Against Pandrug Resistant *Acinetobacter Baumannii*." *Frontiers in Microbiology* 11 (September): 506068. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.506068>.
- Kasman, Laura M., Alex Kasman, Caroline Westwater, Joseph Dolan, Michael G. Schmidt, and James S. Norris. 2002. "Overcoming the Phage Replication Threshold: A Mathematical Model with Implications for Phage Therapy." *Journal of Virology* 76 (11): 5557–64. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.11.5557-5564.2002>.
- Kellenberger, E. 1961. "Vegetative Bacteriophage and the Maturation of the Virus Particles." *Advances in Virus Research* 8: 1–61. [https://doi.org/10.1016/s0065-3527\(08\)60682-x](https://doi.org/10.1016/s0065-3527(08)60682-x).

- Kim, Sang Woo, Chul Hee Choi, Dong Chan Moon, Jong Sook Jin, Jung Hwa Lee, Ji-Hyun Shin, Jung Min Kim, et al. 2009. "Serum Resistance of *Acinetobacter Baumannii* through the Binding of Factor H to Outer Membrane Proteins." *FEMS Microbiology Letters* 301 (2): 224–31. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01820.x>.
- Kropinski, Andrew M., David Prangishvili, and Rob Lavigne. 2009. "Position Paper: The Creation of a Rational Scheme for the Nomenclature of Viruses of Bacteria and Archaea." *Environmental Microbiology* 11 (11): 2775–77. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01970.x>.
- Krupovic, Mart, Dann Turner, Vera Morozova, Mike Dyall-Smith, Hanna M. Oksanen, Rob Edwards, Bas E. Dutilh, et al. 2021. "Bacterial Viruses Subcommittee and Archaeal Viruses Subcommittee of the ICTV: Update of Taxonomy Changes in 2021." *Archives of Virology* 166 (11): 3239–44. <https://doi.org/10.1007/s00705-021-05205-9>.
- Kumarasamy, Karthikeyan K, Mark A Toleman, Timothy R Walsh, Jay Bagaria, Fafhana Butt, Ravikumar Balakrishnan, Uma Chaudhary, et al. 2010. "Emergence of a New Antibiotic Resistance Mechanism in India, Pakistan, and the UK: A Molecular, Biological, and Epidemiological Study." *The Lancet Infectious Diseases* 10 (9): 597–602. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70143-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70143-2).
- Kusradze, Ia, Natia Karumidze, Sophio Rigvava, Teona Dvalidze, Malkhaz Katsitadze, Irakli Amiranashvili, and Marina Goderdzishvili. 2016. "Characterization and Testing the Efficiency of *Acinetobacter Baumannii* Phage VB-GEC\_Ab-M-G7 as an Antibacterial Agent." *Frontiers in Microbiology* 7 (October). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01590>.
- Labrie, Simon J., Julie E. Samson, and Sylvain Moineau. 2010. "Bacteriophage Resistance Mechanisms." *Nature Reviews Microbiology* 8 (5): 317–27. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2315>.
- LaVergne, Stephanie, Theron Hamilton, Biswajit Biswas, M Kumaraswamy, R T Schooley, and Darcy Wooten. 2018. "Phage Therapy for a Multidrug-Resistant *Acinetobacter Baumannii* Craniectomy Site Infection." *Open Forum Infectious Diseases* 5 (4): ofy064. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofy064>.

- Lee, Chang-Ro, Jung Hun Lee, Moonhee Park, Kwang Seung Park, Il Kwon Bae, Young Bae Kim, Chang-Jun Cha, Byeong Chul Jeong, and Sang Hee Lee. 2017. "Biology of *Acinetobacter Baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7 (March). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00055>.
- Lefkowitz, Elliot J., Donald M. Dempsey, Robert Curtis Hendrickson, Richard J. Orton, Stuart G. Siddell, and Donald B. Smith. 2018. "Virus Taxonomy: The Database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)." *Nucleic Acids Research* 46 (D1): D708–17. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx932>.
- Lin, Ming-Feng, Yun-You Lin, Hui-Wen Yeh, and Chung-Yu Lan. 2014. "Role of the BaeSR Two-Component System in the Regulation of *Acinetobacter Baumannii* AdeAB Genes and Its Correlation with Tigecycline Susceptibility." *BMC Microbiology* 14 (1): 119. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-119>.
- Lin, Nien-Tsung, Pei-Yu Chiou, Kai-Chih Chang, Li-Kuang Chen, and Meng-Jiun Lai. 2010. "Isolation and Characterization of  $\Phi$ AB2: A Novel Bacteriophage of *Acinetobacter Baumannii*." *Research in Microbiology* 161 (4): 308–14. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.03.007>.
- Lingohr, Erika, Shelley Frost, and Roger P. Johnson. 2009. "Determination of Bacteriophage Genome Size by Pulsed-Field Gel Electrophoresis." In *Bacteriophages*, edited by Martha R.J. Clokie and Andrew M. Kropinski, 502:19–25. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-565-1\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-565-1_3).
- Liou, Ming-Li, Po-Chi Soo, Siao-Ru Ling, Han-Yueh Kuo, Chuan Yi Tang, and Kai-Chih Chang. 2014. "The Sensor Kinase BfmS Mediates Virulence in *Acinetobacter Baumannii*." *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 47 (4): 275–81. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2012.12.004>.
- Liu, Yannan, Zhiqiang Mi, Wenkai Niu, Xiaoping An, Xin Yuan, Huiying Liu, Yong Wang, et al. 2016. "Potential of a Lytic Bacteriophage to Disrupt *Acinetobacter Baumannii* Biofilms *in Vitro*." *Future Microbiology* 11 (11): 1383–93. <https://doi.org/10.2217/fmb-2016-0104>.

