საქართველოში გამოყოფილი ანტიბიოტიკორეზისტენტული და ბიოფილმწარმომქმნელი S. *aureus* შტამებზე ბაქტერიოფაგების მოქმედების შესწავლა

დავით ლაზვიაშვილი

სამაგისტრო ნაშრომი წარდგენილია ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტის საბუნებისმეტყველო მეცნიერებებისა და მედიცინის ფაკულტეტზე მოლეკულური ბიომეცნიერებების მაგისტრის აკადემიური ხარისხის მინიჭების მოთხოვნების შესაბამისად

სიცოცხლის შემსწავლელი მეცნიერებები: მოლეკულური ბიომეცნიერებები

სამეცნიერო ხელმძღვანელი: ეკატერინე თევდორაძე, ბმდ,
ასოცირებული პროფესორი
თანახელმძღვანელი: ნატა ბაკურაძე, ბმდ

ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტი
თბილისი, 2024

განაცხადი

”როგორც წარდგენილი ნაშრომის ავტორი, ვაცხადებ, რომ ნაშრომი არ შეიცავს სხვა ავტორების მიერ აქამდე გამოქვეყნებულ, გამოსაქვეყნებლად მიღებულ ან დასაცავად წარდგენილ მასალებს, რომლებიც ნაშრომში არ არის მოხსენიებული ან ციტირებული სათანადო წესების შესაბამისად.”

კვლევა განხორციელდა “შოთა რუსთაველის საქართველოს ეროვნული სამეცნიერო ფონდის მხარდაჭერით [გრანტის ნომერი MR-23-715]” / “This work was supported by Shota Rustaveli National Science Foundation of Georgia (SRNSFG) [Grant number MR-23-715]”

დავით ლაზვიაშვილი, 15.06.2024

აბსტრაქტი

ბოლო წლების განმავლობაში ანტიბიოტიკორეზისტენტული ბაქტერიული ინფექციები მილიონობით ადამიანის სიკვდილის მიზეზი გახდა. ამ მიზეზით გამოწვეული სიკვდილიანობის მეორე ყველაზე გავრცელებულ მიზეზს S. *aureus*-ის ინფექციები წარმოადგენს, რომელთა ყველაზე რთული ფორმები გამოწვეულია მეტიცილინ რეზისტენტული შტამებით. MRSA-ს მკრუნალობას კიდევ უფრო ართულებს აღნიშნული შტამებისთვის დამახასიათებელი რეზისტენტობა სხვადასხვა კლასის ანტიბიოტიკის მიმართ. ოქროსფერი სტაფილოკოკის ინფექციები ხშირად ხასიათდება ბიოფილმის წარმოქმნით, რაც ბაქტერიას დამატებით დაცვას სთავაზობს ანტიბიოტიკების მიმართ და თანამედროვე თერაპიულ საშუალებებს კიდევ უფრო ნაკლებად ეფექტურს ხდის. შესაბამისად, საჭირო და აქტუალურია S. *aureus* - ით გამოწვეულ ინფექციებთან ბრძოლის ალტერნატიული გზის მოძიება, რომელიც არ გამოიწვევს ბაქტერიების გაძლიერებას და ეფექტური იქნება ანტიბიოტიკორეზისტენტული და ბიოფილმწარმომქმნელი შტამებით გამოწვეული ინფექციების მკურნალობაში. საკითხის გადაჭრის ერთ-ერთ გზად ბაქტერიოფაგების გამოყენება მიიჩნევა.

კვლევის მიზანს წარმოადგენს საქართველოში გამოყოფილი S. *aureus* - ის ანტიბიოტიკორეზისტენტულ და ბიოფილმწარმომქმნელ შტამებზე სექვენირებული და ბიოლოგიურად დახასიათებული ფაგის, vB_SaS_GE1-სა და კომერციული სტაფილოკოკური ბაქტერიოფაგური პრეპარატის, SB-1-ის მოქმედების შესწავლა და შედარება.

თბილისის ერთ-ერთი მულტიპროფილური კლინიკიდან მოწოდებული ბაქტერიული იზოლატების S. *aureus* სახეობის დონეზე იდენტიფიკაცია ხდებოდა ბაქტერიულოგიური და ბიოქიმიური მეთოდებით. სულ მოწოდებული 25 იზოლატიდან, S. *aureus*-ის სახეობას მიკუთვნებულ იქნა 20. იზოლატებს შორის MRSA-სა და მულტირეზისტენტული ფორმების იდენტიფიკაციისთვის გამოყენებულ იქნა მგრძნობელობის განსაზღვრა კირბი ბაუერის დისკო-დიფუზიური მეთოდით. მეტიცილინის მიმართ რეზისტენტობა

ფენოტიპურად გამოვლინდა ორი შტამისთვის, რომელიბიც ექვს სხვა მრავლობით რეზისტენტულ იზოლატთან ერთად შემოწმდა mecA გენის არსებობაზე, პჯრ მეთოდით. შედეგად გენის დეტექცია მოხდა ორ იზოლატში, რომლებიც ამჟღავნებდნენ მეტიცილინის მიმართ მდგრადობას ფენოტიპურადაც, რაც აღნიშნულ შტამებში სტაფილოკოკური კასეტური ქრომოსომის არსებობაზე მიუთითებს.

