

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЗАКЛАД ВИЩОЇ ОСВІТИ «ПОДІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ»**

Кваліфікаційна освітньо-наукова
праця на правах рукопису

СТРОЇЧ ВАСИЛЬ ВАСИЛЬОВИЧ

УДК 619. 615.281.9

**ДИСЕРТАЦІЯ
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ТА РОЗРОБКА
БАКТЕРІОФАГОВОГО ПРЕПАРАТУ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ СОБАК ЗА
ШОДЕРМІЇ**

211 – ветеринарна медицина

Подається на здобуття наукового ступеня
доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень.
Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання
на відповідне джерело



В. В. Строїч

Науковий керівник – **Горюк Юлія Вікторівна**,
доктор ветеринарних наук, доцент

Кам'янець-Подільський – 2024

АНОТАЦІЯ

Строїч В. В. Експериментальне обґрунтування та розробка бактеріофагового препарату для лікування собак за піодермії.

Кваліфікаційна освітньо-наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 211 – Ветеринарна медицина (21 Ветеринарія). Заклад вищої освіти «Подільський державний університет», Кам'янець-Подільський, 2024.

Здатність ефективно лікувати піодермії у собак зараз суттєво обмежена через появу мультирезистентних, метицилінрезистентних стафілококів (*MRS*), а також обмеженням на призначення антимікробних препаратів для домашніх тварин. У зв'язку з формуванням резистентних до метициліну стафілококів, головним чином *Staphylococcus aureus* (*MRSA*) і *Staphylococcus pseudintermedius* (*MRSP*), необхідно зменшити антимікробні препарати, які є основним рушієм множинної лікарської стійкості. Оскільки загроза зростання резистентності до антимікробних препаратів і зоонозний потенціал *MRS* створюють нові виклики із значними наслідками для охорони здоров'я та до лікування піодермії собак, це вимагає перегляду та пошуку нових ефективних стратегій лікування даного захворювання. Однією із добрих стратегій лікування піодермії собак з меншою часткою використання місцевих біоцидних препаратів може стати фаготерапія. Бактеріофаги за піодермії собак найреальніше застосовувати місцево у комплексній терапії для зменшення вірулентних властивостей збудників, які спричиняють запальний процес. Водночас, для розроблення місцевих фагових препаратів для впливу на збудники піодермії, необхідно системно підходити до даного завдання, зокрема, вивчити мікробіоту шкіри здорових і хворих собак за піодермії, найбільш поширені клінічні патогени-збудники, частку резистентних серед них, можливість використання наявних на ринку фагових препаратів та ізоляцію й ідентифікацію бактеріофагів з біотопу шкіри.

Дисертаційна робота спрямована на обґрунтування та розробку високолітичного бактеріофагового препарату для лікування піодермії собак.

Акцентовано увагу на те, що коагулазонегативні та коагулазопозитивні види стафілококів відносяться до представників автохтонної мікробіоти шкіри клінічно здорових собак, які виділяються з різних ділянок в 100 та 60-68,5 % випадків, відповідно. Коагулазопозитивний вид *S. pseudintermedius* та коагулазо-варіабельний вид *S. schleiferi subsp. coagulans* займають основну нішу – до 65 %, на частку КНС припадає до 30 % від усіх ідентифікованих стафілококів. Збудником за піодермії у монокультурі був вид *S. pseudintermedius* – у 85,8 % випадків. У 57,1 % випадків асоціація за піодермії була представлена КПС та кишковою паличкою, у 4,0 раза рідше виявляли мікробну асоціацію з КПС та синьогнійною паличкою – 14,3 % випадків. У 28,6 % випадків мікробних асоціацій входили КПС, проте у поєднанні з кишковою або синьогнійною паличками. На частку коагулазопозитивних стафілококів *S. pseudintermedius*, *S. aureus* та коагулазо-варіабельного підвиду *S. schleiferi subsp. coagulans* припадає основна частина стафілококової мікробіоти (93,1 %), яка ідентифікована із запальних вогнищ шкіри за піодермії. Водночас, вид *S. pseudintermedius* значно переважав над іншими видами, зокрема, на його частку припадало 78,4 % від виділених стафілококів, що в 16,0 раза більше, ніж на вид *S. aureus* та в 8,0 раза більше, ніж на *S. schleiferi subsp. coagulans*. Отже, в етіології та патогенезі піодермії собак значну роль відіграють КПС, зокрема вид *S. pseudintermedius*.

Під час вивчення чутливості виділених мікроорганізмів зі здорової шкіри собак та за піодермії встановлено, що основні види мікробіоценозу шкіри здорових собак *S. pseudintermedius*, *S. epidermidis* та *S. saprophyticus* були високочутливими до беталактамного антибіотику пеніцилінового ряду амоксициліну з клавулановою кислотою, цефалоспоринових антибіотиків I – IV покоління (цефалексину, цефтріаксону й цефквіному) та фторхінолонового антибіотику марбофлоксацину, так як чутливість бактерій становила від 82,3 до 100 %.

За піодермії собак, яка реєструвалася повторно, виявляли стійкіші до антибіотиків стафілококи, кишкову й синьогнійну палички. Чутливість *S. pseudintermedius* до амоксициліну з клавулановою кислотою була 58,0 %, до

цефалоспоринових антибіотиків й марбофлоксацину – в діапазоні 64,5 – 74,2 %. Аналогічну тенденцію відмічали при визначенні чутливості у *E. coli* й *P. aeruginosa*, винятком були лише антибіотики тілозин й тетрациклін, до яких були чутливими 30 – 40 % даних культур. Отже, застосування мікробіологічних посівів з ізоляцією збудників та визначення антимікробної чутливості є однією з умов зменшення розповсюдження резистентних мікроорганізмів та ефективного лікування. До того ж, пошук нових високоефективних та безпечних методів лікування інфікованих вогнищ є альтернативою за піодермії собак.

Дослідження літичної активності зареєстрованих фагових препаратів виявило, що наявні на ринку бактеріофагові препарати «Піофаг», «Інтестіфаг» та розроблений ветеринарний препарат «Фагомаст» не проявляли літичної активності щодо основних збудників піодермії собак: *S. pseudintermedius*, *S. aureus*, та *S. schleiferi subsp. coagulans*. Із вогнищ запалення за піодермії виділяються найчастіше фаги, активні до клітин стафілококів видів *S. pseudintermedius* та *S. schleiferi subsp. coagulans*, які використали для розробки бактеріофагового препарату. Виділено чотири фаги, які були літичні до кожного із чотирьох видів стафілококів, зокрема, фаг *S.a 4* активний щодо *S. aureus*; фаг *S.p 2* літичний щодо *S. pseudintermedius*; фаг *S.she 3* – щодо *S. schleiferi subsp. coagulans*; фаг *S.e 5* – щодо *S. epidermidis*. Дослідження спектру літичної активності чотирьох стафілококових фагів виявило переважну їх специфічність щодо конкретного виду бактерій. Отже, для лізису більшої кількості збудників піодермії стафілококової етіології необхідно розробляти фаговий препарат «коктейльного» типу із вмістом різних фагів.

Встановлено, що виділені чотири літичні фаги до культур стафілококів, які виявляються у запальному процесі за піодермії, мали латентний період від 40 до 50 хв, при цьому кількість вивільнених віріонів становила від 6,71 до 7,91 log БУО/мл. При цьому оптимальна температура для розвитку даних фагів була від 30 до 40 °C, а за температури вище 45 °C відбувається поступове зниження їх життєдіяльності. За кислого рН середовища (4,0 од) кількість літичних фагів була, в середньому, на 3,1 порядки менша, порівнюючи з рН 6 та 7 од, за якого

відмічали найбільшу кількість життєздатних вірусів – до $7,9 \log$ БУО/мл. Тому фаговий препарат для боротьби зі збудниками піодермії собак має мати рН від слабо кислого до слабо лужного (5–8 од). Такий латентний період та кількість вивільнених віріонів є цілком задовільним для використання даних фагів у технології виробництва фагового препарату.

Для вибору оптимального титру фагів у бактеріофаговому препараті для лікування піодермії собак встановлено, що зараження бульйонної культури стафілококів фагами *S.a* 4, *S.p* 2, *S.she* 3 та *S.e* 5 у кількості від 10^7 до 10^8 БУО/мл дозволяє підтримувати інтенсивний інфекційний процес до 12 год з практично повним лізисом бактерій. Внесення у поживний бульйон стафілококів у кількості 10^3 та 10^4 КУО/мл та стафілококового бактеріофагу *S.p* 2 у кількості 10^7 – 10^8 БУО/мл забезпечує повний лізис бактерій протягом 12 год, а за початкової кількості стафілококів у бульйоні 10^6 – 10^7 КУО/мл активний інфекційний процес з повним лізисом *S. pseudintermedius* проходив 24–36 год. Тому виділені нами фаги мають добре діяти на збудників піодермії собак на поверхні шкіри у клінічних випадках.

На підставі системних лабораторних досліджень розроблено стафілококовий бактеріофаговий препарат «Фагодерм», у складі якого наявні чотири фаги специфічні до збудників піодермії собак: фаг *S.a* 4, фаг *S.p* 2, фаг *S.she* 3 та *S.e* 5 у кількості 10^7 – 10^8 БУО/мл. Встановлено, що стабільність фагового препарату «Фагодерм» (прозорість, рН, стерильність, концентрація літичних фагів) суттєво не змінюються протягом 6 місяців його зберігання у побутовому холодильнику ($+ 5 \pm 1$ °C). За використання методу «прискореного старіння», зберігання при $+ 20$ °C протягом 5 діб, концентрація фагів у препараті зменшилася в 1,6 раза, водночас, все ще становила більше 10^7 БУО/мл. Дослідження на 10 добу зберігання препарату «Фагодерм» виявили зменшення концентрації фагів, в середньому на один порядок, проте їх титр був більшим вище мінімально допустимої кількості 10^4 БУО/мл.

Токсикологічні дослідження виявили, що препарат «Фагодерм» з титром літичних фагів 10^8 БУО/мл в дозі від 5500 до 10000 мг/кг живої маси мишей мав

ЛД₀, тобто є переносимим і нетоксичним антибактеріальним засобом. Також у випадку довготривалого застосування піддослідним тваринам не відмічали ознак хронічної токсичності. Розроблений препарат «Фагодерм» не проявляв подразнюючої та сенсibiliзуючої дії протягом 15 добового нанесення на шкіру морських свинок. До того ж, не спричиняв шкірно-резорбтивної дії, оскільки ознак запалення шкіри хвостів у мишей не виявлено, при цьому зміни в кількості рідини також не було, що є свідченням відсутності всмоктування препарату через шкіру.

Препарат «Фагодерм» є ефективним для лікування поверхневої й глибокої піодермії собак, оскільки за концентрації фагів 10^7 – 10^8 БУО/мл повний терапевтичний ефект досягався на одну-дві доби швидше, або одночасно як у контрольній групі. Мікробіологічна характеристика процесу лікування способом зрошення уражених ділянок фагодермом, сприяє зменшенню стафілококів на 4–5 порядків – до 10^2 КУО/мл змиву. При цьому кількість стафілококів на шкірі після загоювання уражених ділянок відповідала вмісту нормомікробіоценозу даного біотопу. Застосування стафілококових бактеріофагів у комплексній терапії піодермії собак забезпечувало нормалізацію вмісту нейтрофілів, еозинофілів та базофілів, які найчастіше зростають за даного захворювання, та нормалізації біохімічних показників крові. До того ж, застосування бактеріофагових препаратів взамін антибіотиків для лікування піодермії собак навіть місцево дозволяє скоротити загальне використання антибіотиків й тим самим внести певну лепту в зниженні формування антибіотикорезистентних штамів у ветеринарній медицині.

Отже, бактеріофаговий препарат «Фагодерм» рекомендується застосовувати в комплексній терапії собак за піодермії способом зрошення уражених ділянок шкіри 5 – 8 разів на добу до повного загоєння.

Ключові слова: собаки, піодермія, лікування, розробка препарату, бактеріофаги, стафілококи, антибактеріальні засоби, антибіотики, чутливість до антибіотиків, гематологічні та біохімічні параметри.

ANNOTATION

Stroich V. V. Experimental substantiation and development of a bacteriophage drug for the treatment of pyoderma in dogs.

Qualifying scientific work on manuscript rights.

Dissertation for obtaining the scientific degree of Doctor of Philosophy in specialty 211 – Veterinary medicine (21 Veterinary). Higher educational institution «Podillia State University», Kamianets-Podilskyi, 2024.

The ability to effectively treat pyoderma in dogs is currently severely limited by the emergence of multidrug-resistant, methicillin-resistant staphylococci (*MRS*), as well as restrictions on prescribing antimicrobials for pets. Due to the emergence of methicillin-resistant staphylococci, mainly *Staphylococcus aureus* (*MRSA*) and *Staphylococcus pseudintermedius* (*MRSP*), it is necessary to reduce antimicrobial drugs, which are the main driver of multidrug resistance. Since the threat of increasing resistance to antimicrobial drugs and the zoonotic potential of *MRS* create new challenges with significant consequences for health care and for the treatment of canine pyoderma, it requires a review and search for new effective strategies for the treatment of this disease. One of the good strategies for the treatment of canine pyoderma with a smaller share of the use of local biocidal drugs can be phage therapy. Bacteriophages for canine pyoderma are most realistically applied locally in complex therapy to reduce the virulent properties of pathogens that cause the inflammatory process. At the same time, in order to develop local phage preparations to affect the causative agents of pyoderma, it is necessary to systematically approach this task, in particular to study the microbiota of the skin of healthy and sick dogs with pyoderma, the most common clinical pathogens, the proportion of resistant among them, the possibility of using phage preparations available on the market and isolation and identification of bacteriophages from the skin biotope.

The dissertation is aimed at the substantiation and development of a highly lytic bacteriophage drug for the treatment of pyoderma in dogs.

Attention is focused on the fact that coagulase-negative and coagulase-positive species of staphylococci are representatives of the autochthonous microbiota of the

skin of clinically healthy dogs, which are isolated from different areas in 100 and 60 – 68.5% of cases, respectively. The coagulase-positive species *S. pseudintermedius* and the coagulase-variable species *S. schleiferi subsp. coagulans* occupy the main niche up to 65%, coagulase-negative staphylococci account for up to 30% of all identified staphylococci. The causative agent of pyoderma in monoculture was *S. pseudintermedius* in 85.8% of cases. In 57.1% of cases, association with pyoderma was represented by coagulase-positive staphylococci and *Escherichia coli*, microbial association with coagulase-positive staphylococci and *Pseudomonas aeruginosa* was detected 4.0 times less often – 14.3% of cases. In 28.6% of cases, microbial associations included coagulase-positive staphylococci, *Proteus* in combination with intestinal or *Pseudomonas aeruginosa*. On the share of coagulase-positive staphylococci *S. pseudintermedius*, *S. aureus* and coagulase-variable subspecies *S. schleiferi subsp. coagulans* accounts for the main part of the staphylococcal microbiota (93.1%), which is identified from inflammatory skin foci in pyoderma. At the same time, the species *S. pseudintermedius* significantly prevailed over other species, in particular, its share accounted for 78.4% of the isolated staphylococci, which is 16.0 times more than *S. aureus* and 8.0 times more than *S. schleiferi subsp. coagulans*. Therefore, coagulase-positive staphylococci, in particular the species *S. pseudintermedius*, play a significant role in the etiology and pathogenesis of canine pyoderma.

