

ანტიბიოტიკორეზისტენტული *Acinetobacter baumannii*-ის სპეციფიკური
ბაქტერიოფაგების დახასიათება სამკურნალო-პროფილაქტიკური
პრეპარატის შექმნის მიზნით

ია კუსრაძე

სადისერტაციო ნაშრომი წარდგენილია ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტის
მეცნიერებისა და ხელოვნების ფაკულტეტზე სიცოცხლის შემსწავლელ მეცნიერებათა
დოქტორის აკადემიური ხარისხის მინიჭების მოთხოვნის შესაბამისად

ბიოქიმია და ნეირობიოლოგია

სამეცნიერო ხელმძღვანელი: აივენგო შათირიშვილი, ემერიტუსი
მარინე გოდერძიშვილი, ბმდ

ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტი
თბილისი 2012

განაცხადი

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

ია კუსრაძე

18.12.2012

აბსტრაქტი

გრამუარყოფით *Acinetobacter* spp.-ს საავადმყოფოში ინფექციების ეთიოლოგიაში წამყვანი ადგილი უკავია. ამ გვარის წარმომადგენელ ბაქტერიულ შტამებს აქვთ უნარი გამოიწვიონ და გაართულონ ისეთი დაავადებები, როგორიცაა სეპტიცემია, პნევმონია, ენდოკარდიტი, მენინგიტი, კანისა და ჭრილობის ინფექციები. კლინიკაში *A.baumannii*-ის პირველი გამოვლენიდან დღემდე მკვეთრად შეიცვალა ამ ბაქტერიების მგრძნობელობა სხვადასხვა ანტიბიოტიკების მიმართ. დღეისათვის უკვე გავრცელებულია *A.baumannii*-ის ისეთი შტამები, რომლებიც რეზისტენტულია თითქმის ყველა ანტიბიოტიკის, მათ შორის იმიპენემის მიმართ, - ანტიბიოტიკისა, რომელიც განიხილება როგორც ერთ-ერთი საუკეთესო და უალტერნატივო საშუალება *Acinetobacter*-ით გამოწვეული ინფექციების სამკურნალოდ. ანტიბიოტიკორეზისტენტული ბაქტერიული შტამების გავრცელებამ განაახლა ინტერესი ფაგოთერაპიის მიმართ. დღეისათვის ფაგებით წარმატებით მკურნალობენ სხვადასხვა ბაქტერიული შტამებით გამოწვეულ ინფექციებს, თუმცა *Acinetobacter* spp-ის სპეციფიკური ფაგების სამკურნალო პრეპარატი ჯერ არ შემუშავებულა, სწორედ ამიტომ ამ ნაშრომის მიზანს წარმოადგენდა *Acinetobacter* spp.-ს სპეციფიკური ფაგების საცდელი სამკურნალო პრეპარატის შექმნა. კვლევის საწყის ეტაპზე მოხდა ბაქტერიული შტამების იდენტიფიცირება-შესწავლა და იმიპენემრეზისტენტულ შტამებში იმ მექანიზმების შესწავლა, რაც განაპირობებდა ამ ანტიბიოტიკის მიმართ რეზისტენტობას. 210 *Acinetobacter* spp. ბაქტერიული შტამის კვლევისათვის გამოყენებული იქნა კვლევის შემდეგი მეთოდები: დისკო-დიფუზური მეთოდი, Etest, პოლიმერაზა ჯაჭვური რეაქცია, პლაზმიდის ტრანსფორმაცია. კვლევის შედეგად დადგინდა, რომ 6 იმიპენემრეზისტენტული *A. baumannii* -ის შტამიდან ხუთში (*A. baumannii* 3, 4, 5, 6, 9) იმიპენემრეზისტენტობა განპირობებული იყო პლაზმიდაში მდებარე OXA-23-like -ის მაკოდირებელი გენით, ხოლო საქართველოში გამოყოფილი *A. baumannii* G7 შტამში კარბაპენემრეზისტენტობა განპირობებული იყო როგორც ქრომოსომულად მდებარე OXA24like-ის გენით, ასევე პლაზმიდაში მდებარე ISAbal და OXA51like კომპლექსით. კვლევის შემდეგ საფეხურს წარმოადგენდა ფაგების გამოყოფა - დახასიათება, რაც ფაგებზე მუშაობის კლასიკური

მეთოდების გამოყენებით განხორციელდა. გამოყოფილია *Acinetobacter*-ს გვარის ბაქტერიული შტამების მიმართ აქტიური ხუთი ფაგი, რომელთაგან 2 მიეკუთვნება *Myoviridae*-ის (*vB_Ab-M-G7* და *vB_Ab-M-40*), 3 კი (*vB_Ab-S-31*, *vB_Ab-S-14*, *vB_Ag-S-7*) -*Siphoviridae*-ის ოჯახს. აქედან მხოლოდ *Myoviridae* ოჯახის წარმომადგენელი ფაგები არიან სეროლოგიურად მსგავსნი. ნაშრომში დახასიათებული 5 *Acinetobacter* spp-ის ფაგის ბიოლოგიური თვისებები, როგორიცაა სწრაფი ადსორბცია პატრონ უჯედზე (7-10წუთი), მოკლე ლატენტური პერიოდი (12-40 წუთი) და მაღალი გამოსავლიანობა (80-200ფაგური ნაწილაკი), ასევე მაღალი სტაბილურობა pH-ის ფართო დიაპაზონში (pH=5-11) და მაღალი ტემპერატურის პირობებში (50°C-მდე), ნათლად მიუთითებს ამ ფაგების მაღალ თერაპიულ პოტენციალზე. *vB_Ab-M-G7* ფაგის გამოყენებით ვირთაგვებზე მოდელირებული *A. baumannii*-ით ინფიცირებული ჭრილობის მკურნალობით კიდევ ერთხელ დადასტურდა ფაგოთერაპიის არატოქსიკურობა და ეფექტურობა, რაც ნათლად გამოიხატა ინფიცირებულ კერაში *A. baumannii*-ის ბაქტერიული შტამების ტიტრის კლებით. კვლევისას დადგინდა, რომ *vB_Ab-M-G7* ფაგი შეიცავს იმიპენემრეზისტენტობის განმსაზღვრელ გენს *bla_{OXA24like}*. ერთი წლის განმავლობაში მიმდინარე ცდების მიუხედავად ტრანსდუქცია არ გამოვლენილა, მიუხედავად ამისა აღნიშნული ფაგი ფაგოთერაპიის მიზნით არ იქნა გამოყენებული. დახასიათებული ფაგების გაერთიანებით მივიღეთ ფაგების „კოქტეილი“, რომელიც შეიძლება განვიხილოთ, როგორც ფაგის საცდელი სამკურნალო პრეპარატი. აღნიშნული „კოქტეილი“ ხასიათდება სხვადასხვა გარემო ფაქტორების მიმართ მაღალი სტაბილურობითა და მოქმედების ფართო დიაპაზონით, რაც ემსახურებოდა კვლევის მიზანს.

ძირითადი საძიებო სიტყვები: *Acinetobacter* spp., კარბაპენემაზა, ბაქტერიოფაგი, ფაგოთერაპია.

Abstract

Gram-negative *Acinetobacter* spp. has become an emerging nosocomial pathogen. There are a lot of clinical manifestations of *Acinetobacter* infections, including septicaemia, pneumonia, endocarditis, meningitis, wound infections. Antibiotic susceptibility of these strains have been changed since it was isolated first time from clinical sample. To date, strains of *A.baumannii* have become resistant to almost all currently available antibiotics, including imipenem, that is the drug of choice for treatment of infections caused by *Acinetobacter* strains. The worldwide spread of MDR strains has renewed interest in phage therapy. Phage preparations are widely used to treat infections caused by different bacteria, however *A. baumannii* phages have not yet been used as therapeutic tools. The aim of this study was creation of experimental *Acinetobacter* phage preparation. Early steps of this research were included identification and study of the bacterial strains and investigation of the molecular mechanisms of imipenem resistance in IMP-resistant strains. A total 210 *Acinetobacter* spp. strains were characterized by using following methods: Etest, DD, PCR, Plasmid transformation. According to the results among 6 IMP-resistant *A.baumannii* strains, in 5 strains (*A.baumannii* 3, 4, 5, 6, 9) IMP-resistance was conditioned by bla_{OXA23like} gene located on a plasmid. However IMP-resistant *A. baumannii* G7 strain (isolated in Georgia) contained OXA-24-like-encoding gene chromosomally and a plasmid bearing the ISAbal and bla_{OXA51like} genes. Phage research work was done by using classical methods. 5 *Acinetobacter* phages are characterized in this study, among them 2 phages are serologically relative *Myoviridae* (*vB_Ab-M-G7*, *vB_Ab-M-40*), rest 3 phages (*vB_Ab-S-31*, *vB_Ab-S-14*, *vB_Ag-S-7*) are belonged to *Siphoviridae* family. Characteristics of these phages (a short latent period (12-40 nim), large burst size (80-200 pfu), stability in different pH ranges (pH=5-11) and in high thermal condition (50°)) help made these phages a very promising component for phage therapy. Phage *vB_Ab-M-G7* and an animal wound model was used to demonstrate that phage application did not have a toxic effect on wounded rats, phage administration in wound infections caused by *A. baumannii* strains effectively reduced the number of bacteria isolated from treated animals. Genetical characterization of the phage *vB_Ab-M-G7* showed that DNA of this phage contains bla_{OXA24like} gene, despite that no

successful transduction was manifested during the experiments, this phage will not be used for treatment remedy. Characterized phages were used for creation phage “cocktail” that could be determined as an experimental phage preparation that is non-toxic, remains stability in different conditions and has wide host range.

Key Words: *Acinetobacter* spp., carbapenemase, bacteriophage, phage therapy.

მადლობა

სადოქტორო ნაშრომის ძირითადი ნაწილი შესრულებულია გ. ელიავას სახელობის ბაქტერიოფაგიის, მიკრობიოლოგიისა და ვირუსოლოგიის ინსტიტუტის ბაზაზე, ზოგადი მიკრობიოლოგიის ლაბორატორიაში.

მადლიერებას გამოვხატავ შოთა რუსთაველის ეროვნული სამეცნიერო ფონდის მიმართ, რომლის მიერ ინდივიდუალური სამეცნიერო-სტაჟირების გრანტის დაფინანსებით სადოქტოროს ნაშრომის ნაწილი შესრულდა მარსელის ხმელთაშუა ზღვის უნივერსიტეტის, რიკეციების განყოფილების მიკრობიოლოგიის ლაბორატორიაში, პროფესორ Jean-marc Rolain-ის ხელმძღვანელობით.

მადლობას ვუხდით ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტს და სადოქტორო ნაშრომის სამეცნიერო ხელმძღვანელებს თანადგომისთვის და გაწეული დახმარებისთვის.

სარჩევი

სარჩევი	VIII
ცხრილების ჩამონათვალი	XI
გრაფიკების ჩამონათვალი	XII
ილუსტრაციების ჩამონათვალი	XIV
აბრევიატურების ჩამონათვალი	XV
შესავალი	16
სამეცნიერო ლიტერატურის მიმოხილვა	20
თავი 1. <i>Acinetobacter</i> -ის გვარის ზოგადი დახასიათება	20
1.1 ტაქსონომია, იდენტიფიკაცია	20
1.2 <i>Acinetobacter spp</i> -ს გავრცელება და კლინიკური მნიშვნელობა	22
1.3 <i>Acinetobacter baumannii</i> -ის ანტიბიოტიკორეზისტენტობა	25
1.4 <i>A. baumannii</i> -ში β -lactam ანტიბიოტიკების მიმართ რეზისტენტობის მექანიზმები	27
თავი 2. <i>Acinetobacter spp</i> -ით ინფიცირებული კერიდან გამოყოფილი ბაქტერიები და მათი მნიშვნელობა (<i>Stenortophomonas maltophilia</i>)	31
თავი 3. ბაქტერიოფაგები	32
3.1 ბაქტერიოფაგების კლასიფიკაცია	32
3.2 ბაქტერიოფაგების ბიოლოგია, ლითიური სასიცოცხლო ციკლი	34
3.3 ზომიერი ბაქტერიოფაგები, ტრანსდუქცია	37
3.4 ფაგოთერაპია	39
3.5 <i>Acinetobacter</i> -ის სპეციფიკური ფაგების ზოგადი მიმოხილვა	42
მეთოდოლოგია	44
თავი 1. გამოყენებული მასალა	44
თავი 2. ბაქტერიული შტამების დასახასიათებლად გამოყენებული მეთოდები	46
2.1 ბაქტერიული შტამების იდენტიფიკაცია	46
2.2 ანტიბიოტიკომგრძნობელობის განსაზღვრა	47

2.3 ანტიბიოტიკორეზისტენტული გენების მოლეკულური გამოვლენა	48
2.4 პლაზმიდის გამოყოფა, ტრანსფორმაცია	48
თავი 3. ბაქტერიოფაგების დასახასიათებლად გამოყენებული მეთოდები	49
3.1 ბაქტერიოფაგების გამოყოფა	49
3.2 ბაქტერიოფაგების გამოვლენა, მოქმედების სპექტრის შესწავლა	49
3.3 ბაქტერიოფაგის ტიტრის განსაზღვრა	50
3.3.1 გრაციას მეთოდი	50
3.3.2 აპელმანის მეთოდი	50
3.4 ბაქტერიოფაგის გამრავლება/კონცენტრირება	50
3.5 ელექტრონული მიკროსკოპია	51
3.6 ბაქტერიოფაგების სეროლოგიური ნათესაობის შესწავლა	51
3.7 ბაქტერიოფაგების სტაბილურობის შესწავლა ქლოროფორმის თანაობისას, სხვადასხვა ტემპერატურისა და pH-ის პირობებში	52
3.8 ფაგის ერთჯერადი გამრავლების ციკლი	52
3.8.1 ადსორბცია	53
3.8.2 ფაგის ლატენტური პერიოდი და გამოსავლიანობა	53
3.9 ბაქტერიოფაგის დნმ-ის გამოყოფა	53
3.10 რესტრიქციული ანალიზი	54
3.11 გელ-ელექტროფორეზი პულსირებად ველში	54
3.12 პროფაგების გენების არსებობაზე ფაგის დნმ-ის შემოწმება	55
3.13 ტრანსდუქცია, ტრანსფორმაცია	55
3.14 ცხოველური მოდელის შექმნა	56
3.15 ფაგის საცდელი პრეპარატის შემუშავება	58
შედეგები	59
თავი 1. ბაქტერიული შტამების დახასიათება	59
1.1 ბაქტერიული შტამების იდენტიფიკაცია	59
1.2 იმიპენემრეზისტენტული ბაქტერიული შტამების ფენოტიპური დახასიათება	60
1.3 იმიპენემრეზისტენტული ბაქტერიული შტამების მოლეკულური დახასიათება	63
თავი 2. <i>Acinetobacter</i> spp.-ის ბაქტერიოფაგების შესწავლა	66

2.1	ფაგის გამოყოფა და დახასიათება	66
2.1.1	vB_Ag-S7	66
2.1.2	vB-Ab-S-31	70
2.1.3	vB-Ab-M-G7	73
2.1.4	vB-Ab-S-T14	76
2.1.5	vB-Ab-M-T40	80
2.2	<i>Acinetobacter spp</i> -ს ბაქტერიოფაგებს შორის ნათესაური კავშირის დადგენა	83
2.3	ტრანსდუქციის შესაძლებლობები vB_Ab-M-G7-ფაგის მაგალითზე	85
2.4	ფაგოთერაპიის ეფექტურობის შესწავლა ცხოველურ მოდელზე	86
თავი 3.	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> -ს ბაქტერიული შტამის და სპეციფიკური ფაგის დახასიათება	89
თავი 4.	ბაქტერიოფაგის საცდელი პრეპარატი	93
	დისკუსია/ინტერპრეტაცია	95
	დასკვნა და რეკომენდაციები	107
	ბიბლიოგრაფია	109

ცხრილების ჩამონათვალი

ცხრილი 1: <i>Acinetobacter</i> გვარის სახეობები	21
ცხრილი 2: β -lactam ანტიბიოტიკების კლასიფიკაცია	27
ცხრილი 3: კარბაპენემების კლასიფიკაცია	29
ცხრილი 4: კვლევაში გამოყენებული PCR-ის პრაიმერები	46
ცხრილი 5: <i>A. baumannii</i> -ის შტამების ანტიბიოტიკომგრძნობელობა	62
ცხრილი 6: <i>vB_Ab-M-G7</i> -ის შრატით ნეიტრალიზაციის რეაქცია	83
ცხრილი 7: <i>vB_Ab-S-31</i> -ის შრატით ნეიტრალიზაციის რეაქცია	84
ცხრილი 8: <i>Stenotrophomonas maltophilia 18</i> -ის ანტიბიოტიკომგრძნობელობა	89

გრაფიკების ჩამონათვალი

გრაფიკი 1: <i>vB_Ag-S7</i> ფაგის ერთჯერადი გამრავლების ციკლი	
ა. ადსორბცია; ბ. ფაგის ლატენტური პერიოდი, გამოსავლიანობა	67
გრაფიკი 2: <i>vB_Ag-S7</i> ფაგის სტაბილურობა სხვადასხვა ტემპერატურისა (ა.) და pH-ის (ბ.) პირობებში	68
გრაფიკი 3: <i>vB_Ag-S7</i> -ის მოქმედების სპექტრი	70
გრაფიკი 4: <i>vB_Ab-S-31</i> ფაგის ერთჯერადი გამრავლების ციკლი	
ა. ადსორბცია; ბ. ფაგის ლატენტური პერიოდი, გამოსავლიანობა	71
გრაფიკი 5: <i>vB_Ab-S-31</i> ფაგის სტაბილურობა სხვადასხვა ტემპერატურისა (ა.) და pH-ის (ბ.) პირობებში	72
გრაფიკი 6: <i>vB_Ab-S-31</i> -ის მოქმედების დიაპაზონი	73
გრაფიკი 7: <i>vB_Ab-M-G7</i> ფაგის ერთჯერადი გამრავლების ციკლი	
ა. ადსორბცია; ბ. ფაგის ლატენტური პერიოდი, გამოსავლიანობა	74
გრაფიკი 8: <i>vB_Ab-M-G7</i> ფაგის სტაბილურობა სხვადასხვა ტემპერატურისა (ა.) და pH-ის (ბ.) პირობებში	75
გრაფიკი 9: <i>vB_Ab-M-G7</i> -ის მოქმედების დიაპაზონი	76
გრაფიკი 10: <i>vB_Ab-S-T14</i> ფაგის ერთჯერადი გამრავლების ციკლი	
ა. ადსორბცია; ბ. ფაგის ლატენტური პერიოდი, გამოსავლიანობა	77
გრაფიკი 11: <i>vB_Ab-S-T14</i> ფაგის სტაბილურობა სხვადასხვა ტემპერატურისა (ა.) და pH-ის (ბ.) პირობებში	78
გრაფიკი 12: <i>vB_Ab-S-T14</i> ფაგის მოქმედების დიაპაზონი	79
გრაფიკი 13: <i>vB_Ab-M-T40</i> ფაგის ერთჯერადი გამრავლების ციკლი	
ა. ადსორბცია; ბ. ფაგის ლატენტური პერიოდი, გამოსავლიანობა	80
გრაფიკი 14: <i>vB_Ab-M-T40</i> ფაგის სტაბილურობა სხვადასხვა ტემპერატურისა (ა.) და pH-ის (ბ.) პირობებში	81
გრაფიკი 15: <i>vB_Ab-M-T40</i> მოქმედების დიაპაზონი	82
გრაფიკი 16: ფაგისა და მიკრობის ტიტრის ცვლილება ფაგოთერაპის დროს ცხოველურ მოდელზე. ა. III/V ჯგუფი; ბ. IV/VI ჯგუფი	88
გრაფიკი 17: <i>vB_Sm-P-18</i> ფაგის ერთჯერადი გამრავლების ციკლი	

ა. ადსორბცია; ბ. ფაგის ლატენტური პერიოდი, გამოსავლიანობა	90
გრაფიკი 18: <i>vB_Sm-P-18</i> ფაგის სტაბილურობა სხვადასხვა ტემპერატურისა (ა.) და pH-ის (ბ.) პირობებში	92
გრაფიკი 19: ბაქტერიოფაგის საცდელი პრეპარატის მოქმედების დიაპაზონი	93

ილუსტრაციების ჩამონათვალი

ილუსტრაცია 1: <i>Acinetobacter</i> spp.-ის დამახასიათებელი ზრდა Herellae-ს აგარზე	46
ილუსტრაცია 2: მოდელირებული ჭრილობა ვირთაგვებზე	57
ილუსტრაცია 3: <i>A. baumannii</i> -ის საიდენტიფიკაციო OXA51-like პრაიმერი	59
ილუსტრაცია 4: Etest იმიპენემრეზისტენტული შტამებისთვის	61
ილუსტრაცია 5: Etest საფრანგეთის შტამებიდან ყველაზე ნაკლებად მგრძნობიარე შტამისთვის	61
ილუსტრაცია 6: <i>A. baumannii</i> შტამების MS დენდროგრამა	65
ილუსტრაცია 7: <i>vB_Ag-S7</i> -ის მორფოლოგია. ა. ნეგატიური კოლონია; ბ. ელექტრონული მიკროსკოპია	66
ილუსტრაცია 8: <i>vB_Ag-S7</i> -ის დნმ-ის ზომა (PFGE)	68
ილუსტრაცია 9: <i>vB_Ab-S-31</i> -ის მორფოლოგია. ა. ნეგატიური კოლონია; ბ. ელექტრონული მიკროსკოპია	70
ილუსტრაცია 10: <i>vB_Ab-M-G7</i> -ის მორფოლოგია. ა. ნეგატიური კოლონია; ბ. ელექტრონული მიკროსკოპია	73
ილუსტრაცია 11: <i>vB_Ab-S-T14</i> -ის მორფოლოგია. ა. ნეგატიური კოლონია; ბ. ელექტრონული მიკროსკოპია	77
ილუსტრაცია 12: <i>vB_Ab-M-T40</i> -ის მორფოლოგია. ა. ნეგატიური კოლონია; ბ. ელექტრონული მიკროსკოპია	80
ილუსტრაცია 13: OXA24-like გენი <i>vB_Ab-M-G7</i> გენომში	85
ილუსტრაცია 14: <i>vB_Ab-M-G7</i> -ისა და <i>A. baumannii</i> G7-ის OXA24-like გენის სექვენსის შედარება	86
ილუსტრაცია 15: Herellae აგარზე <i>S. maltophilia</i> -ს ზრდის თავისებურება	89
ილუსტრაცია 16: <i>vB_Sm-P-18</i> -ის მორფოლოგია. ა. ნეგატიური კოლონია; ბ. ელექტრონული მიკროსკოპია	90
ილუსტრაცია 17: <i>vB_Sm-P-18</i> -ის დნმ-ის ზომა (PFGE)	91
ილუსტრაცია 18: <i>Acinetobacter</i> spp.-ის საცდელი სამკურნალო პრეპარატი	93

აბრევიატურების ჩამონათვალი

ABC, - *Acinetobacter baumannii*-სა და *Acinetobacter calcoaceticus*-ის კომპლექსი;

Spp, გვარში გაერთიანებული სახეობები (Several Species);

bp, ნუკლეოტიდურ ფუძეთა წყვილი (base pair);

PBPs, პენიცილინ-დამჭერი პროტეინები (Penicillin-Binding-Proteins);

OMPs, გარე მემბრანული პროტეინები (Outer Member Proteins);

BHIB/A, გულ-ტვინის ნარევის ბულიონი/აგარი (Brain Heart Infusion Broth/Agar);

MALDI-TOF MS, მასის სპექტრომეტრი (Matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry);

EUCAST, ანტიბიოტიკების მგრძნობელობის ტესტის ევროპული კომიტეტი (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing);

MICs, მინიმალური ინჰიბიტორული კონცენტრაცია (Minimum Inhibitory Concentrations);

pfu/ml, კოლონიების წარმოქმნის რაოდენობა 1 მილილიტრში(მლ).
(ფაგების შემთხვევაში) (plaque forming unit);

cfu/ml, კოლონიების წარმოქმნის რაოდენობა 1 მილილიტრში(მლ).
(ბაქტერიების შემთხვევაში)(colony forming unit);

PCR, პოლიმერაზა ჯაჭვური რეაქცია (Polymerase Chain Reaction);

PFGE, გელ-ელექტროფორეზი პულსირებად ველში (Pulsed field gel electrophoresis).

ანტიბიოტიკები:

RIF , rifampicin;	NOR , norfloxacin;	TOB , tobramycin;
CAZ , ceftazidime;	FOS , fosfomycin;	TIC , ticarcillin;
PIP , piperacillin;	COL , colistin;	IPM , imipenem.
TZP , piperacillin/tazobactam;	CIP , ciprofloxacin;	GEN , gentamicin
SXT , sulfamethoxazole/trimethoprim;	AMI , amikacin	

შესავალი

უკანასკნელი 20-30 წლის განმავლობაში მსოფლიოს მთელ რიგ ქვეყნებში ძლიერ შეიცვალა საავადმყოფოსშიდა ინფექციების ეთიოლოგია: გაიზარდა გრამუარყოფითი ბაქტერიებით გამოწვეული ინფექციების ხვედრითი წილი, რომელთაგან ბოლო მონაცემებით ერთ-ერთი მნიშვნელოვანია *Acinetobacter* spp. თუ მეოცე საუკუნის სამოციან წლებში *Acinetobacter* spp. არაპათოგენურ ბაქტერიად მიიჩნეოდა, დღეისათვის ის უკვე ყველაზე დიდ პრობლემას უქმნის სამედიცინო პერსონალს (42, 59, 78, 127).

Acinetobacter spp. მიიჩნევა დაბალი პათოგენობის მქონე მიკრობად, რომლისთვისაც ძირითადად დამახასიათებელია კოლონიზაცია და ნაკლებად ინფიცირება (5, 23, 31, 41, 127), მაგრამ ინფიცირების შემთხვევაში გამოსავალი სამწუხაროდ ხშირად ლეტალურია (37, 59). ეს ძირითადად დამოკიდებულია ინფიცირების ადგილსა და პაციენტის ფიზიკურ მდგომარეობაზე. თავდაპირველად *Acinetobacter* spp. ასოცირდებოდა პოსტოპერაციულ და შარდ-სასქესო გზების ინფექციებთან, დღესთვის კი ეს ბაქტერია გამოიყოფა ისეთი პაციენტებისგან, რომლებიც დაავადებულნი არიან სეპტიცემიით, პნევმონიით, ენდოკარდიტით, მენინგიტით, ასევე გამოიყოფა კანისა და ჭრილობის ინფექციის დროს (5, 23, 24, 27, 31, 37, 47, 53, 59, 99, 105, 111, 113, 115, 126).

კლინიკაში *A.baumannii*-ის პირველი გამოვლენიდან დღემდე მკვეთრად შეიცვალა ამ ბაქტერიების მგრძნობელობა სხვადასხვა ანტიბიოტიკების მიმართ. დღეისთვის უკვე გავრცელებულია *A.baumannii*-ის ისეთი შტამები, რომლებიც რეზისტენტულია თითქმის ყველა ანტიბიოტიკის მიმართ, მათ შორის ამინოპენიცილინის, პირველი და მეორე თაობის ცეფალოსპორინების და ქლორამფენიკოლის მიმართ (31, 53, 78). ყველაზე დიდ პრობლემას წარმოადგენს რეზისტენტული შტამები ანტიბიოტიკების ჯგუფის- კარბაპენემების მიმართ, რომელიც მიჩნეულია საუკეთესო და უალტერნატივო საშუალებად *Acinetobacter* spp.-ით გამოწვეული ინფექციების სამკურნალოდ. 1970 წლამდე ამ ინფექციებისაგან განკურნება ხდებოდა ისეთი ანტიბიოტიკებით, როგორიცაა: გენტამიცინი, მონოციკლინი, ამპიცილინი. 1970 წლიდან დღემდე ბაქტერიულმა

შტამებმა თანდათან განვითარეს რეზისტენტობა ამინოპენიცილინის, ამინოგლიკოზიდების, ტეტრაციკლინის მიმართ (5). ამ მიკრობის წინააღმდეგ ბოლო წლებამდე ყველაზე აქტიურ საშუალებად იმიპენემი მიიჩნეოდა, მაგრამ დროთა განმავლობაში რეზისტენტობა მის მიმართაც განვითარდა და დღეისათვის ზოგიერთ არეალში იმიპენემრეზისტენტული *Acinetobacter baumannii*-ის რაოდენობა 25%-საც კი აღწევს (11, 64, 78, 103).

Acinetobacter baumannii-ის მიერ გამოწვეული ინფექციების აფეთქებები ევროპაში ჯერ კიდევ მეოცე საუკუნის ოთხმოციან წლებში დაფიქსირდა, ხოლო კარბაპენემრეზისტენტული შტამებით გამოწვეული საავადმყოფოსშიდა აფეთქებების შემთხვევათა რიცხვი ბოლო ათი წლის განმავლობაში მკვეთრად გაიზარდა (64, 127). მაგალითად, 2003-2004 წლებში იტალიაში, საფრანგეთში და საბერძნეთში, 2004-2005 წლებში ბელგიაში, 2005-2007 წლებში საბერძნეთში და 2007 წელს იტალიაში, დაფიქსირდა საავადმყოფოსშიდა აფეთქებები, სადაც ინფექციის გამომწვევ ბაქტერიებში იმიპენემრეზისტენტობას OXA-58 კარბაპენემაზა განაპირობებდა. 2004 წელს საფრანგეთში, 2005-2007 წლებში თურქეთსა და გერმანიაში და 2007 წელს იტალიაში იფეთქა OXA-23-ის მაპროდუცირებელი იმიპენემრეზისტენტული ბაქტერიული შტამით გამოწვეული ინფექციების შემთხვევებმა (64). 2009 წელს ხორვატიაში დაფიქსირდა bla-OXA24like გენის შემცველი *A. baumannii*-ით გამოწვეული საავადმყოფოსშიდა აფეთქება (64).

ერთადერთი ანტიბიოტიკი, რომლის მიმართ ჯერ სრული რეზისტენტობა არ გამოუვლენია *A. baumannii* ბაქტერიულ შტამებს, წარმოადგენს კოლისტინი. მიუხედავად დიდი ტოქსიურობისა, კოლისტინი ჯერ-ჯერობით ერთადერთ უკანასკნელ იმედის მომცემ საშუალებას წარმოადგენს მულტირეზისტენტული შტამების წინააღმდეგ. თუმცა უნდა აღინიშნოს, რომ ადგილი აქვს კოლისტინის მიმართ რეზისტენტული ფორმების ზრდას (5%-28%), რაც *A. baumannii*-ით გამოწვეული ინფექციების მკურნალობას უალტერნატივოს ქმნის (13, 83, 93). მდგომარეობას ართულებს ის ფაქტი, რომ *Acinetobacter* spp-თვის დამახასიათებელია გარემოს არახელსაყრელ პირობებში გადარჩენის დიდი უნარი. ამ ბაქტერიებს შეუძლიათ გარემოში არსებობა მრავალი დღისა თუ კვირის განმავლობაში მშრალ პირობებშიც კი, მათ შორის მტვრის ნაწილაკებზე (50, 55).

ანტიბიოტიკორეზისტენტული ბაქტერიული შტამების გავრცელებამ და თანამედროვე ანტიბაქტერიული საშუალებებით მასთან ბრძოლის სირთულემ განაახლა ინტერესი ფაგოთერაპიის მიმართ (1, 52, 72, 86, 119). ბაქტერიული ვირუსები ანუ ბაქტერიოფაგები ვირუსების ყველაზე ფართო ჯგუფს შეადგენენ. მათი გავრცელების არეალი საკმაოდ ფართოა: ისინი გავრცელებულია ჰაერში, ნიადაგში, წყალში, განსაკუთრებით ჩამდინარე – საკანალიზაციო წყლებში, ადამიანების, ცხოველების სხეულის და მცენარეების ზედაპირზე. მრავალი ფაგი გვხვდება ასევე სხეულის ღრუებში, ნაწლავებში.

D'Herelle-ს მიერ ფაგის აღმოჩენიდან (მე-20 საუკუნის დასაწყისი) მალევე მოხდა მისი გამოყენება დიზენტერიის სამკურნალოდ (19). სწორედ ეს იყო ფაგის პირველი თერაპიული გამოყენება. დღეისთვის ჭეშმარიტად ვირულენტური ბაქტერიოფაგები განიხილება, როგორც ანტიბიოტიკების ერთ-ერთი ალტერნატიული საშუალება სხვადასხვა ეთიოლოგიის მქონე ინფექციების პრევენციისათვის და სამკურნალოდ. ფაგების მიმართ მაღალი ინტერესი განპირობებულია, ერთის მხრივ, ანტიბიოტიკების მიმართ მულტირეზისტენტული ბაქტერიული შტამების გავრცელებით, მეორეს მხრივ კი ფაგების მოქმედების მაღალი სპეციფიკურობის, ეფექტურობისა და უვნებლობის ფაქტორით (12, 19, 71, 72, 118, 119).

ინფექციურ პათოლოგიაში ბაქტერიოფაგის გამოყენების რეკომენდაციები დაფუძნებულია იმ გამოცდილებაზე, რაც დაგროვდა მრავალი წლის მანძილზე. დღეისათვის ბაქტერიოფაგები წარმატებით გამოიყენება ჩირქოვან-ანთებითი ინფექციების, ნაწლავური ინფექციების, შარდ-სასქესო გზების ანთებითი პროცესების სამკურნალოდ. დანიშნულების მიხედვით არსებობს ფაგის კომერციული პრეპარატები, როგორიცაა პიოფაგი, ინტესტიფაგი, სტაფილო ფაგი, სეს ფაგი და სხვა, რომლებიც ათწლეულებია ფართოდ გამოიყენება საქართველოში.

დღეისათვის ფაგებით მკურნალობენ ინფექციებს, რომლებიც გამოწვეულია *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., *E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., *Enterococcus* spp და სხვა ბაქტერიული შტამებით (12, 19, 71, 72, 118, 119). *Acinetobacter* spp-ის სპეციფიკური ფაგების სამკურნალო პრეპარატი ჯერ არ შემუშავებულა, მიუხედავად იმისა, რომ ამ მიკრობის სპეციფიკური ფაგების

შესწავლა დიდი ხანია მიმდინარეობს, რასაც გამოქვეყნებული სამეცნიერო ნაშრომებიც მოწმობს.

ბაქტერიოფაგების მეცნიერული შესწავლა აუცილებელი წინაპირობაა პრაქტიკულ მედიცინაში მის სამკურნალო საშუალებად გამოყენებისათვის.

სწორედ ამიტომ ამ ნაშრომის კვლევის მიზანს წარმოადგენს *Acinetobacter* spp.-ის სპეციფიკური ფაგების საცდელი სამკურნალო პრეპარატის შექმნა.

აღნიშნული მიზნის მისაღწევად დასახულ იქნა კვლევის შემდეგი ამოცანები:

1. კლინიკური მასალიდან გამოყოფილი *Acinetobacter* spp. ბაქტერიული შტამების იდენტიფიცირება;
2. იმიპენემრეზისტენტული *Acinetobacter* spp. ბაქტერიული შტამების გამოვლენა და რეზისტენტობის მოლეკულური მექანიზმების შესწავლა;
3. *Acinetobacter* spp.-ის ფაგების გამოყოფა და სელექცია;
4. ფაგების მორფოლოგიისა და ბიოლოგიური თვისებების შესწავლა (მოქმედების დიაპაზონი, გამრავლების ერთჯერადი ციკლი, სეროლოგია);
5. ფაგების სტაბილურობის შესწავლა გარემოს სხვადასხვა პირობებში (ტემპერატურა, pH, ქლოროფორმი);
6. ფაგების გენეტიკური დახასიათება;
7. ფაგოთერაპიის ეფექტურობის შესწავლა ცხოველურ მოდელზე;
8. ფაგების საცდელი სამკურნალო-პროფილაქტიკური პრეპარატის მიღება.

თავი 1. *Acinetobacter*-ის გვარის ზოგადი დახასიათება

1.1 ტაქსონომია, იდენტიფიკაცია

1911 წელს *Beijerinck*-მა პირველმა გამოყო მიწიდან გრამ-უარყოფითი ბაქტერიის ახალი სახეობა და მას *Micrococcus calcoaceticus* უწოდა (3). მოგვიანებით, 1954 წელს *Brisou*-მ და *Prevot*-მა გრამ-უარყოფითი საპროფიტები, რომლებიც არ აწარმოებდნენ პიგმენტს, გააერთიანეს *Acinetobacter*-ის გვარში, სადაც პირველი სახეობა იყო *A. Anitratum*. ამ გვარში თავიდან შედიოდნენ როგორც ოქსიდაზა-პოზიტიური, ასევე ოქსიდაზა-ნეგატიური შტამები (5), თუმცა *Baumann et al*-ის ექსპერიმენტებზე დაყრდნობით ამ ნიშნის მიხედვით მოხდა აღნიშნული მიკრობების ორ ჯგუფად კლასიფიცირება (4), სადაც ოქსიდაზა-პოზიტიური შტამები *Moraxella*-ს ჯგუფში და ოქსიდაზა-ნეგატიური ბაქტერიები კი *Acinetobacter*-ის ქვეშ გაერთიანდა. ჯერ კიდევ მეოცე საუკუნის ოთხმოციან წლებში სახეობების იდენტიფიცირება დიდ სირთულესთან იყო დაკავშირებული და ამიტომ ყველა სახეობა ზოგადად მოიხსენიებოდა, როგორც *A. calcoaceticus* (3, 99).

თანამედროვე კლასიფიკაციის მიხედვით გვარი *Acinetobacter* მიეკუთვნება: სამეფოს-*Bacteria*, კლასს-*Gammaproteobacteria*, რიგს-*Pseudomonales*, ოჯახს-*Moraxellaceae*. დღეისთვის *Acinetobacter*-ის გვარში 31 სახეობაა იდენტიფიცირებული, აქედან 17-ს აქვს სახელი მინიჭებული (99) (ცხრილი 1), ხოლო 14 უსახელოა და მოიხსენიება როგორც *genomospecies*, შესაბამისი ნუმერაციით (99). ყველა მათგანი ხასიათდება როგორც გრამ-უარყოფითი, არამაფერმენტირებელი კოკობაცილა, მკაცრად აერობული, უმოძრაო, კატალაზა-პოზიტიური და ოქსიდაზა ნეგატიური ბაქტერია, რომლის დნმ-ში ც+გ შემცველობა არის 39-47მოლ%-მდე (5, 99).

Acinetobacter ზრდის სტაციონალურ ფაზაში იძენს კოკოიდურ ფორმას, ამ ბაქტერიებს აქვთ მიდრეკილება დაწყვილდნენ ან შექმნან ჯაჭვი, სადაც მათი რაოდენობა ვარიაბელურია. *Acinetobacter* spp. მყარ საკვებ არეზე წარმოქმნის გლუვ კოლონიას, მისი ფერი შეიძლება მერყეობდეს თეთრიდან მკრთალ ყვითლამდე, თუმცა ნაჩვენებია, რომ ზოგიერთ, გარემოდან გამოყოფილ შტამს ახასიათებს ყავისფერი პიგმენტაცია (5, 99). ზოგიერთი კლინიკური შტამისთვის ასევე

დამახასიათებელია ჰემოლიზური აქტივობა. გარემოდან გამოყოფილი *Acinetobacter* spp. ძირითადად მეზოფილურია, მისი ზრდის ოპტიმალური ტემპერატურა არის 25-28°C, თუმცა კლინიკური შტამებისთვის ხშირად ოპტიმალური ტემპერატურა 37°C-ია. გვხვდება ისეთი შტამებიც, რომელთაც უნარი აქვთ გაიზარდონ 0°C-ზე. *Acinetobacter* spp.-ის წარმომადგენლების ოპტიმალური pH არის 7,2 (5).

Acinetobacter spp.-სთვის დამახასიათებელია გარემოს არახელსაყრელ პირობებში გადარჩენის დიდი უნარი (50, 53, 55). ამ ბაქტერიებს შეუძლიათ გარემოში არსებობდნენ ბევრი დღისა თუ კვირის განმავლობაში, მშრალ პირობებში, მტვრის ნაწილაკებზეც კი. *A.baumannii* ყველაზე უკეთ უძლებს შრობას ამ გვარის სხვა წარმომადგენლებთან შედარებით. მაგალითად, *A.lwoffii* მშრალ ზედაპირზე 7 დღის განმავლობაში ინარჩუნებს სიცოცხლისუნარიანობას, *A.baumannii* 25 დღის განმავლობაში (50). მაშინ როცა სხვა გრამ-უარყოფითი მიკრობები ძლებენ მხოლოდ რამდენიმე საათი: *E. coli* 24 საათში, ხოლო *Pseudomonas aeruginosa* 24 საათზე ნაკლებ დროში კარგავს აქტივობას (50, 53, 55).