- Luong, Tiffany, Ann-Charlott Salabarria, and Dwayne R. Roach. 2020. "Phage Therapy in the Resistance Era: Where Do We Stand and Where Are We Going?" *Clinical Therapeutics* 42 (9): 1659–80. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2020.07.014>.
- MacGowan, Alasdair, and Emily Macnaughton. 2017. "Antibiotic Resistance." *Medicine* 45 (10): 622–28. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2017.07.006>.
- Magiorakos, A.-P., A. Srinivasan, R. B. Carey, Y. Carmeli, M. E. Falagas, C. G. Giske, S. Harbarth, et al. 2012. "Multidrug-Resistant, Extensively Drug-Resistant and Pandrug-Resistant Bacteria: An International Expert Proposal for Interim Standard Definitions for Acquired Resistance." *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 18 (3): 268–81. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>.
- Massova, Irina, and Shahriar Mobashery. 1998. "Kinship and Diversification of Bacterial Penicillin-Binding Proteins and  $\beta$ -Lactamases." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42 (1): 1–17. <https://doi.org/10.1128/AAC.42.1.1>.
- McConnell, Michael J., Luis Actis, and Jerónimo Pachón. 2013. "*Acinetobacter Baumannii*: Human Infections, Factors Contributing to Pathogenesis and Animal Models." *FEMS Microbiology Reviews* 37 (2): 130–55. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00344.x>.
- Merabishvili, Maia, Dieter Vandenneuvel, Andrew M. Kropinski, Jan Mast, Daniel De Vos, Gilbert Verbeken, Jean-Paul Noben, Rob Lavigne, Mario Vaneechoutte, and Jean-Paul Pirnay. 2014. "Characterization of Newly Isolated Lytic Bacteriophages Active against *Acinetobacter Baumannii*." Edited by Baochuan Lin. *PLoS ONE* 9 (8): e104853. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104853>.
- Morgan, M.E.I., C.A. Hart, and R.W.I. Cooke. 1984. "Klebsiella Infection in a Neonatal Intensive Care Unit: Role of Bacteriological Surveillance." *Journal of Hospital Infection* 5 (4): 377–85. [https://doi.org/10.1016/0195-6701\(84\)90005-7](https://doi.org/10.1016/0195-6701(84)90005-7).
- Morris, Faye C., Carina Dexter, Xenia Kostoulis, Muhammad Ikhtear Uddin, and Anton Y. Peleg. 2019. "The Mechanisms of Disease Caused by *Acinetobacter Baumannii*." *Frontiers in Microbiology* 10 (July): 1601. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01601>.