During the study of the sensitivity of microorganisms isolated from the healthy skin of dogs and pyoderma, it was established that the main types of microbiocenosis of the skin of healthy dogs *S. pseudintermedius*, *S. epidermidis* and *S. saprophyticus* were highly sensitive to beta-lactam antibiotics of the penicillin series amoxicillin with clavulanic acid, cephalosporin antibiotics I – IV generation (cephalexin, ceftriaxone and cefquinome) and the fluoroquinolone antibiotic marbofloxacin, as the sensitivity of bacteria ranged from 82.3 to 100%.

For dog pyoderma, which was registered repeatedly, antibiotic-resistant staphylococci, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* were detected. The sensitivity of *S. pseudintermedius* to amoxicillin with clavulanic acid was 58.0%, to

cephalosporin antibiotics and marbofloxacin in the range of 64.5 – 74.2%. A similar trend was observed with determined sensitivity in *E. coli* and *P. aeruginosa*, except for the antibiotics tylosin and tetracycline, to which 30 – 40% of these cultures were sensitive. Therefore, the use of microbiological cultures with the isolation of pathogens and the determination of antimicrobial sensitivity is one of the conditions for reducing the spread of resistant microorganisms and effective treatment. In addition, the search for new highly effective and safe methods of treating infected foci is an alternative for canine pyoderma.

The study of the lytic activity of registered phage drugs revealed that the bacteriophage drugs Piophage®, Intestifage® and the developed veterinary drug Fagomast® did not show lytic activity against the main causative agents of canine pyoderma: *S. pseudintermedius*, *S. aureus*, and *S. schleiferi subsp. coagulans*. Phages active on cells of staphylococci species *S. pseudintermedius* and *S. schleiferi subsp. coagulans*, which were used to develop a bacteriophage drug. Four phages were isolated that were lytic to each of the four types of staphylococci, in particular, phage *S.a 4* is active against *S. aureus*; phage *S.p 2* is lytic against *S. pseudintermedius*; phage *S.she 3* – in relation to *S. schleiferi subsp. coagulans*; phage *S.e 5* – for *S. epidermidis*. The study of the spectrum of the lytic activity of four staphylococcal phages revealed their predominant specificity for a specific type of bacteria. Therefore, for the lysis of a larger number of causative agents of pyoderma of staphylococcal etiology, it is necessary to develop a phage preparation of the "cocktail" type with the content of various phages.

It was established that the isolated four lytic phages to the cultures of staphylococci, which are detected in the inflammatory process in pyoderma, had a latent period of 40 to 50 minutes, while the number of released virions was from 6.71 to 7.91 log PFU/ml. At the same time, the optimal temperature for the development of these phages was from 30 to 40 °C, and at temperatures above 45 °C, their vital activity gradually decreases. At an acidic pH of the medium (4.0 units), the number of lytic phages was, on average, 3.1 orders of magnitude lower, compared to pH 6 and 7 units, at which the highest number of viable viruses was noted up to 7.9 log CFU/ml.

Therefore, the phage preparation for combating causative agents of canine pyoderma should have a pH from weakly acidic to weakly alkaline (5 – 8 units). Such a latent period and the number of released virions is quite satisfactory for the use of these phages in the production technology of a phage preparation.

To select the optimal titer of phages in a bacteriophage preparation for the treatment of pyoderma in dogs, it was established that infection of a broth culture of staphylococci with phages *S.a* 4, *S.p* 2, *S.she* 3 and *S.e* 5 in the amount of 10^7 to 10^8 PFU/ml allows maintaining an intensive infectious process up to 12 hours with almost complete lysis of bacteria. The addition of staphylococci in the amount of 10^3 and 10^4 CFU/ml and staphylococcal bacteriophage *S.p* 2 in the amount of 10^7 – 10^8 PFU/ml into the nutrient broth provides complete lysis of bacteria within 12 hours, and at the initial amount of staphylococci in the broth 10^6 – 10^7 PFU/ml is active the infectious process with complete lysis of *S. pseudintermedius* took 24 – 36 hours. Therefore, the phages selected by us should act well on causative agents of canine pyoderma on the surface of the skin in clinical cases.

On the basis of systematic laboratory studies, the staphylococcal bacteriophage preparation Fagoderm was developed, which contains four phages specific to the causative agents of canine pyoderma: phage *S.a* 4, phage *S.p* 2, phage *S.she* 3 and *S.e* 5 in the amount of 10^7 – 10^8 PFU/ml . It was established that the stability of the phage preparation Fagoderm (transparency, pH, sterility, concentration of lytic phages) does not change significantly during 6 months of its storage in a household refrigerator ($+ 5 \pm 1$ °C). Using the "accelerated aging" method, storage at $+ 20$ °C for 5 days, the concentration of phages in the preparation decreased by 1.6 times, while it still amounted to more than 10^7 PFU/ml. Studies on the 10th day of storage of the drug Fagoderm revealed a decrease in the concentration of phages, on average by one order of magnitude, but their titer was higher than the minimum permissible amount of 10^4 PFU/ml.

Toxicological studies revealed that the drug Fagoderm with a titer of lytic phages of 10^8 PFU/ml in a dose of 5500 to 10000 mg/kg of live weight of mice had LD₀, that is, it is a tolerable and non-toxic antibacterial agent. Also, in the case of long-term use

in experimental animals, no signs of chronic toxicity were noted. The developed drug Fagoderma did not show an irritating or sensitizing effect during 15 daily application on the skin of guinea pigs. In addition, it did not cause a skin resorptive effect, since no signs of inflammation of the skin of the tails were found in mice, while there was no change in the amount of liquid, which is evidence of the absence of absorption of the drug through the skin.

The drug Fagoderma is effective for the treatment of superficial and deep pyoderma in dogs, because at a phage concentration of 10^7 – 10^8 PFU/ml, the full therapeutic effect was achieved one to two days faster, or at the same time as in the control group. Microbiological characteristics of the treatment process by irrigating the affected areas with phagoderma helps to reduce staphylococci by 4 – 5 orders of magnitude to 10^2 CFU/ml of wash. At the same time, the number of staphylococci on the skin after the healing of the affected areas corresponded to the content of the normomicrobiocenosis of this biotope. The use of staphylococcal bacteriophages in the complex therapy of canine pyoderma ensured the normalization of the content of neutrophils, eosinophils and basophils, which most often increase in this disease, and the normalization of biochemical blood parameters. In addition, the use of bacteriophage preparations instead of antibiotics for the treatment of pyoderma in dogs, even locally, allows to reduce the general use of antibiotics and thereby contribute to the reduction of the formation of antibiotic-resistant strains in veterinary medicine.

Therefore, the bacteriophage drug Fagoderma is recommended to be used in the complex therapy of dogs with pyoderma by irrigating the affected areas of the skin 5 – 8 times a day until complete healing.

Key words: dogs, pyoderma, treatment, drug development, bacteriophages, staphylococci, antibacterial agents, antibiotics, sensitivity to antibiotics, hematological and biochemical parameters.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

Статті у фахових наукових виданнях, включених до категорії Б:

1. **Stroich, V. V., & Horiuk, Y. V.** (2023). Identification of the skin microbiota of healthy dogs and those with pyoderma. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies*, 25(110), 46–53. <https://doi.org/10.32718/nvlvet11008> (Здобувач провів дослідження з визначення мікробіоценозу шкіри здорових та за піодермії собак та підготував матеріали до друку).

2. **Строїч, В. В., & Горюк, Ю. В.** (2023). Аналіз чутливості до антибіотиків мікробіоти шкіри здорових собак та за піодермії. *Podilian Bulletin Agriculture Engineering Economics*, (41), 75–82. <https://doi.org/10.37406/2706-9052-2023-4.11> (Здобувач провів визначення чутливості виділених мікроорганізмів зі шкіри здорових собак та за піодермії до антибіотиків та підготував матеріали до друку).

3. **Строїч, В. В., & Горюк, Ю. В.** (2024). Оцінка наявних бактеріофагових препаратів на ринку України та виділення фагів специфічних до збудників піодермії собак. *Podilian Bulletin Agriculture Engineering Economics*, (43), 230–236. <https://doi.org/10.37406/2706-9052-2024-2.33> (Здобувач провів дослідження з визначення літичної активності бактеріофагових препаратів, наявних на ринку України, виділив специфічні фаги до збудників за піодермії та підготував матеріали до друку).

4. **Stroich, V., & Horiuk, Y.** (2024). Characteristics of the latent period of staphylococcal phages isolated from pyoderma in dogs. *Scientific Progress & Innovations*, 27 (3), 95–99. <https://doi.org/10.31210/spi2024.27.03.15> (Здобувач провів дослідження з визначення тривалості латентного періоду виділених фагів з піодермії та підготував матеріали до друку).

Методичні рекомендації:

5. **Строїч, В. В., & Горюк, Ю. В.** Лікування піодермії собак бактеріофаговим препаратом «Фагодерм»: методичні рекомендації. Кам'янець-

Подільський: ЗВО «ПДУ», 2024. 22 с. *(Здобувач проводив експериментальні дослідження та оформлював методичні рекомендації).*

Технічні умови України:

6. **Строїч, В. В., & Горюк, Ю. В.** Технічні умови ТУ У 21.2–22769675–002:2024. Препарат ветеринарний «Фагодерм». Кам'янець-Подільський, 2024. 18 с. *(Здобувач приймав участь у розробці бактеріофагового препарату, організації і проведенні експериментальних досліджень та підготовці відповідної документації).*

Матеріали і тези наукових конференцій та інші наукові видання, які додатково відображають наукові результати дисертації:

7. **Строїч В. В., Горюк Ю. В.** Виділення фагів специфічних до збудників піодермії собак. Актуальні питання ветеринарної медицини: реалії та перспективи: збірник тез доповідей Міжнар. наук.-практ. конф. науковців, викладачів та аспірантів, 22 травня 2024 р.; Держ. біотехнологічний ун-т. Харків, 2024. С. 60-62.

8. **Stroich V., Horiuk Y.** The influence of commercial bacteriophage drugs on the causes of pyoderma in dogs. Science, technology, innovation: global trends and regional aspect: The 4th International scientific and practical conference, September 24 – 27, 2024, International Science Group Tallinn, Estonia, 2024. P. 280-281.

9. **Stroich V., Horiuk Y.** Characteristics of staphylococcal phages isolated during pyoderma in dogs: Science in the modern world: innovations and challenges. Proceedings of the 1st International scientific and practical conference. Perfect Publishing. Toronto, Canada. 2024. Pp. 30-32.

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ	2
СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ	12
ЗМІСТ	14
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ І СКОРОЧЕНЬ	16
ВСТУП	17
РОЗДІЛ 1	
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	23
1.1. Бактеріофаги для лікування тварин	23
1.1.1. Історія розвитку фаготерапії	24
1.1.2. Розвиток фагів та їх антибактеріальні сполуки	25
1.2. Переваги і недоліки застосування бактеріофагів у лікуванні тварин	29
1.3. Піодермія у собак: частота та причини виникнення	31
1.4. Збудники піодермії собак, ефективність лікування	35
1.5. Класифікація та причини піодермії у собак	38
1.6. Антибіотикорезистентні збудники за піодермії у собак	42
1.7. Висновки з огляду літератури	45
РОЗДІЛ 2	
ВИБІР НАПРЯМКІВ ДОСЛІДЖЕНЬ. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	47
РОЗДІЛ 3	
РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	53
3.1. Характеристика мікробіоти шкіри здорових та хворих на піодермію собак	53
3.2. Аналіз чутливості до антибіотиків мікробіоти шкіри здорових собак та за піодермії	59
3.3. Розробка препарату для лікування піодермії у собак на основі специфічних фагів	65

3.3.1. Оцінка наявних бактеріофагових препаратів на ринку України та виділення фагів специфічних до збудників піодермії собак	66
3.3.2. Характеристика властивостей та оцінка впливу фізичних факторів на життєдіяльність виділених фагів	70
3.3.3. Визначення літичної дії стафілококових фагів в залежності від кількості їх та цільових клітин у середовищі	80
3.4. Опис технологічного процесу виробництва бактеріофагового препарату літичного до збудників піодермії собак та оцінка його стабільності за зберігання	87
3.4.1. Технологія виробництва бактеріофагового препарату Фагодерм	87
3.4.2. Оцінка стабільності бактеріофагового препарату Фагодерм до зберігання	90
3.5. Токсикологічна характеристика розробленого бактеріофагового препарату Фагодерм для лікування піодермії у собак	92
3.5.1. Визначення гострої токсичності Фагодерму	92
3.5.2. Визначення хронічної токсичності Фагодерму	93
3.5.3. Визначення подразнюючої й сенсibiliзуючої дії Фагодерму	94
3.5.4. Визначення шкірно-резорбтивної дії Фагодерму	95
3.6. Клінічне дослідження бактеріофагового препарату Фагодерм для лікування собак за піодермії	96
3.6.1. Ефективність застосування фагового препарату Фагодерм за поверхневої піодермії у собак	97
3.6.2. Ефективність застосування фагового препарату Фагодерм за глибокої піодермії у собак	106
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ	117
ВИСНОВКИ	129
ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ	133
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ЛІТЕРАТУРИ	134
ДОДАТКИ	159

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ І СКОРОЧЕНЬ

БУО – бляшкоутворюючі одиниці

КНС – коагулазонегативні стафілококи

КПС – коагулазопозитивні стафілококи

КУО – колонієутворюючі одиниці

ЛД₀ – летальна доза

МАФАнМ – мезофільні аеробні та факультативно анаеробні мікроорганізми

МБК – мінімальна бактерицидна концентрація

МПА – м'ясо-пептонний агар

МПБ – м'ясо-пептонний бульйон

CLSI – інститут клінічних і лабораторних стандартів

MRS – метицилін резистентний *Staphylococcus*

MRSA – метицилін резистентний *Staphylococcus aureus*

MRSP – метицилін резистентний *Staphylococcus pseudintermedius*

ВСТУП

Актуальність теми. Серед захворювань собак бактеріальні інфекції шкіри є частою причиною звернення до ветеринарних клінік. При цьому, піодермія у собак діагностується найчастіше з-поміж інших шкірних хвороб [10, 67]. Незважаючи на те, що піодермія рідко загрожує життю тварин, вона значною мірою викликає дискомфорт у собак через наявний свербіж або біль і розвиток важких запальних процесів шкіри [129, 150]. Оскільки піодермія завжди є вторинною по відношенню до основного захворювання, то рецидив вірогідний, якщо таке захворювання не буде усунено [75].