ცხრილი 1. *Acinetobacter* გვარის სახეობები

<i>Acinetobacter</i> spp.	სტანდარტული შტამი
<i>A.calcoaceticus</i>	ATCC 23055
<i>A.baumannii</i>	ATCC 19606
<i>A.baylyi</i>	DSM 14961
<i>A.bouvetii</i>	DSM 14964
<i>A.gernerii</i>	DSM 14967
<i>A.grimontii</i>	DSM 14968
<i>A.haemolyticus</i>	ATCC 17906
<i>A.johnsonii</i>	ATCC 17909
<i>A.junii</i>	ATCC 17908
<i>A.lwoffii</i>	ATCC 15309
<i>A.parvus</i>	NIPH 384
<i>A.radioresistens</i>	IAM 13186
<i>A.schindleri</i>	NIPH 1034
<i>A.tandoii</i>	DSM 14970
<i>A.tjernbergiae</i>	DSM 14971
<i>A.towneri</i>	DSM 14962
<i>A.ursingii</i>	NIPH 137

1.2 *Acinetobacter* spp.-ს გავრცელება და კლინიკური მნიშვნელობა

Acinetobacter spp.-ის წარმომადგენლები ფართოდაა გავრცელებული გარემოში (5, 47, 98, 130), მათი გამოყოფა შესაძლებელია როგორც მიწიდან და წყლიდან, ასევე ადამიანისგან და ცხოველისგან. ამ ბაქტერიებს ვხვდებით როგორც მტკნარ, ასევე ჩამდინარე და დაბინძურებულ წლებში, ნაჩვენებია შემთხვევები, როცა შტამები გამოიყო ტილებიდანაც, რომელიც შეგროვებული იყო უსახლკარო ადამიანებიდან (65). საკვები პროდუქტებიც ასევე მიიჩნევა ამ ბაქტერიების გავრცელების არედ, თუმცა კვებით ქსელში *Acinetobacter* spp.-ის არსებობის შესახებ არსებობს მწირი ინფორმაცია. *Berlau et al.*-მა აჩვენა, რომ გამოკვლეული ბოსტნეულის 17% მცირე რაოდენობით შეიცავდა ამ ბაქტერიას (6). *Acinetobacter* spp. ასევე ჩართულია ისეთი საკვები პროდუქტების ფუჭების პროცესში, როგორიცაა ბეკონი, ქათამი, კვერცხი, თევზი, იმ შემთხვევაშიც კი, როცა აღნიშნული საკვები ინახება მაცივრის და აერაციის პირობებში.

Acinetobacter spp.-ის ზოგიერთი წარმომადგენელი არის ადამიანის კანის ნორმალური მიკროფლორის შემადგენელი მიკრობი. მისი ამოთესვა ძირითადად ხდება კანის ტენიანი ადგილებიდან, აგრეთვე ყელიდან, სასუნთქი გზებიდან (24). ამ გვარის ბაქტერიების სხვა რეზერვუარს წარმოადგებს სამედიცინო ტექნიკა, საავადმყოფოს გარემო, როგორც პაციენტები, ასევე მომსახურე პერსონალი (51, 98, 115, 130).

უნდა აღინიშნოს, რომ კლინიკური გარემოდან და ბუნებიდან გამოყოფილ მიკრობულ პოპულაციებს შორის სხვაობა დიდია. კლინიკურად გამოყოფილი შტამების უმეტესობას ABC-კომპლექსი (*A. baumannii*, *A. calcoaceticus*) წარმოადგენს (53, 78, 105), მაშინ, როცა ბუნებაში ძირითადად ვხვდებით *A. johnsonii*, *A. Iwoffii*, *A. genomospecies 9* ბაქტერიულ შტამებს (99). *A. Iwoffii*, *A. radioresistens*, *A. genomospecies 3* ადამიანის კანიდან, ხოლო *A. genomospecies 11* ნაწლავებიდან არის გამოყოფილი (99). მნიშვნელოვანია ის ფაქტი, რომ *A. baumannii*, რომელიც ნოსოკომიალური ინფექციების განვითარებაში წამყვან როლს თამაშობს, საკმაოდ იშვიათად ითესება ადამიანის კანიდან თუ ექსკრემენტებიდან (99).

საავადმყოფოსშიდა ინფექციების განვითარებაში ყველაზე დიდი პოტენციალი გააჩნია ABC-კომპლექსით ცნობილ *A. baumannii*-სა და *A. calcoaceticus*-ის შტამებს, რაზეც არაერთი კვლევა მოწმობს (23, 31, 37, 46, 78, 98, 99). თუმცა არის შემთხვევები, როცა ნოსოკომიალური ინფექციების ეთიოლოგიაში სხვა სახეობებიც იღებენ მონაწილეობას. მაგალითად, არის მონაცემები, რომ *A. genomospecies 3* და *13TU* დიდ როლს თამაშობენ საავადმყოფოსშიდა აფეთქებებში (51, 88). ნაჩვენებია აგრეთვე შემთხვევები, როცა ბაქტერიემიისა და სეფსისის მიზეზი გამხდარა *A. genomospecies 3* და *A. junii* (7, 51, 60), ენდოკარდიტის კი - *A. haemolyticus*. მენინგიტების, პერიტონიტის დროს კი გამოყოფილი იყო *A. lwoffii* (17, 111, 113, 126).

Acinetobacter spp. მიიჩნევა დაბალი პათოგენობის მქონე მიკრობად, რომლისთვისაც ძირითადად დამახასიათებელია კოლონიზაცია და ნაკლებად ინფიცირება (5, 23, 31, 41, 127). მაგრამ ინფიცირების შემთხვევაში გამოსავალი სამწუხაროდ ხშირად ლეტალურია (37, 59), რაშიც დღეისათვის უკვე შესწავლილი მრავალი ვირულენტობისა და პათოგენურობის ფაქტორი იღებს მონაწილეობას, ასეთია:

ლიპოპოლისაქარიდი და ლიპიდი A პასუხისმგებელია ვირთაგვებში სასიკვდილო ინტოქსიკაციაზე და ბოცვრებში ციებ-ცხელებაზე. ლიპოპოლისაქარიდი უკავშირდება კაპსულარულ ეგზოპოლისაქარიდებს და შედეგად მიკრობული უჯრედის კედელი მდგრადი ხდება ადამიანის შრატის კომპლემენტის სისტემის მიმართ. ცდებმა აჩვენა, რომ შტამები, რომლებიც შეიცავენ ეგზოპოლისაქარიდებს, უფრო მაღალი პათოგენობით ხასიათდებიან, ვიდრე ისინი, რომლებიც არ აწარმოებენ მას (31, 59). აგრეთვე ცნობილია, რომ ლიპოპოლისაქარიდი მთავარ იმუნოსტიმულატორულ კომპონენტს წარმოადგენს, რომელიც პევმონიის დროს ანთებით პროცესებს წარმართავს (59).

Quorum-sensing- ეს არის გრამ-უარყოფით მიკრობებში რეგულატორული მექანიზმი, რომელიც ჩართულია ისეთ მნიშვნელოვან პროცესებში, როგორიცაა ცილების ბიოსინთეზი, ბიოფილმების ფორმაცია, ანტიბიოტიკებისა და ექსტრაცელულალური ვირულენტური ფაქტორების ბიოსინთეზი. კლინიკურ შტამებში QS-ის 4 სხვადასხვა სასიგნალო მოლეკულაა აღწერილი, რომლებიც მრავალი ვირულენტური ფაქტორის მთავარ ავტოინდუქტორს წარმოადგენს (31, 59).

ბიოფილმების ფორმაცია - ამ მიკრობს აქვს უნარი ჩამოაყალიბოს პილუსით-გაშუალებული ბიოფილმები შუშასა თუ პლასტიკატზე, სამედიცინო აპარატურაზე, რაც ხელს უწყობს პაციენტებში კოლონიზაციას და ინფექციას. ბაქტერიის ზედაპირზე არსებული პილი ურთიერთქმედებს ადამიანის ეპითელიარულ უჯრედთან, პროვოცირებს უჯრედის ადგეზიას- კოლონიზაციის პირველ საფეხურს. ბიოფილმები ასევე განაპირობებენ კლინიკური შტამების მდგრადობას სხვადასხვა სადეზინფექციო ხსნარების მიმართ (31, 32).

გარე-მემბრანული პროტეინები ციტოტოქსიურობასთან არის დაკავშირებული. *Choi et. al.* -ის მიხედვით ეს ცილები უკავშირდებიან რა ეუკარიოტულ უჯრედს, იწვევენ ბირთვის ადგილის ცვლილებას (ტრანსლოკაციას), შედეგად კი უჯრედის სიკვდილს (*in vitro* ცდები) (22, 31).

სტრეს-რეაქციის მექანიზმები *Acinetobacter* spp.-ის წარმომადგენლებს ანიჭებენ განსაკუთრებულ უნარს მოახდინონ ადაპტირება სხვადასხვა გარემო პირობებში მოხვედრის შემთხვევაში (31).

როგორც აღნიშნეთ, კოლონიზაცია ამ ბაქტერიებისთვის დამახასიათებელი ნიშანია. სწორედ კოლონიზაცია და ინფიცირებული პაციენტები წარმოადგენენ *A. baumannii*-ის მნიშვნელოვან რეზერვუარს (23). არის მონაცემები ამ მიკრობის ჰაერწვეთოვანი გზით გავრცელების შესახებ, თუმცა გავრცელების ძირითადი წყარო საავადმყოფოს მომსახურე პერსონალია (31). ინფიცირების შემთხვევაში პროცესის მიმდინარეობა შეიძლება იყოს მსუბუქი, საშუალო სიმძიმის ან ლეტალურიც, რაც ძირითადად დამოკიდებულია ინფიცირების უბანსა და პაციენტის ფიზიკურ მდგომარეობაზე (59). განსაკუთრებით რთულად მიმდინარეობს ინფექციის პროცესი სხვადასხვა ქრონიკული დაავადებების არსებობის შემთხვევაში, აგრეთვე ნიკოტინ თუ ალკოჰოლ-დამოკიდებულ პაციენტებში (37).

Acinetobacter spp.-ით განპირობებული პირველი ეპიდემიური აფეთქება 1970-იან წლებში დაფიქსირდა (46). დღემდე ცნობილი საავადმყოფოსშიდა ინფექციების უმრავლესობაზე *A. baumannii*-ია პასუხისმგებელი. გარემოში ამ ბაქტერიების მაღალი ადაპტაციის უნარი, სამედიცინო პერსონალის მიერ ფართო სპექტრის ანტიმიკრობული აგენტების ინტენსიური გამოყენება და შედეგად მაღალი ანტიბიოტიკორეზისტენტობა, ინფექციის მიმართ მგრძნობიარე პაციენტების რაოდენობის ზრდა, ყოველივე ეს ის ფაქტორებია, რაც ხელს უწყობს

საავადმყოფოსშიდა ინფექციების განვითარებას. დღემდე სხვადასხვა ადგილიდან და სხვადასხვა პერიოდში მსგავსი, თუმცა ეპიდემიოლოგიურად არამონათესავე ბაქტერიული შტამებია გამოყოფილი. თითქმის ყველა ამ კლონისთვის დამახასიათებელია ანტიბიოტიკების მიმართ მაღალი რეზისტენტობა, გენეტიკური სტაბილურობა და მაღალი პათოგენობა (31).

საავადმყოფოსშიდა ინფექციებიდან თავისი მნიშვნელობით ცალკე გამოსაყოფია ნოსოკომიალური პნევმონია. ინტენსიური თერაპიის ქვეშ მყოფ პაციენტებში, რომლებიც ექვემდებარებიან მექანიკური ვენტილაციით მკურნალობას, *A. baumannii*-ით გამოწვეული პნევმონია შემთხვევათა რიცხვის 15-24%-ს შეადგენს, სადაც ლეტალური გამოსავალი საკმაოდ მაღალია. ისეთი ფაქტორები, როგორიცაა ასაკი, ფილტვის ქრონიკული დაავადებები, იმუნოდეფიციტი, ანტიმიკრობული აგენტების ფართო გამოყენება ზრდის ნოსოკომიარული პნევმონიის განვითარების რისკს (5, 59).

სეპტიცემია, ენდოკარდიტი, მენინგიტი, შარდ-სასქესო ტრაქტის ინფექციები, ამ და ყველა ზემოთ ჩამოთვლილი და სხვა მრავალი დაავადების მიზეზი ხშირ შემთხვევაში სწორედ *Acinetobacter* spp. ბაქტერიული შტამებია (5, 59).

1.3 *Acinetobacter baumannii*-ის ანტიბიოტიკორეზისტენტობა

A. baumannii ბაქტერიული შტამებისთვის დამახასიათებელია გენეტიკური ინფორმაციის მაღალი სიხშირით ცვლილება, სადაც პლაზმიდები, ტრანსპოსონები და ინტეგრონები მნიშვნელოვან როლს თამაშობენ:

პლაზმიდა მოკლე წრიული დნმ-ის მოლეკულაა, რომელიც არსებობს ქრომოსომისგან დამოუკიდებლად და გააჩნია დამოუკიდებლად რეპლიკაციის უნარი. ხშირ შემთხვევაში პლაზმიდები შეიცავენ ანტიბიოტიკების მიმართ რეზისტენტობის განმსაზღვრელ გენებს. ტრანსფორმაციის საშუალებით ხდება ამ პლაზმიდების გავრცელება ბაქტერიულ შტამებს შორის და შედეგად ანტიბიოტიკორეზისტენტული ფორმების მიღება.

ტრანსპოსონი დნმ-ის სეგმენტია, რომელიც წარმოიქმნება ქრომოსომის ერთი უბნიდან და შეუძლია გენომის ირგვლივ მოძრაობა. მას გარდა გადაადგილების

გენებისა, გააჩნია ანტიბიოტიკორეზისტენტობისა და ტოქსინის მასინთეზირებელი გენები (42).

ინტეგრონი გენეტიკური ელემენტია, მას ხშირად ვხვდებით ეპიდემიურ შტამებში, მისი არსებობა ასევე დაკავშირებულია ანტიბიოტიკორეზისტენტობასთან (43, 127).

Insertion sequences (IS) დნმ-ის უმარტივესი ელემენტებია, რომელთა სიგრძე მერყეობს 10-40bp-მდე და მათ ფუნქციას წარმოადგენს მათ გვერდზე მყოფი გენების ექსპრესიის რეგულაცია (84). ისინი ზოგჯერ დაკავშირებულნი არიან გენების გადატანასთან, დელეციასთან, რეკომბინაციასთან. *A. baumannii* ბუნებრივად შეიცავს რეზისტენტობის განმსაზღვრელ გენებს: OXA51like, AmpC cephalosporinase, თუმცა მათი ექსპრესია სწორედ IS-ით რეგულირდება (20).

რეზისტენტული კუნძულები - გენეტიკური ელემენტები, რომლებიც ქრომოსომაში აღმოჩნდნენ სხვადასხვა მიკრობული შტამებიდან გენების ჰორიზონტალური გადატანის შედეგად. ამ კუნძულის სიგრძე შეიძლება მერყეობდეს 10-დან 100kb-მდე. *Fournier et al.*-მა აღწერა 86kb რეზისტენტული კუნძული, რომელსაც შეიცავდა ეპიდემიური, მულტირეზისტენტული შტამი *A. baumannii* AYE. შტამის დნმ სულ შეიცავდა 52 რეზისტენტობის განმსაზღვრელ გენს, რომელთაგან 45 ლოკალიზებული იყო ამ კუნძულში. უნდა აღინიშნოს, რომ ეს კუნძული ყოველთვის მოთავსებულია ATPase-ს მაკოდირებელ უბანში და ამ უბნის არსებობა ყოველთვის არ არის დაკავშირებული ანტიბიოტიკორეზისტენტობასთან. *A. baumannii* SDF ანტიბიოტიკების მიმართ ძლიერ მგრძნობიარე შტამს წარმოადგენს, თუმცა შეიცავს ATPase-ს მაკოდირებელ უბანში 20kb ზომის კუნძულს, ყოველგვარი რეზისტენტობის განმსაზღვრელი გენის გარეშე (42, 84).

დღეისთვის უკვე გავრცელებულია *A. baumannii*-ის ისეთი შტამები, რომლებიც რეზისტენტულია თითქმის ყველა ანტიბიოტიკის მიმართ, მათ შორის ამინოპენიცილინის, პირველი და მეორე თაობის ცეფალოსპორინების და ქლორამფენიკოლის მიმართ (31, 53, 78). ყველაზე დიდ პრობლემას წარმოადგენს კარბაპენემების მიმართ რეზისტენტული შტამები, ანტიბიოტიკების ჯგუფისა, რომელიც მიჩნეულია, როგორც საუკეთესო და უალტერნატივო საშუალება *Acinetobacter* spp.-ით გამოწვეული ინფექციების სამკურნალოდ (11, 64, 100). 1970 წლამდე ამ ინფექციებისაგან განკურნება ხდებოდა გენტამიცინით, მონოციკლინით,

ამპიცილინით (5). 1970 წლიდან დღემდე ბაქტერიულმა შტამებმა თანდათან განივითარეს რეზისტენტობა ამინოპენიცილინის, ამინოგლიკოზიდების, ტეტრაციკლინის მიმართ (5). იმიპენემი ბოლო წლებამდე მიიჩნეოდა, როგორც ყველაზე აქტიური საშუალება ამ მიკრობის წინააღმდეგ, თუმცა კარბაპენემ-რეზისტენტული ფორმები უფრო და უფრო ხშირად გამოიყოფა საავადმყოფოებში და დღეისთვის, ზოგიერთ არეალში იმიპენემრეზისტენტული *Acinetobacter baumannii*-ის რაოდენობა 25%-საც კი აღწევს (69, 85, 103, 109, 123). მიუხედავად დიდი ტოქსიურობისა, კოლისტინი უკანასკნელ იმედის მომცემ საშუალებას წარმოადგენს მულტირეზისტენტული შტამების წინააღმდეგ. თუმცა უნდა აღინიშნოს, რომ ადგილი აქვს კოლისტინის მიმართ რეზისტენტული ფორმების ზრდასაც (5%-28%), რაც *A. baumannii*-ით გამოწვეული ინფექციების მკურნალობას უალტერნატივოს ქმნის (13, 83, 93, 108).

1.4. *A.baumannii*-ში β -lactam ანტიბიოტიკების მიმართ რეზისტენტობის მექანიზმები

1928 წელს ფლემინგმა აღმოაჩინა პირველი β -ლაქტამ ანტიბიოტიკი პენიცილინი. დღეისთვის ანტიბიოტიკების ეს ჯგუფი ყველაზე ფართოა და ყველაზე ხშირად გამოყენებადი სხვადასხვა ინექციების დროს (11) (ცხრილი2).

ცხრილი 2: β -ლაქტამ ანტიბიოტიკების კლასიფიკაცია.

β -ლაქტამ ანტიბიოტიკების კლასიფიკაცია		
კლასი	ჯგუფი	β -lactamic
penicillins	Penicillins	Penicillin G, Penicillin V
	Aminopenicillins	Ampicillin, Amoxicillin
	Ureidopenicillins	Mezlocillin, Piperacillin
	Carboxipenicillins	Carbencillin, Ticarcillin
	Isoxazolic oenicillins	Oxacillin, Cloxacillin, Dicloxacillin
Cephalosporins	1 st generation	Cefazolin, Cephalotin, Cefradin, ...
	2 nd generation	Cefuroxime, Cefamandole, Cefaclor, ...

	3 rd generation	Cefotaxime, Ceftriaxone, Cefdinir, ...
	4 th generation	Cefepime
	Cephamicines	Cefoxitin, Cefotetan
	Oxacefems	Moxalactam
	Carbacefems	Loracarbef
Carbapenems		Imipenem, Meropenem, Doripenem, Ertapenem
Monobactams		Aztreinam
β-ლექტამაზას	Clavulanic acid	
ინჰიბიტორები	Sulbactam	
	Taxobactam	

ეს ანტიბიოტიკები არიან ბაქტერიციდული ნივთიერებები, რომლებიც ახდენენ პეპტიდოგლიკანური შრის სინთეზის ბოლო საფეხურის ინჰიბირებას. ბოლო საფეხურის სინთეზი კი განპირობებულია ტრანსპეპტიდაზით, რომელიც ცნობილია როგორც PBPs (Penicillin-Binding-Proteins), β-ლექტამ ანტიბიოტიკები კი უკავშირდებიან და ბოჭავენ მათ, შედეგად გამოვლინდება უჯრედის კედლის დესტრუქცია (129). ამ ანტიბიოტიკებისაგან თავის დასაცავად *Acinetobacter* spp.-ში რამდენიმე მექანიზმი ჩამოყალიბდა, მათ შორისაა:

მემბრანული განვლადობის ცვლილება: β-lactam ანტიბიოტიკები წარმოადგენენ ჰიდროფილურ მოლეკულებს, რომლებიც უჯრედში ხვდებიან გარე მემბრანული ცილების (OMPs) გავლით, რომლებიც განლაგებულია ბაქტერიულ მემბრანაში. ამ ცილების არარსებობის შემთხვევაში აღინიშნება რეზისტენტობა ამ ანტიბიოტიკების მიმართ (40).

Efflux pump: ენერგიადამოკიდებული ეს მექანიზმი გადაისვრის ანტიბიოტიკების მოლეკულებს უჯრედის გარეთ (40).

სპეციფიკური მოდიფიკაცია: ამ შემთხვევაში აღინიშნება PBPs-ის სპეციფიკური მოდიფიკაცია, რის შედეგადაც ანტიბიოტიკის მოლეკულა ვეღარ ბოჭავს მას (40, 101, 103).

β-ლექტამაზას პროდუქცია: ეს β-ლექტამ ანტიბიოტიკების მიმართ რეზისტენტობის მთავარი მექანიზმია. β-ლექტამაზები სტრუქტურულად მსგავსია PBPs-ისა, სწორედ ამიტომ ანტიბიოტიკის მოლეკულები უკავშირდებიან β-

ლაქტამაზებს და შედეგად ხდება მათი ინაქტივაცია. *Acinetobacter* spp.-ის მიკრობული შტამები ახდენენ 50-ზე მეტი β -ლაქტამაზის პროდუქციას, რომლებიც გაერთიანებულნი არიან 4 კლასში (A,B,C,D). (ცხრილი3) თავისი მნიშვნელობით, ყველაზე საინტერესო კლასია კარბაპენემაზების მაჰიდროლიზირებელი კლასი D, სადაც 4 ქვეჯგუფს გამოყოფენ: OXA51-like, OXA23-like, OXA24-like, OXA58like (11, 128).

ცხრილი 3: კარბაპენემაზების კლასიფიკაცია

β -ლაქტამაზა	კლასი	სამიზნე წამალი	მდებარეობა
TEM-1,-2	A	Aminopenicillins	
SCO-1	A	Penicillins	პლაზმიდა
CARB-5	A	Carboxypenicillins	
PER-1,VEB-1, TEM-92, TEM-116, SHV-12	A	Benzylpenicillins, cephalosporins, Monobactams	პლაზმიდა ან ქრომოსომა
CTX-M-2	A	Cefotaxime, ceftriaxone	პლაზმიდა
IMP	B	Carbapenems	1კლასის ინტეგრონი
SIM-1, VIM-2	B	Carbapenems	1კლასის ინტეგრონი
ADC	C	Cephalosporins	ქრომოსომა
OXA-23-like	D	Carbapenems	პლაზმიდა/ ქრომოსომა
OXA-24-like	D	Carbapenems	პლაზმიდა/ ქრომოსომა
OXA-58-like	D	Carbapenems	პლაზმიდა/ ქრომოსომა
OXA-51-like	D	Carbapenems	პლაზმიდა/ ქრომოსომა

OXA23-like აერთიანებს OXA23, OXA27, OXA49 ენზიმებს, მათი მაკოდირებელი გენები შემღება იყოს მოთავსებული როგორც ქრომოსომულად, ასევე პლაზმიდაშიც. ამ გენის შემცველი *A. baumannii*-ის შტამები გამოყოფილია ევროპაში, სინგაპურში, ჩინეთში, ბრაზილიაში, ავსტრალიაში, აშშ-ში, ალჟირში, ეგვიპტეში, ლიბიაში, აფრიკაში, ტაილანდში, ტუნისში, სამხრეთ კორეაში, კოლუმბიაში, ერაყში (11, 56, 61, 64, 80, 85).

კარბაპენემაზების ქვეჯგუფი OXA24-like აერთიანებს შემდეგ ენზიმებს: OXA24, OXA25, OXA26, OXA40, OXA72. საკმაოდ გავრცელებულია და დნმ-ში bla-oxa24like გენის არსებობა იმიპენემის მიმართ მაღალ რეზისტენტობაზე მიუთითებს. ეს გენი ნანახია ესპანეთში, ბელგიაში, პორტუგალიაში, ჩეხეთის რესპუბლიკაში, საფრანგეთში, აშშ-ში და სხვა ქვეყნებში (25, 64, 128). ამ ნაშრომში უკვე ნაჩვენებია, რომ აღნიშნულ გენს შეიცავს საქართველოში, ჰოსპიტალური პაციენტიდან გამოყოფილი *A. baumannii*-ის შტამიც (69). bla-oxa24like გენი ხშირად წარმოადგენს დნმ-ის მოდულის XerC/XerD-like ნაწილს. სწორედ ეს უბნებია ჩართული ქრომოსომასა და პლაზმიდას შორის მობილიზაციაში და საიტ-სპეციფიკურ რეკომბინაციაში (91). *Carlos Bruin et. al.*-მა (110) აჩვენა, რომ bla-oxa24like გენის გადატანა ერთი შტამიდან მეორეში ხდება გარემომბრუნული ვეზიკულების საშუალებით. სწორედ აღნიშნული მექანიზმებია ჩართული ამ გენის ჰორიზონტალურ გადატანაში და შედეგად, გავრცელებაში.

შედარებით მწირია ინფორმაცია OXA58like-ის შესახებ, თუმცა ნაჩვენებია, რომ საფრანგეთში, ესპანეთში, ბელგიაში, თურქეთში, იტალიაში, ავსტრიაში, საბერძნეთში, ინგლისში, არგენტინაში, ავსტრალიაში, კუვეიტში, პაკისტანში და აშშ-ში ამ გენის შემცველი *A. baumannii*-ის შტამებია იდენტიფიცირებული (64, 96, 123).

A. baumannii-ის ნებისმიერი შტამის ქრომოსომა ბუნებრივად შეიცავს bla_{oxa51like} გენს, სწორედ ამიტომ ეს გენი ამ სახეობის ინდიკატორულ გენადაც მიიჩნევა. ქვეჯგუფი OXA51like აერთიანებს OXA-51,-64,-65,-68,-70,-71,-78,-79,-80,-82,-143 კარბაპენემაზებს (11), თუმცა მათი მაკოდირებელი გენები განსაზღვრავენ იმიპენემრეზისტენტობას მხოლოდ იმ შემთხვევაში, თუ „upstream” მდგომარეობაში შეიცავენ ინსერციულ თანმიმდევრობას ISAbal. მიუხედავად იმისა, რომ OXA51like რეზისტენტობის დაბალი უნარით ხასიათდება, ნაჩვენებია, რომ, თუ კომპლექსი ISAbal-blaOXA51like პლაზმიდაშია მოთავსებული, ეს კარბაპენემების მიმართ მაღალი მდგრადობის მაჩვენებელია, სწორედ ასეთი კომპლექსის შემცველი შტამი გახდა მიკრობული აფეთქების გამომწვევი მიზეზი ტაივანში (20, 69, 124, 125).

თავი 2. *Acinetobacter* spp-ით ინფიცირებული კერიდან გამოყოფილი ბაქტერიები და მათი მნიშვნელობა (*Stenortophomonas maltophilia*)

ხშირ შემთხვევაში, ინფექციური კერიდან *Acinetobacter* spp.-თან ერთად ხდება ისეთი მიკრობის გამოთესვა, როგორიცაა *Stenortophomonas maltophilia* (10, 30, 35). ეს ბაქტერია ფენოტიპით, ჰერელას ნიადაგზე ზრდის მიხედვით *Acinetobacter* spp.-ის მსგავსია და ხშირ შემთხვევაში ამ მიკრობის იდენტიფიცირება და *Acinetobacter* spp.-გან გარჩევა გართულებულია.

Stenortophomonas maltophilia მიეკუთვნება სამეფოს- *Bacteria*, კლასს- *Gammaproteobacteria*, რიგს- *Xanthomonadales*, ოჯახს- *Xanthomonadaceae*, გვარს- *Stenortophomonas*. ის არაფერმენტირებადი, გრამ-უარყოფითი მიკრობია. *Stenortophomonas maltophilia* პირველად გამოყვეს 1961 წელს და მას შემდეგ ეს ბაქტერიული შტამი ცნობილია, როგორც საშიში საავადმყოფოშიდა პათოგენი, პასუხისმგებელი მრავალ ინფექციურ პროცესზე, განსაკუთრებით იმუნიტეტდაქვეითებულ პაციენტებში. ეს მიკრობი არის მიზეზი ისეთი დაავადებებისა, როგორიცაა ბაქტერემია, პნევმონია, ენდოკარდიტი, ოსტეომიელიტი და სხვა (90, 97, 133, 135).

Stenortophomonas maltophilia ხასიათდება მდგრადობით მრავალი ანტიბიოტიკის მიმართ, რაც მათ მიერ გამოწვეული ინფექციების მკურნალობას აართულებს (10, 97). ეს ბაქტერიები რეზისტენტულია კარბაპენემების, ანტიბიოტიკის მიმართ, რომელიც ყველაზე ხშირად გამოიყენება *Acinetobacter* spp.-ით გამოწვეული ინფექციების სამკურნალოდ.

თავი 3. ბაქტერიოფაგები

3.1 ბაქტერიოფაგების კლასიფიკაცია

ანტიბიოტიკორეზისტენტული მიკრობული შტამების გავრცელებამ და თანამედროვე ანტიბაქტერიული საშუალებებით მასთან ბრძოლის სირთულემ განაახლა ინტერესი ფაგოთერაპიის მიმართ. ბაქტერიოფაგები, ანუ მიკრობთა ვირუსები, წარმოადგენენ ზოგადად ვირუსების ყველაზე ფართო ჯგუფს (121, 131). მათი გავრცელების არეალი ფართოა, გავრცელებულია ჰაერში, ნიადაგში, წყალში, განსაკუთრებით ჩამდინარე – საკანალიზაციო წყლებში და მცენარეების ზედაპირზე. მრავალი ფაგი გვხვდება ადამიანისა და ცხოველების სხეულის სხვადასხვა ღრუებში, ნაწლავებში.

ბაქტერიოფაგების პრაქტიკული გამოყენების ერა იწყება მე-20 საუკუნის დასაწყისში, როდესაც კანადური წარმოშობის ფრანგმა მეცნიერმა *D Herelle*-მა (პასტერის ინსტიტუტი, პარიზი) დიზენტერიის გამომწვევი მიკრობების საწინააღმდეგო ვირუსი გამოყო და ამ ფენომენს ბაქტერიოფაგი უწოდა. თუმცა *D Herelle*-მდე ბაქტერიოფაგების მიმართ ინტერესს იჩენდნენ სხვადასხვა მცნიერებიც: 1869 წელს *Hankin*; 1895 წელს *Kruse* და *Pansisni*; 1897 წელს *Emerich* და *Low*. 1915 *Twort* სწავლობდა აგარზე გათესილი სტაფილოკოკის ტრანსფორმაციას ამორფულ მინისებურ გამჭვირვალე მასად, ხოლო 1917 წელს ელიავამ მტკვრის წყალში ვიბრიონის აღმოჩენასთან ერთად აღწერა ბაქტერიოფაგის ფენომენი (14, 74).

1940 წელს ელექტრონული მიკროსკოპის საშუალებით დაზუსტდა ფაგების ვირუსული ბუნება. დროთა განმავლობაში, უფრო და უფრო მეტი ფაგების აღმოჩენამ განაპირობა მათი კლასიფიკაციის აუცილებლობა (14, 74).

ფაგების პირველი კლასიფიკაცია მოგვცა *Holmes*-მა (1948 წელს), სადაც ფაგები დაყოფილი იყო 46 ჯგუფად მათი პატრონი ბაქტერიული უჯრედების წრის და მასპინძელი ბაქტერიებით გამოწვეული დაავადების სიმპტომების მიხედვით. თუმცა მოცემული სქემა არ იყო მისაღები სამეცნიერო საზოგადოებისთვის, რადგან

ვირუსების კლასიფიკაცია უნდა მომხდარიყო ფაგების ფიზიკო-ქიმიურ თავისებურებებზე დაყრდნობით (14, 74).

1962 წელს *Lwoff, Horne* და *Tounier*-მა მოახდინეს ფაგების კლასიფიცირება, რომელსაც საფუძვლად დაედო ნუკლეინის მჟავას ტიპი, კაფსიდის ფორმა და კაპსომერების რაოდენობა (ზოგადად ვირიონის მორფოლოგია) (14, 74). ეს სქემა მოგვიანებით ცნობილი იყო როგორც LHT სისტემა, რომელთა შემადგენლობაში შედიოდა $\Phi X174$ და ორი კუდიანი ფაგი.

1967 წელს *Bredley*-მ მოახდინა ფაგების კლასიფიკაცია, სადაც მან ფაგები დაყო 6 ჯგუფად: ფაგები კუმშვადი წანაზარდით, მოკლე წანაზარდიანი ფაგები, კუბური ფორმის, ერთძაფიანი დნმ-ის შემცველი, რნმ-ის შემცველი და ძაფისებრი (ფილამენტური) ფაგები. ეს კლასიფიკაცია უდევს საფუძვლად დღევანდელი ფაგების კლასიფიკაციას.

1983 წელს *Akermman*-მა ბაქტერიოფაგები განალაგა 190 ტაქსონომიურ ერთეულში, რომლებიც მოიცავდა 2000 ფაგს.

ფაგების თანამედროვე კლასიფიკაციით (1992 ICTV) ფაგები დაყოფილია 13 ოჯახად და 31 გვარად. ეს დამყარებულია შემდეგზე (14, 74):

1. ვირიონის ულტრასტრუქტურა: ბინალური სიმეტრიის (წანაზარდიანი), კუბური, ჰელიკალური (სპირალური), ფილამენტური ან პლეომორფული;
2. ნუკლეინის მჟავას ტიპი: dsDNA, ssDNA, ssRNA;
3. შემადგენლობა და ანტიგენური თვისებები;
4. მოლეკულური მასა;
5. პარტონ უჯრედების წრე.

კუდიანი ფაგები (ბინალური სიმეტრიის) დღესდღეობით დახასიათებული ფაგების დაახლოებით 96%-ს წარმოადგენენ და ფაგოთერაპიაშიც ამ ფაგებს იყენებენ, ისინი მიეკუთვნებიან *Caudovirales*, და ნაწილდებიან სამ დიდ ფილოგენეტიკურად დაკავშირებულ ოჯახში: *Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae* (14, 74, 86, 131).

წანაზარდიანი (კუდიანი) ფაგის კაფსიდი არის იკოსაედრა (ოცწახნაგა) ან მისი დერივატი. კაპსომერი იშვიათად ჩანს. ფაგი შედგება თავის, კუდის და ფაკულტატური სტრუქტურებისგან, როგორიცაა თავის ან კუდის ფიბრილები, საყელო, ბაზალური ფირფიტა, ტერმინალური სპიკები. კაფსიდში სუპერ სპირალურად მოთავსებულია ორძაფიანი დნმ. გენეტიკური რუქა კომპლექსურია.

მსგავსი ფუნქციების მქონე გენები დაჯგუფებულია ერთად. გარსში ლიპიდები ძირითადად არ გვხვდება, მაგრამ ის შეიძლება წარმოადგენილი იყოს გამონაკლისის სახით. კუდიანი ფაგების 1/3 ქლოროფორმ-მგრძნობიარეა. დნმ-ის ზომა ვარირებს 17-500kb შორის, ხოლო კუდის სიგრძე 10-800nm. კუდიანი ფაგები შეძლება იყოს როგორც ვირულენტური, ასევე ზომიერი. კუდიანი ფაგების 50%-ს ზომიერი ფაგები წარმოადგენენ (14, 86, 131).

წანაზარდიანი (კუდიანი) ფაგები იყოფა სამ ოჯახად:

Myoviridae: ფაგები, რომლებსაც აქვს გრძელი კომპლექსური კუდი. კუდი შედგება ცენტრალური ღერძისაგან (არხისაგან) და შეკუმშვის უნარის მქონე შალითისაგან. *Myoviridae*-ს მიეკუთვნება კუდიანი ფაგების 25%-ს. მათი ტიპური წარმომადგენლებია: T2, T4, P1, P2, Mu ფაგები და სხვა. ოჯახში გაერთიანებულია 6 გვარი (14, 74).

Siphoviridae: ფაგები გრძელი, მოქნილი კუდით, რომლის შალითას არ გააჩნია შეკუმშვის უნარი. ამ ოჯახში გაერთიანებულია კუდიანი ფაგების 61% (14, 74). ტიპური წარმომადგენლებია: T1, T5, L5, λ ფაგები და სხვა. ოჯახი მოიცავს 6 გვარს.

Podoviridae: კუდიანი ფაგების 14%-ს წარმოადგენენ, მათთვის დამახასიათებელია მოკლე კუდი. ტიპური წარმომადგენლებია: P22, T7 ფაგები და სხვა. ამ ოჯახში გაერთიანებულია 3 გვარი (14, 74).

ამ სამი ოჯახიდან კაფსიდის ყველაზე დიდი ზომით და დნმ-ის მაღალი შემცველობით ხასიათდება *Myoviridae*, ხოლო *Podoviridae* და *Siphoviridae*, ამ მახასიათებლით ერთმანეთთან უფრო ახლო მსგავსებას ავლენენ (14).

3.2 ბაქტერიოფაგების ბიოლოგია, ლიითური სასიცოცხლო ციკლი

ბაქტერიოფაგის ურთიერთქმედება ბაქტერიულ უჯრედთან მკაცრად სპეციფიკურია, ანუ ბაქტერიულ ვირუსებს აქვთ უნარი მოახდინონ მხოლოდ გარკვეული სახეობის ბაქტერიების ინფიცირება (14, 49, 73, 131, 134). არსებობს ბაქტერიოფაგების განვითარების ორი ციკლი: 1. ლიზისური და 2. ზომიერი.

განვითარების ლიზისური ციკლი იწყება ფაგის მიკრობზე ადსორბციით (14, 49, 131, 134). ბაქტერიოფაგის ადსორბცია პატრონ უჯდერზე მკაცრად სპეციფიკურია

და რეცეპტორების საშუალებით ხორციელდება. გრამ-უარყოფით ბაქტერიაში ნებისმიერი ცილა, ოლიგოსაქარიდი, ლიპოპოლისაქარიდი შეიძლება წარმოადგენდეს რეცეპტორს ფაგისათვის. ადსორბციის სიხშირე ხშირად დამოკიდებულია მრავალ გარემო ფაქტორზე და მასპინძელი მიკრობის ფიზიოლოგიურ მდგომარეობაზე. მაგალითად λ რეცეპტორების ექსპრესია ხდება მხოლოდ მალტოზის შაქრის თანაარსებობისას (74). მრავალი ფაგისთვის სხვადასხვა კოფაქტორების არსებობაა აუცილებელი, მაგალითად Ca^{2+} Mg^{2+} იონების, ან სხვა მარტივი კათიონების. მუტაციების დროს, რომელსაც თან ახლავს ბაქტერიული რეცეპტორების ცვლილება, უჯრედი კარგავს ფაგის ადსორბციის უნარს და იძენს რეზისტენტობას მის მიმართ.