გამოყენებულ 8 მრავლობით რეზისტენტულ იზოლატს შორის ბიოფილმწარმოქმნელი ბაქტერიების იდენტიფიკაციისთვის განხორციელდა icaA გენის დეტექცია პჯრ-ს გამოყენებით, რომელზეც ყველა მათგანმა არჩვენა უარყოფითი შედეგი. ბიოფილმწარმომქმნელი შტამების იდენტიფიკაციისთვის, ასევე, გამოყენებულ იქნა ფენოტიპური ანალიზი პოლისტიროლის 96 ფოსოიან პლანშეტზე. ჩვენს ხელთ არსებული S. *aureus*-ის 20 იზოლატიდან ფენოტიპურად ბიოფილმის წარმოქმნის უნარი გამოავლინა შვიდმა, რომელთა შორის ორი პჯრ ანალიზით აჩვენებდა უარყოფით შედეგს. ბიოფილმწარმომქმნელ იზოლატებს შორის 1 ასევე წარმოადგენს MRSA-ს.

ფაგების მოქმედების სპექტრისა და ეფექტურობის შესწავლის მიზნით გამოყენებული იქნა შტრიხების მეთოდი, რომლის მიხედვითაც vB_SaS_GE1-ის მიმართ მგრძნობელობას ავლენდა 18, ხოლო SB-1-ის მიმართ 15 იზოლატი.

შტრიხების მეთოდით vB_SaS_GE1-ის მიმართ 10 ყველაზე მგრძნობიარე იზოლატი შერჩეულ იქნა ფაგის დათესვის ეფექტურობის შესწავლისთვის (EOP). შედეგად, ბაქტერიოფაგის მასპინძელ შტამთან შედარებით ექვსი იზოლატი ხასიათდებოდა მაღალი, ხოლო ორი საშუალო ეფექტურობით.

ბიოფილმ-წარმომქნელ იზოლატებზე ფაგების მოქმედების შესწავლისას ნანახი იქნა რომ, ორივე ფაგი (vB_SaS_GE1 და SB-1) მაღალი კონცენტრაციით გამოყენებისას, წარმატებით ახდენდა შვიდიდან ექვსი იზოლატის მიერ წარმოქმნილი ბიოფილმის დეგრადაციას.

ჩვენს ხელთ არსებულ შედეგებზე დაყრდნობით შეიძლება ითქვას რომ ორივე ფაგი ხასიათდება თითქმის იდენტური მოქმედების სპექტრითა და ხარისხით S. *aureus* იზოლატებზე. MRSA ფორმებზე მათი ეფექტურობის შესახებ დასკვნის გაკეთება არ არის შესაძლებელი მონაცემების სიმწირის გამო. გარდა ამისა, როგორც vB_SaS_GE1, ისე SB-1

ფაგი მაღალი ეფექტურობით გამოირჩევიან S. *aureus* ბიოფილმწარმომქმნელი იზოლატების მიმართ.

ძირითადი საძიებო სიტყვები: ოქროსფერი სტაფილოკოკი, ბაქტერიოფაგი, ბიოფილმი, MRSA, icaA, mecA, SB-1, vB_SaS_GE1, ანტიბიოტიკორეზისტენტობა.

Abstract

Antibiotic-resistant bacterial infections have killed millions of people in recent years. Among them, the second most common cause of death is *S. aureus* infections, the most complicated forms of which are caused by methicillin-resistant strains. The virulence of MRSA is further complicated by the resistance of these strains to different classes of antibiotics. *Staphylococcus aureus* infections are often characterized by biofilm formation, which offers the bacteria additional protection against antibiotics and makes current therapeutics even less effective. Therefore, it is necessary and urgent to find an alternative way to fight infections caused by *S. aureus*, which will not lead to the strengthening of bacteria and will be effective in treating infections caused by antibiotic-resistant and biofilm-forming strains. The use of bacteriophages is considered one of the ways to solve the problem.

The research aimed to study and compare the action of the sequenced and biologically characterized phages, vB_SaS_GE1, and the commercially available staphylococcal bacteriophage, SB-1, on antibiotic-resistant and biofilm-forming isolates of *S. aureus*.

species were identified by bacteriological and biochemical testing of the isolates provided by one of the multi-profile clinics of Tbilisi. Out of 25 isolates provided, 20 were assigned to *S. aureus* species. Kirby Bauer disc-diffusion sensitivity test was used to identify MRSA and multi-resistant forms among the isolates. Out of 8 multiresistant isolates, two MRSAs were identified using disc-diffusion and PCR methods. To identify biofilm-forming bacteria among the 8 isolates mentioned above, they were tested for the presence of the icaA gene using PCR, and all of them showed negative results. All isolates at our disposal were screened using phenotypic method on 96-well polystyrene plates to identify biofilm-forming bacteria. Out of the 20 isolates of *S. aureus*, seven were found to be capable of biofilm formation, among which two showed negative results on PCR analysis. Among the biofilm-forming isolates, 1 is also MRSA.

To study the spectrum and effectiveness of phages, the streak method was used, according to which 18 isolates showed sensitivity to vB_SaS_GE1, and 15 isolates showed sensitivity to SB-1.

The 10 most sensitive isolates to vB_SaS_GE1 were selected for phage efficiency of plating (EOP) studies. Phage was characterized by high efficiency on six isolates, and average efficiency on two isolates.

When studying the impact of phages on biofilm-forming isolates, it was observed that both phages, when applied at high concentrations, effectively degraded biofilms formed by six out of seven isolates..

Based on the results available to us, it can be said that both phages are characterized by an almost identical spectrum and quality of activity on *S. aureus* isolates, but due to the paucity of data, it is not possible to conclude the efficacy of phages against MRSA forms. Besides, both vB_SaS_GE1 and SB-1 phage are effective against *S. aureus* biofilm-forming isolates.

Key Words: S. *aureus*, Bacteriophages, Biofilm, MRSA, icaA, mecA, SB-1, vB_SaS_GE1, Antibioticresistance.