Дослідники повідомляють, що собаки з підозрою або підтвердженою піодермією, практично в 100 % випадків отримують системну антибактеріальну терапію з використанням антибіотиків широкого спектру дії [197]. При цьому, зазвичай, антибіотикотерапія носить емпіричний характер, а застосування антибіотиків, на основі даних мікробіологічної лабораторії, становить в середньому 5 % [34, 141, 196]. Це обумовлено тим, що у минулому лікування піодермії собак рідко було складним, оскільки збудники (зазвичай стафілококи) були в основному чутливими до антибактеріальних препаратів широкого спектру дії [125, 153, 162]. Однак здатність ефективно лікувати піодермії у собак зараз суттєво обмежена через появу мультирезистентних, метицилінрезистентних стафілококів (*MRS*), а також обмеженням на призначення антимікробних препаратів для домашніх тварин [45, 67, 110, 129]. Тому багато вчених вважають [103, 121, 175, 193, 197], що у зв'язку з продовженням появи резистентних до метициліну стафілококів, головним чином *Staphylococcus aureus* (*MRSA*) і *Staphylococcus pseudintermedius* (*MRSP*), необхідно зменшити антимікробні препарати, які є основним рушієм множинної лікарської стійкості. Оскільки загроза зростання резистентності до антимікробних препаратів і зоонозний потенціал *MRS* створюють нові виклики із значними наслідками для охорони здоров'я та до лікування піодермії собак, це

вимагає перегляду та пошуку нових ефективних стратегій лікування даного захворювання.

Дослідники вказують [32, 155], що бактерії видів *Staphylococcus spp.* вважаються автохтонною мікрофлорою шкіри здорових собак та проявляють захисну функцію. Водночас, за піодермії дані види бактерій проявляють виражені патогенні властивості, що впливає на патогенез хронічного перебігу і часто ускладнення хвороби [37, 76, 152]. Тому для ефективного лікування піодермії та розроблення нових стратегій профілактики даного захворювання необхідно детально знати збудників та їх стійкість до антибактеріальних препаратів. До того ж, сучасна концепція боротьби з глобальною стійкістю у мікроорганізмів до антимікробних препаратів передбачає застосування нових нетрадиційних підходів з використанням біологічних і фізичних методів. Однією із добрих стратегій лікування піодермії собак з меншою часткою використання місцевих біоцидних препаратів може стати фаготерапія. Бактеріофаги за піодермії собак найреальніше застосовувати місцево у комплексній терапії для зменшення вірулентних властивостей збудників, які спричиняють запальний процес. Водночас, для розроблення місцевих фагових препаратів для впливу на збудники піодермії, необхідно системно підходити до даного завдання, зокрема, вивчити мікробіоту шкіри здорових і хворих собак за піодермії, найбільш поширені клінічні патогени-збудники, частку резистентних серед них, можливість використання наявних на ринку фагових препаратів та ізоляцію й ідентифікацію бактеріофагів з біотопу шкіри.

Отже, за піодермії собак у вогнищі запалення завжди присутні патогенні збудники і для їх знищення застосування безпечних для тварин та навколишнього середовища препаратів є перспективним й актуальним.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано в Закладі вищої освіти «Подільський державний університет» на кафедрі ветеринарного акушерства, внутрішньої патології та хірургії протягом 2022 – 2024 років за ініціативною тематикою «Розробка нових антимікробних препаратів і засобів для профілактики і лікування хвороб тварин

та дезінфекції у ветеринарній медицині», номер державної реєстрації 0122U200511.

Мета і задачі досліджень. Мета робота – експериментально обґрунтувати та розробити високолітичний бактеріофаговий препарат для лікування піодермії собак.

Для досягнення поставленої мети необхідно було виконати наступні завдання:

- провести ідентифікацію мікробіоти, виділеної із здорової шкіри собак та за піодермії;
- провести порівняльний аналіз антибіотикограм мікробіоти, виділеної з шкіри клінічно здорових собак та за піодермії;
- здійснити аналіз наявних бактеріофагових препаратів на ринку України, встановити їх літичний спектр щодо основних збудників піодермії собак;
- виділити літичні фаги до збудників піодермії собак та оцінити вплив фізичних факторів на життєдіяльність ідентифікованих бактеріофагів;
- визначити літичну дію стафілококових фагів в залежності від їх кількісного вмісту та цільових клітин у середовищі;
- розробити бактеріофаговий препарат літичний до збудників піодермії собак та оцінити його стабільність за зберігання;
- провести токсикологічну характеристику розробленого бактеріофагового препарату «Фагодерм» для лікування піодермії у собак;
- провести клінічне випробування бактеріофагового препарату «Фагодерм» для лікування піодермії собак.

Об'єкт дослідження: піодермія собак, мікробіота шкіри, збудники піодермії, антибіотикограми ідентифікованих бактерій за піодермії; бактеріофаги, літичні стафілококові фаги, вплив фагів на стафілококи; фаговий препарат.

Предмет досліджень: мікробіота шкіри здорових собак та за піодермії, чутливість до антибіотиків ізольованих бактерій із здорової та за піодермії шкіри; розробка бактеріофагового препарату літичного до збудників піодермії

собак, ефективність лікування піодермії собак бактеріофаговим препаратом «Фагодерм».

Методи досліджень: мікробіологічні (ізоляція та ідентифікація мікрофлори, диско-дифузійний метод визначення чутливості до антибіотиків, виділення фагів та ідентифікація фагів); токсикологічні (гостра й хронічна токсичність, подразнююча, сенсibiliзуюча шкірно-резорбтивна дія бактеріофагового препарату «Фагодерм»); морфо-біохімічні показники крові; клінічні, статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів. Обґрунтовано доцільність розробки фагового препарату для лікування піодермії собак, як альтернатива зменшення використання антибіотиків у ветеринарній медицині. Уперше в Україні виділено літичні фаги щодо стафілококів-збудників піодермії собак, дано характеристику їм за культуральними й фізичними властивостями та розроблено бактеріофаговий препарат «Фагодерм» для обробки уражених ділянок за піодермії собак.

Стафілококовий бактеріофаговий препарат «Фагодерм» містить чотири специфічні фаги у кількості 10^7 – 10^8 БУО/мл, зокрема фаг *S.a 4* активний щодо *S. aureus*; фаг *S.p 2* літичний щодо *S. pseudintermedius*; фаг *S.she 3* – щодо *S. schleiferi subsp. coagulans*; фаг *S.e 5* – щодо *S. epidermidis*. Уміст літичних фагів у препараті «Фагодерм» є стабільний протягом 6 місяців зберігання за температури $+ 5 \pm 1$ °C, він не спричиняє гострої й хронічної токсичності, подразнюючої, сенсibiliзуючої, шкірно-резорбтивної дії.

Розроблено ефективні режими застосування фагодерму у комплексній терапії поверхневої й глибокої піодермії собак. Встановлено, що під час лікування піодермії способом зрошення уражених ділянок кількість стафілококів зменшується на 4–5 порядків до 10^2 КУО/мл змиву, що відповідає вмісту нормомікробіоценозу.

Практичне значення отриманих результатів. Вивчення мікробіоти шкіри здорових й уражених ділянок за піодермії собак носило не тільки науковий характер, але й мало значне практичне значення, через те, що дозволило

визначити збудники, які найбільш приймають участь у запальному процесі шкіри та обґрунтувати необхідність виділення літичних фагів до даних збудників.

Результати дослідження антибіотикограм у бактерій, виділених із здорової шкіри собак та за піодермії, розширили практичну частину глобальної проблеми антибіотикорезистентності, в тому числі у ветеринарній медицині, та визначили доцільність використання певних груп антибіотиків за піодермії собак.

З метою зменшення місцевого використання антимікробних препаратів за піодермії собак запропоновано ефективну схему лікування даного захворювання із застосуванням бактеріофагового препарату «Фагодерм», що висвітлено у методичних рекомендаціях «Лікування піодермії собак бактеріофаговим препаратом «Фагодерм», які затверджено на засіданні науково-методичної ради ЗВО «ПДУ», протокол №8 від 23 жовтня 2024 року. Також за результатами досліджень розроблено й запропоновано ТУ У 21.2–22769675–002:2024) на препарат ветеринарний «Фагодерм».

Особистий внесок здобувача. Дисертант самостійно провів літературно-патентний пошук й аналіз наукової літератури за обраною темою дисертаційного дослідження, визначив мету і завдання роботи, опрацював методи й методики для проведення досліджень, склав схему експериментів, провів лабораторні й клінічні дослідження щодо мікробного складу шкіри, виділення бактеріофагів, перевірки їх літичної дії та розробки й апробації бактеріофагового препарату «Фагодерм», провів статистичну обробку отриманих цифрових даних. У дисертаційній роботі використано ідеї та положення особистої роботи здобувача та опубліковано їх у наукових працях у співавторстві. Під керівництвом наукового керівника доктора ветеринарних наук Горюк Юлії Вікторівни дисертант провів узагальнення отриманих результатів досліджень.

Апробація результатів дисертаційних досліджень. Основні результати досліджень доповідались, обговорювались та отримали схвалення на засіданнях кафедри ветеринарного акушерства, внутрішньої патології та хірургії, вченої ради факультету ветеринарної медицини і технологій у тваринництві ЗВО

«ПДУ» та на конференціях і семінарах: Міжнар. наук.-практ. конф. науковців, викладачів та аспірантів «Актуальні питання ветеринарної медицини: реалії та перспективи» (Харків, 2024); 4th International scientific and practical conference «Science, technology, innovation: global trends and regional aspect» (Tallinn, Estonia, 2024); 1st International scientific and practical conference «Science in the modern world: innovations and challenges» (Toronto, Canada. 2024).

Публікації. За темою дисертаційного дослідження опубліковано 7 наукових праць, із них 4 статті у фахових наукових виданнях України (категорія Б), 3 праці – у матеріалах конференцій, розроблено і затверджено технічні умови України на стафілококовий бактеріофаговий препарат «Фагодерм» та методичні рекомендації щодо його використання.

Структура і обсяг роботи. Дисертаційну роботу викладено на 159 сторінках комп'ютерного набору тексту. Робота складається із анотацій, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, результатів досліджень, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків, пропозицій виробництву, списку використаних джерел, додатків. Список використаної літератури налічує 214 джерел. Дисертація ілюстрована 19 таблицями, 18 рисунками і містить 6 додатків. До додатків увійшли копії перших сторінок методичних рекомендацій, технічних умов та акти виробничих випробувань бактеріофагового препарату Фагодерм у ветеринарних клініках.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Бактеріофаги для лікування тварин

Тваринництво часто передбачає розведення тварин в обмежених умовах, сприяючи легкому та швидкому поширенню інфекційних захворювань. Для профілактики та лікування цих захворювань звичайною практикою десятиліть було використання антибіотиків [42]. Це призвело до надмірного використання антибіотиків, що загрожує зниження їх ефективності через появу та поширення стійких до антибіотиків бактерій [159] і негативного впливу на навколишнє середовище. У даний час кількість антибіотиків, що використовуються в тваринництві, є найбільшою частиною серед усіх антибіотиків, що використовуються у всьому світі, перевищуючи ті, що використовуються в медицині [157]. Зокрема, у 2010 році в тваринництві по всьому світу було використано приблизно 63 151 тону протимікробних препаратів [75, 120]. До 2030 року споживання антибіотиків, очікується, зросте на 67% [200, 179].

Враховуючи наявну тенденцію до широкомасштабного використання антимікробних препаратів, очевидним є факт, що сьогодні світ стикається зі зростаючою появою бактерій, стійких до антибіотиків. Водночас, заборона деяких існуючих антибіотиків й відсутність розробки нових протимікробних засобів викликали нагальну потребу в пошуку нових альтернатив проти інфекцій тварин [42, 167].

Бактеріофаг та його похідні вважаються цінними альтернативними антимікробними розчинами. Бактеріофаги (фаги) – це віруси, які специфічно заражають бактерії, які можуть вбивати та лізувати бактерії, які вони інфікують [58], будучи нешкідливими для людини, тварин і рослин.

Бактеріофаги є природними хижаками бактерій всюдисущими в навколишньому середовищі з високою специфічністю господаря та нешкідливими для тварин. З цих причин фаги та їх похідні вважаються цінними антимікробними альтернативами та можливістю скоротити поточне

використання антибіотиків у сільськогосподарському виробництві, підвищуючи продуктивність тварин і забезпечуючи захист навколишнього середовища [42].

1.1.1. Історія розвитку фаготерапії

Перше відкриття бактеріофагів відбулося у 1917 році вченим д'Ереллем й призвело до багатообіцяючих досліджень щодо їх антимікробної ефективності [42]. На початку XX століття фаги широко використовувалися для лікування різних бактеріальних захворювань у людей і тварин. Після цього захопленого початку фагової терапії проблеми з неналежним використанням і неконтрольованими дослідженнями та, зрештою, розробка хімічних антибактеріальних препаратів призвели до припинення досліджень фагової терапії в Сполучених Штатах і Західній Європі. Проте, кілька установ у Східній Європі продовжували вивчати та використовувати фаги як терапевтичні агенти для інфекцій людини. Тривожне зростання антибактеріальної стійкості серед бактерій призвело до перегляду східноєвропейських досліджень і до початку контрольованих експериментів на моделях тварин, та сьогодні відновлено науковий й практичний інтерес до фагової терапії [154, 58, 73]. Оскільки, крім використання всієї фагової частинки, також можливе використання їх гетерологічних експресованих білків з антимікробним інтересом (як лізини та деполімерази) [44, 156, 182, 213].

Комплекс сучасних досліджень фаготерапії підтвердив, що фаги можуть бути дуже ефективними в лікуванні багатьох різних типів бактеріальних інфекцій. Смертельність і специфічність фагів для певних бактерій, здатність фагів розмножуватися всередині інфікованих тварин-господарів і безпека фагів роблять їх ефективними антибактеріальними засобами. Незважаючи на перешкоди, сучасні дослідники [42, 58] схиляються до думки, що фагова терапія відновить свою роль, як у медичному, так і у ветеринарному лікуванні інфекційних захворювань, особливо за сценарію появи резистентності до антибактеріальних засобів.

1.1.2. Розвиток фагів та їх антибактеріальні сполуки

Фаги є найпоширенішими істотами в біосфері, і можуть бути ізольовані з кількох джерел, включаючи травний тракт людей і тварин, їжу, ґрунт, воду, каналізаційні та інші екологічні ніші. Насправді фаги можна знайти в тих же середовищах, на яких існують бактеріальні господарі [51]. Вірулентні фаги проходять літичний цикл, розмножуючись всередині бактерії та зумовлюють лізис клітини, при цьому вивільняються нові віруси.

Навпаки, помірні фаги ведуть лізогенний спосіб життя циклу, інтегруючи бактеріальний геном, не викликаючи лізис клітини, але все ще здатні переключатися на літичний цикл при певних подразниках. Для лікування або профілактичного застосування використовуються нетрансдукуючі вірулентні фаги, щоб уникнути ризику трансдукції (перенесення) гена вірулентності, використовують переваги здатності їх до реплікації [69, 118].

Існують сотні бактерій і вірусів, які спричиняють захворювання у тварин. Бактерії спричиняють різноманітні захворювання, які залежать від виду тварини, воріт агента, імунної реакції тварини та санітарних умов утримання [42]. Подібним чином віруси заражають певних тварин і мають наслідки, які варіюються від відсутності симптомів до легких і небезпечних для життя захворювань.

Останнім часом фагові білки, такі як ендолізени, екзолізени та деполімерази досліджуються як антимікробні засоби лікування окремо або в поєднанні з іншими агентами.