ადსორბციის შემდეგ, ფაგის გენომი კუდის გავლით შედის უჯრედში. ეს პროცესი არ განიხილება როგორც დნმ-ის მარტივი ინექცია, არამედ ამ პროცესში ჩართულია დნმ-ის ტრანსფერის რამდენიმე მექანიზმი (74). ფაგის ადსორბციის შემდეგ, უჯრედის კედლის შემადგენლობაში არსებული თუთიის იონები (Zn^{2+}) იწვევს ფაგის კუდის დისტალური ნაწილის ბოჭკოების გაგლეჯას. გამოთავისუფლებული ბაზალური ფირფიტა კუდის დისტალურ ნაწილში მოთავსებული ფერმენტის ენდოლიზინის (ლიზოციმის) გამოყოფით ახდენს ბაქტერიული უჯრედის კედლის მიმდებარე ფრაგმენტის ლიზირებას. ამავდროულად შალისაში გამოთავისუფლებული Ca^{2+} იონები იწვევს ატფ-აზას აქტივირებას, რაც თავის მხრივ განაპირობებს შალის შეკუმშვას და უჯრედში ციტოპლაზმატური მემბრანის გავლით კუდის ღერძის შეჭრას. ამის შემდგომ ადგილი აქვს ვირუსული დნმ-ის უჯრედის ციტოპლაზმაში სწრაფ გადასვლას (14, 73, 134).

უჯრედში ფაგის დნმ-ის ინექციის შემდეგ საწყის საფეხურს წარმოადგენს მასპინძელის რნმ-პოლიმერაზას მიერ ფაგის პრომოტორის შეცნობა და ადრეული გენების ტრანსკრიფცია (14, 134). ამ გენების პროდუქტები იცავენ ფაგურ დნმ-ს და ახდენენ მასპინძელი უჯრედის რესტრუქტურიზაციას: ინაქტივირებენ მასპინძელი უჯრედის პროტეაზებს, რესტრიქციულ ენზიმებს, შლიან სხვადასხვა ცილებს. შუალედური გენების ტრანსკრიფცია მიმართულია ფაგის ახალი დნმ-ის სინთეზისთვის. შუალედურ გენებს მოყვება გვიანი გენები, რომლებიც უკვე კოდირებენ ფაგური ნაწილაკების ასაწყობ სტრუქტურებს. მასპინძელი უჯრედის

დნმ-ის დეგრადაცია და მატრიცული რნმ-ის ტრანსლაციის ინჰიბირება, ეს ის მექანიზმებია, რომელიც პარალელურად მიმდინარეობს უჯრედში (14, 73, 134).

ვირუსული დნმ-ის სპეციფიკური აფინური უბნები იწვევს ფაგების თავების წინამორბედების თავმოყრის ინდუცირებას ნუკლეინის მჟავების აგრეგატების ირგვლივ. ფაგის ოჯახების უმრავლესობაში ამ სტადიაზე ხდება ნუკლეინის მჟავების შესვლა შექმნილ კაფსიდში და დნმ-ის შემცველი ფაგის თავების წარმოქმნა. დანარჩენ ფაგებში ნუკლეინის მჟავების გარშემო ხორციელდება კაფსიდის კონსტრუირება. შევსებული თავები შემდგომ ურთიერთქმედებს კუდის ნაწილებთან – წარმოიქმნება ფუნქციონალური ფაგი, ანუ ხდება ფაგის აწყობა. ახალი ფაგების თავმოყრას უჯრედში ეწოდება ფაგის მომწიფება. ფაგის დნმ-ის ინჰექციიდან ფაგების ახალი შთამომავლობის გამოთავისუფლებამდე დროის ინტერვალს ეწოდება ლატენტური პერიოდი (73). ლატენტური პერიოდი დამოკიდებულია მასპინძლის ფიზიოლოგიაზე და მერყეობს 20 წთ-დან 30-40 სთ-მდე.

ფაგის სასიცოცხლო ციკლის საბოლოო საფეხურია ფაგის ახალი თაობის გამოთავისუფლება და მასპინძელი უჯრედის ლიზისი (73, 86, 134). კუდიანი ფაგები ლიზისისთვის 2 კომპონენტს იყენებენ: ენზიმ-ლიზინს, რომელსაც პეპტიდოგლიკანური შრის გახლეჩვის უნარი აქვს და ცილა ჰოლინს, რომელიც გარკვეულ შიდა მემბრანაზე ფორების გაჩენით ხელს უწყობს ლიზინს, ადვილად მიაღწიოს პეპტიდოგლიკანურ შრემდე. სხვადასხვა ფაგის შვილეულ პოპულაციებში ვირიონების რაოდენობა მეტ-ნაკლებად მუდმივია და იწოდება, როგორც ფაგის გამოსავლიანობა, ანუ ფაგის გამოსავალი.

ვირულენტური ფაგი შესაძლებელია აღმოჩნდეს ე.წ. ფსევდოლიზოგენურ მდგომარეობაში, რომელსაც ზოგჯერ მტარებლობას უწოდებენ (73, 106). ცნობილია ფსევდოლიზოგენიის რამდენიმე მექანიზმი. ზოგჯერ ის ვითარდება ბაქტერიების ფაგისაგან დროებითი იზოლაციის შედეგად. ეს გამოყოფა შესაძლებელია სუფთა მექანიკურ ხასიათს ატარებდეს, მაგალითად, რომელიმე წებოვანი სუბსტრატი უჯრედებს გარს ეკვრის და ხელს უშლის ფაგებით მათ სწრაფ ინფიცირებას. ხშირ შემთხვევაში ფსევდოლიზოგენიას განსაზღვრავს ე.წ. შიმშილობა, ანუ საკვებით ღარიბი პირობები (106). ასეთ დროს არ არის საკმარისი ენერგია იმისთვის, რომ ფაგმა განახორციელოს თავისი სასიცოცხლო ციკლი და ფაგის გენომი მასპინძელი უჯრედის შიგნით არის არააქტიურ მდგომარეობაში.

3.3 ზომიერი ბაქტერიოფაგები, ტრანსდუქცია

ზომიერი ფაგებისთვის დამახასიათებელია სასიცოცხლო ციკლის 2 გზა: ლიზისური ან ზომიერი. ის, თუ რომელი გზით წარიმართება სასიცოცხლო ციკლი, დამოკიდებულია ბაქტერიული უჯრედის ფიზიოლოგიური მდგომარეობის განმსაზღვრელ მრავალ ფაქტორზე (14, 73). ლიზისური გზის შემთხვევაში, ლიზოგენური ფაგები გადიან განვითარების იგივე ეტაპებს, რასაც ლიტიური ფაგები. ზომიერი სასიცოცხლო ციკლის შემთხვევაში, ფაგური დნმ ინტეგრირდება ბაქტერიულ დნმ-ში პროფაგის სახით და რეპლიცირდება სინქრონულად ბაქტერიულ გენომთან ერთად. სწორედ ამ მოვლენას ლიზოგენია ეწოდება, ხოლო ბაქტერიულ კულტურას ლიზოგენური. ლიზოგენია საკმაოდ სტაბილური თვისებაა და მხოლოდ გარკვეული გარემო ფაქტორების გავლენით აღინიშნება ფაგის ვირულენტობის განმსაზღვრელი გენების სტიმულაცია და ფაგის ინდუქცია (14, 73).

ლიზოგენიის კონცეფციას გააჩნია ცვალებადი ისტორია. ფაგის პირველ მკვლევარებს 1920/1930 წლებში სჯეროდათ, რომ ფაგი დაკავშირებული იყო ბაქტერიასთან და თავად ბაქტერიას ჰქონდა ფაგების სპონტანური გენერაციის უნარი, რომელიც პრინციპში ამ დროს უფრო ფერმენტად მიიჩნეოდა და არა ცოცხალ ვირუსად (14, 73). შემდგომში *Lwoff* და *Gutmann*-მა 1950 წელს მიკროსკოპის ქვეშ *Bacillus megatherium*-ის ცალკეული უჯრედების დაკვირვებისას ნახეს, რომ ეს უჯრედები მრავლდებოდნენ ფაგის პროდუქციის გარეშე, თუმცა გარკვეულ შემთხვევაში მათ შეამჩნიეს უჯრედის სპონტანური ლიზისი და არემი თავისუფალი ფაგი. *Lwoff*-მა ფაგის უჯდერშიდა მდგომარეობას პროფაგი უწოდა და მოგვიანებით აჩვენა, რომ ლიზოგენური უჯრედის ულტრაიისფერი დასხივებით ადგილი ჰქონდა პროფაგის ლიტიური ზრდის ინიციაციას და შედეგად ფაგის ინდუქციას (73). *Esther Lederberg*-მა 1951 წელს გამოიკვლია რა *E.coli K-12* შტამი, ნახა, რომ ის შეიცავდა λ ფაგს (26, 73).

ფაგის ლიტიური თუ ლიზოგენიის სასიცოცხლო ციკლის განვითარებაში მონაწილე მექანიზმები ძირითადად შესწავლილია λ ფაგის მაგალითზე (26, 73). ყველა შემთხვევაში ლიზოგენია არის განსაზღვრული რეპრესორული პროტეინით CI, რომელიც ახდენს ყველა გენის ექსპრესიის რეპრესირებას, რომელიც ლიზოგენიაში არ იღებს მონაწილეობას. CI ცილას გააჩნია მოლეკულური დაპირისპირება Cro

ცილასთან, რომელიც უკვე ლიტიურ გზას უზრუნველყოფს. 1 ფაგის მაგალითზე ნაჩვენებია რომ, ლიზოგენური გზის წარმართვაში მნიშვნელოვანია ასევე CII, CIII ცილები, რომლებიც *cI* გენის პრომოტორის აქტივაციაზე არიან პასუხისმგებლები (14, 26, 73).

ლიზოგენიის მოვლენას ხშირად თან ახლავს ე.წ. ლიზოგენური კონვერსია, რომლის დროსაც აღინიშნება ვირუსული დნმ-ით გამოწვეული ბაქტერიული უჯრედის გენეტიკური თვისებების ცვლილება (16, 39). აღწერილია მრავალი შემთხვევა, როდესაც ბაქტერიათა ვირულენტური თვისებები სწორედ ლიზოგენური ფაგების გენომითაა კოდირებული (16, 39). კლასიკული მაგალითი ლიზოგენური კონვერსიისა არის *Corynebacterium diphtheria*-ს ბაქტერიების მიერ ძირითადი ტოქსინის-ჰისტოტოქსინის სინთეზის უნარი, რომელსაც მხოლოდ ამ ტოქსინის მასინთეზირებელი გენის შემცველი ფაგებით ლიზოგენური ბაქტერიული უჯრედები წარმოქმნიან. ქუნთრუშისმიერი ტოქსინის-ერიტროგენინის სინთეზი ასევე გენეტიკურად დეტერმინირებულია პროფაგით.

ლიზოგენურ ფაგებს უნარი აქვთ გადაიტანონ მასპინძელი უჯრედის გენები ერთი ბაქტერიიდან მეორეში (ტრანსდუქცია) (15, 38, 73, 106, 107). მრავალ ლიზოგენურ ფაგს გააჩნია ინტეგრირებისთვის სპეციფიკური საიტები. პროფაგის ინდუქციის დროს ადგილი აქვს მიკრობის დნმ-ის ნაწილის წამოღებას ფაგის მიერ. ამ შემთხვევაში ტრანსდუქცია მოიხსენიება, როგორც სპეციალიზირებული ტრანსდუქცია (73). სხვა ფაგებისთვის დამახასიათებელი არ არის ინტეგრირებისთვის სპეციალური უბნების არსებობა და ისინი ინტეგრირდებიან ბაქტერიული დნმ-ის ნებისმიერ უბანში, შემთხვევითად. ასეთი სახის ტრანსდუქცია უკვე მოიაზრება, როგორც გენერალიზირებული ტრანსდუქცია (73). ფაგების როლი ბუნებაში, როგორც გენების ჰორიზონტალურად გადამტანებისა, საკმაოდ დიდია, განსაკუთრებით ბაქტერიების ევოლუციის თვალსაზრისით (15, 38, 106, 107).

მიკრობთა ვირუსები მიიჩნევიან ბაქტერიებს შორის გენების, მათ შორის ანტიბიოტიკორეზისტენტული გენების ჰორიზონტალურ გადატანაში მონაწილე ყველაზე მეტად გავრცელებულ ვექტორებად (38, 95, 107). თანამედროვე კვლევები მოწმობს, რომ ფაგები რეზისტენტული გენების რეზერვუარს წარმოადგენს და მონაწილეობს მათ გავრცელებაში, ფილოგენეტიკურად არამონათესავე მიკრობებს შორისაც კი. გენერალიზირებული ტრანსდუქციის არსებობასთან ერთად დიდ

საფრთხეს წარმოადგენს ლიზოგენური ფაგებით განპირობებული ახალი ქიმერული გენის შექმნა (122). ფაგები მონაწილეობენ გენების ჰორიზონტალურ გადატანში, ასევე მათ შეუძლიათ წამოიღონ მასპინძელი უჯრედიდან გენის მხოლოდ ნაწილი. თუ ასეთი ფაგი ინტეგრირდება სხვა ბაქტერიის გენომში, ამან შეიძლება გამოიწვიოს ქიმერული გენის შექმნა. ნაჩვენებია, რომ გენი NDM-1 ქიმერულს წარმოადგენს და რომ მის შექმნას ზემოთ აღნიშნული მექანიზმი უდევს საფუძვლად (122).

ფაგებით გენების ჰორიზონტალური გადატანა საკმაოდ ხშირი მოვლენა უნდა იყოს, რაც ახსნის ანტიბიოტიკორეზისტენტული გენების ასეთ მრავლობითობას და გავრცელების ფართო არეალს (38, 95, 107).

3.4 ფაგოთერაპია

D'Herelle-ს მიერ ფაგის აღმოჩენიდან მალევე დაიწყო მისი გამოყენება დიზენტერიის სამკურნალოდ. სწორედ ეს იყო ფაგის პირველადი თერაპიული გამოყენება (19). ეს კვლევა მიმდინარეობდა პარიზში 1919 წელს. ფაგური პრეპარატის ინექცია ხდებოდა დერელის მიერ. თავდაპირველად რამდენიმე მოხალისე იქნა აცრილი, რათა დაემტკიცებინათ ფაგის უვნებლობა, და მხოლოდ ამის შემდეგ შეუწყვანეს პრეპარატი დიზენტერიით დაავადებულ 12 წლის ბიჭს, რომელიც ფაგოთერაპიის შედეგად რამდენიმე დღეში განიკურნა (1, 19). ფაგების თერაპიული გამოყენების ეფექტურობა კიდევ უფრო გამყარდა მას შემდეგ, რაც დიზენტერიით დაავადებული კიდევ რამდენიმე პაციენტი განიკურნა აღნიშნული მკურნალობის კურსით. თუმცა აღნიშნული წარმატებული შედეგები მაშინვე არ გამოქვეყნებულა, უფრო მეტიც, პირველი ანგარიში, სადაც მითითებულია ფაგოთერაპიის წარმატებული შემთხვევა, გამოიცა 1921 წელს *Riichard Bruynoghe*-სა და *Joseph Maisin*-ის მიერ, რომლებმაც ფაგი გამოიყენეს კანის სტაფილოკოკური დაავადების სამკურნალოდ (19). მალევე ჩატარდა მრავალი მსგავსი კვლევა, რომლის შედეგებიც ხაზს უსვამდა ფაგების დიდ პოტენციალს სხვადასხვა ინფექციების სამკურნალოდ, რამაც ხელი შეუწყო რამდენიმე ფაგური პრეპარატის წარმოებას სხვადასხვა კომპანიების მიერ.

D'Herelle-ს ლაბორატორია უშვებდა 5 სამკურნალო კომერციულ პრეპარატს სხვადასხვა ბაქტერიული ინფექციების სამკურნალოდ (1). ამ პრეპარატებს წარმოადგენდნენ Bacte-coli-phage, Bacte-rhino-phage, bacte-intesti-phage, Bacte-pyophage, Bacte-staphy-phage. სამკურნალო ფაგების წარმოება ასევე მიმდინარეობდა ამერიკის შეერთებულ შტატებშიც, მაგალითად 1940-იან წლებში კომპანია Eli Lilly აწარმოებდა რამდენიმე ფაგურ პრეპარატს, რომლებიც შეიცავდა *Staphylococci*, *Escherichia coli*, *Streptococci* და სხვა ბაქტერიების სპეციფიკურ ფაგებს. ეს პრეპარატები გამოიყენებოდა ისეთი ინფექციების სამკურნალოდ, როგორიცაა აბსცესები, ქრილობები, ვაგინიტები, ქრონიკული ინფექციები, ზედა რესპირატორული ტრაქტის ინფექციები და ა.შ. მაგრამ ანტიბიოტიკების ერამ ადვილად ჩაანაცვლა ფაგოთერაპია, განსაკუთრებით დასავლეთ ევროპაში. თუმცა ფაგების გამოყენება სამკურნალო მიზნით გაგრძელდა აღმოსავლეთ ევროპაში და ყოფილ საბჭოთა კავშირის ქვეყნებში (19, 29, 52, 72, 76, 86). სხვადასხვა ქვეყნის რამდენიმე ინსტიტუტი აქტიურად იყო ჩართული ფაგების კვლევისა და წარმოებაში, ამ ინსტიტუტებიდან მნიშვნელოვანია გ. ელიავას სახელობის ბაქტერიოფაგიის, მიკრობიოლოგიისა და ვირუსოლოგიის ინსტიტუტი საქართველოში და ჰირსფილდის იმუნოლოგიისა და ექსპერიმენტული თერაპიის ინსტიტუტი ვროცლავში, პოლონეთში (19, 29, 71, 72, 76, 118, 119).

ელიავას ინსტიტუტი დაარსა გიორგი ელიავამ 1923 წელს (19, 71, 76). ინსტიტუტის განვითარების საქმეში დიდი წვლილი შეიტანა *D'Herelle*-მა, მან რამდენიმე თვე გაატარა საქართველოში, თანამშრომლობდა რა ელიავასთან და სხვა ქართველ მეცნიერებთან, აპირებდა მუდმივად საქართველოში დასახლებას, თუმცა 1937 წელს ელიავა დააპატიმრეს, გამოაცხადეს „ხალხის მტრად“ და დახვრიტეს. ამის შემდეგ *D'Herelle* არასდროს აღარ დაბრუნებულა საქართველოში. მიუხედავად ამისა, ინსტიტუტი გადარჩა და მოგვიანებით გახდა მსოფლიოში ერთ-ერთი ყველაზე დიდი ინსტიტუტი, რომელშიც მიმდინარეობდა ფაგის კვლევა, სამკურნალო-პროფილაქტიკური დანიშნულების ფაგის პრეპარატების წარმოება და მისი გამოყენება სამკურნალო მიზნით (19, 71, 76).

ჰირსფილდის ინსტიტუტი დაფუძნდა 1952 წელს და მისი მომსახურე პერსონალი ფაგოთერაპიის კვლევაში ჩაერთო 1957 წლიდან, მას მერე რაც ფაგი სამკურნალოდ გამოიყენეს შიგელოზების დროს (76). დღემდე ამ ინსტიტუტში

მიმდინარეობს ფაგის ისეთი პრეპარატების წარმოება, რომლებიც ფართოდ გამოიყენება სეპტიცემიის, სასუნთქი გზების და შარდ-სასქესო ტრაქტის და სხვა ინფექციების პროფილაქტიკისა და სამკურნალოდ. საკმაოდ ბევრი საინტერესო პუბლიკაციაა გამოქვეყნებული ამ ინსტიტუტის სამეცნიერო კვლევების შესახებ (29, 76).

ინფექციურ პათოლოგიაში ბაქტერიოფაგის გამოყენების რეკომენდაციები დაფუძნებულია იმ გამოცდილებაზე, რაც დაგროვდა მრავალი წლის მანძილზე. დღეისთვის ბაქტერიოფაგები წარმატებით გამოიყენება ჩირქოვან-ანთებითი, ინფექციების, ნაწლავური და შარდ-სასქესო გზების ინფექციური ანთებითი პროცესების სამკურნალოდ (12, 52, 76, 94, 118, 119). გამოყენების არეალის მიხედვით ფორმულირებულია ფაგის პრეპარატები, რომლებიც ათწლეულებია ფართოდ გამოიყენება საქართველოში. ყველაზე ხანგრძლივი ისტორია გააჩნია პიოფაგს და ინტესტიფაგს. ეს პრეპარატები ჯერ კიდევ 1930 წელს შექმნა დერელმა და დღესაც წარმატებით იწარმოება (76).

ინტესტიფაგი შეიცავს შიგელების, სალმონელების, ნაწლავის ჩხირის, პროტეუსის, ფსეუდომონას აერუგინოსას, სტაფილოკოკისა და ენტეროკოკის ფაგებს და გამოიყენება დიზენტერიის, სალმონელოზის, დისპეპსიის, კოლიტის და ენტეროკოლიტის სამკურნალოდ. მსგავსი დანიშნულება გააჩნიათ ასევე შემდეგ პრეპარატებს: ენტერობაქტერიოფაგი, ეკნოფაგი.

პიოფაგი შეიცავს სტაფილოკოკურ, სტრეპტოკოკურ, ფსეუდომონას, პროტეუსის და ნაწლავის ჩხირის ბაქტერიოფაგებს და ეს პრეპარატი გამოიყენება კანის ინფექციური დაავადებების, ჩირქოვანი გართულებული ჭრილობების, პლევრიტების, მასტიტების, ქოლევსტიტების, ოსეომიელიტის, სტომატიტის, რინიტების და სხვათა დროს.

ელიავას ინსტიტუტი აწარმოებს აგრეთვე მოგვიანებით შექმნილ შემდეგ პრეპარატებს: სტაფილოფაგი, სეს ფაგი, ფერსისი. აღნიშნული პრეპარატები ფართოდაა დანერგილი სამედიცინო პრაქტიკაში.

3.5 *Acinetobacter* spp.-ის სპეციფიკური ფაგების ზოგადი მიმოხილვა

Acinetobacter spp.-ის სპეციფიკური ფაგების გამოყოფა-დახასიათებას დიდი ხნის ისტორია აქვს. თავდაპირველად ამ ფაგებს იყენებდნენ ფაგოტიპირებისთვის. დღეისათვის სამეცნიერო ჟურნალებში მხოლოდ რამდენიმე პუბლიკაციაა ხელმისაწვდომი, რომელიც *Acinetobacter*-ის ფაგების დახასიათებას ეხება.

1994 წელს *Ackermann*-მა მოახდინა *Acinetobacter* spp.-ის 8 ფაგის კლასიფიცირება მორფოლოგიის მიხედვით და აჩვენა, რომ რვავე ფაგი *Caudovirales* -ს მიეკუთვნებოდა და 4 მათგანი წარმოადგენდა *Myoviridae*-ს, 3- *Siphoviridae* -ს, 1 კი მიეკუთვნებოდა *Podoviridae*-ს ოჯახს (2).

2002 წელს *A. genomospecies 16*-დან გამოყვეს ერთჯაჭვიანი რნმ-ის შემცველი ფაგი, რომელიც მორფოლოგიით *levivirus*-ს მიეკუთვნებოდა(68).

ფაგი *ABI*- დახასიათებულია 2010 წელს *Hongjiang Yang et al.* -ის მერ (18, 79). ფაგი წარმოადგენს ორჯაჭვიან დნმ-ის მქონე ვირუსს, 45,2-46,9kb გენომით. მორფოლოგიის მიხედვით განეკუთვნება *Siphoviridae*-ს ოჯახს. ბიოლოგიური მახასიათებლებიდან მნიშვნელოვანია: ადსორბციის პერიოდი 10წთ, ლატენტური პერიოდი 18 წთ და მაღალი გამოსავლიანობა-409 ფაგური ნაწილაკი. ფაგის გამრავლების ოპტიმალური pH არის 6,0. ფაგი მდგრადია მაღალი ტემპერატურის მიმართ, ფაგების რაოდენობის 73,2% ინარჩუნებს აქტივობას 50°C-ზე 1 საათის განმავლობაში. *ABI* ხასიათდება მოქმედების ვიწრო სპექტრით.

ფაგი *AB2*: ამ ფაგისთვის დამახასიათებელია იზომეტრული თავი (60ნმ), მოკლე კუდი (დიამეტრი 9ნმ, სიგრძე 11ნმ), ორჯაჭვიანი 40kb დნმ, რომელიც *Podoviridae*-ს მიეკუთვნება. ნაწილობრივი სექვენსის შედეგებზე დაყრდნობით შედის *φKMV*-like ფაგების ჯგუფში. ბიოლოგიური თვისებებიდან მნიშვნელოვანია: სწრაფი ადსორბცია-99% ფაგებისა ადსორბირდება 8 წუთში, მოკლე ლატენტური პერიოდი - 10 წუთი და მაღალი გამოსავლიანობა -200 ფაგური ნაწილაკით (81). ამ ფაგიდან გამოყოფილია და შესწავლილია ენდოლიზინი *LysAB2*, როგორც ნაჩვენებია (77), ეს ცილა ხასიათდება მაღალი ბაქტერიოციდული აქტივობით როგორც გრამ-უარყოფითი, ასევე გრამ-დადებითი ბაქტერიების მიმართ. *LysAB2* მდგრადია 20-40°C ტემპერატურულ გრადიენტში, ოპტიმალური pH=6.0, თუმცა აქტივობას ინარჩუნებს pH=4-8. დახასიათებულია ასევე 2010 წელს.

ფაგი AP22: გააჩნია 645მ იკოსაჰედრული თავი და 85-90ნმ კუმშვადი კუდი, ამ ფაგს *Myoviridae*-ს ოჯახს მიაკუთვნებენ. იგი შეიცავს 46kb ორჯაჭვიან დნმ-ს. დამახასიათებელია სწარფი ადსორბცია (5 წუთი), 40 წუთიანი ლატენტური პერიოდი და მაღალი გამოსავლიანობა 240 ფაგური ნაწილაკით. აქტივობას ინარჩუნებს სხვადასხვა pH-ის პირობებში (pH=4-9). მისთვის დამახასიათებელია მოქმედების ფართო სპექტრი: 68% (130 შტამიდან იგი აქტიურია 89-ს მიმართ) (104).

ფაგი ZZ1 დახასიათებულია 2012 წელს (58), მიეკუთვნება *Myoviridae*-ის ოჯახს, ამ ფაგისთვის დამახასიათებელია მოკლე ლატენტური პერიოდი (9 წუთი) და მაღალი გამოსავლიანობა (200ფაგური ნაწილაკი), გამძლეობა სხვადასხვა pH-სა (4-9) და ტემპერატურის პირობებში.

2012 წელს გამოქვეყნდა რამდენიმე სამეცნიერო ნაშრომი, რომლებიც ეძღვნება *Acinetobacter*-ის ფაგების ბიოლოგიასა და ბიოფილმებზე მათი გავლენის შესწავლას (34, 57, 58, 67, 79, 114, 120, 132).

აღნიშნული ინფორმაცია კიდევ ერთელ ხაზს უსვამს ბოლო წლებში მსოფლიო სამეცნიერო წრეში ფაგების მიმართ გაძლიერებულ ინტერესს.

მეთოდოლოგია

თავი 1. გამოყენებული მასალები

ნაშრომში სულ გამოყენებულია 210 *Acinetobacter* spp.-ის, 20 *Pseudomonas aeruginosa*, 20 *E. coli*, 10 *Salmonella* spp, 10 *Klebsiella* spp კლინიკური შტამი, ყველა მათგანი დღეს გ. ელიავას ბაქტერიოფაგიის, მიკრობიოლოგიისა და ვირუსოლოგიის ინსტიტუტის კოლექციას წარმოადგენს. 210 *Acinetobacter* შტამის გამოყოფის წყარო განსხვავებულია, უმეტესი მათგანი საავადმყოფოსშიდა ეთიოლოგიისა და მოწოდებულია სხვადასხვა ქვეყნის საავადმყოფოებისა და ინსტიტუტების კოლექციიდან. 210 ბაქტერიული შტამიდან 140 *Acinetobacter* spp. გამოყოფილია ვიეტნამში, 10 - ერაყში, 50 - საფრანგეთში, 4 -ბელგიაში და 6 შტამი საქართველოში.

A.baumannii შტამების ანტიბიოტიკომგრძნობელობის შესასწავლად გამოყენებულ იქნა შემდეგი ანტიბიოტიკები: rifampicin; ceftazidime; piperacillin piperacillin/tazobactam; sulfamethoxazole/trimethoprim; norfloxacin; fosfomycin; colistin; ciprofloxacin; tobramycin; ticarcillin; imipenem; gentamicin, amikacin.

ნაშრომში დახასიათებულია 6 ფაგი: *vB_Sm-P-18*; *vB_Ab-S-31*; *vB_Ab-S-14*; *vB_Ab-M-40*; *vB_Ab-M-G7*; *vB_Ag-S-7*. ფაგები *vB_Ab-M-G7* და *vB_Ag-S-7* ინახება გერმანიის DSMZ საკოლექციო ბაზაში, შემდეგი ნომრით: DSM25639 და DSM25640.

კვლევაში გამოყენებული საკვები ნიადაგები და რეაქტივები:

1. Brain Heart Infusion Broth/Agar (Difco);
2. Herellae Agar;
3. რესტრიქციული ენდონუკლეაზები: EcoR I, HindIII, Spe1;
4. მემბრანული ფილტრები, ფორების ზომით 0,45μ და 0,22μ;
5. ანტიფაგური შრატი;
6. ადიუვანტი (Freund's adjuvant, Difco);
7. პოლიმერაზა ჯაჭვური რეაქციის (PCR) პრაიმერები (ცხრილი 4);
8. ფაგის დნმ-ის გამოსაყოფი კიტი-High Pure Viral Nucleic Acid Qiagen Kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France);

9. PCR-ის პროდუქტის გასასუფთავებელი კიტი-QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France);
10. პლაზმიდის გამოსაყოფი კიტი- QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN);
11. იმიპენემის შემცველი Etest-ის ფირფიტა.

ცხრილი 4: კვლევაში გამოყენებული PCR-ის პრაიმერები

გენი	პრაიმერი	პრაიმერის სეკვენსი	PCR-ის პროდუქტის ზომა	წყარო
bla _{OXA51-like}	OXA51 _{like} -F	TAATGCTTTGATCGGCCTTG	353bp	(125)
	OXA51 _{like} -R	TGGATTGCACTTCATCTTGG		
bla _{OXA23like}	OXA23 _{like} -F	GATCGGATTGGAGAACCAGA	501bp	(69)
	OXA23 _{like} -R	ATTTCTGACCGCATTTCCAT		
bla _{OXA24-like}	OXA24-F	ATGAAAAAATTTATACTTCCTATATTCAGC	825bp	(69)
	OXA24-R	TTAAATGATTCCAAGATTTTCTAGC		
bla _{OXA58}	OXA58-F	AGTATTGGGGCTTGTGCT	453bp	(69)
	OXA58-R	AACTTCCGTGCCTATTTG		
ISab _a 1	ISab _a -F	CATTGGCATTAAACTGAGGAGAAA	451bp	(69)
	ISab _a -R	TTGGAAATGGGGAAAACGAA		
ATPase	ATPase-F	GGGTCTTGCAGTTCTTGAGC	196bp	ამ შრომაში
	ATPase-R	CTTATCCGGCGAACTTTTCAG		
bla _{NDM-1}	NDM1-F	GCGCAACACAGCCTGACTTT	155bp	(69)
	NDM1-R	CAGCCACCAAAAGCGATGTC		
	probe	Fam-CAACCGCGCCCACTTTGGC-TAMRA		
16s RNA	536F	CAGCAGCCGCGGTAATAC	1000 bp	(9)
	Rp2	ACGGCTACCTTGTTACGACTT		
Prph1	Prph1-F	ACCATTAATAATTGACACTAAATGCT	849bp	ამ შრომაში
	Prph1-R	ATTCTTGGTGCCACGGATG		
Prph2	Prph2-F	TTGATCTTATCCCACACTTGC	844bp	ამ შრომაში
	Prph2-R	CGATGACATTTTCGGAACG		
Prph3	Prph3-F	AACGGATCAGCATTACCATT	844bp	ამ შრომაში
	Prph3-R	GCCCGTGGGCTACTTACTTT		

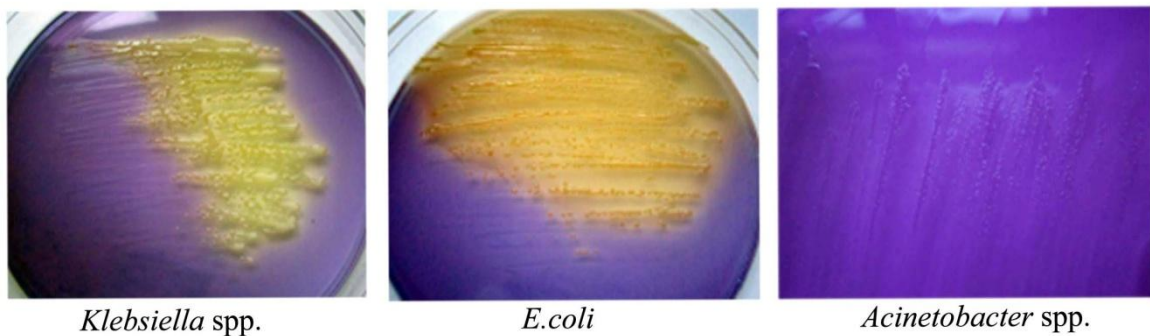
Prph4	Prph4-F	GGTCGTCACAAGAAGGCAGT	993bp	ამ შრომაში
	Prph4-R	GGCCAACGATTTTTCAGAAC		

თავი 2. ბაქტერიული შტამების დასახასიათებლად გამოყენებული მეთოდები

2.1 ბაქტერიული შტამების იდენტიფიკაცია

Acinetobacter spp.-ის ბაქტერიული შტამების საიდენტიფიკაციოდ გამოვიყენეთ *Herellae*-ს საიდენტიფიკაციო საკვები აგარი, რომელზეც *Acinetobacter* spp. იძლევა იასამნისფერ-მოვერცხლისფრო კოლონიებს (54). (ილუსტრაცია 1)

ილუსტრაცია 1: *Acinetobacter* spp-ის დამახასიათებელი ზრდა *Herellae*-ს აგარზე.



ბაქტერიული შტამების სახეობის დონეზე იდენტიფიკაციისთვის გამოვიყენეთ მას-სპექტრომეტრი (112) და PCR-ის (პოლიმერაზა ჯაჭვური რეაქცია) მეთოდი სპეციფიკური პრაიმერების გამოყენებით(125) (ცხრილი4).

მას-სპექტრომეტრი 1980-იანი წლებიდან გამოიყენებოდა სამეცნიერო კვლევაში ცილების შესასწავლად (112). ბოლო დროს მეცნიერებმა დაიწყეს მისი გამოყენება ბაქტერიების საიდენტიფიკაციოდ (70, 112). ეს არის ბაქტერიების იდენტიფიკაციის სწრაფი და იაფი მეთოდი. უფრო მეტიც, ის საშუალებას იძლევა

მოახდინოს შტამის იდენტიფიკაცია უშუალოდ კლინკურ მასალაში. მას-სპექტრომეტრის დადებით შედეგად ითვლება მაჩვენებელი $>1,9$. თითოეულ შტამზე მიღებული შედეგი შედარდა და გაანალიზდა კომპიუტერული პროგრამის გამოყენებით Biotyper 2.0 software, რომელიც ასევე იქნა გამოყენებული დენდროგრამის შესადგენად (70, 112).

A. baumannii-ის შტამებისთვის დამახასიათებელია მათ ქრომოსომაში bla_{OXA51like} გენის არსებობა (125). სწორედ ამ გენის სპეციფიკური პრაიმერები იქნა გამოყენებული *A. baumannii*-ის საიდენტიფიკაციოდ.

2.2 ანტიბიოტიკომგრძნობელობის განსაზღვრა

ანტიბიოტიკომგრძნობელობა იქნა შესწავლილი დისკო-დიფუზური მეთოდის გამოყენებით, სადაც 14 სხვადასხვა ანტიბიოტიკი იქნა გამოყენებული, მათ შორის: rifampicin, amikacin, piperacillin/tazobactam, gentamicin, piperacillin, colistin, tobramycin, norfloxacin, fosfomycin, imipenem (IMP). მგრძნობელობის მაჩვენებლები გამოითვალა „ანტიბიოტიკების მგრძნობელობის ტესტის ევროპული კომიტეტის“ (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) დებულების შესაბამისად, რომლის მიხედვითაც, მაგალითად, IMP-სთვის შტამი ითვლება რეზისტენტულად, თუ ინჰიბიტორული ზონის დიამეტრი არის <17 მმ და მგრძნობიარედ, თუ დიამეტრი არის ≥ 22 მმ. ყველა იმ შტამზე, რომლის ინჰიბიტორული ზონის დიამეტრი იყო 17მმ-ზე ნაკლები, განისაზღვრა მინიმალური ინჰიბიტორული კონცენტრაცია (MICs) Etest-ის საშუალებით.

Etest არის ლაბორატორიული ტესტი, რომელიც გამოიყენება მიკრობების ანტიბიოტიკომგრძნობელობის და ანტიბიოტიკის მინიმალური ინჰიბიტორული კონცენტრაციის დასადგენად. ეს ტესტი ძირითადად დაფუძნებულია აგარ-დიფუზური მეთოდზე და წარმოადგენს მართკუთხედის ფორმის წვრილ ქაღალდს, რომელიც გაჟღენთილია შესასწავლი ანტიბიოტიკით. პეტრის ფინჯანზე კეთდება ბაქტერიის გაზონი და ზედ თავსდება ტესტერი. პრეპარატი დიფუზიის გზით გამოდის აგარის ზედაპირზე. 24 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ, ტესტერის ირგვლივ შეიმჩნევა ოვალური ინჰიბიტორული ზონა და ტესტერის ის მაჩვენებელი,

რომელთანაც მთავრდება ლიზისური ზონა, მიიჩნევა პრეპარატის მინიმალურ ინჰიბიტორულ კონცენტრაციად.

მინიმალური ინჰიბიტორული კონცენტრაცია არის ანტიბიოტიკების ის რაოდენობა, რომელსაც შეუძლია მოახდინოს მიკროორგანიზმის ზრდის ინჰიბირება 24 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ.

2.3 ანტიბიოტიკორეზისტენტული გენების მოლეკულური გამოვლენა

bla_{oxa51like}, bla_{oxa23like}, bla_{oxa24like}, bla_{oxa85}, ISAba1, ATPase გენების და აგრეთვე პროფაგების გენების ამპლიფიკაციისთვის გამოყენებული იქნა სპეციფიკური პრაიმერები.

დადებითი პოლიმერაზა ჯაჭვური რეაქციის პროდუქტები გასუფთავდა კიტის გამოყენებით QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France) და დასექვენირდა ABI 3100 Automated Sequencing (Applied Biosystems, Foster City, CA) გამოყენებით. სექვენსის შედეგები გაანალიზდა კომპიუტერული პროგრამების გამოყენებით, რომელიც ხელმისაწვდომია ინტერნეტის საშუალებით. BlandM-1 გენის გამოსავლენად გამოვიყენეთ Real-time PCR, შესაბამისი სპეციფიკური პრაიმერები და TaqMan probe (ცხრილი 4).

2.4 პლაზმიდის გამოყოფა, ტრანსფორმაცია

პლაზმიდური დნმ გამოვყავით მიკრობიდან კიტის გამოყენებით (QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN)). ქრომოსომული დნმ-ით დაბინძურების გამოსარიცხად, გამოყოფილი პლაზმიდის სისუფთავე შემოწმდა ელექტროფორეზით 0,7% აგაროზის გელზე. თითოეული პლაზმიდა შემოწმდა იმიპენემ რეზისტენტული გენების არსებობაზე პოლიმერაზა ჯაჭვური რეაქციის საშუალებით. გასუფთავებული პლაზმიდები გამოყენებულ იქნა ტრანსფორმაციისთვის იმიპენემ მგრძნობიარე *A.baumannii*-ის შტამებში. ტრანსფორმაციისთვის გამოვიყენეთ ქიმიური გზა: 50მკლ რეციპიენტი შტამი 5მკლ პლაზმიდასთან ერთად დავაყოვნეთ ყინულზე 30წუთი, შემდეგ 30 წამით გადავიტანეთ 42°C პირობებში და შემდეგ კვლავ ყინულზე 2 წუთის

განმავლობაში, დავამატეთ 450 მკლ ბულიონი და დავტოვეთ თერმოსტატში 37°C-ზე 1 საათით. დავაცენტრიფუგირეთ და ნალექი გავთესეთ იმიპენემის შემცველ აგარზე (8მკგ/მლ)(69). ფინჯნებზე 24 საათის შემდეგ კოლონიების არსებობა მიუთითებდა წარმატებულ ტრანსფორმაციაზე. აღნიშნული კოლონიები შემოწმდა იმიპენემის რეზისტენტობის გენების არსებობაზე.

