



Ветеринарно приложение на фаговата терапия при продуктивни животни като алтернатива на антибиотичното лечение и справянето с АМР

Зоонозите са инфекциозни заболявания, предавани пряко или косвено между животните и хората. Няколко важни патогенни причинителя на зоонози колонизират продуктивните животни асимптоматично, което може да доведе до контаминация по цялата хранителна верига и да представлява опасност за общественото здраве. Рутинното вземане на проби от кланични трупове и от храни, както и мониторинга на зоонозните заболявания от страна на ДЧ за контрол през последните 20 години показва високо разпространение на антибиотичната резистентност сред патогените, пренасяни в храните, а също така и сред коменсалните чревни бактерии. Ако тази тенденция продължи, антибиотиците ще бъдат неефективни срещу такива патогени в бъдеще и може да са необходими алтернативни подходи, като фаговата терапия.

През следващите десетилетия ще се изисква значително увеличение на производството на месо, за да се отговори на търсенето от нарастващото население в световен мащаб и променящите се хранителни навици в развиващите се страни. До момента голяма част от това търсене е компенсирано от промишленото животновъдство, особено секторите птицевъдство и свиневъдство. За съжаление, такива производствени системи могат да улеснят предаването и на болести, тъй като тези животни често имат ниско генетично разнообразие и се отглеждат в големи и плътни популации. По данни на Организацията по прехрана и земеделие (ФАО) между 1961 и 2016 г. световното производство на птиче месо се е увеличило от 9 на 120 милиона тона, а производството на яйца е нараснало от 15 на 81 милиона тона. В последния доклад за преглед на пазара на месо на ФАО се изчислява, че производството на домашни птици и свинско месо е било съответно 123,9 и 120,5 милиона тона през 2018 г.

В много части на света антимикуробните средства (АМС) се използват все още в промишленото земеделие за насърчаване на растежа, предотвратяване на заболявания или терапевтично, което увеличава нивата на резистентни бактериални патогени и АМР. Само в САЩ през 2012 г. животните консумират 70 % от медицински важните антибиотици (8,9 тона). В Китай животновъдната промишленост ще използва до 30 % от световното производство на АМС до 2030 г. Появата на антимикуробна резистентност на бактериалните патогени неизбежно ще доведе до неуспех на лечението, увеличено предаване на патогени и съпътстващи производствени загуби.

Най-често срещаните бактериални патогени, инвазиращи домашни птици и свине, са *Salmonella* spp., *E. coli*, *Campylobacter* spp., *Clostridium* spp. и *Listeria* spp. В последния доклад на Европейския орган за безопасност на храните (ЕОБХ) се посочва, че тези патогени често са устойчиви на няколко класа антибиотици. В ЕС официалните данни за зоонозни и индикаторни бактерии, изолати от хора, животни и храни показват високи нива (28,6 % от повече от 8000) на *Salmonella*, резистентни на три или повече антимикробни вещества. Освен това 34,9 % от индикаторните изолати на *E. coli* от прасета за угояване са силно резистентни/устойчиви. Проучванията и разработките по създаване и разработване на нови антибиотици за противодействие на тази резистентност са критично малко и спешно са необходими алтернативни подходи. Една от възможните алтернативи на АМС е използването на **литични бактериофаги за борба с бактериалните инфекции при продуктивните животни**. Проучване на Министерството на здравеопазването на Обединеното кралство и *Wellcome Trust* съобщават, че 3 от 10те най-обещаващи алтернативи на антибиотиците, се основават на използването на бактериофаги или техните компоненти.

Благоприятното въздействие на бактериофагите върху инфекциите при продуктивни животни, предизвикани от бактериални патогенни видове, са открити в началото на ХХ век от *Twort* (1915) и *d'Herelle* (1917). В проучванията си *D'Herelle* първо тества фаговата терапия при птици с успешни резултати в лечението на птичи тиф (95-100 % преживяемост на третираните с фаги птици в сравнение с 0-25 % за нелекуваните контроли). В проучване на *N. J. Pyle* от 1925г. на тема: „*The Bacteriophage In Relation To Salmonella Pullora Infection In The Domestic Fowl*“ се докладва за използване на фагова терапия за лечение на пилета със системна инфекция със *Salmonella*, причинена от *Salmonella enterica*, серотип *Pullorum*.

При *in vitro* проведени опити бактериофагите показват белязана бактериолиза, за разлика от *in vivo* експериментите, при които бактериофагите не намаляват смъртността или нямат много добър терапевтичен ефект. След откриването на антибиотиците през 1920-те години, малко е работено по фаговата терапия. По-подробен преглед на историята на употребата на бактериофаги в агроханителната верига и по-специално в животновъдството, би могло да бъде намерено в обстойния преглед от *Sulakvelidze* и *Barrow* на тема: „*Phage therapy in animals and agribusiness. Bacteriophages: biology and applications*“.

Салмонелоза:

Salmonella spp. е често срещана цел за фаговата терапия, тъй като причинява инфекции при широк спектър от животински видове и човека, както и причинява значителни производствени загуби в промишленото производство. Някои серотипове на *Salmonella* (напр. *S. enterica* серотип *Typhi*) са известни като "хост-ограничени", тъй като те произвеждат тежко, системно, подобно на тиф заболяване при един гостоприемник (или малък брой свързани гостоприемници). Въпреки това, терапията с

фаги се фокусира главно върху серотипове *Enteritidis* и *Typhimurium*, които обикновено водят до не толкова тежка гастроинтестинална инфекция при много повече видове и се изолират често от храните.

Фаговата терапия се използва за контрол на *Salmonella* при пилета, но с различна степен на успех. *Sklar et al.* използват фагова терапия в животински модели на бройлери, за да демонстрират, че **колонизацията на салмонела в цекума може значително да бъде намалена с почти 1 log₁₀ колонобразуващи единици** на грам чревно съдържимо (CFU/g) в продължение на 14 дни чрез прилагане на „коктейл“ от четири вида фаги във фуража (10⁹ формиращи единици (PFU/g)). Освен това лечението с бактериофаги намалява признаците на вторична инфекция при птиците. В проучването си *Fiorentin et al.* показват, че единична перорална доза от три фагови вида всеки 10¹¹ PFU може да намали колонизацията на бактерии в цекума при бройлери с 3,5 log₁₀ CFU/g, когато е приложен на 7-дневни пилета, заразени с 10⁸ CFU *S. Enteritidis*.

Atterbury et al. в проучването си е подбрал три литични фагови видове, изолирани от птицеферми и отпадъчни води в Обединеното кралство, с широка гама от гостоприемници срещу *S. Enteritidis*, *S. Hadar* и *S. Typhimurium*. Суспензия от 9,0 Log₁₀ PFU от всеки бактериофаг е използвана за лечение на 36-дневни пилета - Рос бройлери, които са били отделно заразени с трите различни серотипа. **Всички изследвани фаги намаляват бактериалните колонии** в цекума, макар че само *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium* са намалени значително; приблизително - 2,19-2,52 log₁₀ CFU/g в сравнение с контролите. Бактериофаг-резистентни мутанти (BIMS) са открити от животни, третирани с фаги. Въпреки това, този фенотип, резистентен към бактериофаги не се поддържа *in vitro* след последователни субкултури, нито *in vivo*, когато BIMS е въведен в нова група птици при липса на фагово селективно налягане.

Lim et al. демонстрират в проучването си как **фагите могат да се използват за предотвратяване на хоризонтална инфекция от *Salmonella Enteritidis* в птичи модели**. Групите от едnodневни пилета са заразени с 5x10¹¹ CFU *Salmonella Enteritidis* и за следващите 21 дни птиците са лекувани в три независими групи с един от трите титри (10⁵, 10⁷ или 10⁹ PFU/g) бактериофаги, приготвени като фуражна добавка. Всички експериментални терапии **значително намаляват чревната колонизация** с до 1 log₁₀ CFU/g в края на 21-вия ден, като при 70 % от контактните пилета, лекувани с най-висок титър не се откриват колонии на *Salmonella Enteritidis*. *Borie et al.* прилага комбинация от три специфични за *Salmonella* фаги (10⁸ PFU/mL/dose) чрез аерозолно третиране или чрез добавка във водата за пиене на 10-дневни пилета 24 часа преди експерименталното заразяване с 9.6x10⁵ CFU *S. Enteritidis*. **Фаговата терапия значително намалява средния брой чревни *S. Enteritidis* до 1,6 log₁₀CFU/mL.**

Ahmadi et al. определя в своето проучване способността на фаговите частици да намалят *S. Enteritidis* в цекума на японски пьдпъдъци. Бактериофаг „PSE“ е прилаган

на групи от 8-дневни пѣдпѣдѣци профилактично (10^5 PFU) три дни преди експериментално заразяване с 10^8 CFU *S. Enteritidis*; или терапевтично веднага след *S. Enteritidis* заразяването. Профилактичното приложение на фаговата терапия намалява откриването на *Salmonella* в цекума с 20 %, 24 часа и 7 дни след прилагането на PSE, докато в заразената контролна група всички птици имат положителен резултат за *S. Enteritidis* в цекумните проби. При птиците, лекувани терапевтично, не е наблюдавано такова намаление. В по-нататъшен експеримент, групи от еднoдневни пѣдпѣдѣци са лекувани с 10^8 PFU фаги PSE/дневно в продължение на шест дни, перорално. На четвъртия ден, тези птици са заразени с 10^8 CFU на *S. Enteritidis*. *Salmonella* е открита в цекума на птици, лекувани перорално с фаги PSE 6 часа след заразяване със *Salmonella*, но не по-късно до 35 дни след заразяването. Някои птици, лекувани с фаг PSE, периодично тествани за *S. Enteritidis* през целия период на проучването, остават незаразени от *S. Enteritidis*.