Ендолізени – це ферменти, що виробляються фагами в кінці їхнього циклу реплікації, щоб перетравити стінку бактеріальної клітини пептидоглікан, що дозволяє вивільняти потомство фага [42]. Більшість ендолізинів мають модульну організацію, містять каталітичний домен і домен зв'язування клітинної стінки. Домен зв'язування клітинної стінки зв'язується з пептидогліканом або іншим компонентом клітинної стінки, що дозволяє каталітичному домену розщеплювати специфічний зв'язок у структурі пептидоглікану. Ендолізени можуть бути мурамідази, глюкозамінідази, трансглікозилази, амідази або

ендопептидази [182]. Ці ферменти мають кілька переваг як протимікробні засоби: вони, як правило, дуже специфічні для збудника і, таким чином, не порушують нормальну мікрофлору. Так, немає механізмів резистентності або стійких фенотипів, які були б виявлені після впливу ендолізинів, ймовірно тому що ці ферменти націлені на основні структурні компоненти для життєздатності бактерій й з моменту їх застосування екзогенно вони діють на зовнішню частину клітини, таким чином уникаючи більшості можливих механізмів опору [182]. Індукована імунна відповідь ендолізинами, очевидно, не нейтралізує їх активність та не запобігає їх використанню для лікування системних інфекцій [65].

Більшість досліджень, присвячених ендолізинам, стосується грампозитивних бактерій, тому що грамнегативні бактерії мають високонепроникну зовнішню мембрану, яка обмежує доступ ендолізинів до пептидоглікану, коли застосовується екзогенно. Тому для того, щоб лізувати грамнегативні бактерії, більшість ендолізинів вимагають фізичної обробки або хімічних агентів руйнування зовнішньої мембрани, а саме полікатіонних агентів та хелаторів [39, 208]. Але є деякі ендолізینی, які перетравлюють зовнішню мембрану і це вбиває грамнегативні бактерії без хімічної чи фізичної обробки. Приклади включають ендолізін фага *Salmonella* SPN9CC [124], фаговий ендолізін *Bacillus amyloliquefaciens* – *Lys1521* [158] й ендолізін фагу *LysAB2* проти *Acinetobacter baumannii* [120]. Більшість із їх ферментів мають амфіпатичні або висококатіонні ділянки, які взаємодіють з ліпополісахаридами, щоб перетнути зовнішню мембрану [207, 120].

У дослідженні [148] виявлено, що для боротьби з *Streptococcus pyogenes* пероральний прийом ендолізину *PlyC* колонізованим мишам знищував патоген протягом 2 годин. Також інші дослідження показали, що внутрішньочеревні ін'єкції ендолізину *PlyPy* [131] або *PlySs2* [70] захищали мишей від смерті у моделі бактеріємії інфекції *S. pyogenes* або за комбінованої інфекції, спричиненої *MRSA* і *S. pyogenes*. Для *Streptococcus agalactiae* повторні внутрішньочеревні ін'єкції *PlySK1249* значно захистили мишей від інфекції [173]. Також у ряді

досліджень показано, що фагові ендолізени – це потужні терапевтичні засоби проти мультирезистентних інфекцій, викликаних *S. Aureus*, захищали мишей від смерті при внутрішньочеревному введенні [183, 78]. Попередня композиція на основі ендолізину *SAL200*, що вводиться як внутрішньовенна ін'єкція за мишачої моделі інфекції *MRSA*, показала зниження кількості стафілококів у крові і тривале виживання мишей [97]. У доклінічному дослідженні на щурах і собаках повторне внутрішньовенне введення *SAL200* не викликало ознак токсичності [98].

Холіни – це білки, кодовані фагами на пізній фазі літичного циклу, беруть участь у пермеабілізації мембрани, дозволяючи ендолізинам переходити у периплазму та деградувати пептидоглікан [209]. Комбіноване застосування холінів і ендолізинів може бути багатообіцяючою стратегією антимікробної терапії. Дослідження [188, 189] висвітлюють дані, у яких були поєднані *holin* *HolSMP* і ендолізин *LySMP*, що призводить до розширеного спектру дії ендолізину проти штамів мультирезистентних *S. suis* й *S. aureus*. Виявлено, що завдяки своїй модульній структурі, ендолізени можуть бути генетично сконструйовані для прояву необхідних властивостей, зокрема, щодо розширення спектру дії на різних бактерій-господарів, покращення літичної активності, розчинності та здатності інфікувати грамнегативні бактерії [64, 99].

Модульна інженерія ендолізинів передбачає перетасування доменів природних лізинів, утворюючи химерні лізини (хімеолізени) або злиття природного лізину або частину його області з іншим компонентом, таким як пептид або білок (штучні лізини або артілізини) [64, 99].

Дослідження показали, що хімеолізени мають підвищену літичну активність і природні ферменти, які уражують ширший діапазон бактерій-господарів [56, 140, 184]. Дослідження *in vivo* довели ефективність лікування генетично модифікованими ендолізинами на тваринних моделях проти інфекцій людей і тварин.

Екзолізени є іншим типом пептидогліканових ферментів, який кодується деякими фагами, які на відміну від ендолізинів, присутні як частина фагової

структури та беруть участь у першому етапі фагової інфекції. Екзолізини руйнують пептидоглікан, дозволяючи фагам досягти цитоплазматичної мембрани бактерій, таким чином полегшується ін'єкція ДНК у клітину-хазяїна. Екзолізини мають кілька переваг як протимікробні препарати: висока термостабільність і специфічність, низька ймовірність бактеріальної резистентності та модульна організація, що дозволяє будувати химерні білки з кількома доменами для покращення їх антимікробної активності [42].

Деполімерази – кодовані фагом білки, які мають гліканазоподібну активність і перетравлюють полісахариди клітинної стінки бактерій, а саме, ліпополісахариди й капсульні полісахариди [42]. За механізмом дії фагові деполімерази можуть бути гідролазами, якщо вони каталізують гідроліз глікозидних зв'язків, або ліазами, якщо вони розщеплюють 1,4-глікозидні зв'язки за механізмом β -елімінації [156].

Останні розробки щодо генетичних інструментів створюють нові можливості для модифікації геномів фагів з метою покращення їх властивостей для терапевтичного та профілактичного застосування [168, 194]. Ці засоби включають бактеріофаг рекомбінації електропорованої ДНК, дріжджової штучної хромосоми і системи CRISPR-Cas [63, 135, 137, 138]. Система CRISPR–Cas є одним із нових інструментів для генетичної модифікації фагів. Ця система бере участь у захисті мікробних клітин від вторгнення в ДНК і містить масив повторів і прокладок. У порівнянні з іншими методами, CRISPR–Cas забезпечує більш високий відсоток мутованих фагів, спрощуючи вибір і відновлення [111, 139].

Генетичні модифікації також використовувалися для посилення бактеріального знищення фагів при поєднанні з антибіотиками, наприклад, шляхом створення лізогенних фагів для надмірної експресії білків, які націлені на певний несуттєвий ген [134].

1.2. Переваги і недоліки застосування бактеріофагів у лікуванні тварин

Фаги мають багато переваг перед антибіотиками за терапевтичною здатністю, в тому числі: висока специфічність, що зменшує пошкодження нормальної мікробіоти господаря; реплікація тільки в місці інфікування; самообмеження і здатність до самодозування, тобто реплікація лише при чутливості присутніх бактерій; нижча схильність до формування резистентності, особливо при використанні фагового коктейлю [127, 151].

Фаги та фагові білки, а саме ендолізени, екзолізени та деполімерази можуть мати ряд переваг як протимікробні засоби проти бактеріальних інфекцій, що вражають тварин [42]. Загалом, незважаючи на кілька експериментів *in vivo*, які демонструють, що фаги мають потенціал як антимікробні засоби контролю інфекцій у тварин, вони все ще мають наявні обмеження для терапевтичного використання [133, 142]. Наприклад, хоча фаги менше викликають резистентність, ніж антибіотики, однак все-таки виникають бактеріофаг-нечутливі мутанти, спричинені втратою або мутацією бактеріального рецептора [95, 207]. Інші обмеження включають виділення ендотоксинів, спричинених швидким лізисом великої кількості бактерій, які можуть викликати алергічні реакції [59, 74], можливість індукції *in vivo* – антифагова імунна відповідь, що ускладнює підтримку ефективної концентрації фага [74] і залежно від використовуваної системи доставки, досягнення ефективної концентрації фага в місці інфекції [26]. Щоб обійти ці обмеження, перед застосуванням фагів слід враховувати кілька факторів у природних умовах. До них належать: відповідний відбір фагів; використання фагових коктейлів з фагами, які націлені на різні поверхневі рецептори одного цільового патогена, що може призвести до синергічного ефекту та зменшення ймовірності виникнення стійкості бактерій; оптимізація співвідношення фаг/бактерія, час і шлях доставки фага, відповідно до цільового збудника тварини [42].

Крім біологічних обмежень, нормативні проблеми все ще є основною перешкодою для фагової терапії. Унікальність фагів як білкових живих біологічних агентів [90] є проблемою до регуляторних органів, які намагаються знайти найкращий підхід до регулювання фагових продуктів [108].

Одним з основних недоліків ендолізинів є їх обмежена дія проти грамнегативних бактерій. Це було подолано шляхом розробки цих ферментів як зовнішніх мембранопроникаючих ендолізинів (Артілізини). Дослідження [43] поєднали ендолізени з різними ліпополісахаридами – дестабілізуючими пептидами з полікатіонними, гідрофобними та амфіпатичними властивостями, що дозволило ферментам проходити зовнішню мембрану і стати активними проти грамнегативних бактерій. Наприклад, артілізин *LoGT-001* зміг знищити клітини *P. aeruginosa* у кількості 5,50 log БУО, *A. baumannii* – у кількості 5,18 log, *E. coli* – 2,41 log і *S. typhimurium* – 1,52 log за 30 хв.

У двох тематичних дослідженнях собак з отитом лікування за допомогою бактеріофага *Apm-085* – вдалося вилікувати тварин від інфекції *P. aeruginosa*, яка не була усунена за допомогою стандартних антибіотиків [40].

Однак широке застосування фагів у ветеринарії залежатиме від його ефективності, безпеки та вартості порівняно з іншими альтернативами. Тому більш детальна біологічна та генетична характеристика фагів є обов'язковою, щоб уникнути небажаних результатів [42]. До них відноситься адаптивна відповідь бактерій на фаг інфікування шляхом створення бактеріофаг-нечутливих мутантів або навіть збільшення вірулентних бактерій, коли фаги передають вірулентні гени, такі як гени стійкості до токсинів і антибіотиків серед бактерій. Крім того, ефективність фаготерапії вимагає відповідного вибору фагів, дозування, маршрут доставки та терміни адміністрування, які слід адаптувати відповідно до збудника та цільової тварини [42].

З іншої точки зору, розвиток синтетичної біології та молекулярних інструментів дозволяють конструювати генетично модифіковані фаги з такими цінними властивостями як розширення діапазону господарів. Крім цього, знижується токсичність і імуногенність, посилюється виживання після введення

[42]. Це також дозволяє використовувати фагові білки, а саме ендолізینی та екзолізینی, які мають більш широкий антибактеріальний спектр, низьку імуногенність і низьку ймовірність бактеріального опору і, отже, можуть розглядатися як потенційно цінні терапевтичні засоби для боротьби з інфекціями [42].

У даний час вже є кілька компаній, що розробляють фагові продукти, які можна використовувати у ветеринарії. Вони включають *BioPhage-PA*, місцевий фаговий препарат для лікування хронічного отиту проти стійких до антибіотиків *P. aeruginosa*, та *ViridaxTM* для лікування системних та місцевих інфекцій *S. aureus* та інших видів стафілококів [42, 157].

Загалом, безперервне дослідження вже існуючих альтернатив антибіотикам і розробка безпечних нових ефективних препаратів необхідні для боротьби із загрозою патогенів, стійких до антибіотиків, і для забезпечення сталого добробуту тварин і людей.

1.3. Піодермія у собак: частота, причини виникнення

Собаки як тварини-компаньйони набувають останнім часом особливої популярності. Собаки можуть виконувати різноманітні завдання, включаючи надання товариства, охорону худоби чи майна, відстеження/вилучення мисливських тварин, знищення паразитів, пошук загублених людей чи речей, допомога постраждалим від стихійних лих, допомога інвалідам, розслідування злочинів тощо [109].

Шкіра – це велика метаболічно активна система, яка служить для захисту організму від травм та інфекцій, допомагає в контролі температури, регулювання імунітету, а також діє як резервуар для зберігання певних поживних речовин. Було підраховано, що 20 – 75 % випадків маленьких собак мають проблеми зі шкірою як основний або супутній симптоми [109].

Загалом, нормальна шкіра собак має різноманітні механізми захисту від чужорідних патогенів на зовнішній периферії всього тіла. Окрім фізичних і

хімічних бар'єрів, регулярна мікробна флора на поверхні шкіри також є важливим захисним шаром для підтримки здоров'я шкіри. Мікробна флора з великою різноманітністю може підтримувати баланс всього мікросередовища. Вона може активно виділяти певні речовини з антибіотичними властивостями, щоб пригнічувати розмноження чужорідних мікроорганізмів або виконувати очисний ефект [53, 57].

Розлади шкіри дуже поширені у домашніх тварин, і найчастішими причинами є алергія на паразитів, таких як блохи, алергія на навколишнє середовище та несприятливі реакції на їжу. Проте, всі зміни мікрооточення поверхні шкіри сприяють розмноженню бактерій [152], навіть із кількома шарами захисту, якщо собака має первинну або вторинну бактеріальну інфекцію, спричинену місцевими ранами, шкірною паразитарною інфекцією або витоком шкірного сала, це спричинить різні ураження шкіри. При бактеріальних інфекціях шкіри у собак найпоширенішим захворюванням є поверхнева піодермія [42].

Піодермію можна визначити як гнійну бактеріальну інфекцію шкіри [27]. Піодермія частіше зустрічається у собак через певні характеристики шкіри собаки, наприклад, тонкий роговий шар з меншою кількістю ліпідного матеріалу і незахищені волосяні фолікули, які піддаються підвищеному ризику бактеріальної інвазії та подальшій колонізації і заростання. Це може призвести до більш високої частоти первинного запалення захворювання, яке впливає на першу лінію захисту [166].

З моменту публікації перших комплексних підручників з ветеринарної дерматології в 1960-х роках піодермія постійно фігурує як одне з основних захворювань, що вражають шкіру собак. Було припущено, що це частково є наслідком порівняно тонкого і компактного рогового шару собаки, нестачі внутрішньоклітинної емульсії в епідермісі собаки та відсутності сальної пробки у волосяному фолікулі собаки [150].

Піодермія собак є поширеним явищем у практиці дрібних тварин і часто призводить до призначення системних протимікробних засобів. Хороший

фундамент знань про піодермію був створений протягом 1970-х і 1980-х років, коли лікування інфекції становило відносно мало проблем. Однак, здатність ефективного лікування піодермії у собак зараз суттєво обмежена появою мультирезистентних, метицилінрезистентних стафілококів і, у деяких країнах, обмеженнями на призначення антимікробних препаратів для домашніх тварин. Загроза зростання резистентності до антимікробних препаратів і зоонозний потенціал *MRS* додають новий вимір наслідків для охорони здоров'я до лікування піодермії собак і вимагають перегляду та пошуку нових найкращих стратегій лікування [130, 181].