თავი 3. ბაქტერიოფაგების დასახასიათებლად გამოყენებული მეთოდები

3.1 ბაქტერიოფაგების გამოყოფა

ბაქტერიოფაგების გამოყოფა მიმდინარეობდა ადამსის მეთოდით: 90მლ ჩამდინარე წყალი, 10მლ კონცენტრირებულ ბულიონთან და 1მლ მიკრობულ კულტურასთან ერთად კულტივირდება 37°C-ზე. 18 საათის შემდეგ ხდება ნარევის ცენტრიფუგირება 5000g -ზე 30წუთის განმავლობაში. სუპერნატანტის მემბრანულ ფილტრებში ფილტრაციის შემდეგ ფილტრატი მოწმდება ფაგის შემცველობაზე (44, 62, 63).

3.2 ბაქტერიოფაგების გამოვლენა, მოქმედების დიაპაზონის შესწავლა

ფაგის აქტივობის/არსებობის შესასწავლად საკვლევი შტამის მიმართ გამოიყენება “Spot Test“ (44, 75), რომლის დროსაც, მიკრობული შტამის 18 სთ-იანი ბულიონიანი კულტურა ნახევრად თხიერ აგართან ერთად გადააქვთ 2%-იან აგარიან პეტრის ფინჯანზე და აწვეთებენ საკვლევ ფილტრატებს 5-10μl ოდენობით. ფინჯანს ათავსებენ თერმოსტატში. 24 საათის შემდეგ, ფაგის არსებობის შემთხვევაში, პეტრის ფინჯანზე შეინიშნება ლიზისური უბნები, რომლის რადიუსის მიხედვით შეიძლება განისაზღვროს ფაგის აქტივობის ხარისხი.

3.3 ბაქტერიოფაგის ტიტრის განსაზღვრა

3.3.1 გრაციას მეთოდი

ფაგის ტიტრის დასადგენად გამოიყენება გრაციას მეთოდი, რომლითაც განისაზღვრება ფაგური ნაწილაკების რაოდენობა 1მლ-ში: ხდება საკვლევი ფაგის ლიზატის 10-ჯერადი განზავება (10^1 დან 10^{10} მდე). სათანადო ნაზავიდან 1მლ გადააქვთ სტერილურ სინჯარაში, ემატება 0,1მლ მილიარდიანი კულტურა და 5მლ ნახევრად თხიერი აგარი (0,7%). სინჯარის სწრაფი შენჯღრევის შემდეგ, ნარევი დააქვთ 2% აგარიან პეტრის ფინჯანზე. 30წთ-ის შემდეგ ფინჯანი თავსდება თერმოსტატში. შედეგების დათვლა ხდება 18-24 საათში. ფაგის ტიტრი განისაზღვრება ფაგის ნეგატიური კოლონიების რაოდენობით (62, 63).

3.3.2 აპელმანის მეთოდი

აპელმანის მეთოდით ისაზღვრება ფაგის ის უმაღლესი განზავება, რომელიც თრგუნავს მიკრობული კულტურის ზრდას მოცემული ცდის პირობებში. ამ დროს მიღებული სიდიდე გამოიხატება 10-ის უარყოფითი ლოგარითმით, სადაც ხარისხი ფაგის განზავების მაჩვენებელია. მეთოდი მოიცავს შემდეგ საფეხურებს: ხდება ფაგის 10ჯერადი განზავება, თითოეულ სინჯარას ემატება 0,1მლ 10^8 cfu/ml კულტურა. სინჯარების თერმოსტატში 18 საათიანი კულტივირების შემდეგ შედეგები განისაზღვრება სინჯარებში გამჭვირვალობის ხარისხით კულტურის კონტროლთან შედარებით.

3.4 ბაქტერიოფაგის გამრავლება/კონცენტრირება

კონცენტრატის მომზადება ხდება ორშრიანი აგარის მეთოდის გამოყენებით. საკვლევი ფაგის ლიზატის 10-ჯერადი განზავების შემდეგ (10^1 დან 10^{10} მდე) სათანადო ნაზავიდან 0,1მლ გადააქვთ სინჯარაში, უმატებენ 1მლ მილიარდიან კულტურას და 5მლ ნახევრად თხიერი აგარს (0,7%). თერმოსტატში 24 საათიანი კულტივირების შემდეგ ხდება მიღებული კონცენტრატის გასუფთავება 5000g-ზე 30წთ

ცენტრიფუგირებით და შემდგომ სუპერნატანტის ფილტრაციით მემბრანული ფილტრის გამოყენებით.

3.5 ელექტრონული მიკროსკოპია

ვირიონის მორფოლოგიის შესასწავლად გამოიყენება ელექტრონული მიკროსკოპია. კვლევისთვის გამოსადეგია მაღალტიტრიანი ($1 \cdot 10^9$ pfu/ml) ფაგის ლიზატი. 5მკლ მასალა დაიტანება პიოლოფორმით დაფარულ ბადეზე, ირეცხება ბიდისტილირებული წყლით, ემატება 1%-იანი ურანილის აცეტატის 2 წვეთი და შრება ჰაერზე. სინჯების დათვალიერება ხდება ელექტრონული მიკროსკოპით JEOL JEM 1400 TEM ში 80kV-ზე.

3.6 ბაქტერიოფაგების სეროლოგიური ნათესაობის შესწავლა

აღნიშნული მეთოდი მოიცავს 2 ეტაპს: ცხოველთა იმუნიზაციას და ნეიტრალიზაციის რეაქციას (63).

ა. ცხოველთა იმუნიზაციის შედეგად ხდება ანტიფაგური შრატის მიღება. გამოიყენება 1,5-2კგ წონის ბოცვრები (2-3 ბოცვერი 1 ანტიფაგური შრატის მისაღებად). ცდის განმავლობაში ხდება ბოცვრების 2ჯერადი იმუნიზაცია. პირველი იმუნიზაციისთვის გამოიყენება ფაგისა ($1 \cdot 10^{11}$ pfu/ml ფიზიოლოგიურ ხსნარში) და ადიუვანტის (Freund's adjuvant, Difco) ნარევი პროპორციით 1:1. ნარევი შეჰყავთ ბოცვრის უკანა თათის კუნთში. პირველადი იმუნიზაციიდან 3-4 კვირის შემდეგ ხდება მეორადი იმუნიზაცია, ამჯერად ადიუვანტის გარეშე და შეჰყავთ 1მლ ფაგი ინტრავენურად. რეიმუნიზაციიდან 2 კვირის შემდეგ ბოცვრების გულის მარცხენა პარკუჭიდან იღებენ სისხლს. მიღებულ შრატს ამოწმებენ ანტიფაგური ანტისხეულების არსებობაზე ნეიტრალიზაციის რეაქციით.

ბ. ნეიტრალიზაციის რეაქცია: 0,1მლ ფაგს ტიტრით $1 \cdot 10^7$ pfu/ml ემატება 0,9მლ შრატი გარკვეული განზავებით (1:50, 1:100, 1:500). დროის გარკვეულ ინტერვალებში (0',5',10',20') აიღება 0,1მლ სინჯი, ზავდება შესაბამისად და გადაიტანება პეტრის

ფინჯნებზე ბაქტერიულ კულტურასთან ერთად ორშრიანი აგარის მეთოდით. პარალელურად იდგმება ფაგის კონტროლი, სადაც შრატის მაგივრად გამოიყენება ფიზიოლოგიური ხსნარი. 37°C 18 საათიანი კულტივირების შემდეგ ითვლება ფაგის ნეგატიური კოლონიები და განისაზღვრება ნეიტრალიზაციის პროცენტი კონტროლთან შედარებით.

3.7 ბაქტერიოფაგების სტაბილურობის შესწავლა ქლოროფორმის ზემოქმედებისას, სხვადასხვა ტემპერატურისა და pH-ის პირობებში

ა. ფაგის აქტივობა ქლოროფორმის ზემოქმედებისას: 0,1მლ ფაგურ ლიზატს ემატება 9,9მლ ბულიონი და 0,4მლ ქლოროფორმი. დროის გარკვეულ ინტერვალში (0', 5სთ, 24სთ) ხდება 0,1მლ სინჯის აღება და ფაგის ტიტრის განსაზღვრა გრაციას ორშრიანი აგარის მეთოდით. პარალელურად იდგმება ფაგის კონტროლი, სადაც ქლოროფორმის ნაცვლად ემატება ფიზიოლოგიური ხსნარი.

ბ. ფაგის აქტივობა სხვადასხვა ტემპერატურის პირობებში: ფაგის აქტივობა განისაზღვრა 37°C, 50°C, 70°C ტემპერატურის პირობებში. გამოყენებული იქნა ფაგის ლიზატი ტიტრით $1 \cdot 10^8$ pfu/ml. ფაგის ლიზატს ათავსებენ ზემოთ აღნიშნულ ტემპერატურულ პირობებში და დროის გარკვეულ ინტერვალში (0', 5სთ, 24სთ) ხდება სინჯების აღება და ფაგის აქტივობის განსაზღვრა გრაციას ორშრიანი აგარის მეთოდით.

გ. ფაგის აქტივობის განსაზღვრა სხვადასხვა pH-ის პირობებში- 9,9მლ სხვადასხვა pH-ის (pH 3', 5', 7', 9', 11') მქონე საკვებ ბულიონში შეტანილ იქნა 0,1მლ ფაგის ლიზატი ტიტრით $1 \cdot 10^9$ pfu/ml. სინჯები იღებოდა დროის გარკვეულ ინტერვალში (0', 30წთ, 5სთ, 24სთ) და გრაციას ორშრიანი აგარის მეთოდის გამოყენებით ისაზღვრებოდა ფაგის აქტივობის ცვლილება.

ფაგის აქტივობის ცვლილება სამივე შემთხვევაში განისაზღვრა პროცენტულად კონტროლთან შედარებით.

3.8 ფაგის ერთჯერადი გამრავლების ციკლი

3.8.1 ადსორბცია

ფაგის ლიზატი $1 \cdot 10^7$ pfu/ml და ბაქტერიულ შტამი $1 \cdot 10^8$ cfu/ml თანაბარი რაოდენობით 1:1, თავსდება 37°C -ზე წყლის აბაზანაში და სინჯები იღება დროის გარკვეულ ინტერვალში (0', 3', 5', 7', 10', 12' (' წთ)): 0,1მლ სინჯი შეიტანება 9,9მლ ბულიონში, ემატება 0,4მლ ქლოროფორმი და 10 წუთის განმავლობაში ყოვნდება ყინულში. შემდეგ ზავდება და სინჯი შესაბამისი განზავებიდან გადაიტანება ფინჯანზე გრაციას ორშრიანი აგარის მეთოდით. პარალელურად იდგმება კონტროლი, სადაც ქლოროფორმის მაგივრად გამოყენებულია ფიზიოლოგიური ხსნარი. შედეგების შეფასება ხდება კონტროლთან შედარებით (33, 44, 62, 63).

3.8.2 ფაგის ლატენტური პერიოდი და გამოსავლიანობა

ბულიონში ასჯერადად განზავებული 18 სთ-იანი კულტურა თავსდება 37°C -ზე წყლის აბაზანაში, ბაქტერიის ზრდის ექსპონენციალურ ფაზამდე ($5 \cdot 10^8$ cfu/ml). ფაგი ემატება ($1 \cdot 10^7$ pfu/ml) იმ რაოდენობით, რომ ინფექციის მრავლობითობა შეადგენდეს 0,1. ნარევი კვლავ თავსდება 37°C -ზე წყლის აბაზანაში, სინჯებს ვიღებთ 10 წუთის ინტერვალით 2 საათის განმავლობაში და ვსაზღვრავთ ფაგის ტიტრს გრაციას ორშრიანი აგარის მეთოდით. მეორე დღეს ნეგატიური კოლონიების რაოდენობის მიხედვით ხდება ლატენტური პერიოდისა და ფაგის გამოსავლიანობის განსაზღვრა (33, 44, 62, 63).

3.9 ბაქტეროფაგის დნმ-ის გამოყოფა

ფაგის დნმ-ის გამოსაყოფად გამოყენებულ იქნა კლასიკური მეთოდი: ფაგი და ფენოლი თანაბარი რაოდენობით შეიტანება აპენდორფის სინჯარაში (შეფარდება 1:1). აღნიშნული ნარევის 2 წთ დაყოვნების შემდეგ ხდება მისი ცენტრიფუგირება 15 000g – ზე 10 წთ-ის განმავლობაში. სუპერნატანტს ემატება ფენოლი:ქლოფორმი:იზოამილის სპირტის ნარევი (25:24:1). კარგად შენჯღრევის შემდეგ აღნიშნულ ნარევი ყოვნდება 2 წთ და შემდეგ ხდება მისი ცენტრიფუგირება 15 000g – ზე 10 წთ-ის განმავლობაში. მიღებული სუპერნატანტი და ქლოროფორმ:იზოამილის სპირტი (24:1) თანაბარი რაოდენობით ირევა და 15 000g – ზე

10 წთ-ით ცენტრიფუგირდება. სუპერნატანტს ემატება 0.4 წილი 7.5M ამონიუმის აცეტატი (შეიძლება გამოყენებულ იქნეს 3მ ნატრიუმის აცეტატიც) და 2 წილი იზოპროპანოლი, რის შემდეგაც აღნიშნულ ნარევს ათავსებენ ყინულზე 1 სთ-ის განმავლობაში და შემდეგ აცენტრიფუგირებენ 21 000g – ზე 20 წთ-ის განმავლობაში 4°C-ზე. სუპერნატანტის მოშორებისა და ჰაერზე ხანმოკლე გაშრობის შემდეგ, ნალექი ირეცხება 500µl 70% ეთანოლით, რის შემდეგაც ხდება ცენტრიფუგირება 15 000g – ზე 10 წთ-ის განმავლობაში, მიღებული ნალექი, ჰაერზე კარგად გაშრობის შემდეგ იხსნება ბუფერში.

ფაგური დნმ ასევე გამოყოფილ იქნა კიტით- High Pure Viral Nucleic Acid Qiagen Kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France). დნმ-ის გამოყოფამდე ფაგური ლიზატი დამუშავდა DNase, RNase-ით და მიკრობული გენომის ნაწილებისგან სისუფთავე გადამოწმდა PCR-ის საშუალებით 16s rRNA -ის სპეციფიკური პრაიმერების გამოყენებით.

3.10 რესტრიქციული ანალიზი

რესტრიქციული ანალიზისთვის გამოყენებულ იქნა 3 სხვადასხვა რესტრიქციული ფერმენტი (EcoR I, HindIII, Spe1) სტანდარტული პროტოკოლის მიხედვით. დნმ-ის ფრაგმენტების დასაცალკევებლად გამოყენებულ იქნა ელექტროფორეზი (0,8% აგაროზას გელი, 80 ვოლტი).

3.11 გელ-ელექტროფორეზი პულსირებად ველში

გელ-ელექტროფორეზი პულსირებად ველში გამოიყენება მაღალმოლეკულური დნმ-ების განსაცალკევებლად (82). ელექტრული ველის მიმართულების ცვლილების გამო მოლეკულები იცვლიან ორიენტაციას და ზომების მიხედვით სხვადასხვა სისწრაფით გადაადგილდებიან აგაროზის გელის ფორებში. დიდი ზომის მოლეკულებს რეორიენტაციისთვის უფრო მეტი დრო სჭირდებათ, შესაბამისად აქვთ უფრო ნაკლები დრო პულსირებისას ველის რომელიმე მიმართულებით გადასადგილებლად. ამიტომ ისინი ჩამორჩებიან შედარებით ნაკლები ზომის მოლეკულებს და ამგვარად მიიღება გელში დნმ-ის მოლეკულების

ზომების მიხედვით გადანაწილება. PFGE-ის დროს დნმ-ის მოლეკულების აგაროზის გელში ზომების მიხედვით დაყოფის ხარისხი მნიშვნელოვნად განისაზღვრება აგაროზას კონცენტრაციით, ბუფერის კონცენტრაციით და ტემპერატურით, ძაბვით, ელექტრული ველის მიმართულების გადართვის საწყისი და საბოლოო დროით და ფორეზის მიმდინარეობის სრული დროით.

ფაგის გენომის ზომის დასადგენად გამოყენებულ იქნა გელ-ელექტროფორეზი პულსირებად ველში, სტანდარტული პროტოკოლის მიხედვით, შემდეგი პირობებით: საწყისი დრო - 5წამი, დამთავრების დრო - 25 წამი, მთლიანი გაშვების დრო - 20 საათი, ვოლტი-5vots/cm.

3.12 პროფაგების გენების არსებობაზე ფაგის დნმ-ის შემოწმება

გენების ბანკში არსებული *A.baumannii* SDF შტამის პროფაგების გენომის სექვენსის გამოყენებით დამზადებულ იქნა 4 პროფაგის სპეციფიკური 4 წყვილი პარიმერი და პოლიმერაზა ჯაჭვური რეაქციის მეთოდის საშუალებით შემოწმებულ იქნა ჩვენი საკვლევი ფაგების გენომი აღნიშნული პროფაგების გენების არსებობაზე (ცხრილი 4).

3.13 ტრანსდუქცია, ტრანსფორმაცია

ამ ექსპერიმენტის საშუალებით განხორციელდა იმიპენემის მიმართ რეზისტენტობის გენის მატარებელი ფაგიდან იმიპენემის და ამ ფაგის მიმართ მგრძნობიარე *Acinetobacter baumannii*-ის შტამში ამ გენის გადატანის შესაძლებლობის შეწავლა. ტრანსდუქციის ექსპერიმენტი ჩატარდა როგორც *in vitro*, ასევე *in vivo*. *in vitro* ცდა მოიცავდა შემდეგ საფეხურებს: 9,9მლ ბულიონიან 18 სთ-იან კულტურას ($1 \cdot 10^8$ cfu/ml) ემატებოდა 0,1 მლ ფაგი ($1 \cdot 10^7$ pfu/ml), თერმოსტატში 24 სათიანი კულტივირების შემდეგ ხდებოდა 5000გ-ზე 30 წუთის განმავლობაში ცენტრიფუგირება, ნალექი ითესებოდა 8მკგ/მლ იმიპენემის შემცველ აგარზე. ფინჯნები თავსდებოდა თერმოსტატში 37°C პირობებში. 24 საათის შემდეგ მიკრობული კოლონიების არსებობა მიუთითებდა წარმატებულ ტრანსდუქციაზე.

In vitro-ცდის მეორე ვარიანტი მოიცავდა შემდეგ საფეხურებს: მიკრობის და ფაგის კულტივირება საკვები არის არარსებობის ან ძალიან მცირე საკვები არის პირობებში 48 საათის განმავლობაში 37°C-ზე. შემდგომ ბულიონის დამატება და კვლავ 24 საათიანი კულტივირება. მეორე დღეს 5000გ-ზე 30წუთის განმავლობაში ცენტრიფუგირება. ნალექი ითესებოდა 8მკგ/მლ იმიპენემის შემცველ აგარზე. ფინჯნები თავსდებოდა თერმოსტატში 37°C პირობებში. 24 საათის შემდეგ მიკრობული კოლონიების არსებობა მიუთითებდა წარმატებულ ტრანსდუქციაზე.

იმიპენემისადმი რეზისტენტობის გენის შემცველი ფაგიდან გამოყოფილი გასუფთავებული დნმ გამოყენებულ იქნა იმიპენემის მიმართ მგრძნობიარე შტამებში ტრანსფორმაციისთვის: 50მკლ რეციპიენტი შტამი 5მკლ ფაგის დნმ-თან ერთად დაყოვნებულ იქნა ყინულზე 30 წუთით, შემდეგ 30 წამით გადატანილ იქნა 42°C პირობებში და შემდეგ კვლავ ყინულზე 2 წუთის განმავლობაში. 450მკლ ბულიონის დამატების შემდგომ დატოვებულ იქნა თერმოსტატში 37°C-ზე 1 საათით. ცენტრიფუგირების შემდგომ ნალექი გათესილ იქნა იმიპენემის შემცველ აგარზე (8მკგ/მლ). 24 საათის შემდეგ ფინჯნებზე კოლონიების არსებობა მიუთითებდა წარმატებულ ტრანსფორმაციაზე.

In vivo-ცდის დროს მოხდა ვირთაგვების ჭრილობის ინფიცირება იმიპენემისა და ფაგო მგომნობიარე შტამით და იმიპენემისადმი რეზისტენტობის გენის შემცველი ფაგის აპლიკაცია ჭრილობაზე. 7 დღის განმავლობაში აღებულ სინჯებს ემატებოდა ბულიონი, თერმოსტატში 24 საათიანი კულტივირების შემდგომ ხდებოდა ცენტრიფუგირება 5000გ-ზე და ხდებოდა ნალექის შემოწმება ტრანსდუქტირებული მიკრობული შტამის არსებობაზე.

3.14 ცხოველური მოდელის შექმნა

ცდაში გამოყენებულ იქნა 30 ზრდასრული ვირთაგვა წონით 200-300გრ. ექსპერიმენტული ჭრილობა მომზადდა შემდეგნაირად: ვირთაგვები ანესთეზიის შემდეგ დამაგრდა საოპერაციო მაგიდაზე, გაპარსვის შემდეგ, კანი დამუშავდა ანტისეპტიკური საშუალებით, და ზურგზე 1,5*1,5სმ ჭრილობაზე დამაგრდა პლასტმასის კონტეინერი დაბინძურების თავიდან ასაცილებლად. (ილუსტრაცია 2.)

ილუსტრაცია 2: მოდელირებული ჭრილობა ვირთაგვებზე.



ცდის დროს გამოყენებულ იქნა ორი შტამი *A.baumannii* T-10 და G7. ფაგოთერაპიის ეფექტურობის შესასწავლად კი გამოყენებულ იქნა ფაგი vB_Ab-M-G7, რომლისთვისაც *A.baumannii* G7 იყო პატრონი შტამი, ხოლო *A.baumannii* T-10 შემთხვევითად აირჩა ამ ფაგის მიმართ მგრძნობიარე შტამებიდან. ცდის დროს გამოყენებულ იქნა ბაქტერიული შტამი ტიტრით 2×10^8 cfu/ml, ხოლო ფაგი განზავდა 5×10^7 pfu/ml-მდე.

30 ვირთაგვა ექსპერიმენტული ჭრილობით დაიყო 6 ჯგუფად: 5 ვირთაგვა თითო ჯგუფში. I ჯგუფი- საკონტროლო ჯგუფი: ხდებოდა დაკვირვება ბაქტერიით კონტამინაციაზე და ჭრილობაზე. II ჯგუფი- ხდებოდა ფაგის თერაპიული დოზით (1მლ 5×10^7 pfu/ml) აპლიკაცია ჭრილობაზე მიკრობით ინფიცირების გარეშე. III ჯგუფი- ინფიცირებული ჭრილობის მოდელი, ამ შემთხვევაში ჭრილობა დაინფიცირდა 1მლ *A.baumannii* T-10 მიკრობული შტამის 18 სთ-იანი კულტურით ტიტრით 5×10^8 cfu/ml. ამ ჯგუფში ხდებოდა დაკვირვება ინფექციის მიმდინარეობაზე. IV ჯგუფი- ფაგოთერაპიის ჯგუფი: ჭრილობის 1მლ *A.baumannii* T-10 (5×10^8 cfu/ml) ინფიცირებიდან 12 საათში განხორციელდა 1მლ ფაგის (5×10^7 pfu/ml) აპლიკაცია. V ჯგუფი- ინფიცირებული ჭრილობის მოდელი, ჭრილობის ინფიცირება

განხორციელდა 1მლ *A.baumannii* G7 შტამის 18 სთ-იანი კულტურით ტიტრით $5 \cdot 10^8$ cfu/ml. VI-ჯგუფი, ფაგოთერაპიის ჯგუფი: ჭრილობის 1მლ *A.baumannii* G7 შტამით ($5 \cdot 10^8$ cfu/ml) ინფიცირებიდან 12 საათში განხორციელდა 1მლ ფაგის *vB_Ab-M-G7* ($5 \cdot 10^7$ pfu/ml) აპლიკაცია. ფაგის დამატება ექსპერიმენტულ ჭრილობაზე ხდებოდა ყოველ 24 საათში 6 დღის განმავლობაში. სინჯების აღება ხდებოდა ფაგის აპლიკაციამდე დროის შემდეგ ინტერვალებში 0'(12'), 24', 48', 72' და 144' ('-საათი), სტერილური ტამპონის გამოყენებით. თითოეულ სინჯს ემატებოდა 4,5მლ ბულიონი და ხდებოდა სინჯში ფაგისა და ბაქტერიის ტიტრის დადგენა. ბაქტერიის ტიტრის დასადგენად გამოიყენებოდა ჰერელას აგარი, დაბინძურების შემთხვევაში ცდომილების თავიდან ასაცილებლად. ფაგის ტიტრის განსაზღვრა ხდებოდა თანმიმდევრული განზავებით და გრაციას ორშრიანი აგარის მეთოდით. ცდის შემდეგ ყველა ცხოველი ევთანაზიის გზით იქნა გამოყვანილი ცდიდან, ცხოველთა დაცვის კანონის შესაბამისად.

3.15 ფაგის საცდელი პრეპარატის შემუშავება

დახასიათებული ფაგების თანაბარი რაოდენობით შერევით მიღებულ იქნა ე.წ. ფაგების “კოქტეილი“. კოქტეილისთვის თითოეული ფაგი ისე განზავდა, რომ გრაციას მეთოდით მათი ტიტრი იყო $5 \cdot 10^7$ pfu/ml, ხოლო აპელმანის მეთოდით 10^{-4} - 10^{-5} . რამდენიმე თვის განმავლობაში ხდებოდა თითოეული ფაგის აქტივობის კონტროლი, როგორც გრაციას, ასევე აპელმანის მეთოდის გამოყენებით.

შედეგები

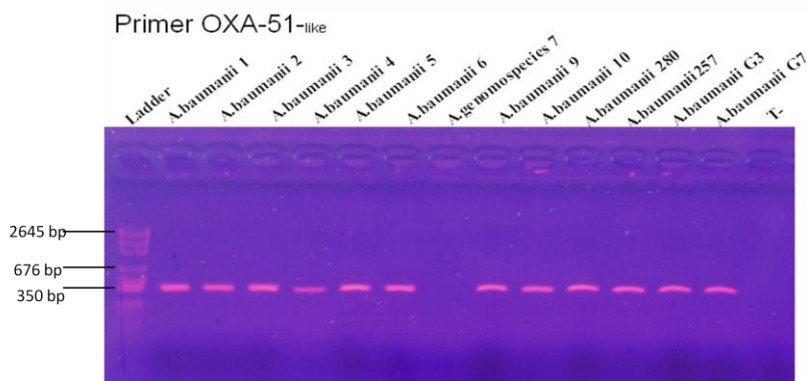
თავი 1. ბაქტერიული შტამების დახასიათება

1.1 ბაქტერიული შტამების იდენტიფიკაცია

235 ბაქტერიული შტამიდან, რომლებიც გამოვიყენეთ სამეცნიერო კვლევებში, 210 წარმატებით იდენტიფიცირდა როგორც *Acinetobacter*-ის გვარის წარმომადგენელი, ერთი ბაქტერიული შტამი აღმოჩნდა *Stenotrophomonas maltophilia*, რომელზეც ასევე ჩატარდა კვლევები.

55 ბაქტერიული შტამის იდენტიფიცირებისათვის გამოვიყენეთ MALDI-TOF MS და სიზუსტის მაჩვენებელი შეადგენდა 2,0-ზე მაღალს. ასევე, 35 შტამის იდენტიფიკაციისთვის გამოვიყენეთ PCR-ის მეთოდი და *A. baumannii*-ის სპეციფიკური პრაიმერები (OXA51like F/R) (ილუსტრაცია 3). დანარჩენი 140 ბაქტერიული შტამი მოწოდებულია ვიეტნამის საავადმყოფოს მიერ და ვეყრდნობით მათი იდენტიფიცირების მონაცემებს. თითოეული *Acinetobacter*-ის ბაქტერიული შტამის გასასუფთავებლად გამოვიყენეთ Herellae-ს აგარი, რომელზეც *Acinetobacter*-ის წარმომადგენლები დამახასიათებელ იასამნისფერ-მოვერცხლისფრო შეფერილობის კოლონიებს იძლევა (ილუსტრაცია 1).

ილუსტრაცია 3: *A. baumannii*-ის საიდენტიფიკაციო OXA51-like პრაიმერი.



1.2 იმიპენემ-რეზისტენტული ბაქტერიული შტამების ფენოტიპური დახასიათება

კვლევის მიზანს წარმოადგენდა *A.baumannii* შტამების მგრძნობელობის შესწავლა იმიპენემის მიმართ და რეზისტენტულ ფორმებში რეზისტენტობის მექანიზმების შესწავლა.

ამ კვლევაში გამოვიყენეთ სულ 37 კლინიკური შტამი, რომელთა გამოყოფის წყარო და ადგილი განსხვავდებოდა, საფრანგეთის შტამები იყო ჩვეულებრივი კლინიკური შტამები (25 ბაქტერიული შტამი), ხოლო ერაყიდან (8 ბაქტერიული შტამი), ბელგიიდან (2 ბაქტერიული შტამი) და საქართველოდან გამოყოფილი შტამები (2 ბაქტერიული შტამი) ჭრილობიდან იყო აღებული, მათ შორის 2 შტამი მოწოდებული იყო გორის სამხედრო ჰოსპიტალიდან და გამოყოფილი იყო რუსეთ-საქართველოს ომში დაჭრილი ჯარისკაცისგან. საფრანგეთის 25 კლინიკური შტამი გამოყენებულ იქნა მხოლოდ ჭრილობიდან გამოყოფილ შტამებთან შესადარებლად, ძირითადი კვლევა წარიმართა *A.baumannii*-ის 12 შტამზე, რომელიც მოცემულია დენდროგრამაზე. დენდროგრამა, რომელიც აჩვენებს ნათესაურ კავშირს, აგებულია MALDI-TOF MS-ის მონაცემებზე დაყრდნობით. დენდროგრამის მონაცემების მიხედვით შტამები გაერთიანდა 2 კლასტერად, სადაც ერთ კლასტერში-A შედის მხოლოდ ერთი შტამი, რომელიც გამოყოფილია საქართველოში *A. baumannii* G3, ხოლო დანარჩენები გაერთიანებულია კლასტერში B.

ანტიბიოტიკომგრძნობელობის შედეგები მოცემულია ცხრილში 5. 12 შტამიდან 6 აღმოჩნდა იმიპენემრეზისტენტული, რომლის რეზისტენტობა დამტკიცდა Etest-ის საშუალებით (ილუსტრაცია 4). მინიმალურ ინჰიბიტორული კონცენტრაცია თითოეული მათგანისთვის იყო MICs $\geq$ 16 μ g/ml. ექვსივე შტამი გამოყოფილი იყო ინფიცირებული ჭრილობიდან, 5 მათგანი ერაყში დაჭრილი პაციენტებიდან 2007 წელს (*A.baumannii* 3, *A.baumannii* 4, *A.baumannii* 5, *A.baumannii* 6, *A.baumannii* 9), ხოლო ერთი ბაქტერიული შტამი კი - 2008 წელს რუსეთ-საქართველოს ომში დაჭრილი ჯარისკაცისგან (*A.baumannii* G7). ექვსივე შტამი იყო მთლიანად ან საშუალოდ რეზისტენტული დანარჩენი ანტიბიოტიკების მიმართ, გარდა კოლისტინისა, რომლის მიმართ აღნიშნული ბაქტერიული შტამები იჩენდნენ მაღალ მგრძნობელობას. უნდა აღინიშნოს, რომ საფრანგეთის კლინიკური მასალიდან გამოყოფილი ყველა შტამი იმიპენემის მიმართ მეტად მგრძნობიარე აღმოჩნდა, რასაც

ნათლად მოწმობს ყველაზე ნაკლებ მგრძნობიარე შტამის მინიმალური ინჰიბიტორული კონცენტრაცია- MICs $\geq$ 1 μ g/ml. (ილუსტრაცია 5)

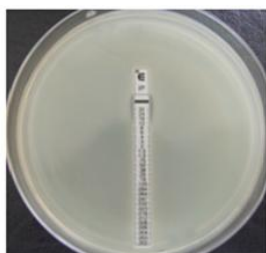
ილუსტრაცია 4: Etest იმიპენემრეზისტენტული შტამებისთვის.



A. baumannii G7



A. baumannii 9



A. baumannii 5



A. baumannii 3



A. baumannii 4



A. baumannii 6

ილუსტრაცია 5: Etest საფრანგეთის შტამებიდან ყველაზე ნაკლებად მგრძნობიარე შტამისთვის



ცხრილი 5: *A. baumannii*-ის შტამების ანტიბიოტიკომგრძნობელობა

ანტიბიოტიკი (mG/L)	<i>Acinetobacter baumannii</i> (ინჰიბიტორული ზონის დიამეტრი მმ-ში)											
	1	2	3	4	5	6	9	10	257	280	G3	G7
	ერაყი	ერაყი	ერაყი	ერაყი	ერაყი	ერაყი	ერაყი	ერაყი	ბელგია	ბელგია	საქართველო	საქართველო
RIF (30)	I(17)	I(15)	I(15)	I(15)	I(16)	I(15)	I(16)	I(14)	I(16)	I(16)	I(14)	I(14)
CAZ (30)	R(6)	R(6)	R(6)	R(6)	R(6)	R(6)	R(6)	R(6)	R(6)	R(6)	R(8)	R(6)
PIP (75)	R(6)	R(6)	R(6)	R(6)	R(6)	R(6)	R(6)	R(6)	I(14)	I(13)	R(8)	R(6)
TZP (85)	I(18)	I(15)	R(6)	R(6)	R(8)	R(8)	R(8)	I(16)	I(17)	I(15)	R(10)	R(10)
CIP (5)	R(6)	R(14)	R(6)	R(6)	R(6)	R(6)	R(6)	R(6)	R(6)	R(6)	R(6)	R(10)
NOR (5)	R(6)	R(6)	R(6)	R(6)	R(6)	R(6)	R(6)	R(6)	R(6)	R(6)	R(6)	R(6)
FOS (50)	R(6)	R(6)	R(6)	R(6)	R(6)	R(7)	R(6)	R(6)	R(6)	R(6)	R(6)	R(6)
COL (50)	S(16)	S(16)	S(16)	S(16)	S(16)	S(17)	S(16)	S(16)	S(15)	S(15)	S(15)	S(16)
SXT (25)	R(6)	I(15)	R(7)	R(7)	R(6)	R(6)	R(8)	R(6)	R(6)	I(10)	R(6)	R(6)
GEN (15)	R(7)	S(22)	R(6)	R(6)	R(6)	R(6)	R(6)	R(6)	S(18)	I(17)	S(20)	R(6)
AMI (30)	R(10)	S(17)	R(13)	R(12)	R(10)	R(12)	R(14)	R(10)	R(10)	R(11)	R(10)	R(10)
TOB (10)	R(6)	S(18)	R(8)	R(8)	R(6)	R(7)	R(9)	R(6)	S(18)	S(18)	S(18)	R(6)
TIC (75)	R(6)	R(6)	R(6)	R(6)	R(6)	R(6)	R(6)	R(6)	R(10)	R(6)	R(14)	R(6)
IMP (10)	S(30)	S(32)	R(14)	R(15)	R(14)	R(12)	R(12)	S(25)	S(30)	S(25)	S(26)	R(6)
IMP Etest MICs- (µg/ml)	0.38	0.38	16	32	16	32	16	0.75	1	0.75	0.5	32

1.3 იმიპენემრეზისტენტული ბაქტერიული შტამების მოლეკულური დახასიათება

თორმეტივე შტამი PCR-ის მეთოდით შემოწმდა კარბაპენემების მაკოდირებელი გენების არსებობაზე. ყველა მათგანი შეიცავდა bla_{OXA51-like} და ISAbal1 გენებს. 5 იმიპენემრეზისტენტული ბაქტერიული შტამი (*A. baumannii* 3, *A. baumannii* 4, *A. baumannii* 5, *A. baumannii* 6, *A. baumannii* 9), რომლებიც გამოყოფილი იყო ერაყში დაჭრილი ჯარისკაცებიდან, შეიცავდა bla_{OXA23-like} გენს, ხოლო საქართველოში გამოყოფილი იმპ-რეზისტენტული ბაქტერია *A. baumannii* G7 - bla_{OXA24like} გენს. bla_{OXA23-like} და bla_{OXA24like} გენების PCR პროდუქტები დასეკვენირდა და მათი პროტეინების სექვენსები შედარდა გენების ბანკის მონაცემთა ბაზაში არსებულ სექვენსებს BLAST-ის გამოყენებით, რამაც 100% თანხვედრა მოგვცა შემდეგ გენებთან HQ700358 (bla_{OXA23-like}) და HQ219688 (bla_{OXA24-like}). არცერთი იმიპენემგრძნობიარე შტამი არ შეიცავდა bla_{OXA23-like} და bla_{OXA24-like} გენებს და 12 შტამიდან არცერთი არ შეიცავდა bla_{OXA58} და bla_{NDM-1} გენებს (ილუსტრაცია 6).

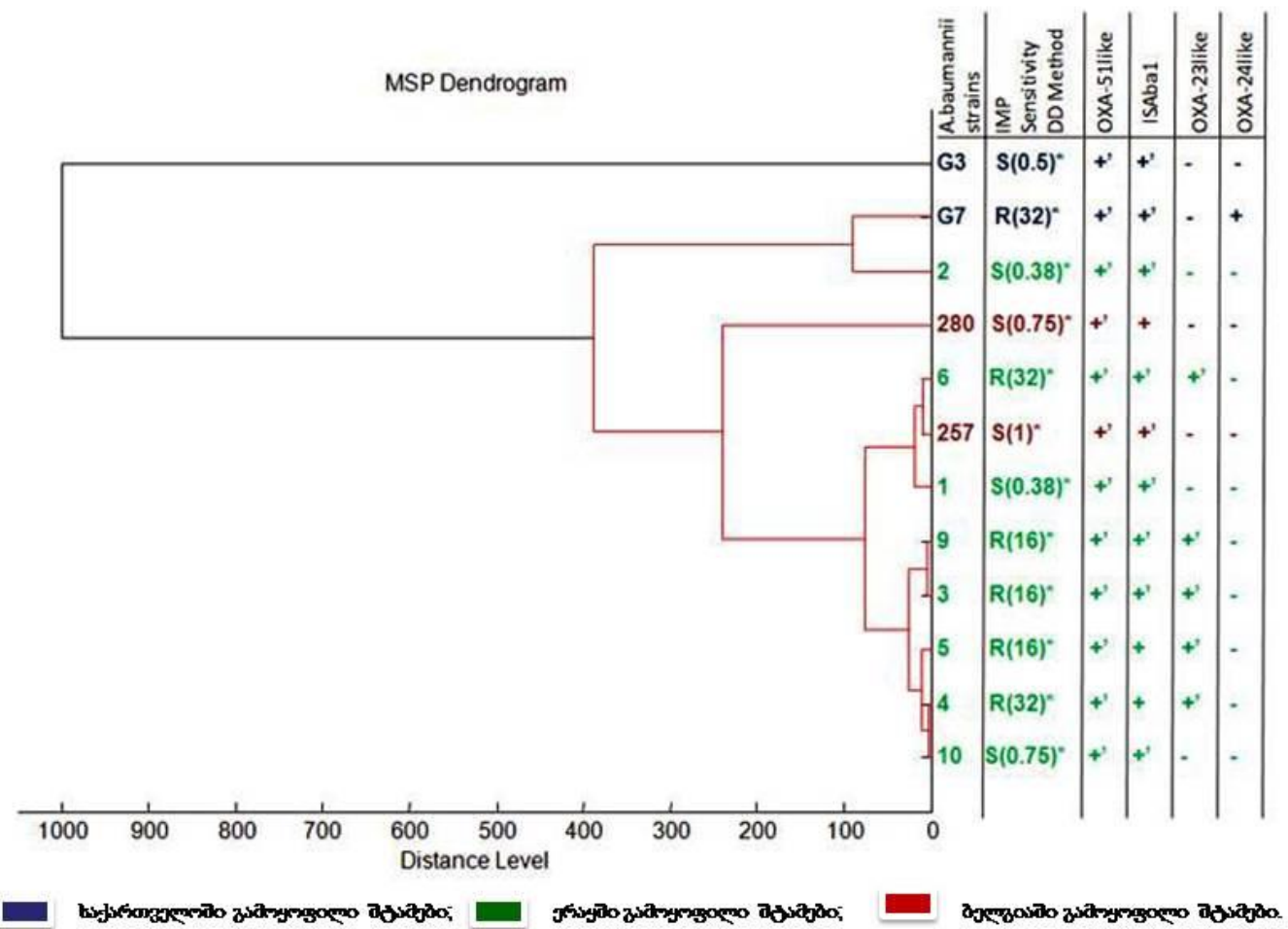
თორმეტივე შტამიდან გამოყვავით პლაზმიდა, გავასუფთავეთ და პლაზმიდები შევამოწმეთ ზემოთ აღნიშნული გენების არსებობაზე PCR-ის მეთოდის გამოყენებით. შედეგად ვნახეთ, რომ ყველა მათგანის პლაზმიდა შეიცავდა bla_{OXA51-like} გენს, აგრეთვე იმიპენემრეზისტენტულ 5 შტამში bla_{OXA23-like} გენი მოთავსებული იყო პლაზმიდაში. პლაზმიდის PCR bla_{OXA24-like} გენის სპეციფიკური პრაიმერების გამოყენებით იყო უარყოფითი, რაც მოწმობს *A. baumannii* G7 შტამში bla_{OXA24-like} გენის ქრომოსომულ მდებარეობას. PCR-ის მონაცემებზე დაყრდნობით 9 ბაქტერიული შტამის პლაზმიდა შეიცავდა ISAbal1 გენს (ილუსტრაცია 6).