- Nagano, Rie, Yuka Adachi, Terutaka Hashizume, and Hajime Morishima. 2000. "In Vitro Antibacterial Activity and Mechanism of Action of J-111,225, a Novel 1methylcarbapenem, against Transferable IMP-1 Metallo-Beta-Lactamase Producers." *The British Society for Antimicrobial Chemotherapy*.
- Nilsson, Anders S. 2014. "Phage Therapy—Constraints and Possibilities." *Upsala Journal of Medical Sciences* 119 (2): 192–98. <https://doi.org/10.3109/03009734.2014.902878>.
- Nobrega, Franklin L., Ana Rita Costa, Leon D. Kluskens, and Joana Azeredo. 2015. "Revisiting Phage Therapy: New Applications for Old Resources." *Trends in Microbiology* 23 (4): 185–91. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.01.006>.
- Nordmann, Patrice, Gaelle Cuzon, and Thierry Naas. 2009. "The Real Threat of *Klebsiella Pneumoniae* Carbapenemase-Producing Bacteria." *The Lancet Infectious Diseases* 9 (4): 228–36. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70054-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70054-4).
- Ofek, Itzhak, Nathan Sharon, and Soman N. Abraham. 2006. "Bacterial Adhesion." In *The Prokaryotes*, edited by Martin Dworkin, Stanley Falkow, Eugene Rosenberg, Karl-Heinz Schleifer, and Erko Stackebrandt, 16–31. New York, NY: Springer New York. [https://doi.org/10.1007/0-387-30742-7\\_2](https://doi.org/10.1007/0-387-30742-7_2).
- Oliveira, Junio, and Wanda C. Reygaert. 2021. "Gram Negative Bacteria." In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538213/>.
- Ørskov, I., and F. Ørskov. 1984. "4 Serotyping of *Klebsiella*." In *Methods in Microbiology*, 14:143–64. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0580-9517\(08\)70449-5](https://doi.org/10.1016/S0580-9517(08)70449-5).
- Pabary, Rishi, Charanjit Singh, Sandra Morales, Andrew Bush, Khalid Alshafi, Diana Bilton, Eric W. F. W. Alton, Anthony Smithyman, and Jane C. Davies. 2016. "Antipseudomonal Bacteriophage Reduces Infective Burden and Inflammatory Response in Murine Lung." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 60 (2): 744–51. <https://doi.org/10.1128/AAC.01426-15>.
- Paterson, David L., and Robert A. Bonomo. 2005. "Extended-Spectrum Beta-Lactamases: A Clinical Update." *Clinical Microbiology Reviews* 18 (4): 657–86. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.4.657-686.2005>.

- Peleg, Anton Y., Harald Seifert, and David L. Paterson. 2008. "Acinetobacter Baumannii: Emergence of a Successful Pathogen." *Clinical Microbiology Reviews* 21 (3): 538–82. <https://doi.org/10.1128/CMR.00058-07>.
- Philippon, Alain, Guillaume Arlet, and George A. Jacoby. 2002. "Plasmid-Determined AmpC-Type  $\beta$ -Lactamases." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46 (1): 1–11. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.1.1-11.2002>.
- Podschun, R., and U. Ullmann. 1992. "Klebsiella Capsular Type K7 in Relation to Toxicity, Susceptibility to Phagocytosis and Resistance to Serum." *Journal of Medical Microbiology* 36 (4): 250–54. <https://doi.org/10.1099/00222615-36-4-250>.
- Podschun, R. 1998. "Klebsiella Spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors." *Clinical Microbiology Reviews* 11 (4): 589–603. <https://doi.org/10.1128/CMR.11.4.589>.
- Rawy, Dalia Kamal. 2020. "Biological Characterization of Two Bacteriophages Infecting Klebsiella Pneumoniae." *Journal of Multidisciplinary Sciences* 2 (1): 1–10. <https://doi.org/10.33888/jms.2020.214>.
- Regeimbal, James M., Anna C. Jacobs, Brendan W. Corey, Matthew S. Henry, Mitchell G. Thompson, Rebecca L. Pavlicek, Javier Quinones, et al. 2016. "Personalized Therapeutic Cocktail of Wild Environmental Phages Rescues Mice from Acinetobacter Baumannii Wound Infections." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 60 (10): 5806–16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02877-15>.
- Rohde, Christine, Grégory Resch, Jean-Paul Pirnay, Bob Blasdel, Laurent Debarbieux, Daniel Gelman, Andrzej Górski, et al. 2018. "Expert Opinion on Three Phage Therapy Related Topics: Bacterial Phage Resistance, Phage Training and Prophages in Bacterial Production Strains." *Viruses* 10 (4): 178. <https://doi.org/10.3390/v10040178>.
- Roier, Sandro, Franz G. Zingl, Fatih Cakar, Sanel Durakovic, Paul Kohl, Thomas O. Eichmann, Lisa Klug, et al. 2016. "A Novel Mechanism for the Biogenesis of Outer Membrane Vesicles in Gram-Negative Bacteria." *Nature Communications* 7 (1): 10515. <https://doi.org/10.1038/ncomms10515>.
- Rumbo, Carlos, María Tomás, Esteban Fernández Moreira, Nelson Cruz Soares, Micaela Carvajal, Elena Santillana, Alejandro Beceiro, Antonio Romero, and Germán Bou.