Освен прилагането при домашни птици, е демонстриран и **ефектът на фаговата терапия срещу салмонела при прасета**. В проучване на Wall et al., е прилаган 5×10^9 CFU на *S. Typhimurium* $\gamma 4232$ едновременно с микрокапсулни перли, съдържащи 5×10^9 PFU от 16 фагови видове, в суспензия, на 3 до 4 седмични прасета за угояване. Авторите съобщават за **намаление от 2 до 3 \log_{10} CFU/g в броя на бактериалните колонии *Salmonella* в илеума, цекума и тонзилите**. При различен експериментален дизайн прасетата за угояване са заразявани с 5×10^9 CFU *S. Typhimurium* перорално и след това третирани с 10^{10} PFU микрокапсулен „коктейл“ от бактериофаги 48 часа по-късно (перорално три пъти дневно, с 2 часа интервал между дозите). Средният брой на животните със *Salmonella* в цекумните проби, подложени на фагова терапия е значително намален с $1,4 \log_{10}$ CFU /mL в сравнение с нетретирани контроли.

Saez et al. прилага коктейл от бактериофаги като фуражна добавка и резултатите доказват, че **фаговата терапия може да бъде ефективен и практичен начин за намаляване на колонизацията на *Salmonella* и инвазивността и при прасета**. Експерименталният дизайн включва 21 прасета, разделени на три групи. На група 1 е дадена фуражна добавка, съдържаща фагов „коктейл“ (5×10^{11} PFU на ден) в продължение на 5 дни преди перорално да бъде заразена с 5 mL 10^9 CFU/mL *Salmonella Typhimurium*. Група 2 получава 60 mL от фаговата суспензия (5×10^{11} PFU) на всеки 2 часа след заразяването, за общо 6 часа. Група 3 не е получила фагова терапия, но всички групи са подложени на орално заразяване на петия ден с 5 mL от 10^9 CFU/mL бактериална суспензия. Резултатите показват **по-ниско ниво на заразяване със *S. Typhimurium*** 2 часа след заразяването (група 1 = 38.1 %, група 2 = 71,4 %, група 3 = 71,4 %, $P < 0.05$) и 4h след заразяването (група 1 = 42,9 %, група 2 = 81,1 %, група 3 = 85,7 %, $P < 0.05$), когато фаговата терапия е прилагана като фуражна добавка. Освен това *S. Typhimurium* в илеумното и цекумното съдържание е $1 \log_{10}$ CFU/g, което съдържание е по-ниско в групата, третирана с фуражните добавки с бактериофаги в сравнение с контролната група.

Seo et al. в своето проучване определя терапевтичния потенциал на бактериофаговия „коктейл“, който е в състояние да убие 34 референтни щамове и 99 изолати (107 тествани) на *S. Typhimurium*. На групите от четириседмични прасета са дадени 5 mL от фаговия коктейл от 10^9 PFU/mL до края на проучването (15 дни) и на ден 7 са заразени с 10 ml *S. Typhimurium* (ATCC140828) при 10^8 CFU/mL. Не е установено присъствие на *Salmonella* във фекалните проби 7 дни след инфекцията в третираната с фаги група в сравнение със средна колонизация от $1,0 \log_{10}$ CFU/ mL за нетретираната контролна група.

Пероралното прилагане на фагова терапия срещу *Salmonella*, излага бактериофагите на потенциално агресивна среда, като ниско рН в стомаха и активността на жлъчката и ензимите в дуоденума, които могат да повлияят на жизнеспособността на бактериофагите. Използвани са **различни подходи за намаляване на възможните неблагоприятни фактори на средата**, включващо едновременното приложение на антиацидни агенти или фармакологично групиране на фагите в микрокапсули или нанокапсули.

Колибактериоза:

Патогенните щамове на *Escherichia coli* при домашни птици са причинно-следственият агент на колибактериозата, който е отговорен за значителна смъртност при домашни птици. *E. coli* колонизацията при птиците може да прогресира до септицемия и смърт.

В бройлери, *Huff et al.* демонстрира ефикасността на прилагането на смес с висок титър от фаги чрез аерозолно третиране за намаляване на смъртността, свързана с колибактериозата. В този модел, високи титри от два фагови вида (*SPR02*, $2,6 \times 10^8$ PFU /mL и *DAF6*, $2,35 \times 10^9$ PFU/mL) са прилагани в ден 7, последвани от заразяване с патогенни *E. Coli* (инжектирана директно в гръдния сак ($5,6 \times 10^4$ CFU)) на ден 7, 8 или 10. **Фаговата терапия води до значително намаляване на смъртността**, което е най-силно изразено, когато фагите се прилагат едновременно с бактериалното заразяване (30 % смъртност спрямо 60 % смъртност при нетретираните контролни групи птици). Забележително е, че една експериментална група птици, вече заразена с *E. coli*, показва благоприятното въздействие на фаговата терапия и висока податливост на бактериалния патоген на лизиране от фага *SPR02*. Това предполага, че **прилагането на фаги** може да е осигурило **терапевтично лечение** за съществуващата колибактериоза.

Huff et al. отново използва фаг *SPR02* в различен модел на фаговата терапия. Групи от десет тридневни пилета са заразени с 10^3 до 10^4 CFU *E. coli* чрез директно инжектиране в дробовете. Едната група включва животни, при които е прилагана фагова терапия (10^3 или 10^6 PFU) едновременно с *E. coli*, втората група включва животни, на които е прилагана фагова терапия в питейната вода. Приложението на фагите в питейна вода няма защитен ефект, за разлика от едновременното инжектиране на патогенните бактерии и бактериофагите, което е свързано с намалена смъртност (25

% или 5 % за птиците, лекувани съответно с 10^3 и 10^6 PFU). При контролната група е наблюдавана 80 % смъртност.

Huff et al. използват фаги *SPR02* и *DAF6* за лечение на колибактериоза и чрез аерозолна терапия или интрамускулно-инжектиране. Заразяването е с 5.96×10^4 CFU на *E. coli*, инжектирани в 7-дневни пилета. Лечението с бактериофаги посредством **аерозолна терапия** ($7,65 \times 10^8$ и $2,83 \times 10^9$ PFU/mL, *DAF6* и *SPR02*) осигурява значителна защита за птиците, както личи от резултатите на проучването - **ниска смъртност** на третираната група (20%) в сравнение с контролната група (50%). Ако обаче лечението с фаги е забавено с 24 или 48 часа след бактериалното заразяване, не е наблюдавана терапевтична полза. Обратно, птиците, лекувани с комбинация от фаги ($1,88 \times 10^9$ и $6,35 \times 10^8$ PFU/mL съответно *DAF6* и *SPR02*) и от интрамускулно инжектиране са имали значително по-ниска смъртност (< 20 %) в сравнение с контролната група (53%), дали фаговата терапия е приложена незабавно или до 48 часа след бактериалното заразяване. Тези резултати показват, че **пътят на приложение играе основна роля в ефективността на фаговата терапия**, тъй като изглежда, че **най-добрите резултати** се постигат **чрез инжектиране на бактериофаги**, но при птиците, като се има предвид естеството на отглеждането им, едва ли ще предложи практическо решение за колибактериозата.

В едно от многобройните си проучвания *Huff et al.* оценява потенциалната **синергия на антибиотиците и лечението с бактериофаги** за колибактериоза. Групи от десет седемдневни пилета са заразени с 6×10^4 CFU *E. Coli*, което е последвано от инжектиране на един от двата фагови вида интрамускулно (съответно $3,7 \times 10^9$ и $9,3 \times 10^9$ PFU на mL фаги *DAF6* или *SPR02*). Енрофлоксацин е терапевтично приложен в питейната вода на птиците в 50 ppm за 7 последователни дни, започвайки веднага след заразяването с *E. coli*. За нелекуваната контролна група е регистрирана висока смъртност (68 %). Това е висок процент смъртност в сравнение с 15 % смъртност в групата, третирана с бактериофаги, 3 % смъртност в групата, лекувана с енрофлоксацин и 0 % за птиците, лекувани с фагова терапия и антибиотици. Това проучване и резултатите от него свидетелстват за подобрена ефикасност и поява на синергия между двата терапевтични агента, когато се използват в комбинация.