Незважаючи на те, що піодермія рідко загрожує життю, вона значною мірою сприяє захворюваності собак через пов'язаний свербіж або біль і потенційно поширені важкі запальні зміни. Оскільки піодермія завжди є вторинною по відношенню до основного захворювання, рецидив вірогідний, якщо таке захворювання не буде виправлено, що вимагає повторної терапії та спричиняє розчарування та постійні витрати [93, 130].

Піодермія є одним із основних проявів, які призводять до призначення антимікробних препаратів у практиці дрібних тварин [93]. Результати опитування громадської думки у Великобританії показало, що 92 % із 683 собак з піодермією, підозрюваною чи підтвердженою, отримували системну антибактеріальну терапію [130]. У зв'язку з продовженням появи резистентних до метициліну стафілококів, головним чином *Staphylococcus aureus* (*MRSA*) і *Staphylococcus pseudintermedius* (*MRSP*), необхідно зменшити антимікробні препарати, які є основним чинником множинної лікарської стійкості; піодермія забезпечує чудові можливості для ефективного антимікробного лікування [130].

Історично піодермію собак лікували в первинній практиці за допомогою емпіричних системних антибіотиків і мінімальної місцевої терапії. Цей підхід більше не є надійним, особливо в місцевостях, де повідомлялося про резистентність стафілококів. Зведення до мінімуму резистентних інфекцій у тварин-компаньйонів є однією з найбільших проблем, з якими стикаються ветеринари, що спонукає професію ознайомитися з нетрадиційними, але

відповідними підходами до лікування піодермії. Фактори, які впливають на терапію, окрім антимікробної резистентності, включають тяжкість і ступінь ураження, фактори пацієнта (такі як шерсть, темперамент та навколишнє середовище), супутнє захворювання та здатність власника проводити місцеву або системну терапію, усі вони можуть впливають на ефективність обраної терапії [83].

Дослідження [109] були проведені з метою визначення поширеності різних дерматологічних уражень у собак. З 987 досліджених випадків собак 205 (20,77%) тварин мали різні дерматологічні ураження. Найпоширенішим дерматологічним захворюванням був демодекоз з подальшою інвазією ектопаразитами, поверхневою піодермією та дерматомікозом, відповідно, у порядку перерахування. Більшість уражень шкіри спостерігалися під час сезону дощів (39,51 %), потім літній сезон (36,58 %) та зимовий сезон (23,90 %). Собаки віком від одного до трьох років найбільш часто страждали (40,62%). Серед собак із ураженням шкіри 50,73 % були самцями, 40,97 % – самками, 5,36 % були кастровані, а 2,92 % стерилізовані [109].

Схожі результати були отримані і в інших дослідженнях. Так, у дослідженні [177] перевірено 566 собак і досліджено, що 118 (20,85 %) собак мали різні захворювання шкіри. У праці Р. Хурана та ін. [117] перевірили 22 193 собак та повідомили, що 4736 (21,34 %) тварин мали різні дерматологічні захворювання.

У працях Сінг та ін. [187] і Сенапаті та ін. [186] повідомляли про поширеність шкірних захворювань на рівні 23,51 % та 36 % відсотків відповідно. До підвищених чинників, які спричиняють дерматологічні проблеми, можна віднести сезонність, кліматичні фактори, а також методи управління, прийняті на конкретній території [151].

1.4. Збудники піодермії собак, ефективність лікування

Поверхнева піодермія – це поверхнева інфекція бактеріями, такими як *S. pseudintermedius*, *S. schleiferi*, *Escherichia coli* та видами родів *Pseudomonas* й *Proteus*. *S. pseudintermedius* – вид, ідентифікований лише за останні десять років, і його часто ідентифікували як інший вид *Staphylococcus* через недостатній розвиток технології класифікації [54]. *S. pseudintermedius* є членом групи *S. intermedius*, до якої також входять *S. intermedius* й *S. delphini*. Види цієї групи мають подібні біохімічні властивості та високу подібність послідовності 16s рДНК [180].

Бактерії можуть викликати вторинну інфекцію внаслідок місцевої травми, подряпин, забруднення внаслідок поганого догляду, себореї, паразитарної інвазії, гормональних факторів, місцевих подразників й алергії у собак [31].

Ступінь тяжкості піодермії варіюється від тимчасового ураження поверхні шкіри до глибокої інфекції, яка може не реагувати на терапію та часто мати рецидиви. Дев'яносто відсотків піодермії собак пов'язані з бактеріями видів стафілококів [109].

Відомо, що *Staphylococcus pseudintermedius* є видом стафілокока, який найчастіше виділяється від собак, хворих на піодермію. Ця коагулазо-позитивна бактерія є опортуністичним патогеном шкіри собак, який мешкає у здорових собак, і його носійство в носі було також продемонстровано у здорових членів сім'ї, які володіють домашніми тваринами [72].

Згідно з результатами дослідження [122], *S. pseudintermedius* мав найвищий показник (72,3 %) у собак з поверхневою піодермією, що вказує на те, що *S. pseudintermedius* відіграє важливу роль у шкірних інфекціях собак.

Дослідження [122] показали, що у собак із поверхневою піодермією було виділено 65 бактерій, серед яких 47 *S. pseudintermedius* (72,3 %), 12 інших стафілококів (18,5 %), 4 інші грампозитивні бактерії (6,2 %) і 2 грамнегативні бактерії (3,1 %). Штами, що містять гени *mecA* та *blaZ*, продемонстрували стійкість до множинних препаратів. Собаки, які отримували антимікробну

терапію протягом останнього місяця, мали значно вищий ризик інфікування *MRSP*. Із 60 зразків власників виділено лише п'ять штамів *S. pseudintermedius* (8,33 %). Аналіз факторів ризику показав відсутність значного зв'язку між *S. pseudintermedius*, виділеним від собак, і власниками, але «утримання трьох або більше собак» і «собаки можуть лизати обличчя власника» мають високі коефіцієнти шансів – 3,503 і 5,712 відповідно. Ізоляти *MRSP* належали до трьох різних типів *dru*, включаючи *dt11y* (29,41 %), *dt11a* (47,06 %) і *dt10cp* (23,53 %) [122].

Дослідження [147] показали, що антимікробно-резистентні стафілококи, особливо метицилін-резистентні *Staphylococcus pseudintermedius*, часто виділяються за поверхневої піодермії собак; резистентні стафілококи в носових пазухах і уражених ділянках поверхневої піодермії домашніх тварин були виділені 107 (13 видів) і 110 (вісім видів) штамів стафілококів. Рівень ізоляції *S. pseudintermedius* з ділянок піодермії (82/110 штамів, 74,5 %) був значно вищим, ніж із ніздрів (57/107 штамів, 53,3 %), у ділянках піодермії (28/82 штамів, 34,1%). Крім того, фенотипи та генотипи резистентності до антимікробних препаратів із ділянок піодермії були подібними до таких, що були виявлені у ділянках піодермії. Поширеність резистентних до антимікробних засобів стафілококів у носових пазухах домашніх собак з поверхневою піодермією є на тому ж рівні, що і в уражених місцях, тому значну увагу слід приділяти антимікробній резистентності коменсальних стафілококів у тварин-компаньйонів [147].

У дослідженні [185] проаналізовано частоту різних основних захворювань у собак із рецидивною піодермією. За 6 років спостереження у лікарняних картах виявлено 157 тварин із рецидивною піодермією та проаналізовано дані щодо первинних захворювань. Також оцінювали час між рецидивами, тип клінічних ознак і вік початку піодермії. Принаймні одне первинне захворювання було виявлено у 107 собак. Алергія була основною причиною у 63 собак, алергія на навколишнє середовище була найпоширенішою (n=45) і часто асоціювалася з іншими алергіями, за якою йшов гіпотиреоз (n=12) і гіперадренкортицизм (n=6). Шістнадцять собак із рецидивною піодермією хворіли на демодекоз. У молодих

собак із рецидивуючою піодермією у більшості випадків алергічне обстеження у поєднанні з глибоким зіскрібком шкіри могло призвести до діагностики основного захворювання. У собак, у яких піодермія почалася в середньому або похилому віці, першими кроками повинні бути гормональні дослідження та виключення можливого зараження блохами [185].

У дослідженні [212] проведена ретроспективна оцінка зразків бактеріальних і грибкових культур шкіри у випадках поверхневої піодермії котів і собак і детальне виявлення патогенів та їх чутливості та/або резистентності до антимікробних засобів, а також демографічних даних і клінічних симптомів пацієнтів. Було розглянуто медичні записи 28 кішок і 35 собак, які відповідають критеріям включення. Види *Staphylococcus spp.* й *Trichophyton* були найпоширенішими культивованими мікроорганізмами як у кішок, так і у собак. Резистентність до антимікробних препаратів визначали як у зразках котів, так і собак. У результаті було продемонстровано, що культура зі шкіри особливо важлива для управління процесами діагностики та лікування [212].

Дослідження ряду авторів показали, що як пряма, так і непряма передача *S. pseudintermedius* може відбуватися між людьми [79] і домашніми тваринами, які проживають в одному домі [203]. Ці результати підкреслюють необхідність адекватного лікування шкірних захворювань якомога раніше, щоб уникнути розвитку в найближчі роки інфекцій у популяції собак, які важче лікувати. Хоча ризик інфекції, пов'язаної з *S. Pseudintermedius*, у здорових людей низький, інфекції патогенних стафілококів, отриманих від домашніх тварин, були задокументовані у людей [170, 193]. При складанні терапевтичного плану слід враховувати можливість передачі стафілококів між тваринами та людьми, а власникам домашніх тварин слід рекомендувати належну гігієнічну практику [128].

У дослідженні [71] було проведено молекулярну характеристику бактеріальних ізолятів собак, уражених КПС, на додаток до фенотипування, антимікробного профілю та оцінки статусу носійства резистентних видів стафілококів. У дослідженні брали участь п'ятдесят собак (24 самиці та 26

самців). Було взято мазки з активних уражень шкіри для бактеріального посіву, фенотипування та профілі протимікробної резистентності були оцінені за допомогою фенотипування *API-Staph* та методу Кірбі-Бауера відповідно. Також проведено молекулярне виявлення та характеристику гена, що кодує *mecA* та пус коагулазопозитивних стафілококів. Частоту гена *mecA* встановлювали за допомогою ПЛР-ампліфікації фрагмента гена 131 bp. Дані оцінювали за допомогою описової статистики. Переважаючими симптомами були еритема, лущення, свербіж і алопеція (72, 56 і 46 % відповідно). З усіх досліджених зразків виділяли бактерії, сумісні з видами *Staphylococcus*. Фенотипування API показало від 83,1 до 97,8 % сумісності з *S. pseudintermedius*. ПЛР-генотипування призвело до 15, 3 та 1 ізолятів, позитивних на *S. pseudintermedius*, *S. aureus* та *S. schleiferi* відповідно. Виділені штами показали високу чутливість до іміпенему, ампіциліну/сульбактаму та рифампіцину (100, 94 та 92 % відповідно). Найвища стійкість була до ванкоміцину та триметоприму/ сульфаметоксазолу (98 і 74 % відповідно). Ізоляти *S. pseudintermedius*, *S. aureus* і *S. schleiferi* були клоновані та мали 96 % спільної гомології послідовності. Також було виявлено 62 % статусу носійства гена *mecA* в ізолятах пацієнтів з КПС, хоча лише 36 % ізолятів були резистентними до метициліну. Ідентифікація трьох видів *Staphylococcus*, що викликають шкіряні захворювання, показала високий рівень резистентності до звичайних протимікробних препаратів і носійство гена *mecA*, підкреслюють важливість проведення молекулярної характеристики бактерій, що викликають дерматологічні захворювання у собак [71].

1.5. Класифікація та причини піодермії у собак

Залежно від ступеня зараження піодермію можна поділити на поверхневу піодермію, неглибоку піодермію та глибоку піодермію.

Діагноз поверхневої бактеріальної піодермії ґрунтується на наявності змінної макроскопії ураження шкіри (папули, пустули, епідермальні комірці, еритема, утворення кірок, і гіперпігментація), позитивні результати

мікроскопічного дослідження цитології шкіри (ацетатна стрічка або мазки-відбитки предметного скла зі спостереженням нейтрофілів з внутрішньоклітинними бактеріями) і, рідше, за результатами гістопатології [109].

Поверхневий бактеріальний фолікуліт є бактеріальною інфекцією, обмеженою поверхневою частиною волосяного фолікула [143]. Бактерії можуть викликати вторинну інфекцію внаслідок місцевої травми, подряпин, забруднення внаслідок поганого догляду, себореї, паразитарної інвазії, гормональних факторів, місцевих подразників або алергії [143]. У собак поверхневий бактеріальний фолікуліт є найпоширенішою формою піодермії, а також основною причиною використання антимікробних препаратів у практиці дрібних тварин [77, 83].

Переважаючим патогеном, який викликає поверхневу піодермію, є *Staphylococcus pseudintermedius* [143] (раніше *S. intermedius*), коменсальна бактерія, яка мешкає на слизових оболонках і шкірі собак [30, 161]. Ці резидентні штами можуть діяти як умовно-патогенні мікроорганізми та спричиняти інфекцію, головним чином залучаючи шкіру. Інфекція є результатом взаємодії між генетичними, екологічними та імунологічними факторами [94, 157]. Різноманітні фактори схильності та первинні причини інфекції сприяють перетворенню *S. pseudintermedius* з коменсального на патоген [30, 161]. Рідше собаки також можуть бути колонізовані та інфіковані іншими видами стафілококів та іншими бактеріями [143].

Поверхневий бактеріальний фолікуліт часто може стати хронічним та/або рецидивуючим станом, якщо основна причина не виявлена та належним чином не усунена або контрольована. Причини персистенції або рецидиву піодермії включають невідповідну терапію (застосовувані препарати, тривалість лікування), відсутність діагностики, резистентність до метициліну. Ці та інші фактори, такі як бактеріоносійство на окремих собаках, пригнічення імунітету та стійке основне захворювання, можуть призвести до виділення метицилін-резистентних стафілококів у пацієнта [94].

Staphylococcus pseudintermedius в основному ідентифікується у собак і рідко зустрічається у інших видів тварин [82, 149, 160]. У той час як *S. pseudintermedius* розглядається як специфічний для собак патоген, який обмежений шкірними інфекціями, є випадки післяопераційних інфекцій у собак та інфекцій у людей [46, 202]. Також було підтверджено наявність нерозрізнених ізолятів у домашніх тварин та їх власників [79]. Ідентифікація бактерії й перевірка їх на стійкість до ліків підкреслюють необхідність для ветеринарів дотримуватися найкращих практик під час лікування поверхневої піодермії у собак.

Лікування поверхневої бактерії піодермії найчастіше передбачає застосування системних і місцевих засобів антимікробної дії [169].