6 პლაზმიდა, გამოყოფილი იმიპენემრეზისტენტული ბაქტერიებიდან, წარმატებით ტანსფორმირდა (ქიმიური ტრანსფორმაცია) იმიპენემ მგრძნობიარე *A. baumannii*-ის შტამებში (*A. baumannii* 2; *A. baumannii* 280) და 18 სათიანი კულტივირების შემდეგ 8მკგ/მლ იმიპენემის შემცველ აგარიან ფინჯნებზე მოგვცა კოლონიები.

იმიპენემრეზისტენტული შტამები შემოწმდა რეზისტენტული კუნძულის არსებობაზე. PCR-ის მეთოდის გამოყენებით და ATPase-ს მაკოდირებული უბნის სპეციფიკური პრაიმერებით ვნახეთ, რომ ერაყის ბაქტერიული შტამები (*A. baumannii*

3, *A.baumannii* 4, *A.baumannii* 5, *A.baumannii* 6, *A.baumannii* 9) შეიცავენ ასეთ უბნებს, ხოლო საქართველოში გამოყოფილი შტამი კი მათ არ შეიცავს (ილუსტრაცია 6).

ილუსტრაცია 6: *A. baumannii* შტამების MS დენდროგრამა



DD, დისკო დიფუზური მეთოდი; R, IMP-რეზისტენტული შტამი; S, IMP-მგრძნობიარე შტამი; +, პლასმიდაში მდებარე გენი.

თავი 2. *Acinetobacter spp.*-ს ბაქტერიოფაგების შესწავლა

2.1 ბაქტერიოფაგების გამოყოფა და დახასიათება

Acinetobacter spp.-ის სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების გამოყოფის მიზნით ბაქტერიების ჩამდინარე წყლებში ჩათესვა მიმდინარეობდა პარალელურად მთელი სამეცნიერო კვლევების პერიოდის განმავლობაში. სულ გამოყოფილ იქნა 16 სპეციფიკური აქტივობის ფილტრატი. მიღებული ფილტრატების შემოწმება ხდებოდა Spot tset-ის მეთოდით. ფილტრატებიდან სულ შეირჩა 6, 9-10-ჯერადი თანამიმდევრული პასირების შედეგად კი მიღებულ იქნა 5 *Acinetobacter spp.*-ისა და 1 *Stenotrophomonas spp.*-ის სპეციფიკური ფაგი.

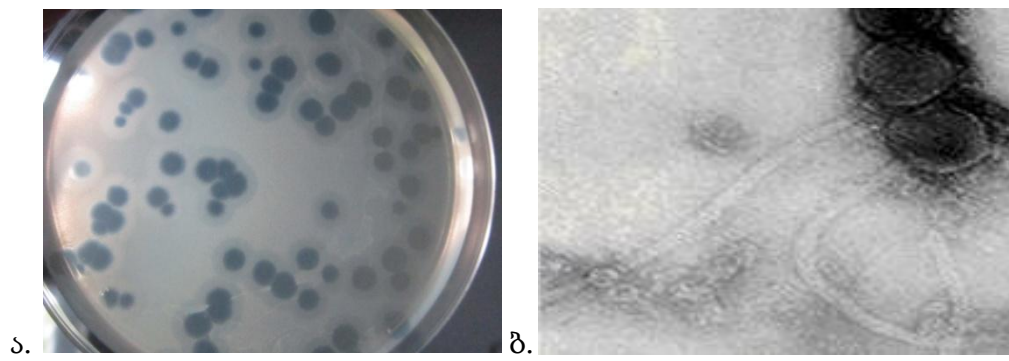
ფაგების გამრავლებისთვის შეირჩა ოპტიმალური საკვები არე BHIB/A, ოპტიმალური ტემპერატურა 22-28°C, pH-7.0.

2.1.1 *vB_Ag-S7*

ფაგი *vB_Ag-S7*, გამოყოფილია 2008 წელს, მდინარე მტკვრის წყლიდან. პატრონ ბაქტერიულ შტამს წარმოადგენს *A.genomospecies 7*, რომელიც გამოყოფილია ერაყში დაჭრილი ჯარისკაცისგან 2007 წელს.

ფაგის ნეგატიური კოლონიები მორფოლოგიის მიხედვით არის დიდი, ნათელი ცენტრით. ელექტრონული მიკროსკოპის მონაცემებით, *vB_Ag-S7* მიეკუთვნება *Siphoviridae*-ს ოჯახს, ზომებით: 50 ნმ თავი, 310 ნმ კუდი (ილუსტრაცია 7). მისი ტიტრი გრაციას მეთოდით განიზაზღვრა როგორც 2×10^9 pfu/ml (ფაგური ნაწილაკი 1მლ-ში), ხოლო აპელმანის მეთოდით 10^{-7} .

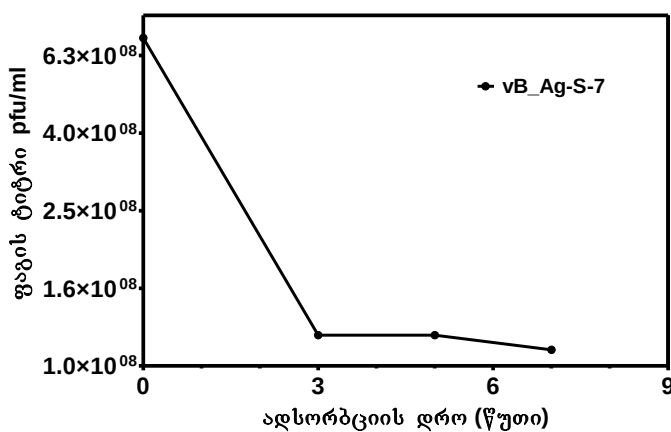
ილუსტრაცია 7: *vB_Ag-S7*-ის მორფოლოგია. ა. ნეგატიური კოლონია; ბ. ელექტრონული მიკროსკოპია.



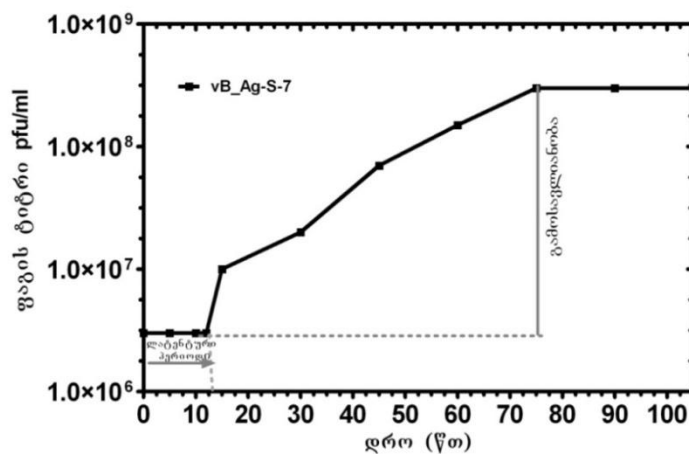
ბიოლოგიური მახასიათებლებიდან მნიშვნელოვანია: სწრაფი ადსორბცია-3 წუთი (82%), მოკლე ლატენტური პერიოდი 12წთ, გამოსავლიანობა - 100 ფაგურ ნაწილაკი (გრაფიკი 1).

გრაფიკი 1: *vB_Ag-S7* ფაგის ერთჯერადი გამრავლების ციკლი. ა. ადსორბცია; ბ. ფაგის ლატენტური პერიოდი, გამოსავლიანობა.

ა.

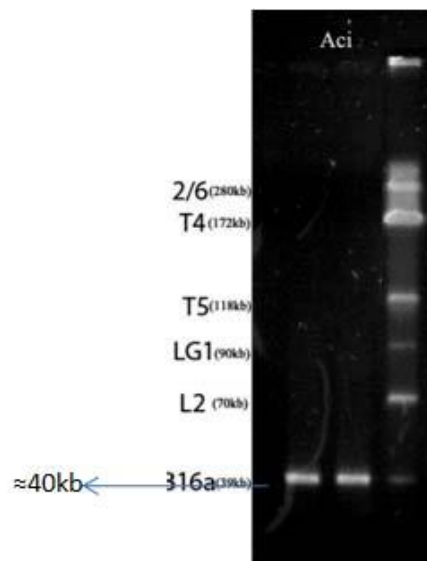


ბ.



vB_Ag-S7 ფაგის და მისი მასპინძელი შტამის გენომი შემოწმდა პროფაგების გენების არსებობაზე PCR-ის მეთოდით, სპეციფიკური პრაიმერების გამოყენებით. არც ფაგი და არც *A.genomospecies 7* არ შეიცავს საკვლევი პროფაგების გენებს. ფაგის გენომის ზომის დასადგენად გამოყენებულ იქნა გელ-ელექტროფორეზი პულსირებად ველში (PFGE). დადგინდა, რომ ეს ფაგი შეიცავდა 40kb ორჯაჭვიან დნმ-ს (ილუსტრაცია 8).

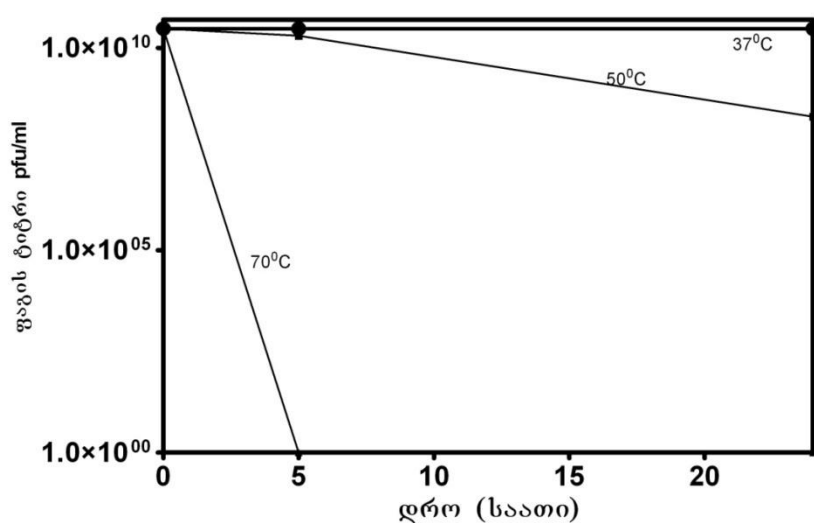
ილუსტრაცია 8: *vB_Ag-S7*-ის დნმ-ის ზომა (PFGE)



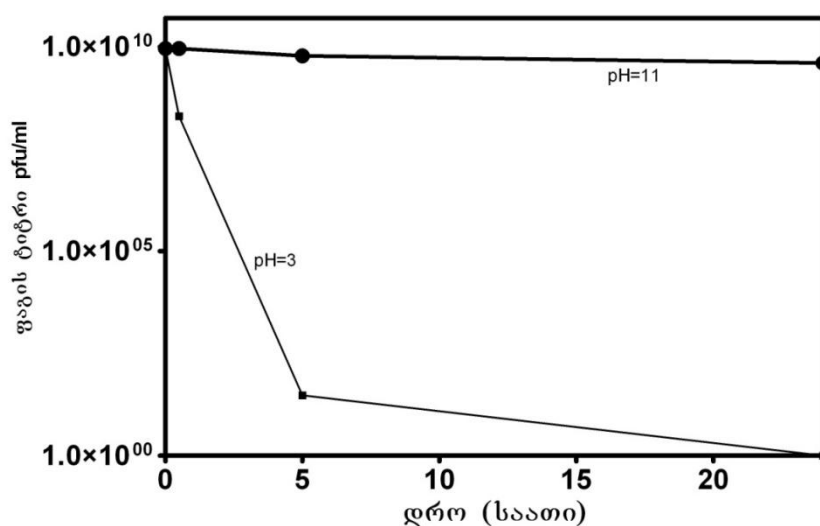
სხვადასხვა ტემპერატურისა და pH-ის პირობებში, ასევე ქიმიური ნივთიერებების ზემოქმედებისას ფაგის აქტივობის შესწავლისას აღმოჩნდა, რომ ქლოროფორმის დამატებისას ფაგის აქტივობა არ იცვლება. 50°C-ზე 24 საათის განმავლობაში ფაგის ტიტრი ეცემა 2 რიგით, ხოლო 70°C-ზე 5 საათის განმავლობაში ფაგი განიცდის ინაქტივაციას. *vB_Ag-S7* აღმოჩნდა გამძლე pH-ის სხვადასხვა პირობებში. pH= 5-11 ის ფარგლებში ფაგის აქტივობა არ იცვლება 24 საათის განმავლობაში. pH=3-ზე კი ფაგი 24 საათში ინაქტივირდება (გრაფიკი 2).

გრაფიკი 2: *vB_Ag-S7* ფაგის სტაბილურობა სხვადასხვა ტემპერატურისა (ა.) და pH-ის (ბ.) პირობებში.

ა.

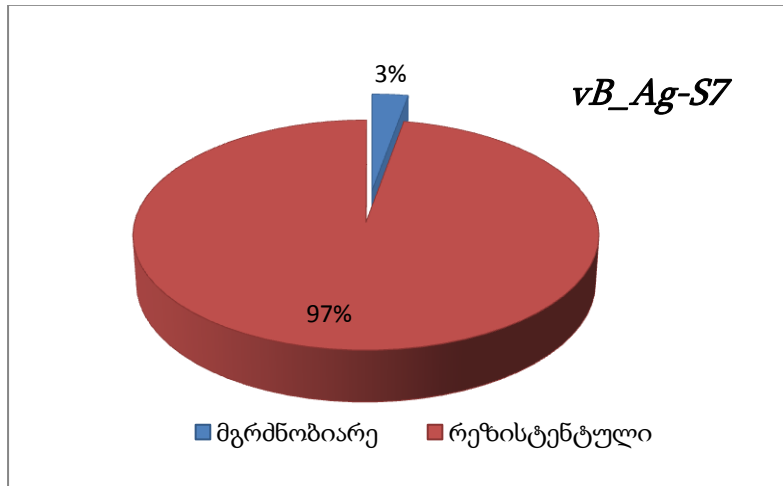


ბ.



ფაგის მოქმედების დიაპაზონის შესასწავლად გამოვიყენეთ *Acinetobacter* spp.-ის 210 და 60 სხვა გვარის წარმომადგენელი ბაქტერიული შტამი (20 *Pseudomonas aeruginosa*, 20 *E. coli*, 10 *Salmonella*, 10 *Klebsiella*). როგორც დიაგრამიდან ჩანს, *vB_Ag-S7* გამოირჩევა მაღალი სპეციფიკურობითა და მოქმედების ვიწრო სპექტრით. ეს ფაგი აქტიური აღმოჩნდა მხოლოდ *Acinetobacter*-ის არა-*baumannii*-ის ბაქტერიული შტამების მიმართ. აქტივობა განისაზღვრა მხოლოდ 3%-ით (გრაფიკი 3).

გრაფიკი 3: *vB_Ag-S7*-ის მოქმედების დიაპაზონი.

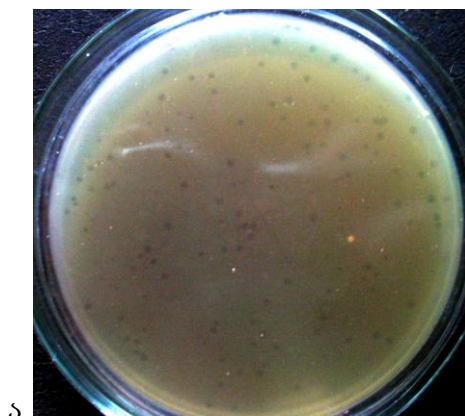


2.1.2 *vB_Ab-S-31*

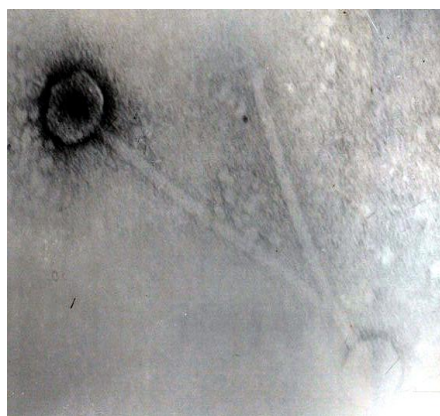
vB_Ab-S-31 ფაგი გამოყოფილია 2007 წელს და პატრონ უჯრედს წარმოადგენს *A.baumannii* 31, რომელიც ბელგიის სამხედრო ჰოსპიტალიდან მოწოდებული, 2006 წელს პაციენტიდან გამოყოფილი ბაქტერიული შტამია.

ფაგის ნეგატიური კოლონია ნათელი და 0,5-1მმ ზომისაა. ელექტრონული მიკროსკოპიით დადგინდა, რომ *vB_Ab-S-31* მიეკუთვნება *Siphoviridae*-ს ოჯახს და აქვს 58 ნმ თავი და გრძელი არაკუმშვადი კუდი ზომით 280 ნმ (ილუსტრაცია 9). ტიტრი გრაციას მეთოდით შეადგენდა $5 \cdot 10^9$ pfu/ml, ხოლო აპელმანის მიხედვით კი 10^6 .

ილუსტრაცია 9: *vB_Ab-S-31*-ის მორფოლოგია. ა. ნეგატიური კოლონია; ბ. ელექტრონული მიკროსკოპია.



ა.

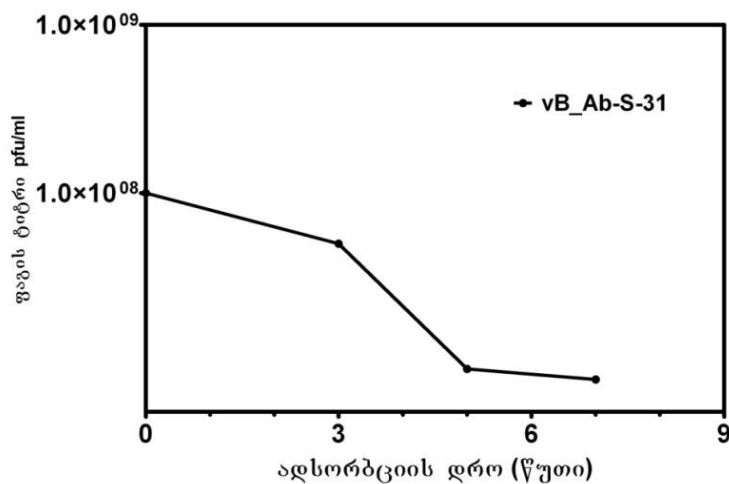


ბ.

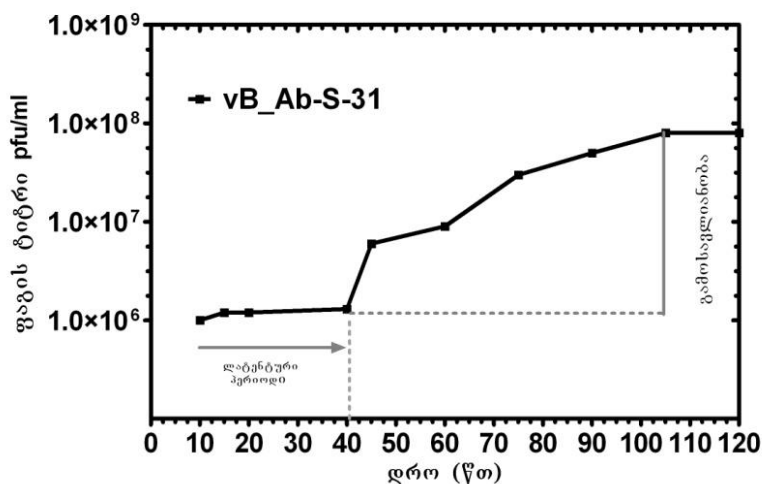
vB_Ab-S-31 ფაგისთვის დამახასიათებელია 78%-ის ადსორბცია 7 წუთისთვის, გრძელი ლატენტური პერიოდი (40წუთი) და შედარებით დაბალი გამოსავლიანობა - 80 ფაგური ნაწილაკი (გრაფიკი 4).

გრაფიკი 4: *vB_Ab-S-31* ფაგის ერთჯერადი გამრავლების ციკლი. ა. ადსორბცია; ბ. ფაგის ლატენტური პერიოდი, გამოსავლიანობა.

ა.



ბ.

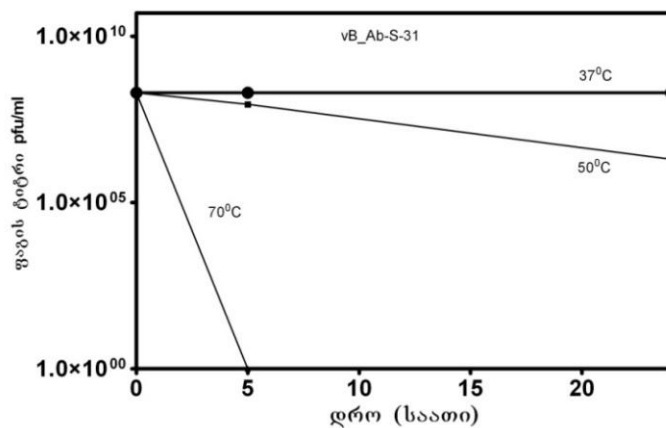


vB_Ab-S-31 ფაგის და შტამის *A.baumannii* 31 გენომი PCR-ის მეთოდით შემოწმდა პროფაგების გენების არსებობაზე სპეციფიკური პრაიმერების გამოყენებით. ორივე მათგანის გენომი სუფთა იყო აღნიშნული პროფაგების გენებისაგან.

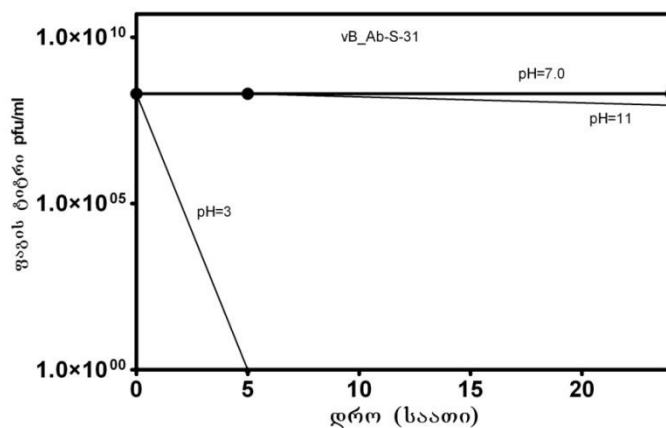
ფაგი *vB_Ab-S-31*-ის აქტივობა არ იცვლება ქლოროფორმის ზემოქმედებისას. ასევე ეს ფაგი ხასიათდება გამძლეობით მაღალი ტემპერატურის პირობებში. მისი აქტივობა არ იცვლება 5 საათის განმავლობაში 50°C-ზე და მხოლოდ 2 რიგით იკლებს 24 საათში. თუმცა 70°C-ზე 5 საათის განმავლობაში ფაგი ინაქტივირდება. pH= 5-11-ის ფარგლებში ფაგის ტიტრი არ იცვლება 24 საათის განმავლობაში. pH=3-ზე კი ფაგი მთლიანად კარგავს აქტივობას 24 საათში (გრაფიკი 5).

გრაფიკი 5: *vB_Ab-S-31* ფაგის სტაბილურობა სხვადასხვა ტემპერატურისა (ა.) და pH-ის (ბ.) პირობებში.

ა.



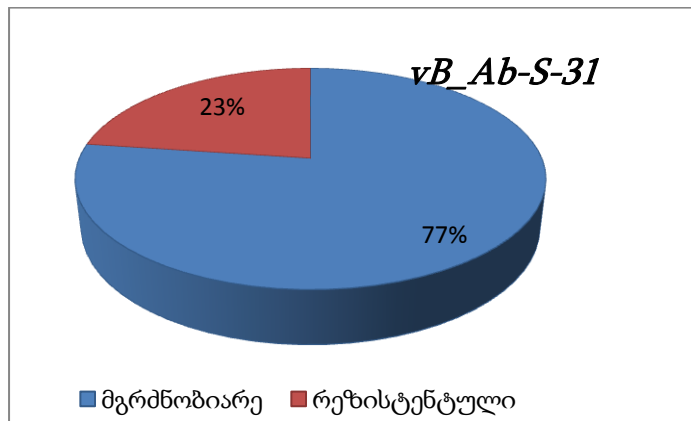
ბ.



მოქმედების დიაპაზონის შესწავლამ აჩვენა, რომ ფაგი *vB_Ab-S-31* ფართო სპექტრის აქტივობით ხასიათდება მხოლოდ *Acinetobacter*-ის გვარის წარმომადგენლების მიმართ და ვერ ახდენს სხვა გვარის წარმომადგენელი ბაქტერიული შტამების (20 *Pseudomonas aeruginosa*, 20 *E. coli*, 10 *Salmonella*, 10

Klebsiella) ლიზისს. 210 *Acinetobacter* spp.-ს შტამიდან 162-ის მიმართ აქტიური აღმოჩნდა, შედეგად მოქმედების სპექტრი განისაზღვრა 77%-ით (გრაფიკი 6).

გრაფიკი 6: *vB_Ab-S-31*-ის მოქმედების დიაპაზონი.

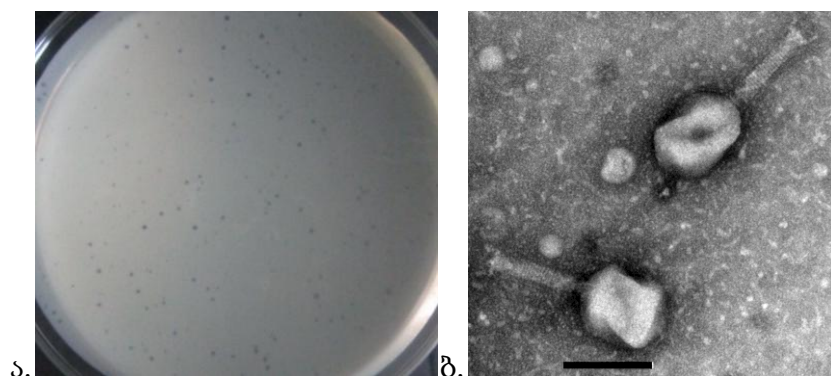


2.1.3 *vB-Ab-M-G7*

vB-Ab-M-G7 ფაგი გამოყოფილია 2009 წელს. პატრონ ბაქტერიულ შტამს წარმოადგენს იმიპენემ რეზისტენტული *A. baumannii* G7, რომელიც რუსეთ-საქართველოს ომის დროს დაჭრილი ჯარისკაციდან არის გამოყოფილი.

vB-Ab-M-G7 ფაგის ნეგატიური კოლონია არის ნათელი, 1-2მმ ზომის. ელექტრონული მიკროსკოპის მიხედვით, ფაგი *Myoviridae*-ს ოჯახს მიეკუთვნება, რაზედაც იკოსაედრული თავი ზომით 100ნმ და 120ნმ სიგრძის კუმშვადი კუდი ნათლად მიუთითებს (ილუსტრაცია 10).

ილუსტრაცია 10: *vB-Ab-M-G7*-ის მორფოლოგია. ა. ნეგატიური კოლონია; ბ. ელექტრონული მიკროსკოპია.

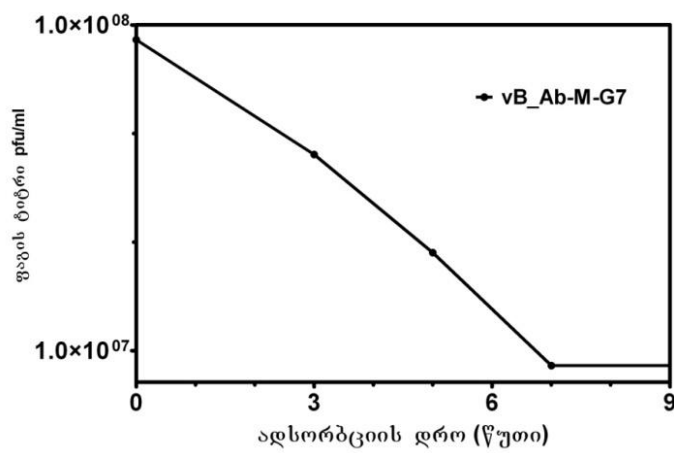


ერთჯერადი გამრავლების ციკლის შესწავლამ აჩვენა რომ, ფაგების 91,1% აღსორბირდებოდა 7 წუთში, განვითარების ლატენტური პერიოდი კი შეადგენს 20წუთს, *vB-Ab-M-G7* ასევე ხასიათდებოდა მაღალი გამოსავლიანობით-120 ფაგური ნაწილაკი (გრაფიკი 7).

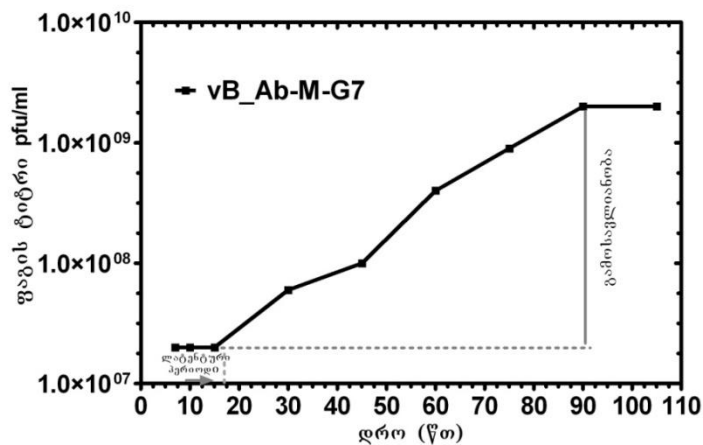
გრაფიკი 7: *vB-Ab-M-G7* ფაგის ერთჯერადი გამრავლების ციკლი.

ა. აღსორბცია; ბ. ფაგის ლატენტური პერიოდი, გამოსავლიანობა.

ა.



ბ.

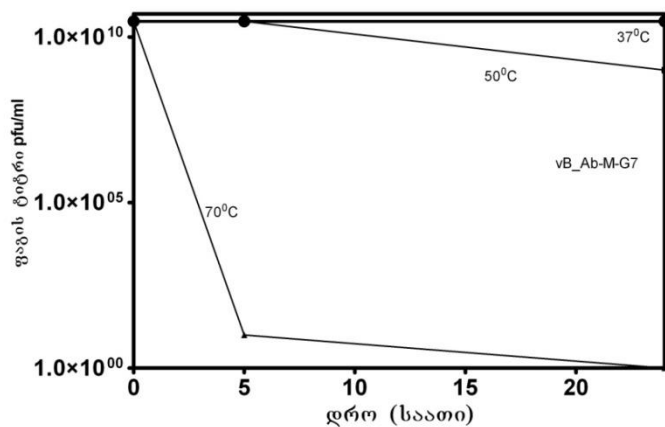


ტემპერატურული სტაბილურობის ტესტმა აჩვენა, რომ ფაგი *vB-Ab-M-G7* ინარჩუნებს აქტივობას 5 საათის განმავლობაში 50°Cზე კულტივირებისას, ხოლო 24 საათში ფაგების თითქმის 90% კვლავ სიცოცხლისუნარიანი რჩება. თუმცა აღმოჩნდა რომ, ეს ფაგი მგრძნობიარეა მაღალი ტემპერატურის მიმართ, კერძოდ ფაგი ინაქტივირდება 70°Cზე 24 საათის განმავლობაში (გრაფიკი 8 ა).

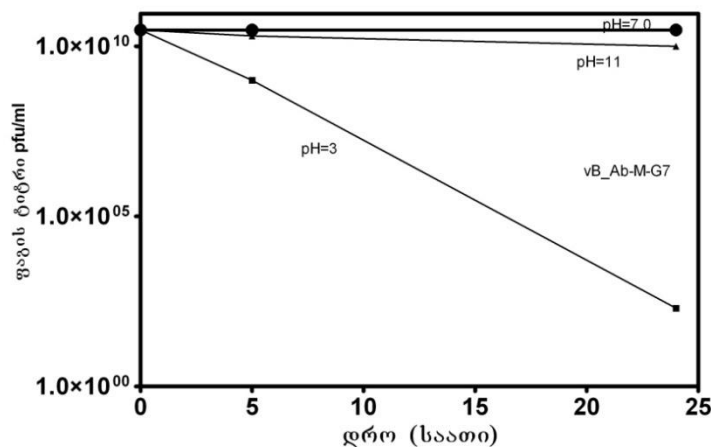
ფაგი *vB-Ab-M-G7* აქტივობას ინარჩუნებს 24 საათის განმავლობაში სხვადასხვა pH-ის პირობებში, კერძოდ, აქტივობა არ ეცემა pH-ის 5-11 დიაპაზონში. თუმცა pH=3 არეში 24 საათში ფაგის ტიტრი დაეცა 10^3 pfu/ml -მდე (გრაფიკი 8 ბ).

გრაფიკი 8: *vB-Ab-M-G7* ფაგის სტაბილურობა სხვადასხვა ტემპერატურისა (ა.) და pH-ის (ბ.) პირობებში.

ა.



ბ.



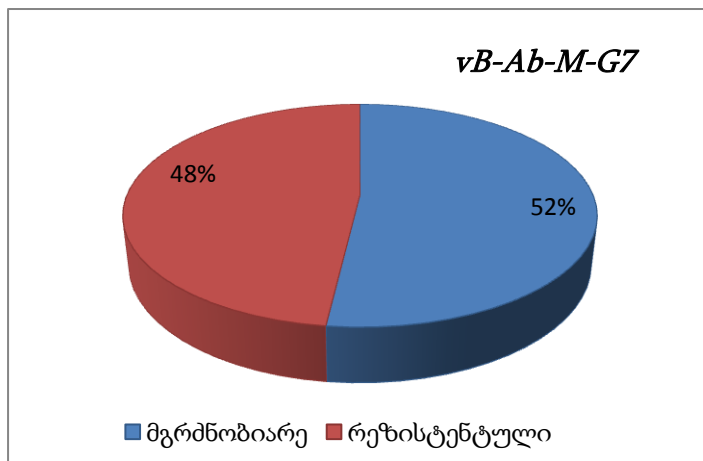
ფაგის *vB-Ab-M-G7* შემთხვევაშიც კიდევ ერთხელ დადასტურდა ქლოროფორმის მიმართ *Acinetobacter*-ის ფაგების მდგრადობა. ფაგის ტიტრი არ შეცვლილა ქლოროფორმის ზემოქმედებისას 24 საათის განმავლობაში.

პულსირებად ველში გელ-ელექტროფორეზის (PFGE) მონაცემების მიხედვით ფაგის გენომის ზომა არის 90კბ. PCR-ის მეთოდის და პროფაგების სპეციფიკური პრაიმერების გამოყენებით დადგინდა, რომ ფაგის *vB-Ab-M-G7* გენომი თავისუფალია

პროფაგების გენებისაგან, თუმცა PCR-ის შედეგი დადებითი აღმოჩნდა მისი მასპინძელი ბაქტერიული შტამის გენომისთვის.

მოქმედების სპექტრის შესწავლამ აჩვენა, რომ ფაგი *vB-Ab-M-G7* ფართო სპექტრის აქტივობით ხასიათდება მხოლოდ *Acinetobacter*-ის გვარის წარმომადგენლების მიმართ, 210 *Acinetobacter* spp.-ის შტამდან ეს ფაგი ახდენს 109-ის ლიზისს (52%). *vB-Ab-M-G7*-ს არ გააჩნია ბაქტერიოციდული აქტივობა სხვა გვარის ბაქტერიული შტამების წარმომადგენელთა (20 *Pseudomonas aeruginosa*, 20 *E.coli*, 10 *Salmonella*, 10 *Klebsiella*) მიმართ (გრაფიკი 9).

გრაფიკი 9: *vB-Ab-M-G7*-ის მოქმედების დიაპაზონი.

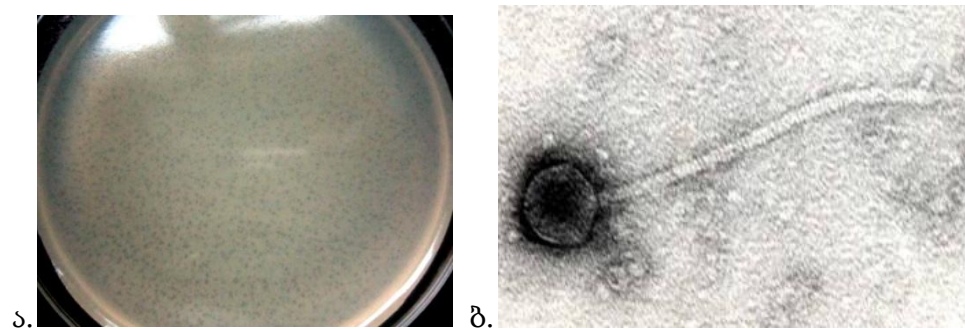


2.1.4 *vB_Ab-S-T14*

ფაგი *vB_Ab-S-T14* გამოყოფილია 2010 წელს, პატრონ შტამს წარმოადგენს *A. baumannii* T14, რომელიც ასევე კლინიკური მასალიდანაა იდენტიფიცირებული, მოწოდებულია ტიმონეს ჰოსპიტალიდან, მარსელიდან.

vB_Ab-S-T14 ფაგისთვის დამახასიათებელია წვრილი, ნათელი ნეგატიური კოლონიები. ელექტრონული მიკროსკოპიით დადგინდა, რომ ის მიეკუთვნება *Siphoviridae*-ს ოჯახს, 68 ნმ თავით და გრძელი, კუმშის უნარს მოკლებული კუდით (340 ნმ) (ილუსტრაცია 11).

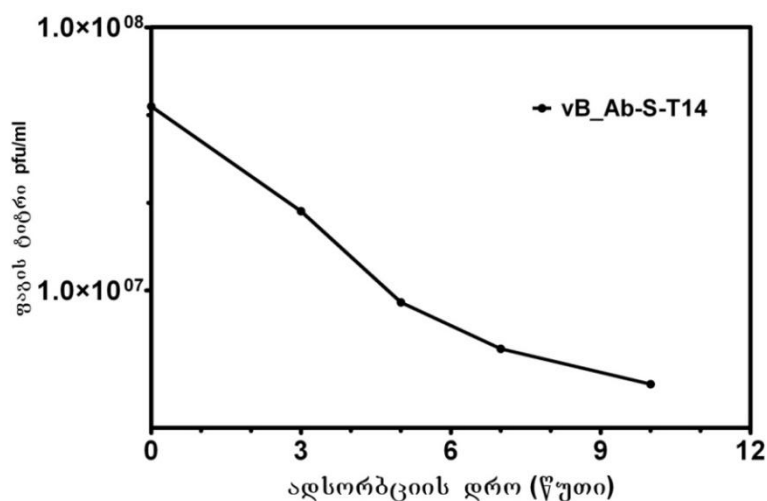
ილუსტრაცია 11: *vB_Ab-S-T14*-ის მორფოლოგია. ა. ნეგატიური კოლონია; ბ. ელექტრონული მიკროსკოპია.