Oliveira et al. тества **фаговата терапия посредством капково разпръскване** при експериментално и естествено инфектирани пилета. Групи от 12 10-седмични пилета са заразени с 1×10^8 CFU от птичи патогенни *E. coli* H839E, чрез инжектиране. На групата, третирана с фаги, е приложена суспензия от $1,5 \times 10^9$ PFU phi F78E, перорално и аерозолно. Резултатите показват **значимо по-ниска патология**, заболяемост ($\approx 60\%$) и смъртност ($\approx 45\%$) в групата, лекувана с фагова терапия в сравнение с нетретираната контролна група - патология (≈ 4), заболяемост ($\approx 100\%$) и смъртност ($\approx 75\%$). Освен това средната смъртност е с 25,0% по-ниска, средната заболяемост 41,7 % по-ниска, а лезиите в кланичните трупове също са по-малко тежки в групата, лекувана с фаги, в сравнение с нелекуваните контроли.

El-Gohary et al. тества разпространението на фаги като средство за намаляване на колибактериозата. Повърхностното третиране с фаги на поголовието животни е с 200 ml от $2,8 \times 10^8$ CFU/mL култура от патогенни *E. coli*. За групите, лекувани с бактериофаги, експерименталните животни са третирани аерозолно с 200 ml от 8×10^8 PFU/mL суспензия на фаг *SPR02*. Смъртността в контролната група и групите, лекувани с бактериофаги, е съответно 25% и 5%. Авторите предполагат, че при третирането на подовата постеля на животните и боксовете с препарати на основата на бактериофаги намалява нивото на целевия патоген до по-ниска от инфекциозната доза, възпрепятствайки появата на бактериални инфекции и това би бил практичен и ефикасен начин за предотвратяване на колибактериоза при бройлери. Въпреки обещаващите резултати все пак това са експериментални проучвания, а в промишленото птицевъдство може да е трудно да се повторят тези резултати.

Освен респираторни инфекции при домашни птици, колибактериозата води до менингит и септицемия при домашни птици. Експерименталният дизайн използва 3-седмични пилета, инфектирани с *E. coli H247K1+* интрамускулно или интракраниално, последвано от интрамускулно инжектиране на фаг *R* 10^4 или 10^6 PFU. Смъртността в групите, подложени на фагова терапия, е нулева, в сравнение със 100 % в нелекуваната контролна група. Нито една от птиците, подложена на фагова терапия, не е показала клинични признаци на инфекция. Профилактичното приложение на фаговата терапия до два дни преди бактериалното заразяване също е ефективно за намаляване на смъртността до 1 от 9 в третираната с фаги група в сравнение с 4 от 9 в контролната група. Фаг *R* е преодолял кръвно-мозъчната бариера успешно, което е още едно доказателство в подкрепа на хипотезата, че дори остри инфекции могат да бъдат податливи на лечение с бактериофаги.

През 80-те години на миналия век от *Smith and Huggins* е извършена пионерска работа във фаговата терапия срещу колибактериоза при прасета (както и при мишки, говеда и овце). В едно от проучванията им прасенца са експериментално заразени с 3×10^8 CFU патогенни *E. coli O20:K101 987P* и 13-16 часа по-късно са били подложени на фагова терапия чрез перорално приложение с два бактериофага (*P433/1* и *P433/2*) или единична фагова терапия (*P433/1*). Симптомите на заболяването при прасенца, лекувани с фаги, престават до около 20 часа, докато заразените нелекувани прасенца са с тежка симптоматика, завършила с летален край.

Jamalludeen et al. показат в проучването си благотворния ефект на фаговата терапия върху отбити прасета, заразени с ентеротоксигенни *E. coli O149:H10:F4*. Прасетата са заразени перорално с 10^{10} CFU *E. coli*, последвано от фагова терапия с комбинация от 6 фагови вида (*GJ1- GJ7*) поотделно или комбинирани в доза 10^9 PFU от всеки фаг. Тези фаги са прилагани профилактично (15 мин след заразяване) или терапевтично (24 часа след заразяване). Антибиотикът флорфеникол е използван преди бактериалното заразяване в опит да се подобри колонизацията на *E. coli*.

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136
<http://corhv.government.bg>, corhv@mzh.government.bg
тел. 02/4273056



Профилактичната употреба на шестте фагови видове индивидуално намалява продължителността и тежестта на симптомите и етиологията на инфекцията. Освен това терапевтичното приложение на „двуфаговия коктейл“ значително намалява симптомите, развитието на диария и инвазивността на патогенните *E. coli*, без да има промени в броя на колонии на коменсалните *E.coli*. Използването на бактериофаги като фуражна добавка за прасета, прилагана профилактично, се счита за безопасно, тъй като няма неблагоприятни имунологични ефекти и може да доведе и до повишено наддаване на тегло.

Кампилобактериоза:

Campylobacter spp. е най-значимият причинител за остро протичащи бактериални инфекции, пренасяни чрез храни в ЕС. Приблизително 95 % от всички докладвани случаи са резултат от инфекция с *C. jejuni*. *Campylobacter* spp. е силно адаптиран към колонизация в птиците черва и има относително ниска инфекциозност за хората (мисля, че е приблизително 500 клетки). Има гостоприемников имуноен отговор, проявен чрез повишаване на титъра на SIgA антителата, но той няма ефект върху нивото на колонизация на *C. jejuni* в бройлери. Високият брой на *Campylobacter* spp. при бройлери може да доведе до заразяване на кланични трупове и месото, предназначено за човешка консумация. Изчислено е, че намаляването на броя на *Campylobacter* spp. в кланичните трупове с 2 log₁₀ може да доведе до 30-кратно намаляване на човешките изолати на *Campylobacter* spp. Профилът на резистентност към антибиотици на 486 изолати на *Campylobacter* spp. от пилетата по данни на UK Food Standards Agency от 2016 г. до 17 показва резистентност към ципрофлоксацин, тетрациклин, налидиксова киселина, стрептомицин и еритромицин. Мултирезистентност към три или повече антибиотични класове е докладвана за 17 изолата. Тези резултати подчертават **необходимостта от по-ефективно решение за справяне с контаминацията на кланични трупове и месото от тях с *Campylobacter*.**

Wagenaar et al. в проучването си дава резултати от експериментално заразяване на 10-дневни бройлери с *C. jejuni* (10⁵ CFU/mL на ден 10) и последваща фагова терапия. Фаговият препарат самостоятелно не показва никакъв защитен ефект при птиците, обаче, когато се прилага след бактериално натоваарване, при третираниите птици намалява броя на колонии *C. jejuni* с 3 log₁₀CFU/g. Фаги CP8 и CP34, изолирани от птичи изпражнения, се използват като **терапия за намаляване на *Campylobacter* при пилета.** Фагите са избрани въз основа на благоприятната кинетика *in vitro* репликация и широк обхват на гостоприемниците. Бройлерите са експериментално инфектирани с *C. jejuni* изолати HPC5 и GIIC8 в различни дози (от 2,7 до 7,8 log₁₀CFU) перорално на 18 до 20 ден. Еднократна фагова терапия с 5-9 log₁₀PFU е приложена на 25-дневна възраст перорално. ***C. Jejuni* броя колонии в цекумните проби от третираниите с фаги птици са намаляли с между 0,5 и 5log₁₀CFU/g, когато са били прилагани при >10⁷ PFU. Резистентни към фаги *C. jejuni***

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136
<http://corhv.government.bg>, corhv@mzh.government.bg
тел. 02/4273056



изолати са открити при третиране с фаги птици (4 %), но това е значително по-ниско от резистентните изолати от *in vitro* проучвания (11%). Авторите предполагат, че при липса на селективно налягане, фаг резистентните мутанти могат да колонизират червата на птиците по-малко ефективно.

Литичните фаги, които инвазират *Campylobacter*, са категоризирани в три групи (I-III) въз основа на структурата, размера на генома и рецептора, използвани за заразяване на гостоприемника. Фаги от група II очевидно използват множество гостоприемникови клетъчни рецептори за свързване. В няколко проучвания са регистрирани $2 \log_{10}$ CFU/g намаляване на цекумния брой на колонииите *Campylobacter* HPC5 48 часа след прилагане на еднократна доза от 10^7 PFU от група II бактериофаги CP220. Честотата на фаговата резистентност при заразени пилета след терапия с бактериофаги е остатъчна, само в около 2 % от популацията.