Бактеріальний посів на піодермію собак ніколи не є протипоказанням і, фактично, заохочується у пацієнтів з хронічною або рецидивуючою піодермією через збільшення частоти ізоляції антибіотикорезистентних стафілококів у ветеринарії за останнє десятиліття [94]. У собак, які отримували повторну терапію антибіотиками, також слід ретельно розглянути бактеріальний посів. Якщо пацієнту показаний бактеріальний посів, зазвичай, бажано в 48-72-годинний період вимивання після антибіотикотерапії. Однак прийнятно збирати зразки для бактеріального посіву та дослідження чутливості з піодермічних уражень у будь-який час, незалежно від поточного використання місцевих або системних антибіотиків [83].

У даний час ветеринари поступово використовують більше місцевих методів лікування піодермії, ніж у минулому, однак місцева терапія поверхневого бактеріального фолікуліту все ще недостатньо використовується через ряд факторів. Деякі власники домашніх тварин не можуть проводити місцеву терапію через витрати зусиль і часу, а також через практичні фактори, такі як стрес пацієнта, темперамент пацієнта та наявність ванн. Ці власники домашніх тварин часто висловлюють занепокоєння, коли обговорюються варіанти лікування. Однак для власників домашніх тварин, які віддані місцевій терапії, є значні потенційні переваги раннього та частого використання

місцевого підходу. Ці переваги включають більш швидке загоєння уражень, скорочення тривалості введення антимікробних препаратів, мінімальні побічні ефекти та значно знижений ризик ненавмисної появи резистентних штамів в інших системах органів [83]. Терапія шампунем також забезпечує небіоцидні переваги, такі як механічне видалення кірочок, сміття та бактерій зі шкіри [38, 143]. Широко поширена місцева терапія може здійснюватися шляхом обприскування розчинами, що містять хлоргексидин, та/або миттям пацієнта шампунями, що містять антисептики, такі як хлоргексидин, бензоїлпероксид і етиллактат [38, 143].

Системна антибіотикотерапія необхідна для лікування поверхневої піодермії, глибокої піодермії та рецидивуючої піодермії. Таку антимікробну терапію слід обирати на основі цитологічного дослідження імпресій із результатами посіву на визначення чутливості та поєднувати з місцевою терапією, де це можливо. Терапія більшості поверхневих піодермій повинна тривати щонайменше 3-4 тижні, незалежно від обраного режиму введення протимікробних засобів [94].

Найефективнішим заходом для запобігання рецидиву поверхневого бактеріального фолікуліту та відбору резистентних штамів бактерій є швидке виявлення та контроль основного захворювання. Такий результат не завжди може бути однозначним у клінічній практиці, оскільки дерматологічне захворювання часто може бути багаторівневим [94]. Тим не менш, збільшення випадків резистентності до лікарських засобів у ветеринарії зробило наголос на цитологічному та культуральному лікуванні поверхневої піодермії та на ранній діагностиці супутнього основного захворювання. Місцевий підхід до лікування раннього поверхневого бактеріального фолікуліту є кращим, беручи до уваги стандарти клієнта та пацієнта. Оскільки *MRSP* і *MSSP* чутливі до хлоргексидину, продукти, що містять хлоргексидин, рекомендуються як єдина терапія або частина комбінованої терапії для поверхневого бактеріального фолікуліту у собак [38].

1.6. Антибіотикорезистентні збудники за піодермії у собак

У минулому ізоляти *S. pseudintermedius*, як правило, були чутливі до β -лактамних антибіотиків, однак за останні десять років метицилінрезистентні штами MRSP стали серйозною проблемою для здоров'я домашніх тварин. З роками про MRSP повідомлялося все частіше [105, 204]. Крім того, штами MRSP часто демонструють профілі резистентності до кількох лікарських засобів у всьому світі, включаючи стійкість до кількох класів антимікробних препаратів [163].

Було виявлено, що ізоляти *S. pseudintermedius* від людей пов'язані з частими контактами між їхніми власними собаками, тому останнім часом цей вид розглядається як важливий зоонозний патоген [171, 205, 192]. На додаток до прямої передачі *S. pseudintermedius* власникам собак, стійкі до ліків фрагменти генів, що переносяться штамом, також мають можливість обмінюватися з іншими стафілококами в організмі людини [205, 192]. Ризик горизонтального перенесення генів від штаму собаки до власника може спровокувати у майбутньому більше бактерій, стійких до багатьох лікарських засобів, що зрештою ускладнить людям лікування бактеріальних інфекцій. Рівень *S. pseudintermedius*, виділених із носової порожнини звичайних людей, набагато вищий у тих людей, які є власниками собак [122].

Важливість даних досліджень підкреслює також те, що гени, стійкі до ліків, можуть передаватися від інфікованих собак іншим стафілококам у людей [122].

Повторне лікування антибіотиками може збільшити ризик вибору бактерій, стійких до множинних лікарських засобів, що є однією з найбільш актуальних загроз для здоров'я населення. Тісний контакт між тваринами та їх власниками забезпечує можливість передачі бактерій, у тому числі штамів MRSP [60].

У стафілококів резистентність до бета-лактамних антибіотиків, таких як метицилін, виникає внаслідок придбання мобільного сегмента гена, який називається *staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec)* [107]. У SCCmec

ген *mecA* дозволяє бактеріям виробляти «пеніцилінзв'язуючий білок 2а» (*PBP2a*), який відрізняється від звичайного пеніцилінзв'язуючого білка, що робить бактерії стійкими до метициліну. Зростання частоти мультирезистентності *MRSP* ускладнює підбір антимікробної терапії у ветеринарії [122].

Згідно з результатами досліджень [122], з уражень шкіри собак було виділено 47 штамів *S. pseudintermedius*, серед яких 16 штамів несли ген *mecA*. Частка *mecA*-позитивних *S. pseudintermedius*, стійких до 10 антибіотиків, протестованих у цьому дослідженні, була значно вищою, ніж частка *mecA*-негативних штамів. Усі 16 *mecA*-позитивних штамів були штамми з мультирезистентністю, що вказує на те, що присутність *mecA* значно корелювала з мультирезистентними характеристиками *S. pseudintermedius*. *S. pseudintermedius* з геном *mecA*, це можна ідентифікувати як *MRSP* через його стійкість до β -лактамних антибіотиків, таких як метицилін. Хоча повідомлялося, що різні види *SCCmec* мають різний ступінь стійкості до кількох лікарських засобів, більшість досліджень погоджуються, що *MRSP* пов'язаний зі штамми з резистентністю до багатьох лікарських засобів, що узгоджується з результатами дослідження [136, 164].

За результатами аналізу гена *blaZ* більшість штамів *S. pseudintermedius* були *blaZ*-позитивними та стійкими до гентаміцину, кліндаміцину, ампіциліну, доксицикліну, пеніциліну G та енрофлораксацину. Всі *blaZ*-негативні штами були чутливі до антибіотиків, перевірених у цьому дослідженні. Можлива причина цього явища полягає в тому, що *blaZ*-негативний *S. pseudintermedius* більш чутливий до зазвичай використовуваних пеніцилінових антибіотиків першого ряду, ніж *blaZ*-позитивні штами, тому він має менше шансів зустрітися з іншими антибіотиками, а також шанс розвитку резистентності до багатьох антибіотиків зменшений [122].

Декілька досліджень показали, що *MRSP* також можна виділити від інших здорових собак і котів, які живуть з *MRSP*-інфікованими собаками та котами [119, 211]. Таким чином, якщо кількість вирощених собак є більшою, джерела

передачі *S. pseudintermedius* можуть збільшитися для власників, і можна очікувати більшу ймовірність ізоляції штаму від власників [122].

У *MRSP*, виділеному в Канаді, переважали чотири типи *dt11a*, *dt10h*, *dt9a* та *dt11af* [174]. Комплексне дослідження ізолятів *MRSP* у Канаді та Сполучених Штатах показало, що *dt11a* та *dt9a* переважають [210]. Інший звіт також виявив, що *dt11a* та *dt9a* були домінуючими в *MRSP*, зібраних у Європі та Північній Америці [100]. В Азії *MRSP*, виділені в Кореї, є *dt11a* і *dt11y*, тоді як у Таїланді це *dt11a* і *dt11cj* відповідно [101, 104]. Відповідно до наведених даних, *dt11a* широко поширений і є переважаючим типом у північній півкулі. Хоча *dt11y* спорадично виявлявся в Європі та Сполучених Штатах, він був виявлений у Південній Кореї та Таїланді в Азії зі значно вищими показниками – 28,5 % та 10,26 %. Вважається, що він є більш поширеним типом в Азії [101, 104].

Тому все більше сучасних досліджень сходяться на думці, що необхідно досліджувати альтернативні неантибіотичні речовини, щоб проводити нові методи лікування захворювань. Так, у дослідженні [152] отримані результати *in vitro* продемонстрували чітку ефективність деяких ефірних олій проти *MRSP* та *MSSP* собак. Зокрема, деякі випробувані ефірні олії продемонстрували відповідну антибактеріальну активність проти всіх досліджуваних штамів. Точніше, олія *Cinnamomum zeylanicum* забезпечувала найкращі результати проти *MRSP* і *MSSP*, демонструючи майже завжди відповідність у значеннях МБК і МІК [152]. Результати цього дослідження підтверджують антибактеріальну активність ефірної олії *Cinnamomum zeylanicum* щодо бактеріальних ізолятів орофациальних інфекцій людини [25] і проти харчових патогенів *Staphylococcus aureus* і *Escherichia coli* [176]. Крім того, дослідження *in vivo* також показали активність ефірної олії *Cinnamomum zeylanicum* проти планктонних і біоплівкових форм грампозитивних і грамнегативних бактерій [80].

Також ефірна олія *Melissa officinalis* продемонструвала подібну антибактеріальну активність проти *MRSP* і *MSSP* та більш ефективну бактерицидну дію проти ізолятів *MSSP*. Властивості ефірної олії меліси

лікарської вже відомі ветеринарній медицині. Дійсно, Ehsani та ін. [61] повідомили про можливе відповідне застосування ефірної олії *Melissa officinalis* в харчовій промисловості завдяки її антиоксидантним і антибактеріальним властивостям проти чотирьох важливих харчових бактерій (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* і *Staphylococcus aureus*). Крім того, була також описана сильна антимікробна активність ефірної олії *Melissa officinalis* проти бактеріальної мікрофлори, виділеної з риби [113]. Однак, у цьому дослідженні також отримали хороші результати для ефірної олії з *Leptospermum scoparium*, *Satureja montana* та *Cymbopogon citratus* проти всіх вибраних штамів *S. pseudintermedius* [152].

1.7. Висновки з огляду літератури

Узагальнюючи оглянуті літературні джерела щодо проблеми інфікування шкіри собак за піодермії та способів лікування, які передбачають зменшення застосування антибіотиків за даного захворювання, можна відзначити наступне. Декілька десятиліть тому лікування піодермії антибіотиками, в основному, не викликало проблеми з ускладненими формами через рецидиви, оскільки основні збудники піодермії були чутливими до рекомендованих антибактеріальних препаратів із групи антибіотиків. Водночас, упродовж останнього десятиліття бактеріальні збудники за піодермії сформували стійкість до антибіотиків, а резистентні стафілококи можуть контамінувати середовище серед собак, які розповсюджують *MRS*, *MRSA* чи *MRSP* як серед тварин, так і серед своїх власників. У такому випадку проблема розповсюдження антибіотикостійких штамів стає глобальною і зачіпає систему охорони здоров'я в цілому. Враховуючи таку тенденцію, на нашу думку, актуальним є розроблення способів лікування піодермії собак за допомогою природних біологічних агентів, таких як бактеріофаги або синтезовані ними речовин – ендолізини. Літературні джерела повідомляють, що фаги можна успішно використовувати з лікувальною метою як у гуманній, так і ветеринарній медицині, особливо на тлі розвитку

антибіотикорезистентності у мікробіоти. Тому в останні роки науковці, особливо за кордоном, розвивають напрям фаготерапії у медицині й ветеринарії. Розроблено ряд бактеріофагових препаратів «коктейльного типу» для боротьби з різними патогенами – збудниками запальних процесів. Наводяться наукові результати про перспективність застосування продуктів метаболізму фагів для подолання інфекцій, до того ж перевагою фаготерапії є те, що фаги вважаються цілком безпечними для організму й не спричиняють побічних токсикологічних реакцій. У підсумку, ми можемо погодитися з даними багатьох науковців, що стратегію боротьби зі збудниками умовно-патогенних бактерій у домашніх тварин можна розробляти з використанням фагових препаратів. Тому розробка препарату для лікування піодермії собак за допомогою виділених фагів специфічних до бактерій, які спричиняють дане захворювання є перспективним й актуальним.

РОЗДІЛ 2

ВИБІР НАПРЯМІВ ДОСЛІДЖЕНЬ.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Експериментальна частина дисертаційного дослідження виконувалася на кафедрі ветеринарного акушерства, внутрішньої патології та хірургії Закладу вищої освіти «Подільський державний університет» протягом 2022 – 2024 років. Виробничі дослідження з вивчення складу мікробіоти шкіри собак та апробації новоствореного бактеріофагового препарату проводили у клініках ветеринарної медицини «VitaeVet» (м. Кам'янець-Подільський), «VetClinic», «Доктор Айболит», «Doctor Vet» (м. Чернівці).

Основна ідея наукової роботи полягала в експериментальному визначенні складу мікробіоти шкіри здорових й хворих на піодермію собак, аналізі антибіотикограм даної мікрофлори, виділенні літичних фагів до основних збудників піодермії та розробці бактеріофагового препарату для безпечної санації уражених ділянок шкіри. Експериментальне дослідження виконувалося у п'ять етапів (рис. 2.1).

Перший етап передбачав проведення досліджень з ідентифікації мікробіоти, виділеної зі здорової шкіри собак та з уражених ділянок за піодермії та визначення чутливості ізольованих бактерій зі шкіри клінічно здорових собак і за піодермії до антибіотиків, які використовуються у ветеринарних клініках.

Змиви зі шкіри здорових (n=35) і хворих на піодермію собак (n=21) відбирали за допомогою одноразового стерильного тампону. Відібрані змиви відправляли у мікробіологічну лабораторію для виділення та ідентифікації мікробіоти. Змиви засівали на середовища: кров'яний агар із 5 % натрію хлориду для виділення стафілококів, на середовище Гарро для виділення стрептококів, на Ендо – для коліформних бактерій, на ентерококагар – для ентерококів, ацетамідний агар – для псевдомонад, на Сабуро – для грибів [14].