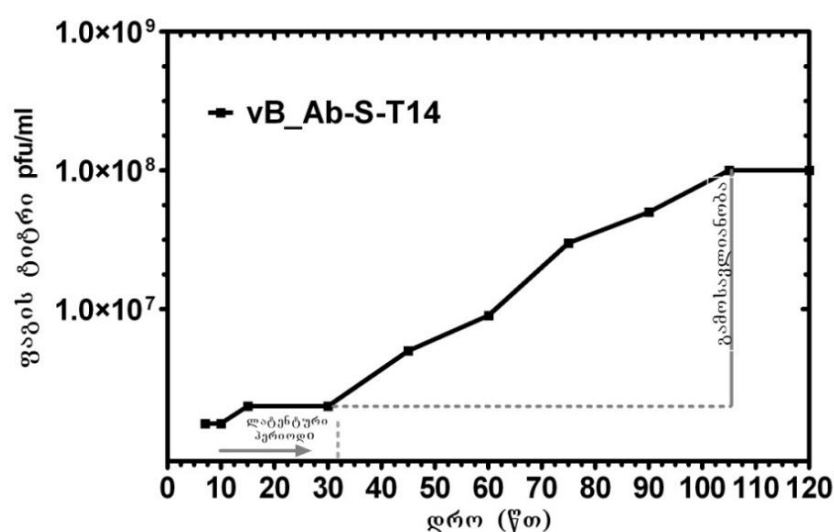
განვითარების ერთჯერადი სასიცოცხლო ციკლის შესწავლამ გვიჩვენა, რომ ფაგის 88% ადსორბირდება 10 წუთის განმავლობაში, ლატენტური პერიოდი წარმოადგენს 35წუთს და ეს ფაგი ხასიათდება მაღალი გამოსავლიანობით-200 ფაგური ნაწილაკი (გრაფიკი 10).

გრაფიკი 10: *vB_Ab-S-T14* ფაგის ერთჯერადი გამრავლების ციკლი. ა. ადსორბცია; ბ. ფაგის ლატენტური პერიოდი, გამოსავლიანობა.

ა.



ბ.

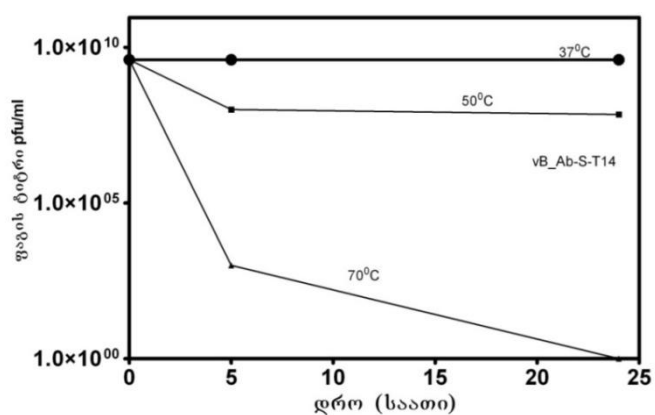


ფაგი *vB_Ab-S-T14*-ის როგორც სუფთა დნმ, ასევე მისი პატრონი შტამის გენომი შემოწმდა პროფაგების გენების არსებობაზე PCR-ის საშუალებით, თუმცა შედეგი იყო უარყოფითი.

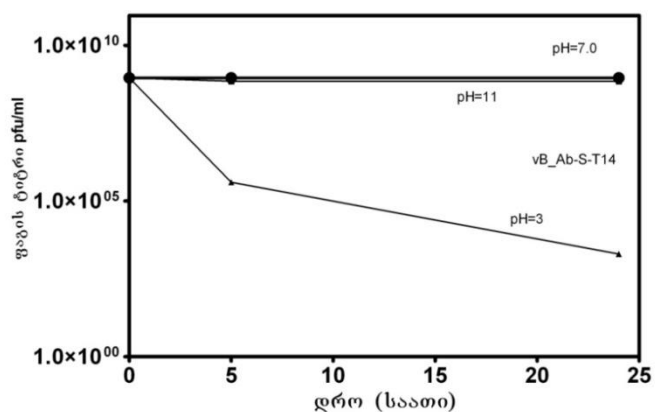
ფაგის სტაბილურობის ტესტმა აჩვენა, რომ *vB_Ab-S-T14* უცვლელად ინარჩუნებს აქტივობას ქლოროფორმის თანაობისას. საკმაოდ სტაბილური აღმოჩნდა მაღალი ტემპერატურის მიმართ. კერძოდ, 50°C-ზე 24 საათის განმავლობაში ტიტრმა დაიკლო მხოლოდ 1 რიგით. 70°C-ზე კი 5 საათში ფაგის აქტივობა მკვეთრად დაეცა, თუმცა ტიტრი შენარჩუნებული ჰქონდა 1×10^3 pfu/ml-მდე. pH=5-11-ის დიაპაზონში *vB_Ab-S-T14* ასევე ინარჩუნებს აქტივობას, ტიტრის მკვეთრი კლება აღინიშნა მხოლოდ pH=3-ის დროს, სადაც 24 საათში ფაგის ტიტრი განისაზღვრა როგორც 5×10^3 pfu/ml (გრაფიკი 11).

გრაფიკი 11: *vB_Ab-S-T14* ფაგის სტაბილურობა სხვადასხვა ტემპერატურისა (ა.) და pH-ის (ბ.) პირობებში.

ა.

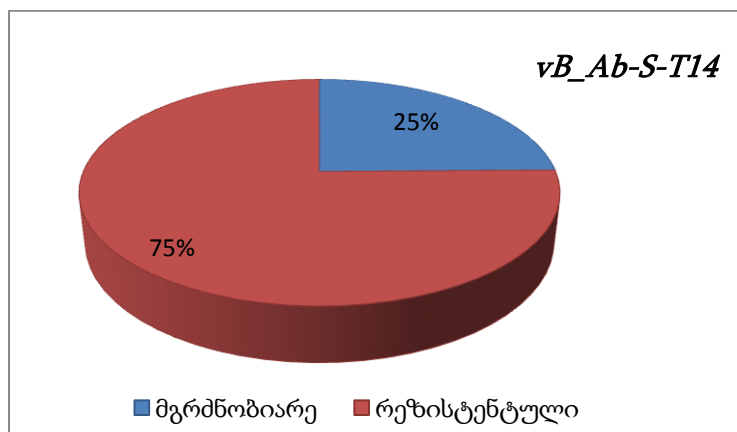


ბ.



მოქმედების სპექტრის შესწავლამ აჩვენა, რომ ფაგი *vB_Ab-S-T14* არააქტიურია სხვა გვარის წარმომადგენლების მიმართ (20 *Pseudomonas aeruginosa*, 20 *E.coli*, 10 *Salmonella*, 10 *Klebsiella*) და *Acinetobacter*-ის გვარის წარმომადგენლებთანაც საშუალო აქტივობით გამოირჩევა, 210 ბაქტერიული შტამიდან 52-ის ლიზისს ახდენს, რაც 25%-ს წარმოადგენს (გრაფიკი 12).

გრაფიკი 12: *vB_Ab-S-T14*-ის მოქმედების დიაპაზონი.

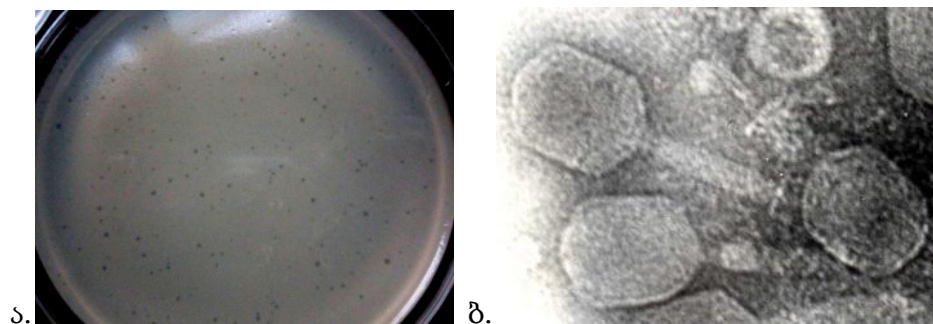


2.1.5 *vB_Ab-M-T40*

ფაგი *vB_Ab-M-T40* გამოყოფილია 2011 წელს, პატრონი ბაქტერიული შტამი არის *A. baumannii T40*, რომელიც საფრანგეთის, ტიმონეს საავადმყოფოდან არის მოწოდებული.

ფაგი *vB_Ab-M-T40* მყარ საკვებ ნიადაგზე იძლევა წვრილ, ნათელ ნეგატიურ კოლონიებს. მორფოლოგიის მიხედვით მიეკუთვნება *Myoviridae*-ს ოჯახს, გააჩნია რა 98 ნმ-იშ ზომის დიდი იკოსაედრული თავი და კუმშვადი 106 ნმ-ის სიგრძის კუდი (ილუსტრაცია 12).

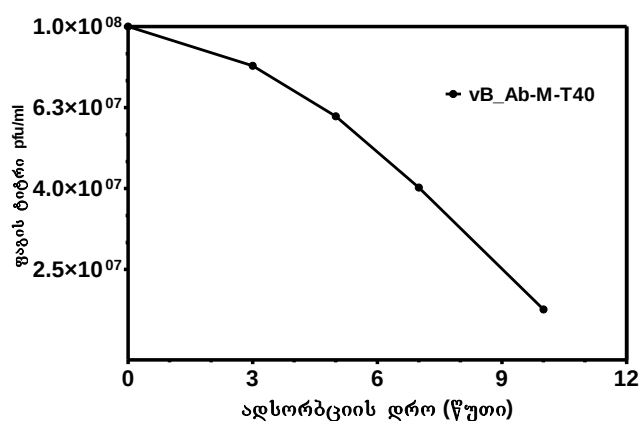
ილუსტრაცია 12: *vB_Ab-M-T40* მორფოლოგია. ა. ნეგატიური კოლონია; ბ. ელექტრონული მიკროსკოპია.



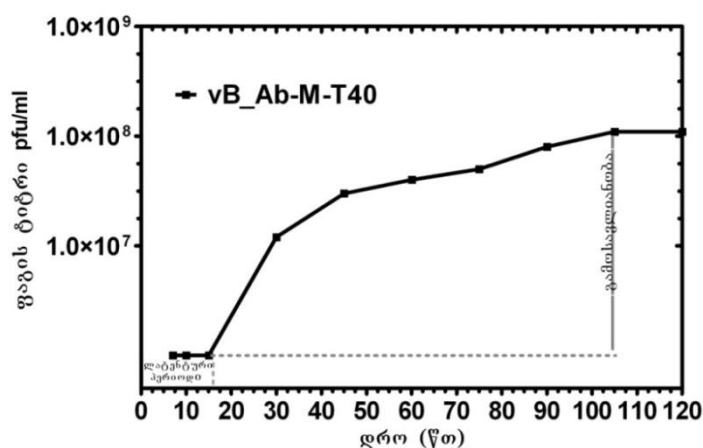
ფაგების 80%-ს ადსორბციისთვის 10 წუთი სჭირდება, დამახასიათებელია ასევე მოკლე ლატენტური პერიოდი - 30 წუთი, და ერთჯერადი განვითარების ციკლის გამოსავლიანობა კი წარმოადგენს 110 ფაგურ ნაწილას (გრაფიკი 13).

გრაფიკი 13: *vB_Ab-M-T40* ფაგის ერთჯერადი გამრავლების ციკლი. ა. ადსორბცია; ბ. ფაგის ლატენტური პერიოდი, გამოსავლიანობა.

ა.



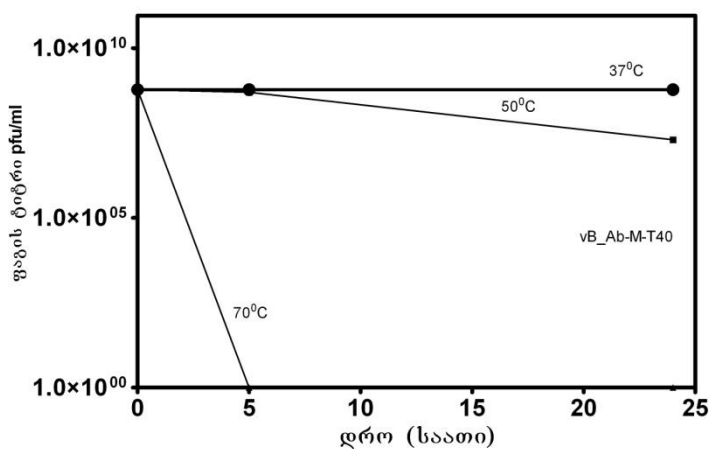
ბ.



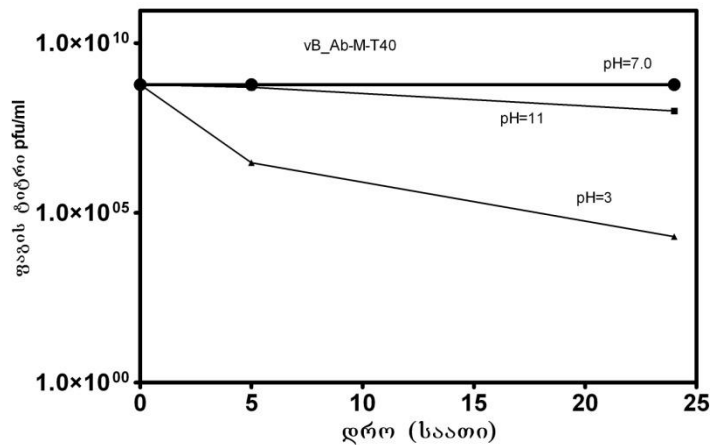
ფაგი *vB_Ab-M-T40* გამძლეა ქლოროფორმის მიმართ, მისი აქტივობა არ იცვლება 24 საათის განმავლობაშიც. მაღალი სტაბილურობით ხასიათდება ასევე pH-ის დიდ დიაპაზონში (5-11), აქტივობას ვერ ინარჩუნებს მხოლოდ ძლიერ მჟავა არეში (pH=3), სადაც 24 საათში ფაგის ტიტრი ეცემა 10^9 -დან 10^4 -pfu/ml-მდე. 50°C-ზე 5საათის განმავლობაში *vB_Ab-M-T40* აქტივობა არ იცვლება, 24 საათში კი ტიტრი იკლებს 2 რიგით. 70°C-ზე 5 საათით ამ ფაგის დაყოვნება საკმარისი აღმოჩნდა მისი ინაქტივირებისთვის (გრაფიკი 14).

გრაფიკი 14: *vB_Ab-M-T40* ფაგის სტაბილურობა სხვადასხვა ტემპერატურისა (ა.) და pH-ის (ბ.) პირობებში.

ა.



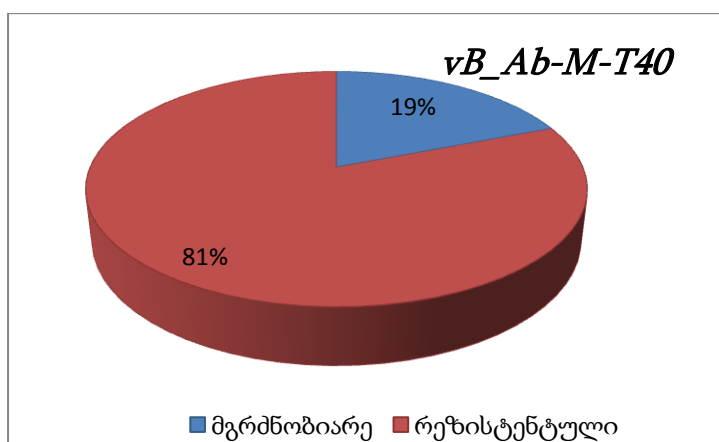
ბ.



ფაგი *vB_Ab-M-T40* და მისი პატრონი ბაქტერიული შტამი *A.baumannii T40* არ შეიცავენ პროფაგებისთვის დამახასიათებელ გენებს, რაც დადასტურდა PCR-ის უარყოფითი შედეგით.

მოქმედების სპექტრის მიხედვით, *vB_Ab-M-T40* დაბალი აქტივობის ფაგებს მიეკუთვნება, 210 ბაქტერიული შტამიდან ეს ფაგი ახდენს *Acinetobacter*-ის გვარის 42 წარმომადგენლის ლიზისს, თუმცა უნდა აღინიშნოს რომ არააქტიურია სხვა გვარის წარმომადგენელი ბაქტერიული შტამების მიმართ (20 *Pseudomonas aeruginosa*, 20 *E. Coli*, 10 *Salmonella*, 10 *Klebsiella*) (გრაფიკი 15).

გრაფიკი 15: *vB_Ab-M-T40*-ის მოქმედების დიაპაზონი.



2.2 *Acinetobacter spp.*-ის ბაქტერიოფაგებს შორის ნათესაური კავშირის დადგენა

Acinetobacter spp.-ის ფაგებს შორის სეროლოგიური ნათესაური კავშირის დასადგენად გამოვიყენეთ ნეიტრალიზაციის რეაქცია. ბოცვრების იმუნიზაციისთვის ავარჩიეთ 2 ფაგი (*vB_Ab-M-G7*; *vB_Ab-S-31*). იმუნიზაციისთვის ფაგების არჩევის დროს გათვალისწინებულ იქნა მათი მორფოლოგია, *vB_Ab-M-G7* განეკუთვნებოდა *Myoviridae*, ხოლო მეორე *vB_Ab-S-31* კი *Siphoviridae*-ს.

ბოცვრების იმუნიზაციით მიღებულ იქნა ანტიფაგური შრატი და სტანდარტული ნეიტრალიზაციის რეაქციით შესწავლილ იქნა ფაგებს შორის სეროლოგიური ნათესაობის არსებობა.

ნეიტრალიზაციის რეაქციის შედეგად დადგინდა, რომ *vB_Ab-M-G7*-ის შრატი 20 წუთში 1:500 განზავების შემთხვევაშიც კი ახდენდა ფაგი *vB_Ab-M-G7*-ს ნეიტრალიზაციას. ფაგი *vB_Ab-M-T40*, რომელიც *Myoviridae*-ს მიეკუთვნება მორფოლოგიით, *vB_Ab-M-G7*-ის შრატით (განზავებული 1:100) ნეიტრალდება 94% 20წუთში, თუმცა, თუ შრატი განზავებული იყო 1:500, მაშინ იგი *vB_Ab-M-T40*-ის 40%-ს ანეიტრალებდა. აღნიშნული შედეგი მოწმობს ამ ორი ფაგის სეროლოგიურ ნათესაურ კავშირზე (ცხრილი 6).

vB_Ab-M-G7-ის შრატი განზავებული 1:50, ვერ ანეიტრალებს დანარჩენ ფაგებს, რომლებიც მიეკუთვნებიან *Siphoviridae*-ს ოჯახს (ცხრილი 6).

ცხრილი 6: *vB_Ab-M-G7*-ის შრატით ნეიტრალიზაციის რეაქცია

ფაგი	მორფოლოგია	<i>vB_Ab-M-G7</i>		ნეიტრალიზაციის პროცენტი
		შრატის განზავება	დრო(წთ)	
<i>vB_Ab-M-G7</i>	<i>Myoviridae</i>	1:500	20	99%
<i>vB_Ag-S-7</i>	<i>Siphoviridae</i>	1:50	20	0
<i>vB_Ab-S-31</i>	<i>Siphoviridae</i>	1:50	20	0

<i>vB_Ab-S-T14</i>	<i>Siphoviridae</i>	1:50	20	0
		1:100	20	94%
<i>vB_Ab-M-T40</i>	<i>Myoviridae</i>	1:500	20	40%

მეორე შრატი მიღებულ იქნა *Siphoviridae*-ს ოჯახის წარმომადგენელი ფაგით *vB_Ab-S-31* ბოცვრების იმუნიზაციით. შემდგომი ნეიტრალიზაციის რეაქციის შედეგმა აჩვენა, რომ 1:500 განზავებულმა შრატმა 20 წუთში *vB_Ab-S-31* ფაგის 95%-ს გაანეიტრალა, თუმცა აღნიშნული შრატი, განზავებით 1:50-თან ვერ მოქმედებდა დანარჩენი ფაგების აქტივობაზე (ცხრილი 7).

ცხრილი 7: *vB_Ab-S-31*-ის შტარით ნეიტრალიზაციის რეაქცია

ფაგი	მორფოლოგია	<i>vB_Ab-S-31</i> შრატის განზავება	დრო(წთ)	ნეიტრალიზაციის პროცენტი
<i>vB_Ab-M-G7</i>	<i>Myoviridae</i>	1:50	20	0
<i>vB_Ag-S-7</i>	<i>Siphoviridae</i>	1:50	20	0
<i>vB_Ab-S-31</i>	<i>Siphoviridae</i>	1:500	20	95%
<i>vB_Ab-S-T14</i>	<i>Siphoviridae</i>	1:50	20	0
<i>vB_Ab-M-T40</i>	<i>Myoviridae</i>	1:50	20	0

ფაგებს შორის გენეტიკური ნათესაური კავშირის დასადგენად გამოყენებულ იქნა ფაგების რესტრიქციული ანალიზი. გამოყოფილ იქნა ხუთივე ფაგის დნმ და სამი ფერმენტის, *EcoRI*, *Spe1*, *HindIII* გამოყენებით მოხდა მათი რესტრიქცია. ხუთივე ფაგის დნმ-ზე ცდა იქნა ჩატარებული ერთდროულად, ერთნაირ პირობებში. რესტრიქციული ენდონუკლეაზებით ფაგების დნმ სხვადასხვა ზომით დაიჭრა, რაც

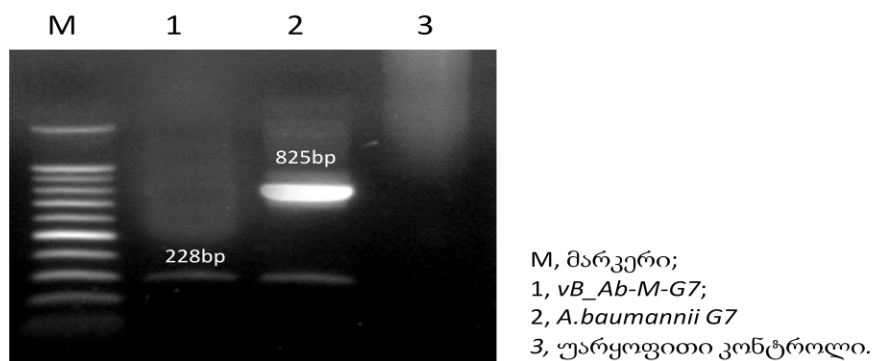
მოწმობს, რომ ხუთივე მათგანის გენომი განსხვავებულია და შედეგად სხვადასხვა ფაგებს წარმოადგენენ.

2.3 ტრანსდუქციის შესაძლებლობები *vB_Ab-M-G7* ფაგის მაგალითზე

vB_Ab-M-G7 ფაგის პატრონ ბაქტერიულ შტამს წარმოადგენს *A.baumannii* G7, რომელიც იმიპენემრეზისტენტულია და სადაც კარბაპენემრეზისტენტობა ქრომოსომულად მდებარე OXA24-like-ის მაკოდირებელი გენით არის განპირობებული.

vB_Ab-M-G7 ფაგის ლიზატი დამუშავდა DNase/RNase-თი, ბაქტერიული დნმ-ის ნარჩენებისგან გასაწმენდად, სასურველი შედეგის შესამოწმებლად შემდეგ ეტაპზე ჩატარდა 16s rRNA PCR, რისი საშუალებითაც კიდევ ერთხელ გადამოწმდა ფაგურ ლიზატში მიკრობული ნარჩენების არარსებობა. ფაგის დნმ გამოყოფილ იქნა High Pure Viral Nucleic Acid Qiagen კიტის გამოყენებით. *bla-oxa24like*-ის გენის სპეციფიკური პრაიმერებით და PCR-ის მეთოდით დადგინდა, რომ პოლიმერაზა ჯაჭვური რეაქცია იყო დადებითი, თუმცა, თუ PCR-ის პროდუქტის ზომა დადებით კონტროლში იყო 825bp, ფაგის გენომის შემთხვევაში PCR-ის პროდუქტის ზომა იყო 228bp (ილუსტრაცია 13). PCR-ის პროდუქტის სექვენირებით და ანალიზით დადგინდა, რომ 228bp-დან მხოლოდ პირველი 177 ნუკლეოტიდური წყვილი იყო თანხვედრაში 100%-ით კარბაპენემაზასთან OXA72, რომლის გენის ნომერი გენების ბანკში წარმოადგენს HQ219688. სექვენსის დანარჩენმა უბანმა კი არ მოგვცა მსგავსება გენების ბანკში არსებულ არცერთ გენტან (ილუსტრაცია 14).

ილუსტრაცია 13: *vB_Ab-M-G7*-ის გენომში OXA24-like გენის მაჩვენებელი აგაროზას გელი



ილუსტრაცია 14: *vB-Ab-M-G7*-ისა და *A.baumannii G7*-ის OXA24-like გენის სეკვენსის შედარება

A 1 MKKFILPIFSISILVSLACSSIKTKSEDNFHISSQHEKAISYFDEAQTQGVIIKGFPCSLAKISTLAQ 72
B 1 MKKFILPIFSISILVSLACSSIKTKSEDNFHISSQHEKAISYFDEAQTQGVIIKEGKNLSTYGNALARANKEYVPA 80

A _____
B 81 STFKNLINALIGLENHKATTNEIFKWDGKKRTYPMWEKDMTLGEAMALSAVPVYQELARRTGLELMQKEVKRVNFGNTNIG 160

A _____
B 161 TQVDNFWLVGPLKITPVQEVNFADDLAHNRLPFKLETQEEVKMLLIKEVNGSKIYAKSGWGMVDVTPQVGWLTGWVEQAN 240

A _____
B 241 GKKIPFSLNLEMKEGMSGIRNETYKSLENLGII 275

ტრანსდუქციის/ტრანსფორმაციის ექსპერიმენტები ჩატარდა როგორც *in vitro* ასევე *in vivo*. *in vitro* ცდებისთვის გამოყენებულ იქნა იმიპენემგრძნობიარე შტამები *A.baumannii T-3*, *T-9*, *T-16*, *T-10*. *in vivo* ცდისთვის კი მხოლოდ *A.baumannii T-10*. ტრანსდუქციის *in vitro* ცდა ტარდებოდა ერთი წლის განმავლობაში. როგორც *in vivo*, ასევე *in vitro* ცდების შედეგად ვერ იქნა მიღებული იმიპენემგრძნობიარე ბაქტერიული შტამები, რომელიც კულტივირებას შეძლებდა $8\mu\text{g/ml}$ შემცველ იმიპენემიან აგარზე. ტრანსდუქციის/ტრანსფორმაციის გამოვლენა ვერ მოხერხდა.

2.4 ფაგოთერაპიის ეფექტურობის შესწავლა ცხოველურ მოდელზე.

ფაგოთერაპიის ეფექტურობის შესასწავლად გამოვიყენეთ ცხოველური მოდელი, კერძოდ, ვირთაგვებზე ხელოვნურად მიყენებული ქრილობის ინფიცირებისა და შემდგომ ფაგის აპლიკაციის გზით დინამიკაში დავაკვირდით

ფაგისა და მიკრობის ტიტრის ცვლილებას და ჭრილობის შეხორცების მიმდინარეობას. დაკვირვება მიმდინარეობდა 7 დღის განმავლობაში.

პირველი ჯგუფი წარმოადგენდა საკონტროლო ჯგუფს. ჭრილობიან ვირთაგვებზე არ ხდებოდა არც ფაგის და არც მიკრობის აპლიკაცია და ამ ჯგუფში მიმდინარეობდა ზოგადად ჭრილობის შეხორცებაზე დაკვირვება. ცდის განმავლობაში ყველა ცხოველი გადარჩა. არცერთი ვირთაგვის ჭრილობიდან არ ამოითესა *A.baumannii*-ის ბაქტერიული შტამი. აღნიშნული შედეგი მოწმობს, რომ ცდა ჩატარდა დაბინძურების გარეშე და ხელოვნურად მიყენებული ჭრილობა არ წარმოადგენდა ვირთაგვებისთვის სასიკვდილოს.

მეორე ჯგუფში ჭრილობაზე ხდებოდა მხოლოდ ფაგის აპლიკაცია. 1მლ ფაგი 5×10^7 pfu/ml ტიტრით დაიტანებოდა 6 დღის განმავლობაში ჭრილობაზე. ცდის ბოლომდე ცხოველები იყვნენ მშვიდად, ჭრილობის მიმდინარეობა იდენტური იყო საკონტროლო ჯგუფის, რაც მიუთითებდა ფაგის არატოქსიკურობაზე. ამ ჯგუფის ცხოველების ჭრილობიდანაც ასევე არ მომხდარა *A.baumannii*-ის ბაქტერიული შტამის ამოთესვა. უნდა აღინიშნოს, რომ ფაგის ტიტრი ჭრილობიდან აღებულ სინჯში არ აღემატებოდა $1-2 \times 10^1$ pfu/ml-ს (გრაფიკი 16).

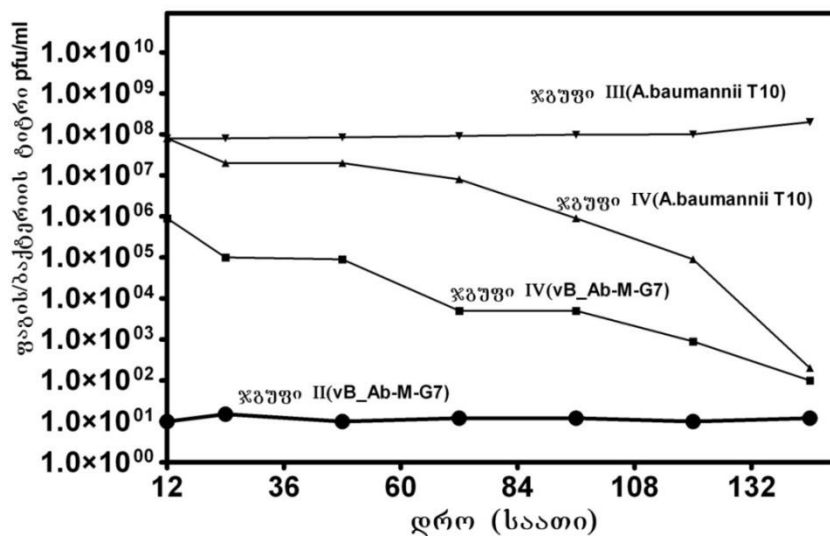
მესამე და მეხუთე საცდელ ჯგუფში - ვირთაგვების ჭრილობაზე მოხდა 1მლ ბაქტერიული შტამის აპლიკაცია *A.baumannii T-10* (მესამე ჯგუფი) და *A.baumannii G7* (მეხუთე ჯგუფი) (5×10^8 cfu/ml). მეორე დღისთვის ორივე ჯგუფის ცხოველებში უკვე აღვილი შესამჩნევი იყო ანთებით პროცესის მიმდინარეობა, აღინიშნა დაჩირქება, რაც მიუთითებდა ინფექციის განვითარებაზე და არა კოლონიზაციაზე, თუმცა უნდა აღინიშნოს, რომ *A.baumannii G7*-ით ინფიცირებული ვირთაგვებში ჩირქოვანი პროცესები უფრო მკვეთრად იყო გამოვლენილი და აღინიშნა 30% ლეტალობა ცდის მე-5 დღისთვის. მიკრობის ტიტრმა მოიმატა 10^8 cfu/ml -მდე (გრაფიკი 16).

მეოთხე და მეექვსე საცდელი ჯგუფები - თერაპიულ ჯგუფებს წარმოადგენდნენ. ფაგის აპლიკაცია ჭრილობაზე (1მლ ფაგი ტიტრით 5×10^7 pfu/ml) პირველად ინფიცირებიდან 12 საათის შემდეგ განხორციელდა და იგივე პროცედურა მეორდებოდა 6 დღის განმავლობაში დღეში ერთხელ. ორივე ჯგუფში პროცესების მიმდინარეობა მსგავსი აღმოჩნდა, მესამე დღემდე შესამჩნევი იყო ანთებითი პროცესები, თუმცა იგი ცდის ბოლოსთვის მთლიანად გაქრა, რაც ასევე აისახა

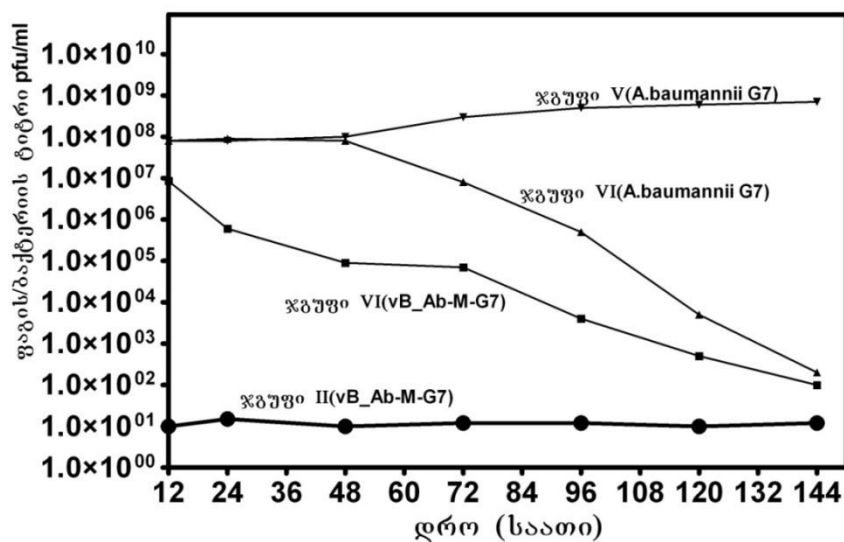
ბაქტერიის ტიტრის კლებაში. ბაქტერიული შტამების ტიტრმა ჭრილობაში დაიკლო 5×10^7 cfu/ml -დან $1-3 \times 10^3$ cfu/ml-მდე, შესაბამისად აღინიშნა ფაგის ტიტრის ცვლილება ცდის განმავლობაში 1×10^5 და $4-2 \times 10^3$ pfu/ml-მდე (გრაფიკი 16).

გრაფიკი 16: ფაგისა და მიკრობის ტიტრის ცვლილება ფაგოთერაპიის დროს მოდელზე. ა. III/V ჯგუფი; ბ. IV/VI ჯგუფი.

ა.



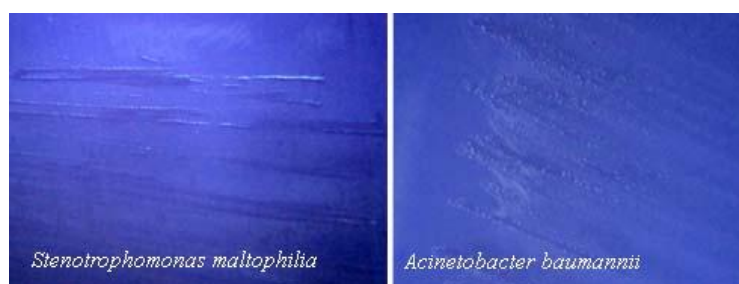
ბ.



თავი 3. *Stenotrophomonas maltophilia*-ს ბაქტერიული შტამის და სპეციფიკური ფაგის დახასიათება

Stenotrophomonas maltophilia 18 გამოყოფილია კლინიკური მასალიდან 2007 წელს. აღნიშნული ბაქტერიული შტამი Herellae აგარზე ისეთივე ფერის კოლონიებს იძლევა, როგორსაც *Acinetobacter*-ის წარმომადგენლები (ილუსტრაცია 15), ამიტომ მისი იდენტიფიცირებისთვის გამოვიყენეთ მასს-სპექტრომეტრი. MALDI-TOF MS-ის სიზუსტის მაჩვენებელი *Stenotrophomonas maltophilia* 18 ბაქტერიული შტამისთვის შეადგენდა 2,2.

ილუსტრაცია 15. Herellae-ის აგარზე *Stenotrophomonas maltophilia*-ს ზრდის თავისებურება.



ანტიბიოტიკომგრძნობელობა შესწავლილ იქნა დისკო-დიფუზური მეთოდით, აღნიშნული ბაქტერია 13 ანტიბიოტიკიდან მხოლოდ 2 ანტიბიოტიკის მიმართ იყო მგრძნობიარე (colistin, sulfamethoxazole/trimethoprim), დანარჩენების მიმართ კი რეზისტენტული, მათ შორის იმიპენემის მიმართაც (ცხრილი 8).

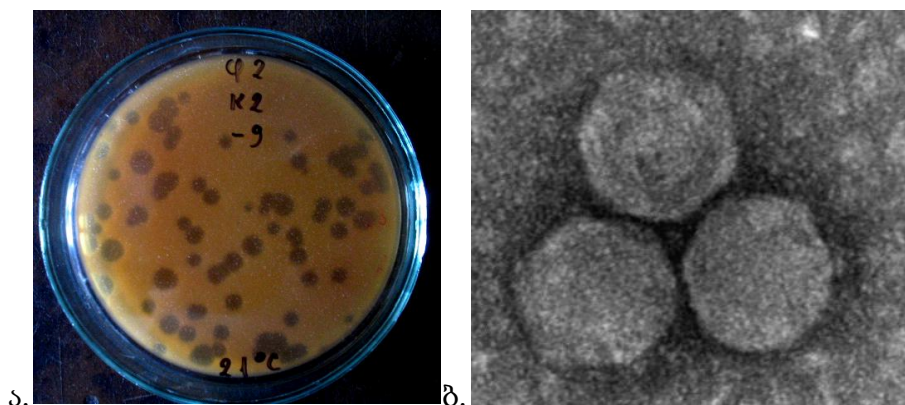
ცხრილი 8: *Stenotrophomonas maltophilia* 18-ს ანტიბიოტიკომგრძნობელობა

RIF	TZP	NOR	FOS	GEN	PIP	COL	SXT	CAZ	CIP	TOB	TIC	IPM
30	85	5	50	15	75	50	25	30	5	10	75	10
14>R	14>R	22>R	14>R	16>R	12>R	15>R	10>R	15>R	22>R	16>R	18>R	17>R
S≥19	S≥19	S≥25	S≥14	S≥18	S≥18	S≥15	S≥16	S≥21	S≥25	S≥18	S≥22	S≥22
I(16)	R(10)	R(6)	R(7)	R(6)	R(8)	S(18)	S(17)	R(8)	I(23)	R(8)	R(12)	R(8)

Stenotrophomonas maltophilia 18 შტამი შემოწმდა OXA51like, OXA23like, OXA24like, OXA58-ის მაკოდირებელი გენების არსებობაზე, თუმცა PCR-ის შედეგი იყო უარყოფითი, რაც მოწმობს, რომ ეს შტამი არ აწარმოებს აღნიშნულ კარბაპენემაზებს.

Stenotrophomonas maltophilia 18-ის სპეციფიკური ფაგი *vB_Sm-P-18* გამოიყოფილია ჩამდინარე წყლიდან 2008 წელს. მყარ საკვებ აგარზე იძლევა დიდი ზომის ნათელ კოლონიებს. ელექტრონული მიკროსკოპირების შედეგად მორფოლოგიურად ეს ფაგი მიეკუთვნა *Podoviridae*-ს ოჯახს, რომელსაც გააჩნია 60ნმ ზომის თავი (ილუსტრაცია 16).

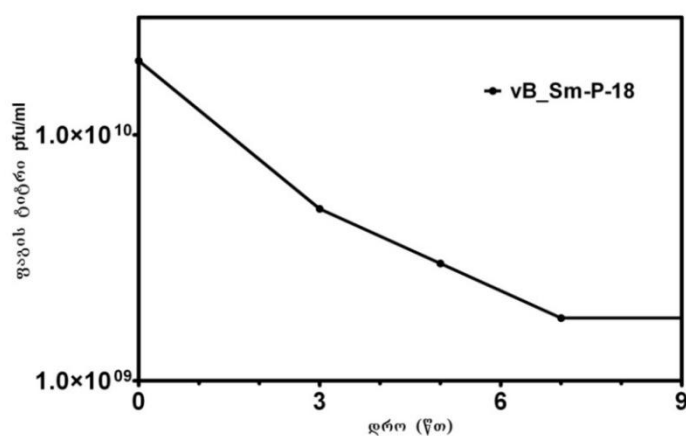
ილუსტრაცია 16: *vB_Sm-P-18*-ის მორფოლოგია. ა. ნეგატიური კოლონია; ბ. ელექტრონული მიკროსკოპია.