Hammerl et al. използва комбинирано третиране на фаги от група II и III. Групи от 20-дневни мъжки птици са заразени с 10^9 *C. Jejuni*, като след 7 дни на заразените птици е приложена **фагова терапия със суспензия** от 5×10^8 PFU от CP14 (група III), CP81 (група III) или CP68 (група II) самостоятелно или комбинирано. На 31-дневна възраст експерименталните птици са евтанизирани и **броят на *C. Jejuni* в цекума показва $1 \log_{10}$ CFU/g и намаляване на цекумната колонизация** при самостоятелно лечение с CP14, в сравнение с контролната група. Добавянето на CP81 към CP14 не подобрява това намаляване на колонииите патогенни бактерии. Авторите твърдят, че различните гостоприемникови рецептори, използвани от групи II и III фаги са основната причина както за значителното намаляване на броя патогенни бактерии, така и за по-ниските нива на резистентни изолати, получени при използване на смес от група II и III фаги (3 %) в сравнение с единични CP14 фаги (4 %) или два фагови вида от една и съща група III (8 %).

Тъй като *Campylobacter* колонизира цекума при птиците и не изглежда да е много инвазивна, **фаговата терапия обикновено се прилага перорално**. Carvalho et al. в своето проучване докладват за намаляване на колонииите *Campylobacter* след прилагане на фагова терапия от три вида фаги при бройлери с приблизително $2 \log_{10}$ CFU/g. Авторите съобщават, че броят на *Campylobacter* е поддържан с $1 \log_{10}$ CFU по-ниско в групата, лекувана с фаги, в сравнение с нелекуваната контролна група.

Клостридиоза:

Clostridium perfringens е патогенен бактериален агент, причиняващ некротичен ентерит, заболяване, което засяга пилетата и чиято патогенеза е не напълно разучена. *C. perfringens* е Грам-положителна бактерия, това предполага, че дебелият пептидогликанов слой е най-външната бариера. Смята се, че участието на токсини и хидролази, секретирани от бактериите, е от значение за вирулентността и чревната колонизация от анаеробния *C. perfringens*. Освен това паразитните *Eimeria* видове, които колонизират тънките черва, като *Eimeria maxima* и *Eimeria acervulina*, са

известни, че предразполагат също към некротичен ентерит чрез изтичане на плазма в чревния лумен, което осигурява необходим растежен субстрат за обширна колонизация на *Clostridium perfringens*. **Фаговата терапия показва известна ефикасност при намаляване на симптомите и прогресията на заболяването при птиците.**

Проучване на *Miller et al.*, включващо общо 900 птици в различни експериментални проекти, показва, че **приложението на суспензия от 5 вида бактериофаги** при 10^5 PFU/mL перорално или в питейна вода на експериментално инфектирани с *C. perfringens* пилета *Cobb broiler* (0 до 42 дни) води до **92% намаление на смъртността** в сравнение с нелекуваната контролна група. Освен това авторите стигат до заключението, че в периода 0-42 дни специфичният „фагов коктейл“, подобрява характеристиките като повишено наддаване на тегло и по-доброто усвояване на фуражите в групата на птиците, претърпели фагова терапия (добавяне на „фаговия коктейл“ във водата ($2,618 \pm 0.059$ kg) и групата на птиците, на които фаговата терапия е прилагана във фуража ($2,47 \pm 0.059$ kg)), в сравнение с нелекуваната група ($2,296 \pm 0.059$ kg). Тези резултати свидетелстват, че **фаговата терапия може да бъде ефективно лечение за контрол на некротичния ентерит, предизвикан от *C. perfringens*.**

Съобщава се, че кодираните от фагите ендолизини, ензими, които целят и хидролизират специфичните връзки в пептидогликановия бактериален слой, са достатъчни за постигане на бактериолиза. Използването на пречистен ендолизин от бактериофаги, чиято цел са *C. perfringens*, е доказано **обещаващ начин за намаляване на колонизацията или подобряване на лечението на инфекциите от този патоген.**

Листерияза:

Listeria monocytogenes представлява сериозен бактериален патоген, пренасян в храните, отговорен за около 255 смъртни случая годишно в САЩ (*Scallan et al., 2011*). Тази бактерия причинява листериоза, тежко заболяване, което включва диария, мъртво раждане, менингит и енцефалит, и се свързва с висока смъртност (20—30 %). Повечето случаи на листериоза при хора са свързани със серотиповете 1/2a, 1/2b и 4b и са свързани със заразени храни (RTE) (*Kim et al., 2008*). Инфекциозната доза в храни, свързани с листериозата, обикновено е по-голяма от 1000 CFU/g (*ICMSF, 1994; ICMSF, 1996; Tompkin, 2002*). През 2011 г. в много държави са докладвани огнища на *L. monocytogenes*, свързани с лошите санитарно хигиенни условия, което подчертава **необходимостта от свеждане до минимум на риска от замърсяване на *L. monocytogenes* в RTE храни и по цялата агрохранителна верига (CDC, 2011).**

L. monocytogenes е патоген, който представлява риск поради уникалните си характеристики: повсеместно присъствие в околната среда, психротрофен растеж при температури на охлаждане или по-ниски (*Membre et al., 1999; Walker et al., 1990*) и толерантност към високи концентрации на сол (*Guenther et al., 2009; Seeliger and Jones, 1986*). Тези уникални свойства позволяват на *L. monocytogenes* да устои на сурови условия, да се размножава и да се превърне в хранително замърсяване. Този

микроорганизъм е в състояние да колонизира и развива биофилми в съоръженията за преработка на храни и дори да се установи в оборудването и да оцелее по повърхности.

Агенцията по храните и лекарствата (*FDA*) на САЩ, Министерството на земеделието на САЩ (*USDA*) и Службата за инспекция на безопасността на храните прилага политика за нулева толерантност към този патоген в RTE храни. Няколко държави също следват същата регулаторна политика. През 2006 г. *FDA* и *USDA* одобриха използването на два фуражни препарата на основата на бактериофаги за контрол на *L. monocytogenes* в храните, ***LMP-102***, добавка за храни като месо и продукти от домашни птици, и ***Listex P100*** като съставка на GRAS за всички хранителни продукти (*Carlton et al., 2005; FDA., 2006; Monk et al., 2010*). Одобрението на анти-*Listeria* фагови препарати от страна на правителствените агенции признава тези продукти като обещаващи и реалистични антибактериални средства за съоръжения при производството на храни.

В обстойно проучване на *Mastura Akhtar, Stelios Viazis, Kyle Christensen, Phillip Kraemer, Francisco Diez-Gonzalez* на тема: „*Isolation, characterization and assessment of virulent bacteriophages against Listeria monocytogenes*“ от официалния контрол за 2016г., с doi:10.1016/j.foodcont.2016.12.035, е използван **коктейл от бактериофаги, наречен *LPI***. Въз основа на данните от проведените тестове е създадена фагова суспензия, наречена *LPI* чрез комбиниране на **6 изолата фаги (*LMA4, LMA8, LMA9, LMB3, LMB3* и *LME3*) срещу *L. monocytogenes* щамове**. Суспензията от бактериофаги съдържа фаги, специфични за *L. monocytogenes* серотипове 4b, 1/2a и 1/2b. Пет щама *L. monocytogenes* са произволно избрани от различни серотипове за изследване на бактериалното предизвикателство, включващи щамове *Scott A (4b), C1—006 (1/2a), J1—004 (1/2a), ATCC 51775 (1/2c) и C1—115 (3a)*. **Фагите, използвани срещу *Scott A*, серотип 4b са в състояние да инвазират по-голямата част от тестваните щамове от всички серотипове с изключение на 3с. Сред всички фаги, *LMA6, LMA8* и *LMA9* са най-инвазивни, засягащи 100 % от изпитваните бактериални щамове от 4b, 3a, 3b, 1/2a и 1/2с серотипове. Фагите, използвани срещу щамове на 1/2a серотип, са в състояние да заразят широк спектър от *L. monocytogenes* (50-100 %), специфичен серотипен гостоприемник. *LMB4*, фагите, използвани специално срещу 1/2a *L. monocytogenes*, лизират всички тествани щамове от 1/2a, 1/2b и 1/2с серотипове. Само два фага срещу 3b са анализирани като както *LMF1*, така и *LMF2*, които са литични срещу 3a, 3b, 1/2a, 1/2b и 1/2с серотипове и с много слаб лизис при 4b серотипове.**

За по-нататъшно характеризиране на обхвата на хоста, са използвани 10-те най-литични бактериофаги. Тези фаги са избрани въз основа на резултатите от тестовете на ефективния лизис срещу широк спектър от щамове *L. monocytogenes*. Също така, общо десет щама *L. Monocytogenes* са избрани от различни серотипове, за да се тества тяхната степен на чувствителност към тези специфични бактериофаги. Тези серотипове са 4b (2), 4a (2), 1/2a (4), 1/2b (1) и 1/2с (1). Шест фагови вида, насочени срещу 4b серотипове, са изследвани за ефективно лизиране на 4b, 1/2a 1/2b и 3a щамове със средна до висока ефективност. *LMA4, LMA5, LMA6* и *LMA7* показват малка или никаква степен на лизиране на щам *4a, J1—0131. LMB3*, фага към 1/2a

гостоприемниковите бактерии, е по-ефективен от *LME3* фага. *LMD3* и *LMD4*, специфичните за 1/2b фагови видове са най-инвазивни и ефективни за голямо разнообразие от *L. Monocytogenes*. Като цяло, резултатите от това обстойно проучване показват характеристиките на инвазивност срещу тези патогенни бактерии на избраните бактериофаги, със способност за инвазиране на над 90 % от изпитваните щамове. Това проучване доказва чрез изолирането и характеризирането на литични, широкоспектърни бактериофаги, че **фаговата терапия би могло да бъде използвана като мощен антибактериален инструмент срещу важен в икономическо и здравно отношение патоген като *L. monocytogenes***. Тези резултати са първоначална стъпка за разработване на антибактериален препарат чрез използване на суспензии от бактериофаги с широк спектър за контрол на *L. monocytogenes* в храните и производствената среда, както и при обработката на храните. Предполага се, че изолирането на *Listeria* специфични фагови частици от различни среди и местообитания може да доведе до изолиране на генетично разнообразни фаги (*Kim et al., 2008*). Докладваните по-рано *Listeria* специфични бактериофаги- *P100* и *A511*, са изолирани от отпадъчни води например (*Carlton et al., 2005*) - 37 фагови вида са изолирани срещу *L. monocytogenes* от този източник.