2014. “The *Acinetobacter Baumannii* Omp33-36 Porin Is a Virulence Factor That Induces Apoptosis and Modulates Autophagy in Human Cells.” Edited by C. R. Roy. *Infection and Immunity* 82 (11): 4666–80. <https://doi.org/10.1128/IAI.02034-14>.
- Sambrook, Joseph, and David W. Russell. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schooley, Robert T., Biswajit Biswas, Jason J. Gill, Adriana Hernandez-Morales, Jacob Lancaster, Lauren Lessor, Jeremy J. Barr, et al. 2017. “Development and Use of Personalized Bacteriophage-Based Therapeutic Cocktails to Treat a Patient with a Disseminated Resistant *Acinetobacter baumannii* Infection.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61 (10). <https://doi.org/10.1128/AAC.00954-17>.
- Sekulovic, Ognjen, Maicol Ospina Bedoya, Amanda S. Fivian-Hughes, Neil F. Fairweather, and Louis-Charles Fortier. 2015. “The *C. Lostridium Difficile* Cell Wall Protein CWPV Confers Phase-variable Phage Resistance.” *Molecular Microbiology* 98 (2): 329–42. <https://doi.org/10.1111/mmi.13121>.
- Soothill, J. S. 1992. “Treatment of Experimental Infections of Mice with Bacteriophages.” *Journal of Medical Microbiology* 37 (4): 258–61. <https://doi.org/10.1099/00222615-37-4-258>.
- Styles, Kathryn M., Rapee Thummeepak, Udomluk Leungtongkam, Sophie E. Smith, Gabrielle S. Christie, Andrew Millard, John Moat, et al. 2020. “Investigating Bacteriophages Targeting the Opportunistic Pathogen *Acinetobacter Baumannii*.” *Antibiotics* 9 (4): 200. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040200>.
- Taati Moghadam, Majid, Nour Amirmozafari, Aref Shariati, Masoumeh Hallajzadeh, Shiva Mirkalantari, Amin Khoshbayan, and Faramarz Masjedan Jazi. 2020. “How Phages Overcome the Challenges of Drug Resistant Bacteria in Clinical Infections.” *Infection and Drug Resistance* Volume 13 (January): 45–61. <https://doi.org/10.2147/IDR.S234353>.
- Tan, Xin, Huaisheng Chen, Min Zhang, Ying Zhao, Yichun Jiang, Xueyan Liu, Wei Huang, and Yingfei Ma. 2021. “Clinical Experience of Personalized Phage Therapy Against Carbapenem-Resistant *Acinetobacter Baumannii* Lung Infection in a Patient With

- Chronic Obstructive Pulmonary Disease.” *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 11 (February): 631585. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.631585>.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2022. “Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters. Version 12.0.”
- Twort, Frederick William. 1936. “Further Investigations on the Nature of Ultra-Microscopic Viruses and Their Cultivation.” *Journal of Hygiene* 36 (2): 204–35. <https://doi.org/10.1017/S0022172400043606>.
- Ventola, C. Lee. 2015. “The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats.” *P & T: A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management* 40 (4): 277–83.
- Verma, Vivek, Kusum Harjai, and Sanjay Chhibber. 2009a. “Characterization of a T7-like Lytic Bacteriophage of *Klebsiella Pneumoniae* B5055: A Potential Therapeutic Agent.” *Current Microbiology* 59 (3): 274–81. <https://doi.org/10.1007/s00284-009-9430-y>.
- Verma, Vivek, Kusum Harjai, and Sanjay Chhibber. 2009b. “Restricting Ciprofloxacin-Induced Resistant Variant Formation in Biofilm of *Klebsiella Pneumoniae* B5055 by Complementary Bacteriophage Treatment.” *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 64 (6): 1212–18. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp360>.
- Walsh, Timothy R., Mark A. Toleman, Laurent Poirel, and Patrice Nordmann. 2005. “Metallo-Beta-Lactamases: The Quiet before the Storm?” *Clinical Microbiology Reviews* 18 (2): 306–25. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.2.306-325.2005>.
- Wargo, Kurt A., and Jonathan D. Edwards. 2014. “Aminoglycoside-Induced Nephrotoxicity.” *Journal of Pharmacy Practice* 27 (6): 573–77. <https://doi.org/10.1177/0897190014546836>.
- Weitz, Joshua S., Timothée Poisot, Justin R. Meyer, Cesar O. Flores, Sergi Valverde, Matthew B. Sullivan, and Michael E. Hochberg. 2013. “Phage–Bacteria Infection Networks.” *Trends in Microbiology* 21 (2): 82–91. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.11.003>.
- Williams, P., P. A. Lambert, M. R. Brown, and R. J. Jones. 1983. “The Role of the O and K Antigens in Determining the Resistance of *Klebsiella Aerogenes* to Serum Killing and Phagocytosis.” *Journal of General Microbiology* 129 (7): 2181–91. <https://doi.org/10.1099/00221287-129-7-2181>.