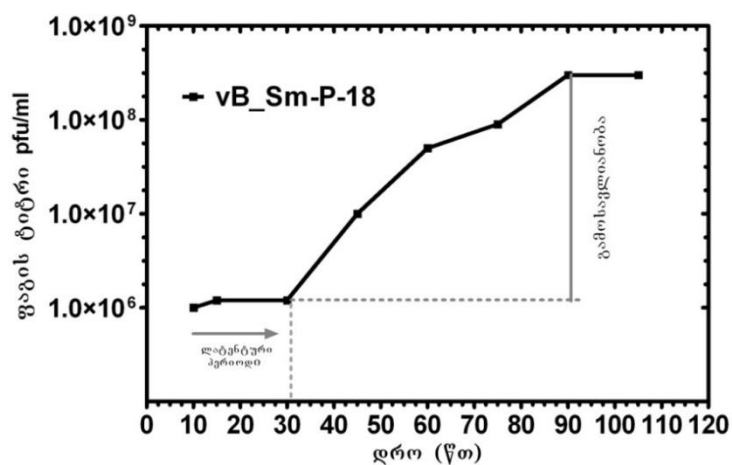
vB_Sm-P-18-ის 92% ადსორბირდება 7 წუთის განმავლობაში. 35 წუთიანი ლატენტური პერიოდის შემდეგ იძლევა მაღალ გამოსავლიანობას 300 ფაგური ნაწილაკის სახით (გრაფიკი 17). პულსირებადი გელ-ელექტროფორეზის შედეგის მიხედვით *vB_Sm-P-18*-ის გენომის ზომა 33kb-ია (ილუსტრაცია 17).

გრაფიკი 17: *vB_Sm-P-18* ფაგის ერთჯერადი გამრავლების ციკლი. ა. ადსორბცია; ბ. ფაგის ლატენტური პერიოდი, გამოსავლიანობა.

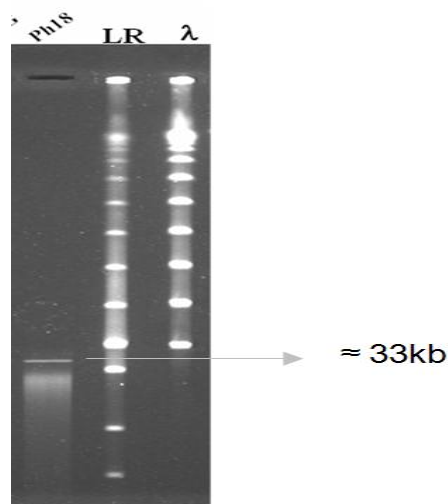
ა.



ბ.



ილუსტრაცია 17: *vB_Sm-P-18*-ის დნმ-ის ზომა (PFGE)

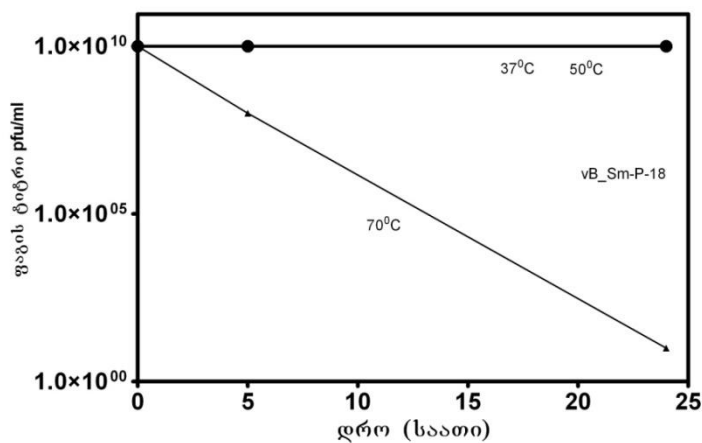


ტემპერატურისა თუ pH-ის სხვადასხვა პირობებში ფაგის *vB_Sm-P-18* სტაბილურობის შესწავლისას დადგინდა, რომ ფაგი ინარჩუნებს სტაბილურობას

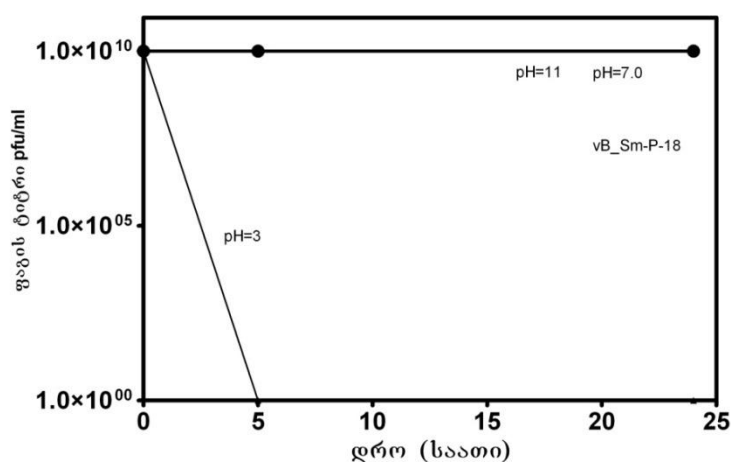
მაღალი ტემპერატურის პირობებში, რაც ნათლად გამოვლინდა 50°C-ზე 24 საათით დაყოვნების შემდეგ. შედეგად ფაგის ტიტრი არ შეცვლილა. *vB_Sm-P-18*-ის ინაქტივაცია მოხერხდა მხოლოდ ფაგის 70°C-ზე 24 საათით დაყოვნებით. pH-ის ფართო დიაპაზონში ამ ფაგის აქტივობა არ იცვლება (pH=5-11), თუმცა ძლიერ მჟავა არეში (pH=3) 5 სათით დაყოვნებამ გამოიწვია *vB_Sm-P-18*-ის სრული ინაქტივაცია (გრაფიკი 18).

გრაფიკი 18: *vB_Sm-P-18* ფაგის სტაბილურობა სხვადასხვა ტემპერატურისა (ა.) და pH-ის (ბ.) პირობებში.

ა.



ბ.



მოქმედების სპექტრი შესწავლილ იქნა მხოლოდ სხვა გვარის წარმომადგენელი ბაქტერიების გამოყენებით (*Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *E.coli*, *Klebsiella*, *Salmonella*), აღნიშნული ფაგი არ იყო აქტიური ამ ბაქტერიული შტამების

მიმართ, რაც მოწმობს მის სპეციფიკურობაზე. სამწუხაროდ, *Stenotrophomonas maltophilia*-ს სხვა ბაქტერიული შტამების ჩვენს კოლექციაში არ არსებობის გამო ამ გვარის შტამების მიმართ მისი აქტივობის შესწავლა ვერ მოხერხდა.

თავი 4. ბაქტერიოფაგის საცდელი პრეპარატი

მეთოდებში აღწერილი პროცედურის მიხედვით, შესაბამისად განზავებული ფაგების გაერთიანებით იქნა მიღებული საცდელი სამკურნალო-პროფილაქტიკური პრეპარატი. ამ კოქტეილში გაერთიანდა 4 *Acinetobacter* spp.-ის სპეციფიკური ფაგი (*vB_Ag-S-7*, *vB_Ab-S-31*, *vB_Ab-S-14*, *vB_Ab-M-40*) და 1 *Stenotrophomonas maltophilia*-ს სპეციფიკური ფაგი *vB_Sm-P-18* (ილუსტრაცია 18). მიუხედავად მოქმედების მაღალი სპექტრისა, კოქტეილში არ შევიდა ფაგი *vB_Ab-M-G7*, რადგან მისი გენომი შეიცავს იმიპენემის რეზისტენტობის განმსაზღვრელ გენს.

ილუსტრაცია 18: *Acinetobacter* spp ფაგის საცდელი სამკურნალო-პროფილაქტიკური პრეპარატი

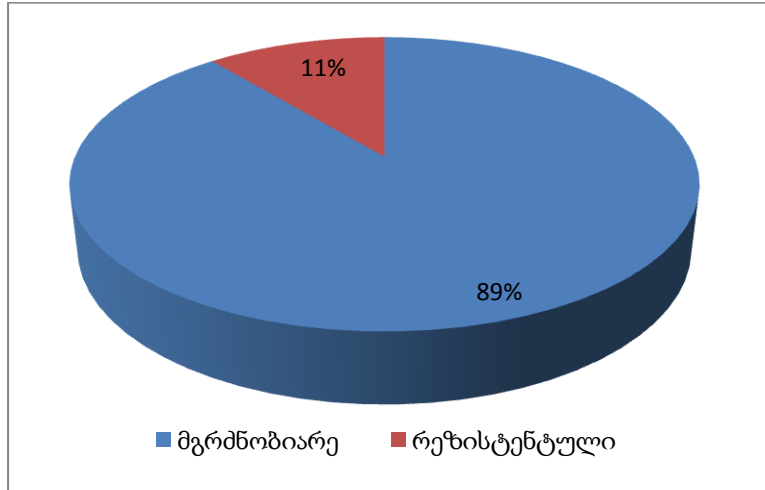


საცდელი პრეპარატის პერიოდული ტიტრაციის (აპელმანის და გრაციას მეთოდი) შედეგების მიხედვით დადგინდა, რომ აღნიშნული ფაგების აქტივობა არ იცვლება, რაც გამორიცხავს ერთმანეთზე ანტაგონისტურ გავლენას.

Acinetobacter spp.-ის ბაქტერიულ შტამებზე კოქტეილის მოქმედების სპექტრის შესწავლამ გამოავლინა ამ საცდელი პრეპარატის მაღალი აქტივობა. 210

შტამიდან აღნიშნულმა კოქტერილმა მოახდინა ბაქტერიების 89%-ის ლიზისი (გრაფიკი 19).

გრაფიკი 19: ფაგის საცდელი პრეპარატის მოქმედების დიაპაზონი



ინტერპრეტაცია/დისკუსია.

ბოლო ათწლეულების მანძილზე *Acinetobacter* spp. მსოფლიოში ერთ-ერთ ყველაზე გავრცელებულ და საშიშ საავადმყოფოსშიდა პათოგენად გვევლინება (5, 48, 59, 78). მრავალი მონაცემი არსებობს *A.baumannii*-ით გამოწვეული კლინიკური აფეთქებების შესახებ. ეს ბაქტერია ხშირად ხდება მიზეზი ისეთი გართულებებისა, როგორიცაა პნევმონიები, სისხლის ინფექციები, მენინგიტები, ქრილობათა ინფექციები (5, 99, 115). ამ ინფექციების მკურნალობას ართულებს ის ფაქტი, რომ *A.baumannii*-ს აქვს უნარი ადვილად განივითაროს რეზისტენტობა სხვადასხვა ბაქტერიოციდული ნივთიერებების მიმართ, შედეგად ვიღებთ მულტი-ანტიბიოტიკორეზისტენტულ ბაქტერიულ შტამებს (5, 53, 78, 129). ბოლო წლებამდე აბ ბაქტერიებით გამოწვეული ინფექციების სამკურნალოდ ყველაზე ეფექტურ საშუალებად კარბაპენემები მიიჩნეოდა. მას შემდეგ, რაც 1993 წელს პირველად აღმოაჩინეს OXA-კარბაპენემაზები *A.baumannii*-ში, მრავალჯერ დადასტურდა მათი საშიშროება და გავრცელება მსოფლიო მასშტაბით (64). დღესთვის მრავალი კარბაპენემრეზისტენტული ბაქტერიაა იდენტიფიცირებული, სადაც რეზისტენტობა სხვადასხვა მექანიზმით არის განპირობებული (11, 56, 61, 64, 66), ეს კი *A.baumannii*-ით გამოწვეული ინფექციების მკურნალობას სერიოზულ საფრთხეს უქმნის.

ზემოაღნიშნულიდან გამომდინარე, ჩვენი კვლევის მიზანს წარმოადგენდა *Acinetobacter* spp.-ს შტამების იდენტიფიცირება და შემდგომ იმიპენემრეზისტენტულ შტამებში რეზისტენტულობის მექანიზმების შესწავლა.

მას-სპექტრომეტრი (MALDI-TOF-MS) დიდი ხანია წარმატებით გამოიყენება ბაქტერიული შტამების იდენტიფიკაციისთვის (112). ამ მეთოდის დიდ უპირატესობას წარმოადგენს ის ფაქტი, რომ უკვე შესაძლებელია ბაქტერიული შტამის იდენტიფიცირება უშუალოდ კლინიკური მასალიდანაც. ჩვენი კვლევის განმავლობაში 55 შტამი წარმატებით იდენტიფიცირდა როგორც *Acinetobacter* spp, სწორედ მას-სპექტრომეტრის საშუალებით, რითაც კიდევ ერთხელ დადასტურდა ამ მეთოდის ბაქტერიული შტამების იდენტიფიკაციისთვის ფართოდ გამოყენების შესაძლებლობა. *A.baumannii* სახეობის ბაქტერიული შტამების იდენტიფიკაციისთვის

ასევე გამართლებული აღმოჩნდა bla_{OXA51like} გენის არსებობის დეტექცია (125), რაც კიდევ ერთხელ დადასტურდა წინამდებრე ნაშრომში, სადაც ყველა *A.baumannii*-ის შტამი შეიცავდა ამ გენს, მაშინ როცა *Acinetobacter*-ის სხვა სახეობის წარმომადგენლის გენომში ეს გენი არ აღმოჩნდა. bla_{OXA51like} გენის დეტექციის საშუალებით *A.baumannii*-ის იდენტიფიკაციის მაგალითი კარგად ჩანს ილუსტრაციაზე (ილუსტრაცია 3), სადაც უარყოფით კონტროლად *A. genomospecies* არის გამოყენებული.

იმიპენემრეზისტენტული შტამების გამოვლენა და რეზისტენტობის მექანიზმის შესწავლა 35 *A.baumannii*-ის შტამზე ჩატარდა. შედეგებიდან ცნობილი გახდა, რომ 6 ბაქტერიული შტამი აღმოჩნდა იმიპენემრეზისტენტული (*A.baumannii* 3, 4, 5, 6, 9, G7) (ილუსტრაცია 4; ცხრილი 5)). ექვსივე მათგანი შეიცავდა bla_{OXA51like} გენს. კარბაპენემაზა OXA51like ცნობილია სუსტი კარბაპენემ-ჰიდროლიზური აქტივობით, თუმცა მისი ჰიპერექსპრესია, რომელიც დაკავშირებულია ამ გენის “upstream” ISAbal-ის არსებობასთან, ხშირად იმიპენემრეზისტენტობის მაჩვენებელი ხდება (11, 20, 124). ნაჩვენებია, რომ თუ OXA51like-ISAbal კომპლექსი მდებარეობს პლაზმიდაში, იგი იმიპენემის მიმართ რეზისტენტობას განსაზღვრავს, ვიდრე ქრომოსომაში მდებარე იგივე კომპლექსი (20). ამას მოწმობს ტაივანში გამოყოფილი იმიპენემ *A.baumannii*-ის შტამი, სადაც რეზისტენტობა გაპირობებული იყო პლაზმიდაში მდებარე OXA51like-ISAbal კომპლექსით. წინამდებარე შრომის შემთხვევაში 5 *A.baumannii*-ის შტამის პლაზმიდა შეიცავდა OXA51like და ISAbal, თუმცა ისინი არ შეიცავდნენ სხვა OXA-მაკოდირებელ გენებს და იყვნენ იმიპენემის მიმართ მგრძნობიარე (*A.baumannii* G3, 2, 1, 257, 10). ეს შეიძლება აიხსნას ჩვენს შტამებში ISAbal-ის არა-upstream მდებარეობით (ილუსტრაცია 6).

6 იმიპენემრეზისტენტული შტამიდან, *A.baumannii*-ის 5 შტამში (რომლებიც გამოყოფილია ერაყში დაჭრილი ჯარისკაცებისგან), იმიპენემრეზისტენტობა განპირობებული იყო bla_{OXA23like} გენის არსებობით პლაზმიდაში. ეს გენი კარგად არის ცნობილი, იგი მსოფლიოში ერთ-ერთი ყველაზე მეტად გავრცელებულია სხვა კარბაპენემაზებთან შედარებით, რომელსაც ვხვდებით, როგორც პლაზმიდაში, ასევე ქრომოსომულად (11, 61, 64, 80, 85). ორივე მდებარეობით ეს გენი ადვილად განაპირობებს მისი მატარებელი შტამების იმიპენემრეზისტენტობას. ერაყში

დაჭრილი ამერიკელი და ინგლისელი ჯარისკაცებიდან გამოყოფილ შტამებში იმიპენემრეზისტენტობის მექანიზმები შესწავლილია და გამოქვეყნებული, სადაც რეზისტენტობა სწორედ OXA23-like გენის არსებობასთან არის დაკავშირებული. ჩვენს შემთხვევაშიც იგივე დადასტურდა.

წინამდებარე ნაშრომის სიახლეს წარმოადგენს საქართველოში, საქართველო-რუსეთ ომის დროს დაჭრილი პაციენტისგან გამოყოფილი შტამის დახასიათება, რომელიც მაღალი რეზისტენტობით ხასიათდებოდა ანტიბიოტიკების მიმართ (კოლისტინის გარდა). იმიპენემრეზისტენტობა ერთის მხრივ აქ გაპირობებული იყო ქრომოსომულად მდებარე OXA24-like გენით, მეორეს მხრივ კი პლაზმიდაში მდებარე bla_{OXA51like} და ISAba1 გენებით, რაც დამტკიცდა ტრანსფორმაციის შედეგად, როდესაც ტრანსკონუგატები გაიზარდნენ იმიპენემის შემცველ აგარზე. მეტალო-β-ლაქტამაზა NDM-1, რომელიც კარბაპენემრეზისტენტობას ძირითადად *Enterobacteriaceae*-ს წარმომადგენლებში განსაზღვრავს, აღმოჩენილია ასევე ინდოეთში და პაკისტანში გამოყოფილ *Acinetobacter baumannii*-ის შტამებშიც (61). სწორედ ამიტომ კვლევის პერიოდში იმიპენემრეზისტენტული შტამები ასევე შევამოწმეთ ამ გენის არსებობაზე, თუმცა ამ გენის, ისევე, როგორც bla_{OXA58} გენის დეტექცია არ მოხდა.

A. baumannii-ის ბაქტერიული შტამების ანტიბიოტიკორეზისტენტობის შესწავლისას გასათვალისწინებელია და საინტერესოა ამ შტამის გენომში ე.წ. „რეზისტენტული კუნძულის არსებობა“ (5, 42). ამ მიზანს ემსახურებოდა იმიპენემრეზისტენტულ შტამებში რეზისტენტული კუნძულების არსებობის დეტექცია, სპეციალურად ამ კვლევისთვის დამზადებული ATPase-ს მაკოდირებელი უბნების სპეციფიკური პრაიმერების გამოყენებით. როგორც აღმოჩნდა, 6 ერაყში გამოყოფილი იმიპენემრეზისტენტული შტამიდან ხუთი (*A. baumannii* 3, 4, 5, 6, 9) შეიცავს ამ უბანს, ამ ხუთივე შტამში კარბაპენემაზების მაკოდირებელი გენები პლაზმიდაშია მოთავსებული, საქართველოში გამოყოფილი *A. baumannii* G7 კი არა. ამ შედეგებიდან შეიძლება დავასკვნათ, რომ კარბაპენემაზები რეზისტენტულ უბანში ლოკალიზებით არ ხასიათდებიან, სხვა ჯგუფის ანტიბიოტიკების რეზისტენტულობის განმსაზღვრელი გენებისგან განსხვავებით.

ანტიბიოტიკორეზისტენტობა არის მზარდი გლობალური პრობლემა. ბაქტერიას ყოველთვის ჰქონდა უნარი დაეცვა თავი სხვადასხვა ბაქტერიოციდული ნივთიერებებისგან, გაეზიარებინა რეზისტენტულობის გენი სხვა ბაქტერიისთვის, ეს ყველაფერი მოწმობს, რომ რეზისტენტობა აგრძელებს განვითარებას. რეზისტენტულობის გენების გაზიარება, გავრცელება სხვადასხვა ბაქტერიებს შორის ხორციელდება ტრანსფორმაციის, ტრანსდუქციის, კონუგაციის საშუალებით. მნიშვნელოვანი წარმომადგენელი, რომელიც მთავარ როლს თამაშობს დნმ-ის უბნის გადატანაში ერთი ბაქტერიიდან მეორეში, არის ბაქტერიოფაგი (15, 95, 107). მიკრობთა ვირუსები, მიიჩნევიან ყველაზე მეტად გავრცელებულ ვექტორებად, რომლებიც ახორციელებენ გენების ტრანსფერს. ლიზოგენურ ფაგებს, რომელთა გენომიც შეიცავს ანტიბიოტიკორეზისტენტულობის განმსაზღვრელ გენს და გააჩნიათ მოქმედების ფართო სპექტრი, შეუძლიათ ეს გენი გაავრცელონ ფილოგენეტიკურად შორს მდგომ ბაქტერიებშიც კი (36, 102). გენერალიზირებული ტრანსდუქციის გარდა, ბაქტერიოფაგები ასევე შეიძლება დიდ როლს თამაშობდნენ ე.წ. ქიმერული გენების შექმნაში (122).

A. baumannii-ის შტამებში, როგორც უკვე აღვნიშნეთ, ყველაზე დიდ პრობლემას წარმოადგენს იმიპენემრეზისტენტულობის განმსაზღვრელი გენების არსებობა. ამ გენების გავრცელება სხვადასხვა ბაქტერიებში კი უკვე მსოფლიო პრობლემაა. ბაქტერიოფაგები, რომელთა გენომი შეიცავდა β -ლაქტამაზას მაცოდირებელ გენს გამოვლენილია, თუმცა ამ გენის ტრანსფერი ტრანსდუქციით არ დადასტურებულა (95).

ცდების შედეგად დადგინდა, რომ ფაგი *vB-Ab-M-G7* შეიცავდა იმიპენემის მიმართ რეზისტენტობის განმსაზღვრელ გენს OXA24like, რომელიც ასევე მისი პატრონი შტამის *A. baumannii* G7 ქრომოსომაში იქნა აღმოჩენილი. PCR-ის პროდუქტის შემდგომი სექვენირებით დადგინდა, რომ მხოლოდ 58 ამინომჟავა იყო მსგავსი OXA72-ის (OXA24like), დანარჩენი 15 ამინომჟავა კი სრულიად განსხვავებული იყო. ბიოლოგიური მახასიათებლებით, სტაბილურობით, კოლონიის მორფოლოგიით ეს ფაგი ვირულენტურია და ამ ფაგის გენომში OXA24-like გენის არსებობა მოულოდნელი აღმოჩნდა (ილუსტრაცია 13, 14).

სწორედ ამიტომ კვლევის მიზანს წარმოადგენდა მოგვეხდინა ტრანსდუქცია ან ტრანსფორმაცია იმიპენემის მიმართ მგრძნობიარე შტამებში. მიზნად დავისახეთ გვენახა ტრანსდუქციის შესაძლებლობა როგორც *in vitro*, ასევე *in vivo*, რომლისთვისაც გამოვიყენეთ ვირთაგვები მოდელირებული ჭრილობით. ცნობილია, რომ ტრანსდუქციის შემთხვევა ძლიან მცირეა და ხდება 10^{-4} -ში ერთხელ. სწორედ ამიტომ *in vitro* ტრანსდუქციისა და ტრანსფორმაციის ცდები 1 წლის განმავლობაში მიმდინარეობდა, თუმცა იმიპენემის შემცველ აგარზე (8მკგ/მლ) ტრანსკონუგატების კოლონიები ვერ მივიღეთ.

აღნიშნული შედეგების ასახსნელად გამოვიყენეთ 2 დაშვება. პირველ შემთხვევაში დავუშვათ, რომ ფაგი *vB-Ab-M-G7* არის ლიზოგენური. ამ შემთხვევაში, ამ გენის არსებობა ფაგში უკვე ნათელია, თუმცა ამ შემთხვევაში, ფაგს მასპინძელი უჯრედიდან წამოღებული აქვს მხოლოდ რეზისტენტული გენის ნაწილი, რომელსაც სხვა მასპინძელში მოხვედრის შემთხვევაში, არ აქვს ექსპრესიის უნარი და შედეგად, ვერ მივიღებთ იმიპენემრეზისტენტულ შტამს, ანუ ვერ მოხდება ტრანსკონუგანტის გამოვლენა წარმატებული ტრანსდუქციის შემთხვევაში.

ამ შემთხვევაში თავს იჩენს ახალი საშიშროება, რაც გულისხმობს ახალი ქიმერული გენის შექმნას, რომელიც, თავის მხრივ, შეიძლება წარმოადგენდეს ახალ რეზისტენტობის გენს. ამის ნათელი მაგალითია გენი NDM-1, რომელიც ფართოდაა გავრცელებული *Enterobacteriaceae*-ს წარმომადგენლებში და იმიპენემის მიმართ რეზისტენტობას განაპირობებს. ბოლო კვლევებიდან დადგინდა, რომ ეს გენი არის ქიმერული, შექმნილი *A. baumannii*-ში ორი გენისგან: ამინოგლიკოზიდების მიმართ რეზისტენტობის განმსაზღვრელი გენისა *aph6* და ძველი ლაქტამაზ-გენისგან (122).

მეორე დაშვება უკვე შეეხება *vB-Ab-M-G7* -ის, როგორც ლიტიური ფაგის განხილვას. კვლევაში შევეცადეთ მოგვეხდინა ტრანსდუქციის ინდუცირება, თუმცა წარუმატებლად. აქედან შეიძლება დავასკვნათ, რომ ეს ფაგი არის ლიტიური და არ იღებს მონაწილეობას გენების ჰორიზონტალურ ტრანსფერში. იმისთვის, რომ ავხსნათ ამ გენის არსებობა ფაგის გენომში, შეიძლება მოვიყვანოთ რამდენიმე მაგალითი ლიტერატურიდან, რომელიც შეეხება OXA24like ის გავრცელებას.

რამდენიმე პუბლიკაციაა დათმობილი OXA24like-ისა და დნმ-ის მოდულის XerC/XerD-like-ის კავშირზე, ეს მოდული კი, როგორც ცნობილია, გენების მობილიზაციასა და საიტ-სპეციფიკურ რეკომბინაციაში იღებს მონაწილეობას (92).

ცალკე განხილვის თემაა ფსევდოლიზოგენიის მდგომარეობა, რომელიც გამოვლინდება მასპინძელი უჯრედის ე.წ. შიმშილის დროს, ანუ საკვებით ღარიბ პირობებში (106). ასეთ დროს არ არის საკმარისი ენერგია იმისთვის, რომ ფაგმა განახორციელოს თავისი სასიცოცხლო ციკლი და ფაგის გენომი მასპინძელი უჯრედის შიგნით არის არააქტიურ მდგომარეობაში.

დავუშვათ, რომ ფსევდოლიზოგენიის მდგომარეობის დროს მოხდა OXA24like გენის ჩართვა ფაგის გენომში. საკვების მიწოდების შემდეგ ფაგი აგრძელებს თავის ნამდვილ სასიცოცხლო ციკლს, ჩვენს შემთხვევაში ლიტიურ ციკლს, ოღონდ ამჯერად OXA24like გენით.

ფაგში OXA24like გენის არსებობა და ქცევა ექვემდებარება ე.წ. ეგოისტური გენის თეორიას (45), რომელიც შემდგომ შთამომავლობას ან არ გადაეცემა, ან გადაეცემა შემთხვევითი ვარიაციებით და ხდება მეტ-ნაკლებად ჩვეული მომდევნო თაობებში.

ორივე შემთხვევა მხოლოდ თეორიულად შეგვიძლია განვიხილოთ, დაზუსტებით კი შეგვიძლია ვთქვათ, რომ მსგავსი ფაგები, რომელთა გენომი შეიცავს რომელიმე ანტიბიოტიკის მიმართ რეზისტენტულობის განმსაზღვრელ გენს, ფაგოთერაპიაში არ გამოიყენება.

აღნიშნული შედეგები, ერთის მხრივ, კიდევ ერთხელ ხაზს უსვამს კარბაპენემაზების მაკოდირებელი გენების მსოფლიო მნიშვნელობას, მეორეს მხრივ, მნიშვნელობას და ინტერესს უზრდის ჭეშმარიტად ლიტიურ ფაგებს, როგორც ანტიმიკრობულ საშუალებას.

ანტიბიოტიკო რეზისტენტული მიკრობული შტამების გავრცელებამ და თანამედროვე ანტიბაქტერიული საშუალებებით მასთან ბრძოლის სირთულემ გაანახლა ინტერესი ფაგოთერაპიის მიმართ (28, 29, 52, 118, 119). ინფექციურ პათოლოგიაში ბაქტერიოფაგის გამოყენების რეკომენდაციები დაფუძნებულია იმ გამოცდილებაზე, რაც დაგროვდა მრავალი წლის მანძილზე. დღეისათვის ბაქტერიოფაგები წარმატებით გამოიყენება ჩირქოვან-ანთებითი ინფექციების,

ნაწლავური ინფექციების, შარდ-სასქესო გზების ანთებითი პროცესების სამკურნალოდ (1, 12, 19, 29, 52, 118, 119). გამოყენების არეალის მიხედვით ფორმულირებულია ბაქტერიოფაგის პრეპარატები, რომლებიც ათწლეულებია ფართოდ გამოიყენება საქართველოში (19, 71).

ჩამდინარე წყლიდან გამოყოფილი ფაგის ლიზატიდან სამკურნალო პროფილაქტიური პრეპარატის მიღება რთული, დროში გაწელილი პროცესია, რომელიც მოიცავს მთელი რიგი სამეცნიერო კვლევების ჩატარებას, როგორცაა ფაგის ბიოლოგიისა თუ გენეტიკის შესწავლა, მოქმედების სპექტრის განსაზღვრა და ასე შემდეგ.

იმ ლიზატებიდან, რომლებიც კლასიკური მეთოდით ფაგის გამოყოფა-გასუფთავების შედეგად დაგროვდა, გადაირჩა სულ 6 ფაგი. ამათგან, *vB_Ab-S-31*, *vB_Ab-S-14*, *vB_Ab-M-40*, *vB_Ab-M-G7* ფაგების პატრონი შტამი *A.baumannii*-ია, ხოლო ერთი მათგანის, კერძოს *vB_Ag-S-7* ფაგის პატრონი შტამს წარმოადგენს *A. genomospecies 7*. აქ განხილული კვლევა საბოლოოდ ემსახურებოდა *Acinetobacter*-ით გამოწვეული ინფექციების სამკურნალო-პროფილაქტიკური პრეპარატის შექმნას. სწორედ ამიტომ, მიუხედავად იმისა, რომ მეექვსე ფაგის *vB_Sm-P-18* პატრონი ბაქტერია არ განეკუთვნება *Acinetobacter* - ის გვარს, ის შედის *Stenotrophomonas* spp. შემადგენლობაში და რადგან ამ გვარის წარმომადგენელი ბაქტერიული შტამები ხშირად ითესება *Acinetobacter*- ის გვარის ბაქტერიებთან ერთად ინფექციური კერიდან (30, 35), *vB_Sm-P-18* ფაგის დახასიათება მიზანშეწონილად მივიჩნიეთ დაგეგმილი კვლევის ფარგლებში.

vB_Ag-S-7 ფაგის პატრონი-შტამს *A. genomospecies 7* წარმოადგენს. თანამედროვე ლიტერატურაში მომრავლდა მონაცემები, რომ *A. genomospecies*-ის ბაქტერიული შტამები საკმაოდ მაღალი ვირულენტულობით ხასიათდებიან და ხშირ შემთხვევაში არ ჩამოუვარდებიან *A.baumannii*-ით გამოწვეული ინფექციების სიმძიმეს (5, 51). სწორედ ამიტომ, მიუხედავად იმისა, რომ *vB_Ag-S-7* ფაგი ვიწრო მოქმედების სპექტრით ხასიათდება და არ არის აქტიური *A.baumannii*-ის შტამების მიმართ, მნიშვნელოვან ფაგს წარმოადგენს ფაგოთერაპიის თვალსაზრისით, რადგან ახდენს ისეთი შტამების ლიზისს, როგორიცაა *A. radioresistens*, *A. genomospecies*, *A. junii*. *vB_Ag-S-7* ფაგი მორფოლოგიით *Siphoviridae* ოჯახს მიეკუთვნება და ნათელ,

დიდ კოლონიებს იძლევა მყარ საკვებ არეზე (ილუსტრაცია 7). იგი სტაბილური ფაგია, მაღალი ტიტრით. ბიოლოგიური მახასიათებლებიდან მნიშვნელოვანია სწრაფი ადსორბცია (3წთ), მოკლე ლატენტური პერიოდი (12წთ) და მაღალი გამოსავლიანობა (100 ფაგური ნაწილაკი). ეს მახასიათებლები კიდევ ერთხელ უსვამს ხაზს ამ ფაგის დიდ პოტენციალს ფაგოთერაპიის თვალსაზრისით (გრაფიკი 1).

ნაშრომში დახასიათებული ფაგებიდან ყველაზე ფართო მოქმედების სპექტრით ხასიათდება *Siphoviridae*-ს ოჯახის წარმომადგენელი ფაგი *vB_Ab-S-31* (ილუსტრაცია 9), რომლის პატრონ შტამს *A.baumannii* 31 წარმოადგენს. მიუხედავად იმისა, რომ ფაგი *vB_Ab-S-31* ბიოლოგიური მახასიათებლებით ჩამოუვარდება აქ მოცემულ სხვა ფაგებს, კერძოდ, 7 წუთში ადსორბირდება ფაგების მხოლოდ 78%, გააჩნია გრძელი ლატენტური პერიოდი (40 წუთი) და დაბალი გამოსავლიანობა (80 ფაგური ნაწილაკი), ეს ყველაფერი მას ხელს არ უშლის 210 *Acinetobacter*-ის შტამიდან 162-ის ლიზისი მოახდინოს, რაც 77%-ს წარმოადგენს (გრაფიკი 4, 6).

vB_Ab-M-G7 ხასიათდება, როგორც 90kb სიგრძის გენომის მქონე ფაგი, რომელიც მიეკუთვნება *Myoviridae*-ის ოჯახს (ილუსტრაცია 10), მყარ საკვებ აგარზე იძლევა წვრილ, ნათელ კოლონიებს და გამოირჩევა სტაბილურობით, აქვს მაღალი ტიტრი და 210 *Acinetobacter*-ის შტამიდან ახდენს 109-ის ლიზისს (52%). გამრავლების ერთჯერადი ციკლისას ფაგების 91,1% ადსორბირდება 7 წუთში, აქვს 20 წუთიანი ლატენტური პერიოდი და მაღალი გამოსავლიანობა 120 ფაგური ნაწილაკით (გრაფიკი 7, 9). ყველა ეს მახასიათებელი მიუთითებს *vB_Ab-M-G7* ფაგის ვირულენტულ ბუნებაზე, თუმცა მის გენომში ნანახი იმიპენემის მიმართ რეზისტენტობის განმსაზღვრელი გენი, ამ ფაგს გამოუსადეგარს ხდის ფაგოთერაპიაში.

vB_Ab-S-T14 ფაგი *Siphoviridae*-ის ოჯახს მიეკუთვნება, უჯრედშიდა რეპროდუქციის დროს ამ ფაგების 88%-ის ადროსბირებისათვის საჭიროა 10 წუთი, 35 წუთიანი ლატენტური პერიოდი და მაღალი გამოსავლიანობა 200 ფაგური ნაწილაკით. მოქმედების სპექტრის მიხედვით საშუალო აქტივობით ხასიათდება, 210 *Acinetobacter*-ის შტამიდან მხოლოდ 25%-ის მიმართ არის აქტიური (გრაფიკი 10, 12).

Myoviridae-ის ოჯახის წარმომადგენელი *vB_Ab-M-T40* ფაგიც მოქმედების სპექტრის მიხედვით საშუალოდ აქტიურად ხასიათდება, მისი აქტივობა განისაზღვრა 20%-ით (210 *Acinetobacter*-დან 42-ის ლიზისი). ფაგების 80%-ს ადსორბციისთვის 10 წუთი სჭირდებათ, 30 წუთიანი ლატენტური პერიოდის შემდეგ იძლევიან 110 ფაგურ ნაწილაკს (გრაფიკი 13, 15).

vB_Sm-P-18 *Podoviridae*-ის ოჯახს მიეკუთვნება, 33kb ორჯაჭვიანი დნმ-ის შემცველი ფაგია. მოქმედების სპექტრი უცნობია, რადგან კოლექციაში არ მოგვეპოვება *Stenotrophomonas* spp შტამები, *Acinetobacter*-ის მიმართ კი არააქტიური აღმოჩნდა. ფაგების 92% ადროსბირდება 7 წუთის განმავლობაში, 35 წუთიანი ლატენტური პერიოდის შემდეგ იძლევიან მაღალ გამოსავალს -300 ფაგურ ნაწილაკს (გრაფიკი 17).

აღსანიშნავია, რომ ექვსივე ფაგი (*vB_Sm-P-18*, *vB_Ab-S-31*, *vB_Ab-S-14*, *vB_Ab-M-40*, *vB_Ab-M-G7*, *vB_Ag-S-7*) ხასიათდება მაღალი სტაბილურობით სხვადასხვა ტემპერატურისა, თუ pH-ის პირობებში. მათ თითქმის მსგავსი შედეგი აჩვენებს 50°C-სა და 70°C -ზე 24 საათით დაყოვნების შედეგად. 24 საათში 50°C -ზე აქტივობა ყველა ფაგისთვის მხოლოდ 1-2 რიგით დაეცა, გამონაკლისს წარმოადგენს მხოლოდ *vB_Sm-P-18*, რომლის ტიტრის ცვლილება არ აღინიშნა. 70°C-ის პირობებში 5 საათის განმავლობაში *Acinetobacter*-ის ფაგებიდან დაბალი აქტივობა შეინარჩუნა მხოლოდ *vB_Ab-M-G7* ($2 \cdot 10^2$ pfu/ml) და *vB_Ab-S-T14* ($1 \cdot 10^3$ pfu/ml) ფაგმა, რომლებიც 24 საათში ინაქტივირდნენ. 70°C-ის პირობებში ასევე უფრო გამძლე აღმოჩნდა *vB_Sm-P-18* ფაგი, რომლის ტიტრი მხოლოდ 2 რიგით დაეცა 5 საათში, თუმცა 24 საათში მთლიანად ინაქტივირდა (გრაფიკი 2, 5, 8, 11, 14, 18).

როგორც *Acinetobacter*-ის ფაგების, ასევე *Stenotrophomonas*-ს ფაგის მდგრადობა pH-ის სხვადასხვა პირობებში მსგავსი აღმოჩნდა. ფაგები მდგრადნი აღმოჩნდნენ pH-ის საკმაოდ დიდ დიაპაზონში: 5-9-მდე, pH-3-ის პირობებში, *vB_Sm-P-18*, *vB_Ag-S-7*, *vB_Ab-S-31* ფაგებმა აქტივობა სრულიად დაკარგეს 5 საათში, ხოლო დანარჩენი ფაგების ტიტრი დაეცა 4-6 რიგით 24 საათში, თუმცა აქტივობა მაინც ჰქონდათ შენარჩუნებული. ქლოროფორმის უვნებლობა ფაგის აქტივობაზე კიდევ ერთხელ დადასტურდა ჩვენს მიერ ჩატარებული ცდებით. ქლოროფორმის

თანაობისას ფაგების ტიტრი შენარჩუნდა უცვლელად 24 საათის განმავლობაში (გრაფიკი 2, 5, 8, 11, 14, 18). .

Acinetobacter-ის მიმართ აქტიური ბაქტერიოფაგების იმუნოგენური თვისებების შესწავლის მიზნით ბოცვრების იმუნიზაციის შედეგად მივიღეთ 2 სპეციფიკური ანტიფაგური შრატი: 1. *vB_Ab-M-G7* ფაგის ანტიფაგური შრატი - ეს ფაგი მიეკუთვნება *Myoviridae*-ის ოჯახს; 2. *vB_Ab-S-31* ანტიფაგური შრატი - ეს ფაგი მიეკუთვნება *Siphoviridae*-ის ოჯახს. ფაგების სეროლოგიური თვისებების შესწავლამ ნეიტრალიზაციის რეაქციის მეთოდის გამოყენებით გვიჩვენა, რომ *Myoviridae*-ს ოჯახის წარმომადგენელი ფაგები (*vB_Ab-M-G7* და *vB_Ab-M-40*) მიეკუთვნებიან სეროლოგიურად მონათესავე ფაგებს, თუმცა *Siphoviridae*-ს ოჯახის ფაგები (*vB_Ab-S-31*, *vB_Ab-S-14*, *vB_Ag-S-7*) არ წარმოადგენენ სეროლოგიურად მონათესავე ბაქტერიების ვირუსებს (ცხრილი 6, 7).