Интересното в това проучване е, че щамове на 4b серотипове са доказани като най-чувствителни, последвани от 1/2a след това 1/2b срещу фаговата терапия. 3b щамовете също са чувствителни, но значителна част от тези щамове са и резистентни. Свързаната със серотипа резистентност е описана от *Kim et al., 2008*. В друго проучване, щамове на 3с серотип *L. Monocytogenes* са доказани като напълно резистентни на фаговата терапия (*Kim et al., 2008*).

Въпреки успешните резултати, трябва да се отбележи, че **чувствителността на серотиповете към фаговата терапия може да се различава поради неспецифичните свързващи рецептори на клетъчната стена или други резистентни механизми** като дефектна адсорбция, невъзприемчивост, ограничителни/модифициращи системи, инхибиране на фаговата ДНК и др. (*Duckworth et al., 1981; Walker and Klaenhammer, 2003*). Също така, фагите могат да съдържат протеини, които помагат за разпознаване на рецепторите на бактериалната клетъчна стена (*Guttman et al., 2005; Singh et al., 2010*).

Важно при такива експериментални проучвания с бактериофаги е да се проследи и изследват характеристиките на гостоприемниковите видове бактерии преди прилагане на фаговата терапия, тъй като понякога фагите са не само специфични спрямо даден серотип, но и щам специфични. (*Denou et al., 2009*). За да се преодолее това ограничение, както и устойчивостта на щама, LP1 суспензията обхваща литичната ефективност срещу множество серотипове на *L. monocytogenes*.

Условията при провеждане на фаговата терапия и оптимизирането на условията за провеждане на лизис от LP1 на *L. monocytogenes* като **време, температура и доза са от решаващо значение за ефективността на терапията**. Проучванията с бактериофагова суспензия LMP-102 показват, че фагите са най-вече ефективни при рН 7-8 и са постигнали повече от 2 log (CFU/mL) спрямо щам *L. Monocytogenes* LCDC 81-

861 след 2 часа инкубация при 30 °C в течна среда (*Leverentz et al., 2003*). Това проучване е един от малкото доклади, които са тествали комбинация от фагови видове срещу *Listeria*, но данните включват отчетени резултати само след 2 часа, а не при дълга експозиция.

Както бе отбелязано по-рано, употребата на коктейл от фаги не може да бъде успешна, ако бактериалните щамове развият резистентност срещу специфичната фагова терапия. Появата на **бактериална резистентност може да бъде овладяна главно чрез използване на смес от фаги с широк обхват на гостоприемника** (*Guenther et al., 2009*). Ефективността на LP1 като антибактериална активност обаче е силно зависима от дозата.

В заключение, *L. monocytogenes* е сериозен хранителен патоген, който поражда загриженост за общественото здраве. С наличните понастоящем методи за контрол на контаминацията и разпространението на патогените, **литичните фаги** могат да се използват като **много полезен инструмент за контролиране на широк спектър от патогенни бактерии**.

В дисертационен труд на тема: „*Dynamics of phage resistance in Listeria monocytogenes treated with individual and combined phages*“ на *Leticia Alejandra Orellana Galindo* е изследвана употребата на бактериофаги в борбата с листериозата и *Listeria monocytogenes*, изолати от храни и хранителната промишленост. Едно от основните критични точки, засегнати в това проучване е резистентността на бактериите на фаговата терапия. Използвани са щамове *Listeria monocytogenes 10403S* и бактериофаги **LP-048** и **LP-125**. Резултатите показват, че фактори като *quorum sensing* могат да повлияят способността за проникване на бактериофагите през клетъчната стена. Всички резултати показват еднакъв брой CFU/ml преживели клетки след терапия с бактериофаги, като процентът на чувствителни и резистентни клетки не се променя по време на етапа на повторна терапия с **LP-125** и терапия със смесени двата бактериофагови видове. За разлика от това, **LP-048** има възможен обратим ефект върху резистентните мутантни бактериални клетки.

Резултатите показват развитие на резистентност на *Listeria monocytogenes 10403S* към фаговата терапия след 21-ви и 27-ми час, за **LP-048**, **LP-125** и терапия със смесена фагова суспензия. Смесената суспензия не е имала никакво предимство при намаляване на времето за развитие на резистентност. Устойчивостта на патогенните бактерии към единия фаг може да се придаде и за другия фаг. Обратимост на резистентността към **LP-048** може да възникне по време на повторна терапия с фаги. Броят на оцелелите бактериални клетки след фаговата терапия и след повторно инвазиране при същите условия няма статистическа разлика.

Необходими са повече изследвания, за да се разбере бактериалния геном, мутациите, отговорни за резистентността към фагите и други съпътстващи фактори, свързани с ефективността на фаговата терапия.

В литературен преглед на тема: „*Bacteriophages and Their Role in Food Safety*“ на авторски колектив: *Sanna M. Sillankorva, Hugo Oliveira, Joana Azeredo*, е изследван *Listeria monocytogenes* в няколко хранителни матрици и условия на съхранение (напр.

високи нива на сол, ниско рН, липса на кислород и ниски температури). Инвазивната *L. monocytogenes* причинява листериоза и се предава на хора с 10^3 CFU/ml нива. Често се свързва със контаминирани минимално преработени храни като продукти, готови за консумация (RTE), птичи и млечни продукти или хранителни взривове, свързани с кръстосано замърсяване след процеса на топлинна обработка на храни, съхранявани при ниски температури. Въпреки ниската си честота, която се изчислява на порядъка на 2 от 10 докладвани случая на милион годишно в Европа, нейната патогенност причинява висока смъртност от приблизително 255 смъртни случая всяка година само в САЩ според Центровете за контрол на заболяванията и превенция (CDC).

Първите две проучвания в този литературен преглед са проведени с използване на комбинация от фаги и низин, широкоспектърен антибактериален пептид, използван по време на производството за удължаване на срока на годност чрез потискане на растежа на Грам-положителни патогенни бактерии. При говеждото месо комбинацията фаг-низин се оказва не съвсем ефективна. Биологичният контрол на фагите трябва да бъде оптимизиран отделно за всяка изследвана хранителна матрица.

Четири други проучвания са използвали фаг **P100**, който е бил **много ефективен за инхибиране на растежа на *Listeria* при температури на съхранение в продължение на няколко дни.**

В статия на *Soni u Nannapaneni (2010)* е изследвана ефикасността на фагите срещу образуването на биофилми на *Listeria monocytogenes*. Тези автори оценяват способността на *P100* срещу 21 *L. monocytogenes* щамове, принадлежащи към 13 серотипа и установяват, че ***P100* намалява с 3,5 до 5,4log/cm² жизнеспособните клетки, присъстващи върху контактни повърхности в производствените съоръжения.**

Независими от това, проучвания, проведени върху различни експериментално замърсени меса, пресни продукти и преработени храни, показват, че **биоконтролът се влияе от времето за контакт с фагите и дозата на фаговата терапия, независимо от температурата.** Резултатите, проведени върху RTE храни и меса с използване на фагов препарат ***LMP-102*** (шестфагов коктейл), са довели до комерсиализирането на фагов продукт ***ListShield*** от ***Intralytix*** (<http://www.intralytix.com/index.php?page=prod&id=1>).

Също така, продуктът на базата на фагови частици ***LISTEX P100*** (от *EBI Food Safety*) е със статус **GRAS** (общопризнат като безопасен), и е използван официално на пазара и в промишлеността за предотвратяване замърсяването с *Listeria* на хранителни продукти и съоръжения за преработка на храни. Повече за този и други продукти на базата на бактериофаги би могло да бъде намерено на следният линк: <https://phageguard.com/tag/listex-p100/>.