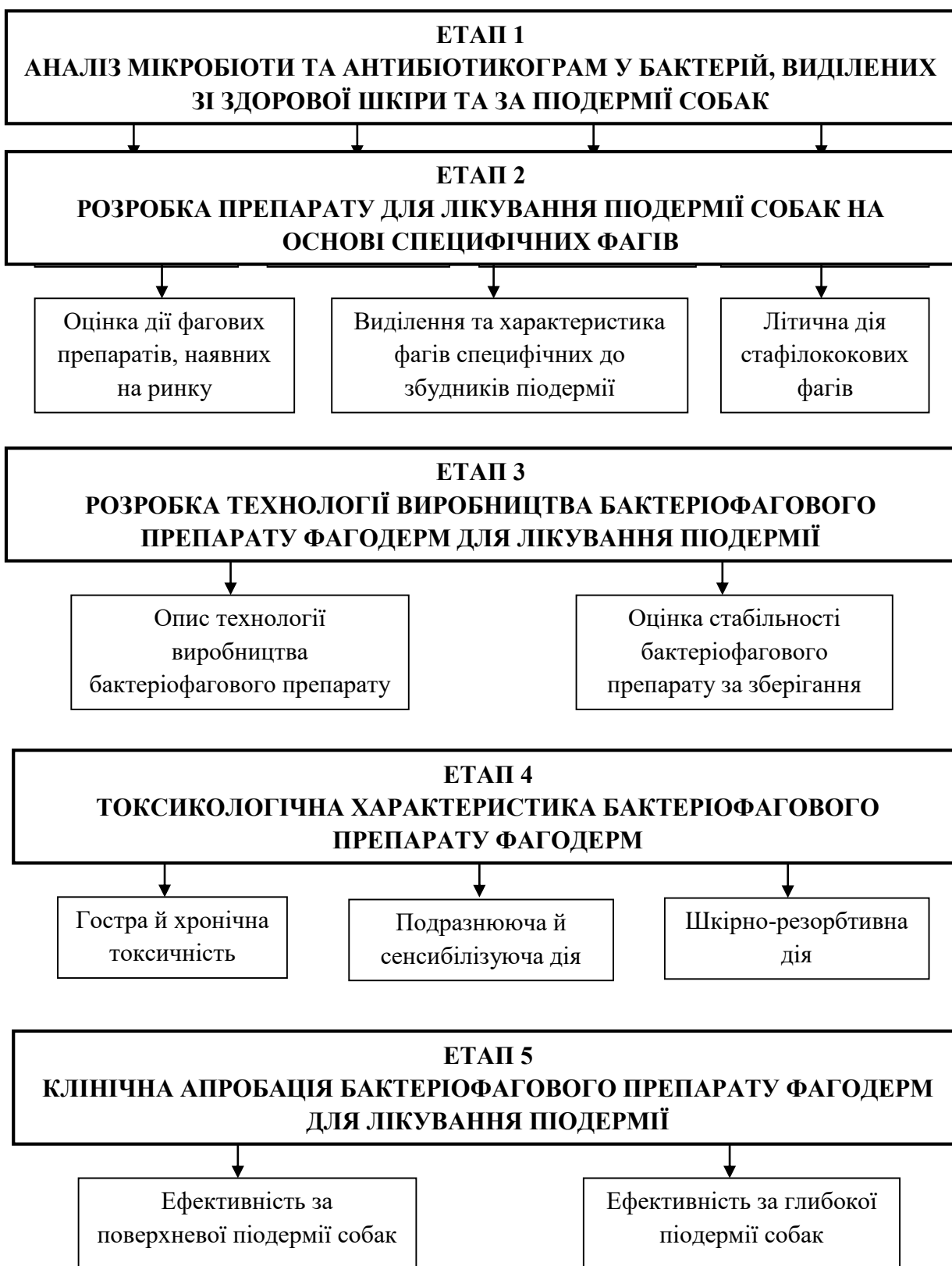


Рис. 2.1. Схема проведення експериментальної частини

Ідентифікацію виділених культур мікроорганізмів здійснювали за загальноприйнятими в мікробіологічній практиці методами (культуральними, тинкторіальними, морфологічними та біохімічними тестами) [23], згідно визначника бактерій Берджі (Vos et al., 2011) [206], до того ж використовували закордонні тест-системи: "STAPHY-test 16", "En-coccus-test 36", "НЕФЕРМ тест-24". Визначення чутливості виділених бактерій до антимікробних препаратів проводили методом дифузії в агар з використання комерційних дисків відповідно до стандарту CLSI [47]. Використовували диски з наступними антибіотиками: амоксицилін з клавулановою кислотою (20+10 мкг), цефквіном (25 мг), цефтриаксон (30 мкг), цефалексин (30 мкг), марбофлоксацин (5 мкг), тілозин (50 мкг), тетрациклін (30 мкг).

Другий етап передбачав розробку бактеріофагового препарату для лікування піодермії собак на основі виділення й ідентифікації літичних фагів до найпоширеніших збудників. Спочатку було досліджено спектр літичної дії двох медичних бактеріофагових препаратів «Піофаг» й «Інтестіфаг» канадсько-української компанії ТОВ Неопробіокеар – Україна, які містять у своєму складі специфічні фаги до золотистого стафілококу та один ветеринарний бактеріофаг «Фагомаст» для лікування стафілококового маститу корів.

Визначення спектру літичної дії даних бактеріофагових препаратів проводили щодо клінічних штамів, ізольованих зі шкіри собак крапельним методом «стікаючої краплі» [86]. Для цього використовували чашки з універсальним поживним середовищем – МПА, на поверхню якого наносили декілька крапель добової бульйонної культури стафілококу з оптичною щільністю 0,5 одиниць за МакФар-Ланд ($1,0 \times 10^8$ КУО/мл.), розтирали по середовищі та підсушували за 37 °С протягом 20 хв, а потім наносили краплю бактеріофагового препарату, піднімали чашку для того, щоб крапля стікала, та ставили на інкубацію протягом 24 год. У контролі на засіяне середовище наносили стерильну краплю дистильованої води. Оцінювання міри лізису фагу здійснювали за шкалою чотирьох хрестів: «++++» – повний лізис, у ділянці стікання краплі фагу відсутній ріст колоній; «+++» – напівзливний лізис, у

ділянці стікання краплі фагу виявляємо декілька колоній стафілококів; «++» – плямистий лізис, у ділянці стікання краплі фагу виявляють більше 50 БУО; «+» – у ділянці стікання краплі фагу виявляють в межах 20–50 БУО; «+ /-» – у ділянці стікання краплі фагу виявляють менше 20 БУО. За наявності міри лізису від «+++» до «++++» результат вважали позитивним [87].

Під час виділення специфічних літичних фагів до культур стафілококів було досліджено змиви зі шкіри здорових собак ($n=23$) та змиви зі шкіри хворих собак на піодермію ($n=21$) за методикою Oliveira et al. [11]. Для цього змиви засівали в м'ясопептонний бульйон, в який додавали 0,5 мл добової культури відповідного виду стафілококу та інкубували 20 год за температури 37 °С. Після цього бульйонну культуру фільтрували від грубої фракції, розливали у пробірки та центрифугували за 300 об./хв 30 хв, потім надосад звільняли від сторонньої мікрофлори методом подвійної фільтрації через бактеріальні фільтри з порами 0,45 та 0,22 мкм (Sartorius, Німеччина). Отриманий таким способом фаголізат досліджували на наявність літичних бактеріофагів за методом Грація [11]. Зокрема, розливали у стандартні чашки Петрі 25 мл МПА, який після застигання підсушували в термостаті, потім в пробірці готували напіврідкий МПА (0,7% агар-агару), у який вносили 1 мл раніше отриманого фаголізату й 0,2 мл 24-годинної бульйонної культури певного виду стафілококу, все перемішували та виливали вміст пробірки в чашку Петрі з МПА, розподіляючи по всій чашці. Ставили в термостат та інкубували за 37 °С – 24 год, через кожні 6 год проводили морфологічну оцінку утворених негативних колоній (форма, прозорість, характер країв).

З метою встановлення періоду латентного часу у виділених фагів використовували спосіб одиночного циклу розмноження фага [190].

Для оцінки стійкості виділених фагів до температури готували суспензію фагів з приблизним вмістом у 1 мл бульйону 10^7 – 10^8 БУО, розливали у пробірки та ставили у водяну баню за різних температур: $+ 30 \pm 1$ °С; $+ 45 \pm 1$ °С; та $+ 55 \pm 1$ °С через проміжок часу (20 хв, 40 хв та 50 хв) відсівали на середовище для підрахунку кількості життєздатних фагів за методом Грація [11].

Для визначення літичної дії виділених фагів за різних рН середовищ, ми відбирали фаги, вносили у бульйон з маточною культурою стафілококу з відповідним рН та вирощували протягом 24 год. Після закінчення інкубації в дослідних пробірках визначали кількість життєздатних фагів за методом Грація.

Під час визначення літичної дії стафілококових фагів в залежності від кількості їх та цільових клітин у середовищі, відбирали 24 годинну бульйону культуру чотирьох видів стафілококів, кожний вид в окремій пробірці та вносили у ці пробірки по 1 мл специфічного для даної культури виділеного фагу з різним титром. Інкубували до 12 год та визначали кількість клітин стафілококів у бульйоні, порівнюючи з бульйоном зі стафілококами але без фагів. Використовували фаги з трьома титрами: 10^6 БУО/мл, 10^7 БУО/мл, 10^8 БУО/мл. Тобто проведено три серії дослідів.

Третій етап передбачав розробку бактеріофагового препарату специфічного до основних збудників піодермії. Показники стабільності бактеріофагового препарату «Фагодерм» за зберігання визначали за температури $+ 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 10 діб зберігання та за $+ 5\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ – 6 місяців зберігання. Для цього через певні проміжки часу зберігання визначали кількість життєздатних фагів методом Грація. Також визначали прозорість, рН препарату, порівнюючи з контрольним свіжоприготовленим препаратом та стерильність методом висівання на МПА, сольовий гемоагар, середовище Сабуро, Ендо.

Четвертий етап передбачав проведення токсикологічного дослідження розробленого фагового препарату «Фагодерм». Гостру й хронічну токсичність, подразнюючу, сенсibiliзуючу та шкірно-резорбтивну дію бактеріофагового препарату «Фагодерм» визначали стандартними методами, які описані у монографії (І. Я. Коцюмбас та ін. 2006) [7, 13].

П'ятий етап передбачав проведення клінічної апробації бактеріофагового препарату «Фагодерм» у ветеринарних клініках під час лікування хворих на поверхневу й глибоку піодермію собак. Діагноз ставили на основі анамнезу, клінічних ознак та бакпосівів. Було проліковано 10 собак із поверхневою піодермією та 5 з глибокою (дослідні групи), яким у комплексній терапії уражені

ділянки шкіри зрошували фагодермом з титром 10^7 та 10^8 БУО/мл. Контролем служили показники ефективності терапії при лікування тварин з використанням антибіотиків. Під час лікування у змивах зі шкіри визначали кратність зменшення стафілококів на середовищі сольовий гемоагар та проводили дослідження на початку та в кінці лікування морфологічних показників крові на автоматичному аналізаторі Element ht5 та біохімічних показників на аналізаторі FUJI DRI-CHEM NX600.



а) Аналізатор Element ht5



б) Аналізатор FUJI DRI-CHEM NX600

Рис. 2.2. Автоматичні аналізатори визначення морфологічних і біохімічних показників крові, які були використані у дослідженнях

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

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Характеристика мікробіоти шкіри здорових та хворих на піодермію собак

Для розроблення ефективних лікувальних заходів за піодермії собак необхідно ґрунтовно вивчити збудники та їх патогенні властивості. Тому було проведено дослідження в два етапи, на першому визначали видовий склад мікробіоти різних ділянок шкіри клінічно здорових собак, а на другому – за встановлення діагнозу піодермія. Проведені за такою схемою експерименти мають на меті з’ясувати роль найбільш вагомих збудників у патогенезі піодермії. Результати досліджень частоти виявлення мікрофлори з поверхні шкіри здорових собак наведено на рис. 3.1.

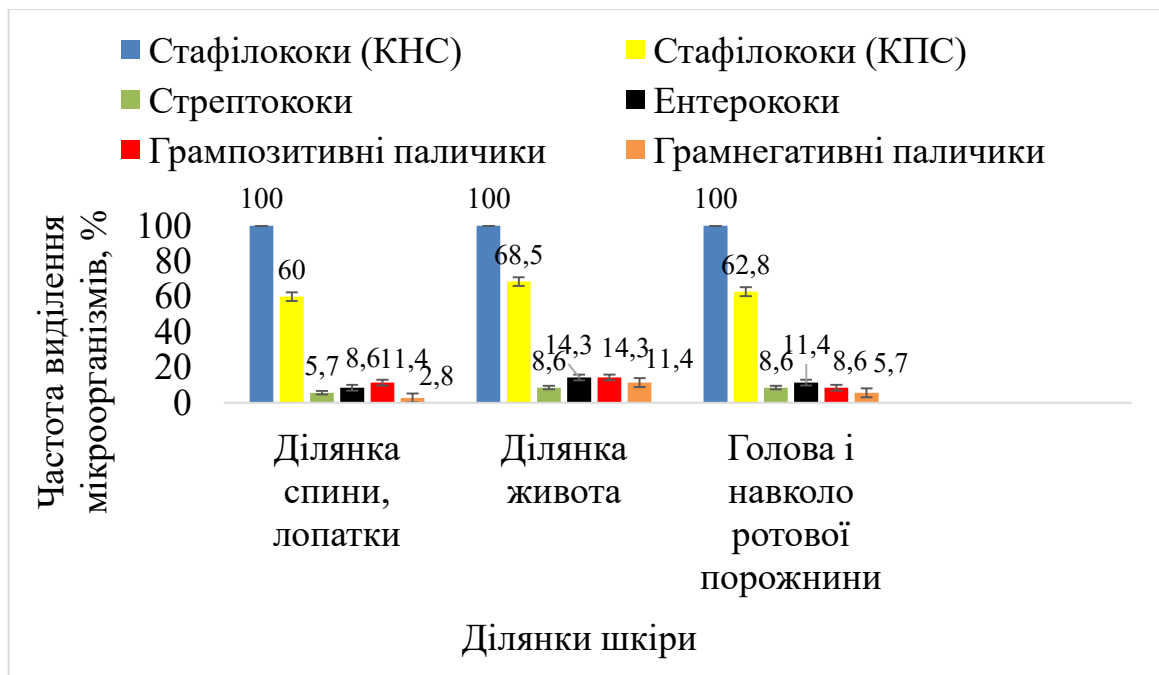


Рис. 3.1. Частота виділення мікроорганізмів зі шкіри різних ділянок клінічно здорових собак, n=35

З рис. 3.1 спостерігаємо, що мікробний пейзаж різних біотопів шкіри здорових собак суттєво не відрізнявся між собою та в основному представлений грампозитивною коковою мікрофлорою. Зокрема, до автохтонної мікрофлори

належать коагулазонегативні стафілококи (КНС), які в 100 % виділяються зі шкіри різних біотопів та коагулазопозитивні стафілококи (КПС), які виділялися зі здорової шкіри від 60,0 до 68,5 % випадків. На другому місці за частотою виявлення були ентерококи та грампозитивні палички. Дані мікроорганізми виділялися зі здорової шкіри від 8,6 % до 14,3 % випадків. Стрептококи також виділялися з різних ділянок шкіри не більше, як у 8,6 % випадків. Грамнегативні бактерії на здоровій шкірі собак є транзиторними, оскільки з біотопу спини і лопатки вони виділялися тільки в одній пробі – 2,8 %, водночас, за частотою виявлення найбільше їх виявляли в ділянці нижньої частини живота – 11,4 %, що ймовірно, пов'язано із фекальним забрудненням.