რამდენიმე *Acinetobacter baumannii*-ის შტამის გენომი მთლიანად დასექვენირებულია და ნანახია, რომ ზოგიერთი მათგანი შეიცავდა პროფაგებს. მათ შორის არის ბაქტერიული შტამი *A.baumannii SDF (42)*. ეს შტამი შეიცავს რამდენიმე პროფაგს, ამ პროფაგების სექვენსის გამოყენებით, რომელიც გენების ბანკშია ხელმისაწვდომი, დავამზადეთ 4 წყვილი პრაიმერი და საკვლევი ფაგების დნმ და მათი პატრონი შტამების გენომი შევისწავლეთ ამ პროფაგების გენების არსებობაზე. PCR-ის შედეგი უარყოფითი იყო ყველა ფაგისთვის, რაც მოწმობს, რომ ზემოთ დახასიათებული არც ერთი ფაგი არ შეიცავს *A.baumannii SDF*-ის გენომში არსებული პროფაგებისთვის დამახასიათებელ გენებს. თუმცა PCR აღმოჩნდა დადებითი *A.baumannii G7* შტამისთვის.

A.baumannii G7 შტამის გენომში *A.baumannii SDF*-ისთვის დამახასიათებელი პროფაგების გენების არსებობა მიუთითებს *A.baumannii G7*-ის ლიზოგენურობაზე. თუმცა უნდა აღინიშნოს, რომ ლიზოგენურობა შტამის საკმაოდ სტაბილური თვისებაა და პროფაგის ინდუქციაზე გარემო ფაქტორების (ულტრაიისფერი გამოსხივება, ანტიბიოტიკი) გავლენაც კი ხშირ შემთხვევაში არაეფექტურია. *A.baumannii G7* წარმოადგენს პატრონ შტამს *vB_Ab-M-G7* ფაგისთვის. ამ ფაგის დნმ არ შეიცავს პატრონი უჯრედის გენომისთვის დამახასიათებელ პროფაგის გენებს, რაც

მოწმობს იმას, რომ *vB_Ab-M-G7* არ წარმოადგენს *A.baumannii* G7-დან ინდუცირებულს.

ფაგების *in vitro* შესწავლიდან მათ კლინიკურ გამოყენებამდე მნიშვნელოვან ხიდს წარმოადგენს ცხოველურ მოდელზე ფაგოთერაპიის ეფექტურობის შესწავლა. ცხოველური მოდელის გამოყენებით ინფექციის პროცესზე ფაგის მოქმედების შედეგის შესწავლას მრავალი სამეცნიერო ნაშრომი მიეძღვნა (8, 21, 28, 87, 89, 116), სადაც ნაჩვენებია, თუ როგორ განიკურნენ თავები დამწვრობითი ინფექციების, პნევმონიის და ზედა სასუნთქი გზების ინფექციებისაგან ფაგოთერაპიის შედეგად, ინფექციის წყაროს კი წარმოადგენდა *Pseudomonas* spp, *Staphylococcus* spp, *Enterococcus* spp, *Klebsiella pneumoniae*, *E.coli*. მიუხედავად იმისა, რომ *A.baumannii*-ის მრავალი ფაგი დახასიათდა *in vitro*, მისი *in vivo* ეფექტურობა არ შესწავლილა, თუ არ ჩავთვლით ნაშრომს, რომელიც გამოქვეყნდა 1992 წელს *Soothill* -ის მიერ(117). სწორედ ამიტომ ჩვენი კვლევის მიზანს წარმოადგენდა ერთის მხრივ *A.baumannii*-ის ფაგის ფაგოთერაპიის ეფექტურობის შესწავლა ცხოველურ მოდელზე, მეორეს მხრივ ფაგოთერაპიის ეფექტურობის სხვაობის განსაზღვრა ცხოველების ფაგის მასპინძელი შტამითა და შემთხვევითი შტამით ინფიცირების შემთხვევაში.

როგორც ზემოთ აღვნიშნეთ, *in vivo* ცდა ჩატარდა *vB_Ab-M-G7* ფაგის მაგალითზე. ვირთაგვების ზურგზე ხელოვნურად მიყენებული ჭრილობის დასაინფიცირებლად გამოვიყენეთ *A.baumannii* G7 და T10 შტამები. *A.baumannii* G7 შტამი *vB_Ab-M-G7* ფაგისთვის მასპინძელს წარმოადგენს, ხოლო *A.baumannii* T10 შემთხვევითად შეირჩა ამ ფაგის მიმართ მგრძნობიარე შტამებიდან. უნდა აღინიშნოს, რომ *vB_Ab-M-G7* ფაგის ადაპტაცია არ ჩატარებულა *A.baumannii* T10-ზე. ეს ემსახურებოდა კვლევის ერთ-ერთ მთავარ მიზანს, რაც გულისხმობს ფაგოთერაპიის ეფექტურობის სხვაობის განსაზღვრას ცხოველების ფაგის მასპინძელი შტამითა და შემთხვევითი შტამით ინფიცირების შემთხვევაში.

ცხოველური მოდელის გამოყენებით ვაჩვენეთ, რომ ფაგის აპლიკაცია ჭრილობაზე არ ახდენს მავნე გავლენას და ფაგს არ გააჩნია ტოქსიკური ეფექტი ვირთაგვებზე, რაც ნათლად გამოჩნდა მეორე ჯგუფის ცხოველებზე დაკვირვებისას. მათი ფიზიოლოგიური მდგომარეობა და ჭრილობის შეხორცების მიმდინარეობა არ განსხვავდებოდა საკონტროლო პირველი ჯგუფის ცხოველებში მიმდინარე

პროცესებისგან. აგრეთვე ნათლად გამოჩნდა, რომ არეში სპეციფიკური ბაქტერიული შტამის არ არსებობის შემთხვევაში ადგილი აქვს ფაგის ელიმინაციას არედან. მეორე ჯგუფის ცხოველებიდან აღებულ სინჯებში ფაგის ტიტრი არ აღემატებოდა $1-2 \cdot 10^1$ pfu/ml რაოდენობას 1 მლ-ში, მოუხედავად იმისა, რომ 1 მლ ფაგის აპლიკაცია ტიტრით $5 \cdot 10^7$ pfu/ml ხდებოდა ყოველდღე, 6 დღის განმავლობაში.

წარმატებული აღმოჩნდა ფაგის აპლიკაცია ფაგოთერაპიული ჯგუფის ვირთაგვებში (მეოთხე და მეექვსე ჯგუფი), სადაც ინფექცია გამოწვეული იყო *A.baumannii* G7 და T10 შტამებით. ანთებითი პროცესები მესამე დღემდე იყო შესამჩნევი, თუმცა ცდის ბოლოსთვის მთლიანად გაქრა, რაც ასევე აისახა ბაქტერიული შტამების ტიტრის კლებაში. თერაპიული ეფექტი მსგავსი ეფექტურობით აისახა როგორც მეოთხე (*A.baumannii* T10), ასევე მეექვსე (*A.baumannii* G7) ჯგუფის ვირთაგვების ინფიცირებულ ჭრილობაზე (გრაფიკი 16).

ცხოველური მოდელის გამოყენებით, კიდევ ერთხელ გავუსვით ხაზი ფაგის არატოქსიურობას და მის ეფექტურობას ფაგოთერაპიაში. ნაშრომის სიახლეს კი წარმოადგენს ის, რომ მოდელირებული ჭრილობის ინფიცირებისთვის შემთხვევითად შერჩეული შტამის გამოყენებით ჩვენ შევქმენით ინფექციის რეალური სურათი და რეალური შესაძლო გამოსავალი ფაგოთერაპიის შემთხვევაში.

მიუხედავად იმისა, რომ ფაგოთერაპიის ეფექტურობა ცხოველურ მოდელზე კიდევ ერთხელ დადგინდა *vB_Ab-M-G7* ფაგის გამოყენებით, საცდელი სამკურნალო-პროფილაქტიკური ფაგების „კოქტეილის“ შემადგენლობაში ეს ფაგი არ შევიდა. ფაგის საცდელ პრეპარატში სულ 5 ფაგი გავაერთიანეთ: *vB_Sm-P-18*, *vB_Ab-S-31*, *vB_Ab-S-14*, *vB_Ab-M-40*, *vB_Ag-S-7*. ფაგები საცდელ პრეპარატში შედის თანაბარი შემადგენლობით, სადაც მათი ტიტრი გრაციას მეთოდით არის $5 \cdot 10^7$ pfu/ml. დინამიკაში თითოეული ფაგის აქტივობაზე დაკვირვებამ გვიჩვენა, რომ ფაგებს ერთმანეთზე არ გააჩნიათ ანტაგონისტური მოქმედება და ინარჩუნებენ ტიტრს თვეების მანძილზე. ფაგების კოქტეილის შექმნა ემსახურება ისეთი პრეპარატის მიღებას, რომლის მოქმედების სპექტრი გადაფარავს ცალკეული ფაგების მოქმედების სპექტრს, რაც ჩვენს შემთხვევაშიც დაფიქსირდა.

ფაგების „კოქტეილის“ შექმნით მივიღეთ არატოქსიკური, სხვადასხვა გარემო პირობების მიმართ მდგრადი და მაღალი აქტივობის (210 შტამის 89%) ე.წ. საცდელი

პრეპარატი (გრაფიკი 19), რომელიც მომავალში შესაძლოა გამოყენებული იქნას, როგორც პროფილაქტიკური, ასევე სამკურნალო მიზნით.

დასკვნა და რეკომენდაციები

1. კიდევ ერთხელ იქნა დადასტურებული მასს-სპექტრომეტრის შტამების საიდენტიფიკაციოდ გამოყენების დიდი პოტენციალი.
2. ნაშრომში კიდევ ერთხელ გაესვა ხაზი OXA23like ლაქტამაზას მნიშვნელობას იმიპენემრეზისტენტულობის განვითარებაში.
3. პირველად დახასიათდა სააქართველოში გამოყოფილი იმიპენემრეზისტენტული შტამი, რომელშიც კარბაპენემრეზისტენტობა განპირობებული იყო როგორც ქრომოსომულად მდებარე OXA24like-ის გენით, ასევე პლაზმიდაში მდებარე ISAbal და OXA51like კომპლექსით.
4. გამოყოფილია მხოლოდ *Acinetobacter*-ს გვარის ბაქტერიული შტამების მიმართ აქტიური ხუთი ფაგი. ხუთივე მათგანი *Caudovirales*-ის წარმომადგენელია, სადაც 2 ფაგი მიეკუთვნება *Myoviridae*-ის (*vB_Ab-M-G7* და *vB_Ab-M-40*), 3 ფაგი (*vB_Ab-S-31*, *vB_Ab-S-14*, *vB_Ag-S-7*) კი *Siphoviridae*-ის ოჯახს. აქედან მხოლოდ *Myoviridae* ოჯახის წარმომადგენელი ფაგები არიან სეროლოგიურად მსგავსნი.
5. ნაშრომში დახასიათებული 5 *Acinetobacter* spp-ის ფაგის ბიოლოგიური თვისებები, როგორიცაა სწრაფი ადსორბცია პატრონ უჯედზე, მოკლე ლატენტური პერიოდი და მაღალი გამოსავლიანობა, ასევე მაღალი სტაბილურობა pH-ის ფართო დიაპაზონში და მაღალი ტემპერატურის პირობებში, ნათლად მიუთითებს ამ ფაგების მაღალ თერაპიულ პოტენციალზე.
6. არც ერთი ფაგი არ შეიცავს პროფაგების დამახასიათებელ გენებს, თუმცა საინტერესო იქნება *Acinetobacter baumannii*-ის სხვა შტამებში ნანახი პროფაგებისთვის სპეციფიკური გენების არსებობაზე ამ შრომაში გამოყენებული ფაგების გენომის შემოწმება.

7. *vB_Ab-M-G7* ფაგი შეიცავს იმიპენემის მიმართ რეზისტენტობის განმსაზღვრელ გენს *bla_{OXA24like}*. ერთი წლის განმავლობაში მიმდინარე ცდების მიუხედავად ტრანსდუქცია არ გამოვლინდა. ამ ეტაპზე დაბეჯითებით რაიმე დასკვნის გამოტანა ამ მიმართულებით შეუძლებელია. რეკომენდაციის თვალსაზრისით, საინტერესოა ამ ფაგის გენომის სრული სექვენსი, რაც საშუალებას მოგვცემს პასუხი გაეცეს ზემოთ აღნიშნულ კითხვას.

8. იდენტიფიცირდა და დახასიათდა *Stenotrophomonas maltophilia*-ს ერთი კლინიკური შტამი, რომელიც მულტირეზისტენტული აღმოჩნდა ანტიბიოტიკების მიმართ, მათ შორის იმიპენემის მიმართ.

9. *vB_Ab-M-G7* ფაგის გამოყენებით ვირთაგვებზე მოდელირებული *A. baumannii*-ით ინფიცირებული ჭრილობის მკურნალობით, კიდევ ერთხელ დადასტურდა ფაგოთერაპიის არატოქსიკურობა და ეფექტურობა.

10. *vB_Sm-P-18* ფაგი *Stenotrophomonas maltophilia*-ის სპეციფიკური ფაგია, მიეკუთვნება *Podoviridae*-ის ოჯახს და მისი ბიოლოგიური მახასიათებლებიდან მნიშვნელოვანია მოკლე ლატენტური პერიოდი და მაღალი გამოსავლიანობა. მდგრადობა ქლოროფორმის ზემოქმედებისას, მაღალი ტემპერატურისა და pH-ის ფართო დიაპაზონში. ამ ფაგის მოქმედების დიაპაზონი უცნობია ლაბორატორიაში *Stenotrophomonas* spp. ბაქტერიული შტამების არარსებობის გამო.

11. *vB_Sm-P-18*, *vB_Ab-S-31*, *vB_Ab-S-14*, *vB_Ab-M-40* და *vB_Ag-S-7* ფაგების გაერთიანებით მივიღეთ ფაგების „კოქტეილი“, რომელიც შეიძლება განიხილოს, როგორც ფაგის საცდელი სამკურნალო პრეპარატი. აღნიშნული „კოქტეილი“ ხასიათდება სხვადასხვა გარემო ფაქტორების მიმართ მაღალი სტაბილურობითა და მოქმედების ფართო დიაპაზონით.

კვლევის ფარგლებში შექმნილი *Acinetobacter* spp. ფაგის საცდელი სამკურნალო პრეპარატი საჭიროებს მომავალ კლინიკურ გამოცდას სამედიცინო პრაქტიკაში მის დანერგვამდე. ამ ეტაპზე კი მომზადებულია ძირითადი ბაზა აღნიშნული პრეპარატის სრულყოფისთვის.

ბიბლიოგრაფია

1. Abedon ST, Kuhl SJ, Blasdel BG, Kutter EM. 2011. Phage treatment of human infections *Bacteriophage*. 1:66-85
2. Ackermann HW, Brochu G, Emadi Konjin HP. 1994. Classification of Acinetobacter phages *Arch. Virol.* 135:345-54
3. Barbe V, Vallenet D, Fonknechten N, Kreimeyer A, Oztas S et al. 2004. Unique features revealed by the genome sequence of Acinetobacter sp. ADP1, a versatile and naturally transformation competent bacterium *Nucleic Acids Res.* 32:5766-79
4. Baumann P, Doudoroff M, Stanier RY. 1968. A study of the Moraxella group. II. Oxidative-negative species (genus Acinetobacter) *J. Bacteriol.* 95:1520-41
5. Bergogne-Berezin E, Towner KJ. 1996. Acinetobacter spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features *Clin. Microbiol. Rev.* 9:148-65
6. Berlau J, Aucken HM, Houang E, Pitt TL. 1999. Isolation of Acinetobacter spp. including A. baumannii from vegetables: implications for hospital-acquired infections *J. Hosp. Infect.* 42:201-4
7. Bernardis AT, de Beaufort AJ, Dijkshoorn L, van Boven CP. 1997. Outbreak of septicaemia in neonates caused by Acinetobacter junii investigated by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) and four typing methods *J. Hosp. Infect.* 35:129-40
8. Biswas B, Adhya S, Washart P, Paul B, Trostel AN et al. 2002. Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant Enterococcus faecium *Infect. Immun.* 70:204-10
9. Bittar F, Richet H, Dubus JC, Reynaud-Gaubert M, Stremler N et al. 2008. Molecular detection of multiple emerging pathogens in sputa from cystic fibrosis patients *PLoS. One.* 3:e2908
10. Brooke JS. 2012. Stenotrophomonas maltophilia: an emerging global opportunistic pathogen *Clin. Microbiol. Rev.* 25:2-41

11. Brown S, Amyes S. 2006. OXA (beta)-lactamases in *Acinetobacter*: the story so far *J. Antimicrob. Chemother.* 57:1-3
12. Burrowes B, Harper DR, Anderson J, McConville M, Enright MC. 2011. Bacteriophage therapy: potential uses in the control of antibiotic-resistant pathogens *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* 9:775-85
13. Cai Y, Chai D, Wang R, Liang B, Bai N. 2012. Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies *J. Antimicrob. Chemother.* 67:1607-15
14. Calendar Richard. *The Bacteriophages*. 2006.

Ref Type: Generic

15. Canchaya C, Fournous G, Chibani-Chennoufi S, Dillmann ML, Brussow H. 2003. Phage as agents of lateral gene transfer *Curr. Opin. Microbiol.* 6:417-24
16. Casas V. 2011. Role of bacteriophage-encoded exotoxins in the evolution of bacterial pathogens
17. Castellanos ME, Telenti AM, Rodriguez Blanco VM, Rodriguez Suarez ML, Morena TA, Cortina LA. 1995. Infective endocarditis of an interventricular patch caused by *Acinetobacter haemolyticus* *Infection* 23:243-5
18. Chang KC, Lin NT, Hu A, Lin YS, Chen LK, Lai MJ. 2011. Genomic analysis of bacteriophage varphiAB1, a varphiKMV-like virus infecting multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* *Genomics* 97:249-55
19. Chanishvili N. 2012. Phage therapy--history from Twort and d'Herelle through Soviet experience to current approaches *Adv. Virus Res.* 83:3-40
20. Chen TL, Lee YT, Kuo SC, Hsueh PR, Chang FY et al. 2010. Emergence and Distribution of Plasmids Bearing the blaOXA-51-like gene with an upstream ISAba1 in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in Taiwan *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:4575-81
21. Chibani-Chennoufi S, Sidoti J, Bruttin A, Kutter E, Sarker S, Brussow H. 2004. In vitro and in vivo bacteriolytic activities of *Escherichia coli* phages: implications for phage therapy *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:2558-69

22. Choi CH, Hyun SH, Lee JY, Lee JS, Lee YS et al. 2008. Acinetobacter baumannii outer membrane protein A targets the nucleus and induces cytotoxicity *Cell Microbiol.* 10:309-19
23. Cisneros JM, Rodriguez-Bano J. 2002. Nosocomial bacteremia due to Acinetobacter baumannii: epidemiology, clinical features and treatment *Clin. Microbiol. Infect.* 8:687-93
24. Corbella X, Pujol M, Ayats J, Sendra M, Ardanuy C et al. 1996. Relevance of digestive tract colonization in the epidemiology of nosocomial infections due to multiresistant Acinetobacter baumannii *Clin. Infect. Dis.* 23:329-34
25. D'Andrea MM, Giani T, D'Arezzo S, Capone A, Petrosillo N et al. 2009. Characterization of pABVA01, a plasmid encoding the OXA-24 carbapenemase from Italian isolates of Acinetobacter baumannii *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:3528-33
26. Dale JW, Greenaway PJ. 1985. Preparation and assay of phage lambda *Methods Mol. Biol.* 2:201-9
27. de Beaufort AJ, Bernards AT, Dijkshoorn L, van Boven CP. 1999. Acinetobacter junii causes life-threatening sepsis in preterm infants *Acta Paediatr.* 88:772-5
28. Debarbieux L, Leduc D, Maura D, Morello E, Criscuolo A et al. 2010. Bacteriophages can treat and prevent Pseudomonas aeruginosa lung infections *J. Infect. Dis.* 201:1096-104
29. Deresinski S. 2009. Bacteriophage therapy: exploiting smaller fleas *Clin. Infect. Dis.* 48:1096-101
30. Deschaght P, Van SL, Decat E, Van ME, Brisse S, Vaneechoutte M. 2011. Rapid genotyping of Achromobacter xylosoxidans, Acinetobacter baumannii, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa and Stenotrophomonas maltophilia isolates using melting curve analysis of RAPD-generated DNA fragments (McRAPD) *Res. Microbiol.* 162:386-92
31. Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. 2007. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant Acinetobacter baumannii *Nat. Rev. Microbiol.* 5:939-51
32. Donlan RM. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces *Emerg. Infect. Dis.* 8:881-90
33. Drulis-Kawa Z, Mackiewicz P, Kesik-Szeloch A, Maciaszczyk-Dziubinska E, Weber-Dabrowska B et al. 2011. Isolation and characterisation of KP34--a novel phiKMV-like bacteriophage for Klebsiella pneumoniae *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90:1333-45

34. Dubrovin EV, Popova AV, Kraevskiy SV, Ignatov SG, Ignatyuk TE et al. 2012. Atomic Force Microscopy Analysis of the *Acinetobacter baumannii* Bacteriophage AP22 Lytic Cycle *PLoS. One.* 7:e47348
35. Enoch DA, Birkett CI, Ludlam HA. 2007. Non-fermentative Gram-negative bacteria *Int. J. Antimicrob. Agents* 29 Suppl 3:S33-S41
36. Evans TJ, Crow MA, Williamson NR, Orme W, Thomson NR et al. 2010. Characterization of a broad-host-range flagellum-dependent phage that mediates high-efficiency generalized transduction in, and between, *Serratia* and *Pantoea* *Microbiology* 156:240-7
37. Falagas ME, Karveli EA, Kelesidis I, Kelesidis T. 2007. Community-acquired *Acinetobacter* infections *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 26:857-68
38. Fancello L, Desnues C, Raoult D, Rolain JM. 2011. Bacteriophages and diffusion of genes encoding antimicrobial resistance in cystic fibrosis sputum microbiota *J. Antimicrob. Chemother.* 66:2448-54
39. Faruque SM, Mekalanos JJ. 2012. Phage-bacterial interactions in the evolution of toxigenic *Vibrio cholerae* *Virulence.* 3:
40. Fernandez-Cuenca F, Martinez-Martinez L, Conejo MC, Ayala JA, Perea EJ, Pascual A. 2003. Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* *J. Antimicrob. Chemother.* 51:565-74
41. Fernandez-Cuenca F, Pascual A, Ribera A, Vila J, Bou G et al. 2004. [Clonal diversity and antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter baumannii* isolated in Spain. A nationwide multicenter study: GEIH-Ab project (2000)] *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 22:267-71
42. Fournier PE, Vallenet D, Barbe V, Audic S, Ogata H et al. 2006. Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii* *PLoS. Genet.* 2:e7
43. Gallego L, Towner KJ. 2001. Carriage of class 1 integrons and antibiotic resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from northern Spain *J. Med. Microbiol.* 50:71-7

44. Garbe J, Wesche A, Bunk B, Kazmierczak M, Selezska K et al. 2010. Characterization of JG024, a pseudomonas aeruginosa PB1-like broad host range phage under simulated infection conditions *BMC. Microbiol.* 10:301
45. Gardner A, Welch JJ. 2011. A formal theory of the selfish gene *J. Evol. Biol.* 24:1801-13
46. Gerner-Smidt P. 1987. Endemic occurrence of Acinetobacter calcoaceticus biovar anitratus in an intensive care unit *J. Hosp. Infect.* 10:265-72
47. Gerner-Smidt P, Frederiksen W. 1993. Acinetobacter in Denmark: I. Taxonomy, antibiotic susceptibility, and pathogenicity of 112 clinical strains *APMIS* 101:815-25
48. Hanlon GW. 2005. The emergence of multidrug resistant Acinetobacter species: a major concern in the hospital setting *Lett. Appl. Microbiol.* 41:375-8
49. Hatfull GF, Hendrix RW. 2011. Bacteriophages and their genomes *Curr. Opin. Virol.* 1:298-303
50. Hirai Y. 1991. Survival of bacteria under dry conditions; from a viewpoint of nosocomial infection *J. Hosp. Infect.* 19:191-200
51. Horrevorts A, Bergman K, Kollee L, Breuker I, Tjernberg I, Dijkshoorn L. 1995. Clinical and epidemiological investigations of Acinetobacter genomospecies 3 in a neonatal intensive care unit *J. Clin. Microbiol.* 33:1567-72
52. Housby JN, Mann NH. 2009. Phage therapy *Drug Discov. Today* 14:536-40
53. Jain R, Danziger LH. 2004. Multidrug-resistant Acinetobacter infections: an emerging challenge to clinicians *Ann. Pharmacother.* 38:1449-59
54. Jawad A, Hawkey PM, Heritage J, Snelling AM. 1994. Description of Leeds Acinetobacter Medium, a new selective and differential medium for isolation of clinically important Acinetobacter spp., and comparison with Herellea agar and Holton's agar *J. Clin. Microbiol.* 32:2353-8
55. Jawad A, Heritage J, Snelling AM, Gascoyne-Binzi DM, Hawkey PM. 1996. Influence of relative humidity and suspending menstrua on survival of Acinetobacter spp. on dry surfaces *J. Clin. Microbiol.* 34:2881-7

56. Jeon BC, Jeong SH, Bae IK, Kwon SB, Lee K et al. 2005. Investigation of a nosocomial outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 beta-lactamase in Korea *J. Clin. Microbiol.* 43:2241-5
57. Jeon J, Kim JW, Yong D, Lee K, Chong Y. 2012. Complete Genome Sequence of the Podoviral Bacteriophage YMC0902B1251 ABA BP, Which Causes the Lysis of an OXA-23-Producing Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolate from a Septic Patient *J. Virol.* 86:12437-8
58. Jin J, Li ZJ, Wang SW, Wang SM, Huang DH et al. 2012. Isolation and characterization of ZZ1, a novel lytic phage that infects *Acinetobacter baumannii* clinical isolates *BMC. Microbiol.* 12:156
59. Joly-Guillou ML. 2005. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter* *Clin. Microbiol. Infect.* 11:868-73
60. Kappstein I, Grundmann H, Hauer T, Niemeyer C. 2000. Aerators as a reservoir of *Acinetobacter junii*: an outbreak of bacteraemia in paediatric oncology patients *J. Hosp. Infect.* 44:27-30
61. Karthikeyan K, Thirunarayan MA, Krishnan P. 2010. Coexistence of blaOXA-23 with blaNDM-1 and armA in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from India *J. Antimicrob. Chemother.* 65:2253-4
62. Karumidze N, Kusradze I, Riggava S, Goderdzishvili M, Rajakumar K, Alavidze Z. 2012. Isolation and Characterisation of Lytic Bacteriophages of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* *Curr. Microbiol.*
63. Karumidze N, Thomas JA, Kvatadze N, Goderdzishvili M, Hakala KW et al. 2012. Characterization of lytic *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages via biological properties and genomic sequences *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 94:1609-17
64. Kempf M, Rolain JM. 2012. Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options *Int. J. Antimicrob. Agents* 39:105-14

65. Kempf M, Rolain JM, Diatta G, Azza S, Samb B et al. 2012. Carbapenem resistance and *Acinetobacter baumannii* in Senegal: the paradigm of a common phenomenon in natural reservoirs *PLoS. One.* 7:e39495
66. Kempf M, Rolain JM, Diatta G, Azza S, Samb B et al. 2012. Carbapenem resistance and *Acinetobacter baumannii* in Senegal: the paradigm of a common phenomenon in natural reservoirs *PLoS. One.* 7:e39495
67. Kim JH, Oh C, Choresca CH, Shin SP, Han JE et al. 2012. Complete Genome Sequence of Bacteriophage phiAC-1 Infecting *Acinetobacter soli* Strain KZ-1 *J. Virol.* 86:13131-2
68. Klovins J, Overbeek GP, van den Worm SH, Ackermann HW, van DJ. 2002. Nucleotide sequence of a ssRNA phage from *Acinetobacter*: kinship to coliphages *J. Gen. Virol.* 83:1523-33
69. Kusradze I, Diene SM, Goderdzishvili M, Rolain JM. 2011. Molecular detection of OXA carbapenemase genes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Iraq and Georgia *Int. J. Antimicrob. Agents* 38:164-8
70. Kusradze I, Diene SM, Goderdzishvili M, Rolain JM. 2011. Molecular detection of OXA carbapenemase genes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Iraq and Georgia *Int. J. Antimicrob. Agents* 38:164-8
71. Kutateladze M, Adamia R. 2008. Phage therapy experience at the Eliava Institute *Med. Mal Infect.* 38:426-30
72. Kutateladze M, Adamia R. 2010. Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics *Trends Biotechnol.* 28:591-5
73. Kutter Elizabeth, Alexander sulakvelidze. Bacteriophages: biology and applications. Burton Guttman, Raul Raua Elizabeth Kutter. Basic Phage Biology. 2005.

Ref Type: Generic

74. Kutter Elizabeth Alexander Sulakvelidze. Bacteriophages: biology and applications. Hans-W. Ackermann. Bacteriophage classification. 2005.

Ref Type: Generic

75. Kutter E. 2009. Phage host range and efficiency of plating *Methods Mol. Biol.* 501:141-9

76. Kutter E, De VD, Gvasalia G, Alavidze Z, Gogokhia L et al. 2010. Phage therapy in clinical practice: treatment of human infections *Curr. Pharm. Biotechnol.* 11:69-86
77. Lai MJ, Lin NT, Hu A, Soo PC, Chen LK et al. 2011. Antibacterial activity of *Acinetobacter baumannii* phage varphiAB2 endolysin (LysAB2) against both gram-positive and gram-negative bacteria *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90:529-39
78. Lee K, Yong D, Jeong SH, Chong Y. 2011. Multidrug-resistant *Acinetobacter* spp.: increasingly problematic nosocomial pathogens *Yonsei Med. J.* 52:879-91
79. Li P, Chen B, Song Z, Song Y, Yang Y et al. 2012. Bioinformatic analysis of the *Acinetobacter baumannii* phage AB1 genome *Gene* 507:125-34
80. Liakopoulos A, Miriagou V, Katsifas EA, Karagouni AD, Daikos GL et al. 2012. Identification of OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* in Greece, 2010 to 2011 *Euro. Surveill* 17:
81. Lin NT, Chiou PY, Chang KC, Chen LK, Lai MJ. 2010. Isolation and characterization of phi AB2: a novel bacteriophage of *Acinetobacter baumannii* *Res. Microbiol.* 161:308-14
82. Lin NT, Chiou PY, Chang KC, Chen LK, Lai MJ. 2010. Isolation and characterization of phi AB2: a novel bacteriophage of *Acinetobacter baumannii* *Res. Microbiol.* 161:308-14
83. Lopez-Rojas R, Jimenez-Mejias ME, Lepe JA, Pachon J. 2011. *Acinetobacter baumannii* resistant to colistin alters its antibiotic resistance profile: a case report from Spain *J. Infect. Dis.* 204:1147-8
84. Mahillon J, Chandler M. 1998. Insertion sequences *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:725-74
85. Mansour W, Poirel L, Bettaieb D, Bouallegue O, Boujaafar N, Nordmann P. 2008. Dissemination of OXA-23-producing and carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a University Hospital in Tunisia *Microb. Drug Resist.* 14:289-92
86. Matsuzaki S, Rashel M, Uchiyama J, Sakurai S, Ujihara T et al. 2005. Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases *J. Infect. Chemother.* 11:211-9
87. Maura D, Morello E, du ML, Bomme P, Le BC, Debarbieux L. 2011. Intestinal colonization by enteroaggregative *Escherichia coli* supports long-term bacteriophage replication in mice *Environ. Microbiol.*

88. McDonald A, Amyes SG, Paton R. 1999. The persistence and clonal spread of a single strain of *Acinetobacter* 13TU in a large Scottish teaching hospital *J. Chemother.* 11:338-44
89. McVay CS, Velasquez M, Fralick JA. 2007. Phage therapy of *Pseudomonas aeruginosa* infection in a mouse burn wound model *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:1934-8
90. Mehta NJ, Khan IA, Mehta RN, Gulati A. 2000. *Stenotrophomonas maltophilia* endocarditis of prosthetic aortic valve: report of a case and review of literature *Heart Lung* 29:351-5
91. Merino M, Acosta J, Poza M, Sanz F, Beceiro A et al. 2010. OXA-24 carbapenemase gene flanked by XerC/XerD-like recombination sites in different plasmids from different *Acinetobacter* species isolated during a nosocomial outbreak *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:2724-7
92. Merino M, Acosta J, Poza M, Sanz F, Beceiro A et al. 2010. OXA-24 carbapenemase gene flanked by XerC/XerD-like recombination sites in different plasmids from different *Acinetobacter* species isolated during a nosocomial outbreak *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:2724-7
93. Michalopoulos AS, Falagas ME. 2011. Colistin: recent data on pharmacodynamics properties and clinical efficacy in critically ill patients *Ann. Intensive Care* 1:30
94. Miedzybrodzki R, Borysowski J, Weber-Dabrowska B, Fortuna W, Letkiewicz S et al. 2012. Clinical aspects of phage therapy *Adv. Virus Res.* 83:73-121
95. Muniesa M, Garcia A, Miro E, Mirelis B, Prats G et al. 2004. Bacteriophages and diffusion of beta-lactamase genes *Emerg. Infect. Dis.* 10:1134-7
96. Nemec A, Krizova L, Maixnerova M, Diancourt L, van der Reijden TJ et al. 2008. Emergence of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* in the Czech Republic is associated with the spread of multidrug-resistant strains of European clone II *J. Antimicrob. Chemother.* 62:484-9
97. Paez JI, Costa SF. 2008. Risk factors associated with mortality of infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia*: a systematic review *J. Hosp. Infect.* 70:101-8
98. Patterson JE, Vecchio J, Pantelick EL, Farrel P, Mazon D et al. 1991. Association of contaminated gloves with transmission of *Acinetobacter calcoaceticus* var. *anitratus* in an intensive care unit *Am. J. Med.* 91:479-83

99. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. 2008. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen *Clin. Microbiol. Rev.* 21:538-82
100. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. 2008. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen *Clin. Microbiol. Rev.* 21:538-82
101. Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA. 2007. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:3471-84
102. Petty NK, Foulds IJ, Pradel E, Ewbank JJ, Salmond GP. 2006. A generalized transducing phage (phiIF3) for the genomically sequenced *Serratia marcescens* strain Db11: a tool for functional genomics of an opportunistic human pathogen *Microbiology* 152:1701-8
103. Poirel L, Nordmann P. 2006. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology *Clin. Microbiol. Infect.* 12:826-36
104. Popova AV, Zhilenkov EL, Myakinina VP, Krasilnikova VM, Volozhantsev NV. 2012. Isolation and characterization of wide host range lytic bacteriophage AP22 infecting *Acinetobacter baumannii* *FEMS Microbiol. Lett.* 332:40-6
105. Richet H, Fournier PE. 2006. Nosocomial infections caused by *Acinetobacter baumannii*: a major threat worldwide *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 27:645-6
106. Ripp S, Miller RV. 1998. Dynamics of the pseudolysogenic response in slowly growing cells of *Pseudomonas aeruginosa* *Microbiology* 144 (Pt 8):2225-32
107. Rolain JM, Fancello L, Desnues C, Raoult D. 2011. Bacteriophages as vehicles of the resistome in cystic fibrosis *J. Antimicrob. Chemother.* 66:2444-7
108. Rolain JM, Roch A, Castanier M, Papazian L, Raoult D. 2011. *Acinetobacter baumannii* resistant to colistin with impaired virulence: a case report from France *J. Infect. Dis.* 204:1146-7
109. Ruiz M, Marti S, Fernandez-Cuenca F, Pascual A, Vila J. 2007. High prevalence of carbapenem-hydrolysing oxacillinases in epidemiologically related and unrelated *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Spain *Clin. Microbiol. Infect.* 13:1192-8
110. Rumbo C, Fernandez-Moreira E, Merino M, Poza M, Mendez JA et al. 2011. Horizontal transfer of the OXA-24 carbapenemase gene via outer membrane vesicles: a new mechanism of

- dissemination of carbapenem resistance genes in *Acinetobacter baumannii* *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:3084-90
111. Seifert H, Strate A, Schulze A, Pulverer G. 1993. Vascular catheter-related bloodstream infection due to *Acinetobacter johnsonii* (formerly *Acinetobacter calcoaceticus* var. *Iwoffii*): report of 13 cases *Clin. Infect. Dis.* 17:632-6
 112. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La SB, Fournier PE et al. 2009. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry *Clin. Infect. Dis.* 49:543-51
 113. Serrano MI, Solera J, Martinez E, Saez L. 1993. [Community-acquired meningitis caused by *Acinetobacter calcoaceticus* var. *Iwoffii* in a healthy host] *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 11:396-7
 114. Shen GH, Wang JL, Wen FS, Chang KM, Kuo CF et al. 2012. Isolation and Characterization of phikm18p, a Novel Lytic Phage with Therapeutic Potential against Extensively Drug Resistant *Acinetobacter baumannii* *PLoS. One.* 7:e46537
 115. Sherertz RJ, Sullivan ML. 1985. An outbreak of infections with *Acinetobacter calcoaceticus* in burn patients: contamination of patients' mattresses *J. Infect. Dis.* 151:252-8
 116. Soothill JS. 1992. Treatment of experimental infections of mice with bacteriophages *J. Med. Microbiol.* 37:258-61
 117. Soothill JS. 1992. Treatment of experimental infections of mice with bacteriophages *J. Med. Microbiol.* 37:258-61
 118. Sulakvelidze A. 2005. Phage therapy: an attractive option for dealing with antibiotic-resistant bacterial infections *Drug Discov. Today* 10:807-9
 119. Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG, Jr. 2001. Bacteriophage therapy *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:649-59
 120. Thawal ND, Yele AB, Sahu PK, Chopade BA. 2012. Effect of a novel podophage AB7-IBB2 on *Acinetobacter baumannii* biofilm *Curr. Microbiol.* 65:66-72

121. Thurber RV. 2009. Current insights into phage biodiversity and biogeography *Curr. Opin. Microbiol.* 12:582-7
122. Toleman MA, Spencer J, Jones L, Walsh TR. 2012. blaNDM-1 is a chimera likely constructed in *Acinetobacter baumannii* *Antimicrob. Agents Chemother.* 56:2773-6
123. Touati M, Diene SM, Racherache A, Dekhil M, Djahoudi A, Rolain JM. 2012. Emergence of blaOXA-23 and blaOXA-58 carbapenemase-encoding genes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from University Hospital of Annaba, Algeria *Int. J. Antimicrob. Agents* 40:89-91
124. Turton JF, Ward ME, Woodford N, Kaufmann ME, Pike R et al. 2006. The role of ISAba1 in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii* *FEMS Microbiol. Lett.* 258:72-7
125. Turton JF, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL. 2006. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the blaOXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species *J. Clin. Microbiol.* 44:2974-6
126. Valero C, Farinas MC, Garcia PD, Mazarrasa JC, Gonzalez MJ. 1999. Endocarditis due to *Acinetobacter lwoffii* on native mitral valve *Int. J. Cardiol.* 69:97-9
127. Van LM, Goossens H. 2004. Antimicrobial resistance of *Acinetobacter* spp. in Europe *Clin. Microbiol. Infect.* 10:684-704
128. Villalon P, Valdezate S, Medina-Pascual MJ, Carrasco G, Vindel A, Saez-Nieto JA. 2012. Epidemiology of the *Acinetobacter*-derived cephalosporinase, carbapenem-hydrolysing oxacillinase and metallo-beta-lactamase genes, and of common insertion sequences, in epidemic clones of *Acinetobacter baumannii* from Spain *J. Antimicrob. Chemother.*
129. Walsh C. 2000. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance *Nature* 406:775-81
130. Weernink A, Severin WP, Tjernberg I, Dijkshoorn L. 1995. Pillows, an unexpected source of *Acinetobacter* *J. Hosp. Infect.* 29:189-99
131. Weinbauer MG. 2004. Ecology of prokaryotic viruses *FEMS Microbiol. Rev.* 28:127-81

132. Yele AB, Thawal ND, Sahu PK, Chopade BA. 2012. Novel lytic bacteriophage AB7-IBB1 of *Acinetobacter baumannii*: isolation, characterization and its effect on biofilm *Arch. Virol.* 157:1441-50
133. Yemisen M, Mete B, Tunali Y, Yentur E, Ozturk R. 2008. A meningitis case due to *Stenotrophomonas maltophilia* and review of the literature *Int. J. Infect. Dis.* 12:e125-e127
134. Young R. 1992. Bacteriophage lysis: mechanism and regulation *Microbiol. Rev.* 56:430-81
135. Zhang LN, Wang XT, Ai YH, Guo QL, Huang L et al. 2012. Epidemiological features and risk factors of sepsis-associated encephalopathy in intensive care unit patients: 2008-2011 *Chin Med. J. (Engl.)* 125:828-31