Появата на устойчиви на антибиотици зоонотични патогени в хранителната верига е нарастващ проблем за общественото здраве по целия свят. Липсата на нови антибиотици, пускани на пазара, налага разработването на **алтернативни стратегии за справяне с тези бактерии.** Бактериофагите са използвани във ветеринарни приложения скоро след откриването им преди повече от век. Докато в предишни

проучвания и разработки по темата ефикасността на фаговата терапия варира в зависимост от бактериалната цел и сложността на инфекцията, най-новите проучвания при продуктивни животни доказват, че **тези патогени могат да бъдат значително намалени с помощта на фагова терапия**. Това може да има благоприятен ефект както върху здравето на животните, така и върху човешкото здраве, и в някои случаи може да доведе до по-голяма производителност на промишлеността и по-безопасна и качествена храна. Големите производствени системи, в птицевъдството например, са по-податливи на фаговата терапия, тъй като една компания може да контролира всички аспекти на производството на месо преди звеното за продажба на дребно. Потенциално, това позволява гъвкавост при употребата и внедряването на фаговата терапия – като начин на приложение, честота, тип и форма на фаговия продукт, предназначение и въвеждане на бактериофагите в различните етапи и стъпки от целия агрохранителен процес „От полето до вилницата“.

В ЕС обаче няма регулаторна рамка, която да обезпечи производствата с масова употреба на фагова терапия и препарати на основата на бактериофаги. Бактериофагите не се вписват лесно в съществуващите разпоредби и законодателство на ЕС по отношение на използването на добавки в храните или спомагателни средства за преработка на храни, което представлява значителна пречка.

Появата на бактериални патогени, резистентни на фаги е заплаха, аналогична на развитието на антибиотичната резистентност. Въпреки това, устойчивостта към едни фаги не води непременно до резистентност към другите и изглежда, че има шанс тази пречка пред фаговата терапия да бъде избегната, което може да включва суспензии от група фагови видове, насочени към няколко различни рецептора по клетъчната бактериална стена, като по този начин се свежда до минимум вероятността за възникване на резистентност. В този контекст патогените като *Staphylococcus aureus*, могат да бъдат по-лесни цели за фаговата терапия, отколкото генетично разнообразни гостоприемници като *E. coli*.

Като се имат предвид предизвикателствата от нарастващото население и високите нужди от храна и месо на популацията през следващия век, ще бъдат необходими **работещи и ефективни алтернативи на антибиотиците** за борба с болестите при животни и хора и по-доброто обезпечаване от към биосигурност и биобезопасност и по-високите стандарти за добри хигиенни практики на интензивните производствени системи.

Съгласно статия на тема: „*Phage Therapy in the Year 2035*“ на *Jean-Paul Pirnay*, публикувана в *NCBI* и *ResearchGate*, появата на мултилекарствена резистентност при бактериите е призната за основна заплаха за общественото здраве. **Фаговата терапия** все повече се изследва и прилага като **допълнителен инструмент за борба с устойчивите на антибиотици инфекции**. Този документ се застъпва за промяна на парадигмата в развитието и прилагането на персонализирана фагова терапия, която може да бъде реализирана до 2035 година. Предвижда се, тази терапия от 2035г. освен **препарат с бактериофаги** да включва и **технологии като изкуствен интелект**

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136
<http://corhv.government.bg>, corhv@mzh.government.bg
тел. 02/4273056



(Artificial Intelligence (AI)) и технологии като *Distributed Ledger (DL) Technology* и **3D** **принтиране**.

През 1919 г. d'Hérelle използва за първи път терапевтичния потенциал на фагите, когато ги използва, за да излекува момче, страдащо от дизентерия в Париж. Фаговата терапия тогава е призната като терапевтичен подход за лечение на бактериални инфекции и комерсиализацията и е предприета от няколко компании, като *L'Oreal* в Европа и *Eli Lilly Company* в Съединените щати (*Sulakvelidze et al., 2001*). През 1923 г. грузинският микробиолог *Giorgi Eliava* основава *Eliava Institute, Tbilisi, Georgia*, посветен на изследванията на фаговата терапия. Това е и началото на обширни фагови-терапевтични изследвания и развитие в бившия Съветски съюз. Въпреки това, ранните приложения на фаговата терапия често са били ненадеждни и изследванията и създаването на антибиотиците както и създаването на нови такива продължават усилено. Успешното използване на пеницилин по време на Втората световна война и последвалия му световен маркетинг кара западните учени да загубят интерес към фаговата терапия. Руските изследователи, за разлика от други, продължават да развиват фаговата терапия и да публикуват резултатите си, но поради различни обстоятелства техните знания и опит не се разпространяват по целия свят (*Sulakvelidze et al., 2001*). В зората на третото хилядолетие нарастващата тежест на инфекциите с устойчиви на антибиотици бактерии (*Cassini et al., 2019*) събужда нов световен интерес към фаговата терапия като ефективно допълнително средство за клинично лечение на бактериални инфекции (*Thiel, 2004*). По целия свят се създават центрове за фагова терапия, следвайки стъпките на *Eliava Institute* и института Хирцфелд във Вроцлав, Полша за фагова терапия (*Miedzybrodzki et al., 2012*).

Според много проучвания и статистически и прогнозни анализи през 2035 г. се предвижда пренаселеност, големи катаклизми в екосистемата, глобално затопляне и климатични промени.

В действие като рутинен метод ще влезнат метагеномният анализ и биоинформатиката, в един по-съвременен автоматизиран и бърз диагностичен подход, като бъдат включени роботизирани системи и системи на основата на изкуствен интелект. Метагеномният анализ се предвижда да включва секвентен анализ на всички генетични елементи в пробата, включително и геномът на патогенните бактерии, геномът на вируси и плазмиди в пробата и друг генетичен материал едновременно. След това тези генетични данни ще бъдат изпращани на защитен сървър „*Phage XChange*“, където комплексен алгоритъм, управляван от изкуствения интелект, проектира геномната последователност на синтетичен бактериофаг, който с най-висока ефективност би могъл да лизира инфекциозните бактерии, идентифицирани посредством метагеномния анализ и който би трябвало да предизвика най-слабата имунна реакция при пациента. Данните за фаговия геном ще бъдат подавани на бъдещо устройство *Phage-BEAM*, което първо синтезира фаговия геном и след това целите фагови частици, използвайки собствена система за синтез на бактериофаги.

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136
<http://corhv.government.bg>, corhv@mzh.government.bg
тел. 02/4273056



След това тези синтетични фаги ще бъдат смесвани с изолираните патогенни бактерии и ще се пристъпва към модул за валидиране, за да се тества тяхната ефикасност *in vitro*. В рамките на 1 час след вземане на пробата устройството ще произведе готов за употреба и валидиран терапевтичен фагов продукт. Резултатите от стандартната оперативна процедура, стъпка по стъпка, ще бъдат предавани на интерактивен екран или като холограма на учените. След като бъде идентифициран патогенният причинител и геномът му бъде секвениран, ако той е от глобална заплаха и от значение за здравето и благосъстоянието на хора, животни и околна среда, системата ще изпрати предупреждение и доклад до Световния център за контрол и превенция на заболяванията в рамките на час (предвижда се това да е възможно 2033г.). Целта на синтезираните бактериофаги ще бъде до 24 часа да постигат подобряване на състоянието на пациента и до 7 дни пълно възстановяване и оздравяване.

Фагите проявяват редица свойства, които се различават от антибиотиците. Първо, те са склонни да бъдат специфични за определени бактерии. Те в най-добрия случай ще бъдат насочени към значителна част от един единствен бактериален вид, но в най-лошия случай те ще инвазират само малък брой щамове в рамките на един вид. По този начин терапевтичните фаги могат да бъдат избрани да убият главно един бактериален вид или клинично значима подгрупа от тях, и да се пощади коменсалната чревна флора. Недостатъкът на фаговата специфичност е, че патогенните бактерии трябва да бъдат охарактеризирани и идентифицирани преди започване на фаговата терапия. В емпиричната антибиотична терапия, обикновено се използват за разлика от фаговата терапия, широкоспектрни антибиотични „коктейли“, които засягат множество Грам-положителни и Грам-отрицателни бактерии, както и различни гъби. Второ, бактериите и фагите са въввлечени в приемно-паразитна връзка. Строго литичните фаги са повсеместно в околната среда и изискват смъртта на бактериалния си приемник, за да завършат жизнения си цикъл. Без гостоприемниците не могат да съществуват. Фагите налагат избор за устойчиви гостоприемници, които от своя страна налагат избор за ефективни фаги. Това води до това, което се нарича „антагонистична коеволуция“, надпревара във въоръжаването между бактерии и фаги, характеризираща се с реципрочна еволюция на бактериалната резистентност и фаговата инфекциозност (Buckling and Rainey, 2002). Точно както при повечето антимикробни вещества, бактериите също ще станат резистентни към бактериофагите (Лурия и Делбрук, 1943 г.; Schooley et al., 2017), но за разлика от статичните антибиотици, фагите имат способността да преодолеят бактериалната резистентност (Buckling and Rainey, 2002). Въпреки това има индикации, че бактериите и фагите няма да увеличат за неопределен срок съответната им резистентност и инфекциозност (Fortuna et al., 2019).