- Wittebole, Xavier, Sophie De Roock, and Steven M Opal. 2014. "A Historical Overview of Bacteriophage Therapy as an Alternative to Antibiotics for the Treatment of Bacterial Pathogens." *Virulence* 5 (1): 226–35. <https://doi.org/10.4161/viru.25991>.
- World Health Organization. 2020. "Antibiotic Resistance." <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>.
- Wu, Nannan, Jia Dai, Mingquan Guo, Jianhui Li, Xin Zhou, Feng Li, Yuan Gao, et al. 2021. "Pre-Optimized Phage Therapy on Secondary *Acinetobacter Baumannii* Infection in Four Critical COVID-19 Patients." *Emerging Microbes & Infections* 10 (1): 612–18. <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1902754>.
- Xu, Jingzhi, Xiaobo Li, Guangbo Kang, Liang Bai, Ping Wang, and He Huang. 2020. "Isolation and Characterization of AbTJ, an *Acinetobacter Baumannii* Phage, and Functional Identification of Its Receptor-Binding Modules." *Viruses* 12 (2): 205. <https://doi.org/10.3390/v12020205>.
- Yerushalmy, Ortal, Leron Khalifa, Naama Gold, Chani Rakov, Sivan Alkalay-Oren, Karen Adler, Shira Ben-Porat, et al. 2020. "The Israeli Phage Bank (IPB)." *Antibiotics* 9 (5): 269. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9050269>.
- Yin, Supeng, Guangtao Huang, Yulong Zhang, Bei Jiang, Zichen Yang, Zhiwei Dong, Bo You, et al. 2017. "Phage Abp1 Rescues Human Cells and Mice from Infection by Pan-Drug Resistant *Acinetobacter Baumannii*." *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology* 44 (6): 2337–45. <https://doi.org/10.1159/000486117>.
- Zakuan, Z. D., and K. Suresh. 2018. "Rational Use of Intravenous Polymyxin B and Colistin: A Review." *The Medical Journal of Malaysia* 73 (5): 351–59.
- Zaman, Sojib Bin, Muhammed Awlad Hussain, Rachel Nye, Varshil Mehta, Kazi Taib Mamun, and Naznin Hossain. 2017. "A Review on Antibiotic Resistance: Alarm Bells Are Ringing." *Cureus*, June. <https://doi.org/10.7759/cureus.1403>.
- Чанишвили, Т, and Ж Капанадзе. 1967. "Определение Скорости Развития Фагоустойчивости Различных Видов" VI: 91–98.

გამოქვეყნებული ლიტერატურა:

1. Kutateladze M., Leshkasheli L., Bolkvadze D., Askilashvili L., Balarjishvili N. (2016) Bacteriophages against multidrug resistant bacterial infections. *International Journal of Infectious Diseases*, vol. 53, p. 46-47.
2. Leshkasheli L., Kutateladze M., Balarjishvili N., Bolkvadze D., Save J., Oechslin F., Que Y.A., Resch G. (2019) Efficacy of Newly Isolated and Highly Potent Bacteriophages in a Mouse Model of XDRAB Bacteremia. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, vol.19, p. 255-261.
3. Corbellino M., Kieffer N., Kutateladze M., Balarjishvili N., Leshkasheli L., Askilashvili L., Tsertsvadze G., Rimoldi SG., Nizharadze D., Hoyle N., Nadareishvili L., Antinori S., Pagani C., Scorza DG., Romanò ALL., Ardizzone S., Danelli P., Gismondo MR., Galli M., Nordmann P., Poirel L. (2020) Eradication of a multi-drug resistant, carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate following oral and intra-rectal therapy with a custom-made, lytic bacteriophage preparation. *Clinical Infectious Diseases*, vol.70, (9), p.1998-2001.
4. Eskenazi A., Lood C., Wubbolts J., Hites M., Balarjishvili N., Leshkasheli L., Askilashvili L., Kvachadze L., van Noort V., Wagemans J., Jayankura M., Chanishvili N., de Boer M., Nibbering P., Kutateladze M., Lavigne R., Merabishvili M., and Pirnay J.P. (2022) Combination of pre-adapted bacteriophage therapy and antibiotics for treatment of fracture-related infection due to pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Nature communication*, vol.13. N.302.