По време на възобновяването на интереса и проучванията в областта на фаговата терапия в началото на 2000-та година са разработени два различни подхода за фагова терапия (Pirnay et al., 2011). При единия подход, са приложени дефинирани широкоспектрни суспензии от бактериофаги, чиято цел е по-широк спектър от бактериални видове, за които се подозира, че причиняват определени инфекциозни заболявания.

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136
<http://corhv.government.bg>, corhv@mzh.government.bg
тел. 02/4273056



В персонализираните фагови терапевтични концепции (втория подход), един или повече фагови видове са избрани от банка за бактериофаги и след това адаптирани *in vitro* и получавайки се фагови мутанти, проявяващи повишена инвазивност спрямо бактериите, изолирани от мястото на инфекцията на пациента (*Frimanet et al., 2016*). Някои научни центрове, занимаващи се с фагова терапия поддържат банки от бактериофаги, които редовно се обновяват с нови изолати, разширявайки и адаптиращи обхвата на банката към постоянно променящите се бактериални популации. Персонализираната фагова терапия води до по-малко селективно налягане към бактериалната фагова резистентност. Въпреки това, тези фагови терапии са доста по-сложни и все още не достатъчно достъпни.

С началото на третото хилядолетие, **синтетичната биология** се развива все по-често, за да се намали специфичността на фагите и да се намали бактериалната резистентност (напр. структуриран дизайн) (*Pires et al., 2016; Dunne et al., 2019*). Разработени са стратегии за създаване на хибридни фаги с по-предвидим и разширен обхват на гостоприемниците (*Ando et al., 2015 г.; Yosef et al., 2017*) и стратегии за генно инженерство (напр. инструменти за редактиране на *CRISPR-Cas*), за да се разгледат и други аспекти като негативни взаимодействия (напр. анти фагов имунен отговор) (*Brown et al., 2017*), потенциалното възникване и разпространение на механизмите за резистентност към бактериофагите и освобождаване на вредни бактериални метаболити като ендотоксини (*Hwang et al., 2018*). Все повече научни общности и екипи от учени постепенно започват да работят върху прецизността и подходите за персонализираната фагова терапия, използвайки естествени фаги (*Pirnay et al., 2018*), фаги, резултат от генното инженерство (*Dedrick et al., 2019*) и синтетични фаги.

Повече информация за персонализирането на фагите и определянето на техните бактериални гостоприемници би могло да бъде намерено в статията „*HostPhinder: A Phage Host Prediction Tool*“ на *Julia Villarroel, Kortine Annina Kleinheinz, Vanessa Isabell Jurtz, Henrike Zschach, Ole Lund, Morten Nielsen and Mette Voldby Larsen*.

В обстойно проучване на *Martorell-Marugan et al., 2019*, е използван *Machine Learning*, като е програмирано да бъдат търсени взаимовръзки между бактериалните и фаговите геноми с цел по-лесно последващо разработване на специфични бактериофагови препарати. Повече за това експериментално проучване може да се намери на следният линк: https://www.researchgate.net/publication/336971831_Deep_Learning_in_Omics_Data_Analysis_and_Precision_Medicine/link/5dc050c9299bf1a47b13341a/download

Това проучване сочи, че за да бъдат създадени високо ефективни фагови продукти за терапия, трябва да бъде включена и синтетичната биология и да бъдат преодолени доста пречки преди това, за да се разработят безклетъчно синтезирани генерични системи, способни да произвеждат фаги във високи титри и да проявяват същите нива на бактериална инвазивност като естествените им аналози. Основният проблем е, че се оказва много трудно да се съберат огромните количества данни за фагите и бактериалните геномни последователности, които са необходими за прецизното „обучение“ на алгоритмите за изкуствен интелект, за да може да се

прогнозирант и/или проектирант фагови последователности с терапевтично приемливо ниво на точност.

Модулът AI от XChange от 2035г. е предвидено да анализира фагите и бактериалните геноми, за да предскаже и проектира мощни фагови препарати. Той също така се предвижда да прогнозира кои бактериални патогени се нуждаят от най-неотложно внимание, въз основа на информация, предоставена от международни здравни организации, като Световната здравна организация (СЗО) и националните центрове за контрол и превенция на заболяванията. DL модулът на платформата ще осигурява достатъчен и качествен поток на входните данни на фаговите и бактериалните геномни секвенции към модула AI и доставяне на фаговите геномни синтетични последователности под формата на готов фагов продукт на пациентите. Алгоритъмът се предвижда до 2035г. да прави бърза оценка на рисковете, да определя несигурността като параметър, да прогнозира тежестта на заболяването и съответно вирулентността на патогена, обхвата на гостоприемниците и ефективността на бактериофагите, както и неотложността на лечението.

След години официално споразумение между Phage XChange и СЗО ще повиши международното доверие в дългосрочната устойчивост на платформата и защитата от неетична търговска експлоатация. Търсенето на мощни терапевтични фагови препарати скоро ще се превърне в общностно усилие, насочено към решаването на кризата с антибиотичната резистентност. Този възглед за бъдещето на фаговата терапия дава оптимистичен край на кризата с антибиотичната резистентност. *Ad hoc* и на място производството на синтетични фаги, свързани с глобална, общностно-базирана система за управление, предвещава да бъде достъпно и ефективно решение и допълнително оръжие в борбата срещу устойчиви на антибиотици бактериални инфекции. Въпреки идеалистичните представи за бъдещето и 2035г., фаговата терапия не е „магически куршум“ и има още дълъг път на разработки, обмяна на опит и знания и много изпитвания, за да може да се превърне от синергична добавка към установените антимикробни средства в самостоятелна ефективна и безопасна терапия срещу патогенните бактерии.

Независимо от естествения произход на бактериофагите и многобройността им в различни източници, синтетичните фаги биха имали някои предимства естествено изолираните фаги:

- Не е необходимо да се прави индивидуална за един пациент фагова терапия, която би струвала скъпо и би отнемала огромно количество време и ресурс, а би могло да бъдат продуцирани синтетични фагови частици, включени във фармацевтичен продукт с по-широко приложение и по-висока ефективност.
- Бактерии, представляващи сериозна заплаха за общественото здраве, като например *E. coli O104:H4* (Merabishvili et al., 2012), или бактерии, които биха могли да бъдат използвани за биотероризъм (Jonczyk-Matysiak et al., 2014), би могло да бъдат атакувани и обезвредени от синтетични програмирани бактериофаги, които могат да бъдат своевременно произведени на място.

- Би могло в бъдеще да се синтезират бактериофаги срещу бактерии, причиняващи потенциално смъртоносни заболявания, за които не са налични терапии.
- Когато бактериалните патогени са резистентни към конкретни бактериофаги, би могло да се създадат ефективни синтетични бактериофаги с резултати от геномен секвентен анализ. (Reyes et al., 2010; Amgarten et al., 2018).
- Синтетичните фагови препарати не се предвижда да съдържат молекули, които биха могли да имат отрицателно въздействие върху пациентите (напр. ендотоксини).
- Устройствата за синтез на бактериофаги се предвижда да могат да работят при всякакви условия и с максимална бързина, прецизност и ефективност на готовия продукт.

Има малък шанс тези теории и предвиждания за 2035г. да се сбъднат, вероятно част от технологиите като *omics* технологиите и метагеномния анализ биха претърпели сериозно развитие и внедряване в практиката, но това зависи и от подкрепата и одобрението на световни организации като *OIE, FAO, WHO, CDC* и от огромните усилия и експерименталните проучвания на хиляди екипи от учени по света. Някои части от предложената система за 2035г., като например безплатното производство на синтетични фаги, имат разумен шанс да бъдат реализирани, докато други елементи, като корпоративното спонсорство, вероятно ще останат ограничени до сферата на научната фантастика.

В заключение, и с оглед на нарастващия брой документирани проучвания и разработки, **фаговата терапия изглежда обещаваща алтернатива при лечението на някои бактериални инфекции**, мултирезистентни или не. Поради липсата на достатъчно данни от проведени клинични изпитвания, фагите в хуманната медицина понастоящем се използват само в комплицирани случаи на пациенти, за които не съществува друга алтернативна терапия и винаги са придружени от антибиотично лечение. Възможностите за приложение обаче са обещаващи и многобройни и е напълно възможно **след време фаговите препарати да заместят напълно антибиотичното лечение**. Потенциалните приложения на бактериофагите надхвърлят значително приложението им само в човешкото здраве, като са приложими и за биоконтрол, основно при здравето на животните и околната среда (Mahony et al., 2011; Chan and Abedon, 2015; Buttmer et al., 2017; Fernandez et al., 2018).

При **фаговата терапия** все пак съществуват и **някои пречки** и потенциални проблеми. Един от тях е свързан с дългосрочната терапия и масовата употреба на фагови суспензии, още повече, ако употребата им засяга здравето на хората и животните или биоразнообразието. Данните, натрупани през последните 20 години за микробиомите и микробните екосистеми, водят до известна сигурност относно приложенията на тези терапии. На второ място, цената на лечението с фаги вероятно ще бъде много висока. При производството на бактериофагови препарати съществува

риск от незаинтересованост от страна на фармацевтичните производители и липса на финансиране. Поради високата специфичност на бактериофагите срещу бактериалния патоген, разходите по научноизследователската и развойна дейност и създаването и пускането за масова употреба на подобни фармацевтични продукти, би могло да не оправдае средствата, които са вложени и очакваният за ефективност на такава терапия. Поради високата цена на подобен продукт, достъпът до фаговата терапия ще бъде много ограничен, докогато проблемите с АМР продължават да се разрастват и да представляват сериозна заплаха за човешкото и животинското здраве.

Gradmann, 2017 обобщава един много важен принцип, който често не е взиман предвид при разработването и създаването на нови фармацевтични продукти и антибиотични средства срещу патогенните бактерии и той е: „В историята на антибиотичното лечение това, което не е било взето предвид в достатъчна степен, въпреки ранните предупреждения от учени и лекари, са страхотните адаптивни способности на бактериите и на живите организми като цяло. Това, което е отречено, е способността на живите микроорганизми да действат и реагират. **Фагите**, чрез дългата си коеволюционна история с бактериите, са **ценен ресурс**.“ Затова не бива да се negliжира фаговата терапия, въпреки пречките и проблемите, свързани с разработването и налагането и за масова употреба, а трябва да се заложи на допълнителни проучвания, трупане на знания, нови методики като метагеномен секвентен и биоинформатичен анализ, с цел да се проучат по-добре механизмите на действие на бактериофагите, да се разширят гостоприемниците (бактериалните патогени), да се разработят синергични фармацевтични продукти (дори и в комбинации на фаги с антибиотици или фаги с други химиотерапевтици), да се направят клинични проучвания с всички тези фагови препарати, за да може тази фагова терапия постепенно да измести антибиотичното лечение и да послужи като алтернатива за справяне с наболелия проблем антимикробна резистентност, съобразно подхода „Едно здраве“.

Изготвил:

Красимира Захаријева,

Главен експерт в дирекция ОРХВ, ЦОРХВ

Използвана литература:

- Bacteriophages and their applications - Thung, T.Y., Lee, E., Premarathne, J.M.K.J.K., Nurzafirah, M., Kuan, C.H., Elexson, N., Tan, C.W., Malcolm, T.T.H., New, C.Y., Ramzi, O.S.B., Nuzul, N.J., Noor Azira, A.M., Ungku Fatimah, U.Z.A. and Son, R
- ListShield - <http://www.intralytix.com/files/prod/01LP/01LP-Desc.pdf>
- Phage Therapy in the Year 2035 - Jean-Paul Pirnay - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7284012/>
- Fate of Listeria on various food contact and noncontact surfaces when treated with bacteriophage - Robert G. Reinhard, Robin M. Kalinowski, Peter W. Bodnaruk, Joseph D. Eifert, Renee R. Boyer, Susan E. Duncan, R. Hartford Bailey

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136
<http://corhv.government.bg>, corhv@mzh.government.bg
тел. 02/4273056



- Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis - Zhabiz Golkar, Omar Bagasra, Donald Gene Pace
- Bacteriophages and Their Role in Food Safety Sanna M. Sillankorva, Hugo Oliveira, Joana Azeredo
- BACTERIOPHAGES *Biology and Applications* - Elizabeth Kutter Alexander Sulakvelidze
- Dynamics of phage resistance in *Listeria monocytogenes* treated with individual and combined phages - Leticia Alejandra Orellana Galindo
- Selection and Characterization of Phage-Resistant Mutant Strains of *Listeria monocytogenes* Reveal Host Genes Linked to Phage Adsorption - Thomas Denes, Henk C. den Bakker, Jeffrey I. Tokman, Claudia Guldemann, Martin Wiedmann
- Virulent Bacteriophage for Efficient Biocontrol of *Listeria monocytogenes* in Ready-To-Eat Foods - Susanne Guenther, Dominique Huwyler, Simon Richard, and Martin J. Loessner
- Computational Biology - HOLGER HUSI, DR SC NAT
- Cross-resistance to Phage Infection in *Listeria monocytogenes* Serotype 1/2a Mutants and Preliminary Analysis of their Wall Teichoic Acids - Danielle Marie Trudelle
- Deep Learning in Omics Data - Analysis and Precision Medicine - Jordi Martorell-Marugán, Siham Tabik, Yassir Benhammou, Coral del Val Igor Zwir, Francisco Herrera, Pedro Carmona-Sáez
- Efficacy of phage P100 on *L. monocytogenes* in refrigerated vacuum packaged cooked ham – Frank Devlieghere and Lieve Vermeiren
- Examination of the Use of Bacteriophage as an Additive and Determining Its Best Application Method to Control *Listeria monocytogenes* in a Cooked-Meat Model System - Hanie Ahmadi, Shai Barbut, Loong-Tak Lim and S. Balamurugan
- Assessment of the Prevalence and Drug Susceptibility of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Various Types of Meat - Krzysztof Skowron, Ewa Walecka-Zacharska, Natalia Wiktorczyk-Kapischke, Karolina Jadwiga Skowron, Katarzyna Grudlewska-Buda, Justyna Bauza-Kaszewska, Zuzanna Bernaciak, Miłosz Borkowski and Eugenia Gospodarek-Komkowska
- From farm management to bacteriophage therapy: strategies to reduce antibiotic use in animal agriculture - Laura H. Kahn, Gilles Bergeron, Megan W. Bourassa, Bert De Vegt, Jason Gill, Filomena Gomes, François Malouin, Ken Opengart, G. Donald Ritter, Randall S. Singer, Carina Storrs and Edward Topp
- Isolation and Characterization of *Listeria monocytogenes* Phage vB_LmoH_P61, a Phage With Biocontrol Potential on Different Food Matrices - Edel Stone, Antoine Lhomet, Horst Neve, Irene R. Grant, Katrina Campbell and Olivia McAuliffe
- Evaluation of the safety and efficacy of Listex P100 for reduction of pathogens on different ready-to-eat (RTE) food products - EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ)
- Isolation, characterization and evaluation of virulent bacteriophages against *Listeria monocytogenes* - Mastura Akhtar, Stelios Viazis, Kyle Christensen, Phillip Kraemer, Francisco Diez- Gonzalez
- THE BACTERIOPHAGE IN RELATION TO SALMON-ELLA PULLORAI INFECTION IN THE DOMESTIC FOWL - NORMANJ.PYLE
- <https://phageguard.com/listeria-solution/> , <https://phageguard.com/publications/>
- Effectiveness of Phage-Based Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Food Products and Food Processing Environments - Iwona Kawacka , Agnieszka Olejnik-Schmidt, Marcin Schmidt and Anna Sip
- Bacteriophage applications: where are we now? - A.B. Monk, C.D. Rees, P. Barrow, S. Hagens and D.R. Harper
- Activity of Bacteriophages to Control *Listeria monocytogenes* and *Campylobacter jejuni* Antibiotic Resistant Strains - Aprea G, D'Angelantonio D, Boni A, Scattolini S, Di Sera ino G, Neri D, Sacchini L, Acciari VA, Torresi M, Centorame P, Di Giannatale E, Migliorati G, D'Alterio N, Pomilio

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136
<http://corhv.government.bg>, corhv@mzh.government.bg
 тел. 02/4273056



- Пиофаг эффективный и безопасный препарат для лечения лор-инфекций
- Post-process treatments are effective strategies to reduce *Listeria monocytogenes* on the surface of leafy greens: A pilot study - Pilar Truchado, Anne Elsser-Gravesen, Maria I. Gil, Ana Allende
- Practical application of bacteriophage in food manufacturing facilities for the control of *Listeria* sp. - Robert G. Reinhard, Robin M. Kalinowski, Peter W. Bodnaruk, Joseph D. Eifert, Renee R. Boyer, Susan E. Duncan, R. Hartford Bailey
- Veterinary use of bacteriophage therapy in intensively-reared livestock - Adriano Gigante and Robert J Atterbury
- Distributed Ledger Technology in genomics: a call for Europe - Scott Thiebes, Matthias Schlesner, Benedikt Brors, Ali Sunyaev
- Phage therapy as a potential solution in the fight against AMR: obstacles and possible futures Charlotte Brives, Jessica Pourraz
- Bacteriophage Therapy - Alexander Sulakvelidze, Zephira Alavidze and J. Glenn Morris Jr. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001, 45(3):649. DOI: 10.1128/AAC.45.3.649-659.2001
- HostPhinder: A Phage Host Prediction Tool - Julia Villarroel, Kortine Annina Kleinheinz, Vanessa Isabell Jurtz, Henrike Zschach, Ole Lund, Morten Nielsen and Mette Voldby Larsen

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136
<http://corhv.government.bg>, corhv@mzh.government.bg
 тел. 02/4273056