Отже, КНС та КПС вважаються представниками автохтонної мікробіоти шкіри клінічно здорових собак, які виділяються з різних ділянок, що необхідно враховувати при оцінці виділених збудників за піодермії.

Під час видової ідентифікації найпоширенішого роду – *Staphylococcus* мікробіоти здорової шкіри собак виявлено (рис. 3.2). Більшу частину (57,3 %) серед ідентифікованих стафілококів становить коагулазопозитивний вид *S. pseudintermedius*. На другому місці серед стафілококової мікробіоти становить коагулазонегативний вид *S. epidermidis*, на частку якого припадає 20,2 %. На частку коагулазо-варіабельного виду *S. schleiferi subsp. coagulans* та коагулазонегативного виду *S. saprophyticus* припадає по 7 – 8 % стафілококової мікробіоти. На загальновідомий вид *S. aureus* припадає незначна частина стафілококової мікробіоти шкіри собак – 2,2 %. Інші неідентифіковані коагулазонегативні стафілококи – *Staphylococcus spp.* у структурі видового складу становили 5,6 %.

Отже, у мікробіоценозі шкіри клінічно здорових собак коагулазопозитивний вид *S. pseudintermedius* та коагулазо-варіабельний вид *S. schleiferi subsp. coagulans* займають основну нішу – до 65 %, що необхідно враховувати при визначенні збудників за різних хвороб шкіри.

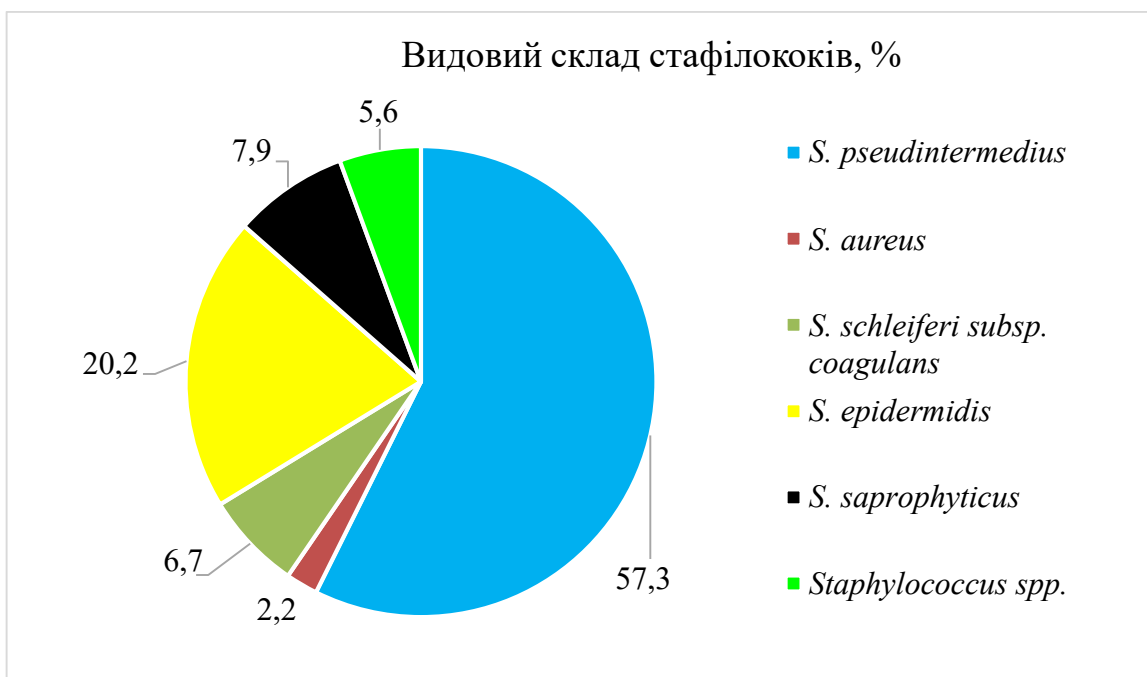


Рис. 3.2. Видовий склад стафілококів шкіри клінічно здорових собак, n=89

Наступна частина досліджень була спрямована на ідентифікацію мікробіоти, виділеної з ураженої за піодермії шкіри собак. Результати визначення частоти виділення мікробних асоціацій наведено на рис. 3.3.



Рис. 3.3. Частота виділення мікроорганізмів зі шкіри собак за піодермії, n=21

Встановлено (рис. 3.3), що у більшості випадків – 66,7 % мікрофлора, виділена із вогнищ запалення за піодермії (пустол, міхурців), була представлена різними мікробними асоціаціями, а в 33,3 % виділялася в монокультурі.

Дослідження з ідентифікації збудників, які виділені в монокультурі, наведено на рис. 3.4.



Рис. 3.4. Ідентифікація стафілококів, які виділені у собак у монокультурі за піодермії, n=7

Виявлено (рис. 3.4), що за піодермії в собак у монокультурі виділялися та ідентифікувалися бактерії роду *Staphylococcus*, зокрема види *S. pseudintermedius* і *S. aureus*. Водночас, серед даних двох видів *S. pseudintermedius* належить основна роль як патогенна, оскільки вони виділялися у 85,8 % випадків, а вид *S. aureus* був збудником тільки в однієї тварини.

Під час досліджень мікробних асоціацій за піодермії встановлено наступне (рис. 3.5), що основні бактеріальні представники, які постійно були присутні у мікробній асоціації за піодермії в собак – це види коагулазопозитивних стафілококів у поєднанні з іншими родами грамнегативної мікрофлори.

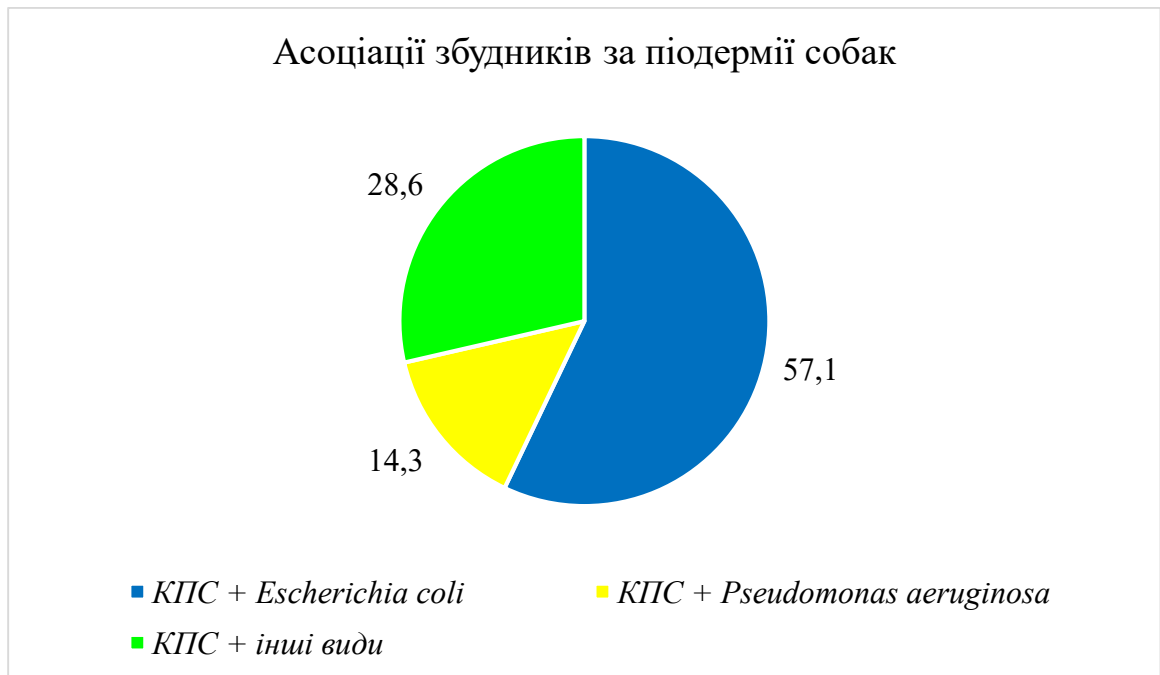


Рис. 3.5. Ідентифікація бактерій, які виділені за піодермії собак в асоціації, n=14

Так, у більшості – 57,1 % випадків асоціація за піодермії була представлена КПС та кишковою паличкою, у 4,0 рази рідше виявляли мікробну асоціацію з КПС та синьогнійною паличкою – 14,3 % випадків. У мікробний склад інших асоціацій в 28,6 % випадків входили КПС, протей у поєднанні з кишковою або синьогнійною паличками.

Отже, отримані дані відзначають постійну присутність КПС у вогнищі запалення шкіри за піодермії собак, що безпосередньо вказує на їх роль в патогенезі даної хвороби. До того ж, поряд із КПС, у багатьох випадках виявляють бактерії видів *Escherichia coli* та *Pseudomonas aeruginosa*, тобто дво- та трьохкомпонентні асоціації. Загалом можна відзначити, що основні мікробні асоціації, які приймають участь у розвитку піодермії відносяться до умовно-патогенних мікроорганізмів. Тому даний факт необхідно враховувати при розробці лікувальних та профілактичних заходів щодо даної хвороби.

Видова ідентифікація стафілококової мікробіоти, як найбільш часто виявленої за різних мікробних асоціацій під час піодермії собак наведена на рис. 3.6.

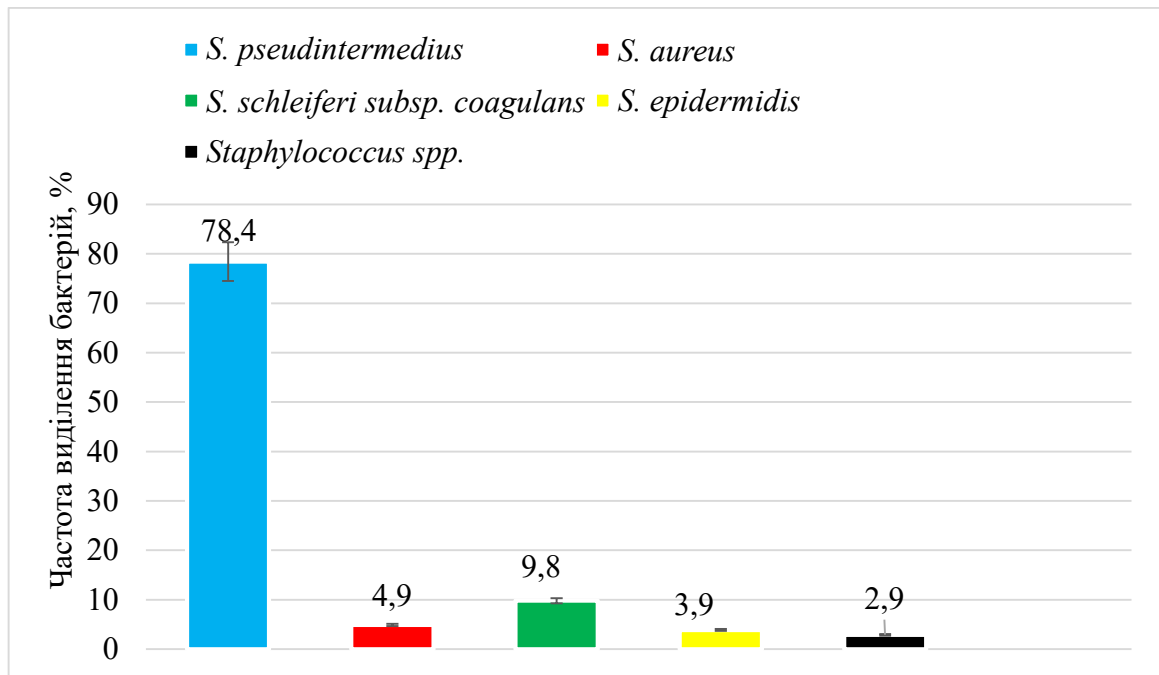


Рис. 3.6. Видовий склад стафілококів, виділених з вогнищ запалення за піодермії собак, n=102

З рис 3.6 бачимо, що на частку коагулазопозитивних стафілококів *S. pseudintermedius*, *S. aureus* та коагулазо-варіабельного підвиду *S. schleiferi subsp. coagulans* припадає основна частина стафілококової мікробіоти (93,1 %), яка ідентифікована із запальних вогнищ шкіри за піодермії. Тобто, за піодермії переважають коагулазопозитивні види, які проявляють сильніші патогенні властивості, ніж КНС. Водночас, серед КПС вид *S. pseudintermedius* значно переважає над іншими видами даної групи, зокрема, на його частку припадало 78,4 % від виділених стафілококів, що в 16,0 раза ($p \leq 0,001$) більше, ніж на вид *S. aureus* та в 8,0 раза ($p \leq 0,001$) більше, ніж на *S. schleiferi subsp. coagulans*. Тобто, серед стафілококової мікробіоти *S. pseudintermedius* займає суттєво домінуючу позицію як збудник, що сприяє розвитку запального процесу на шкірі та ускладнює лікування піодермії.

На частку КНС, *S. epidermidis* та інших неідентифікованих видів (*Staphylococcus spp.*), які зазвичай вважаються непатогенними, припадала незначна кількість – 3,9 та 2,9 % відповідно.

Отже, з аналізу ідентифікації стафілококової мікробіоти ураженої шкіри собак за піодермії можна підсумувати, що в етіології та патогенезі даного

захворювання значну роль відіграють КПС, зокрема вид *S. pseudintermedius*, який виділяється як у монокультурі, так і в асоціації з іншими умовно-патогенними бактеріями.

Результати дослідження опубліковано в статті:

Stroich, V. V., & Horiuk, Y. V. (2023). Identification of the skin microbiota of healthy dogs and those with pyoderma. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies*, 25(110), 46–53. <https://doi.org/10.32718/nvlvet11008> [195].

3.2. Аналіз чутливості до антибіотиків мікробіоти шкіри здорових собак та за піодермії

У попередньому нашому дослідженні [195] виявлено, що мікробіота шкіри клінічно-здорових собак була представлена наступними видами автохтонних бактерій, зокрема коагулазопозитивний вид *S. pseudintermedius* та коагулазоваріабельний вид *S. schleiferi subsp. coagulans* займають основну нішу – до 65 %, на частку коагулазонегативних стафілококів припадає до 30 % від усіх ідентифікованих стафілококів. Враховуючи такий мікробіоценоз, було визначено чутливість до антимікробних препаратів у видів *S. pseudintermedius* (n=17), *S. epidermidis* (n=19), *S. saprophyticus* (n=22), тобто у дослід взято коагулазопозитивні та коагулазонегативні види стафілококів біотопу шкіри здорових собак (рис. 3.7). При цьому у дослідженні використано диски з антимікробними препаратами, які зазвичай використовують у даних ветеринарних клініках. Встановлено, що стафілококи мікробіоти шкіри клінічно здорових собак у загальному були чутливими до антибактеріальних препаратів, використаних у даному дослідженні. Так, до амоксициліну з клавулановою кислотою були чутливими 82,3 % (n=14) культур *S. pseudintermedius*, 89,5 % – 95,4 % культур коагулазонегативних видів *S. epidermidis* та *S. saprophyticus*, відповідно.

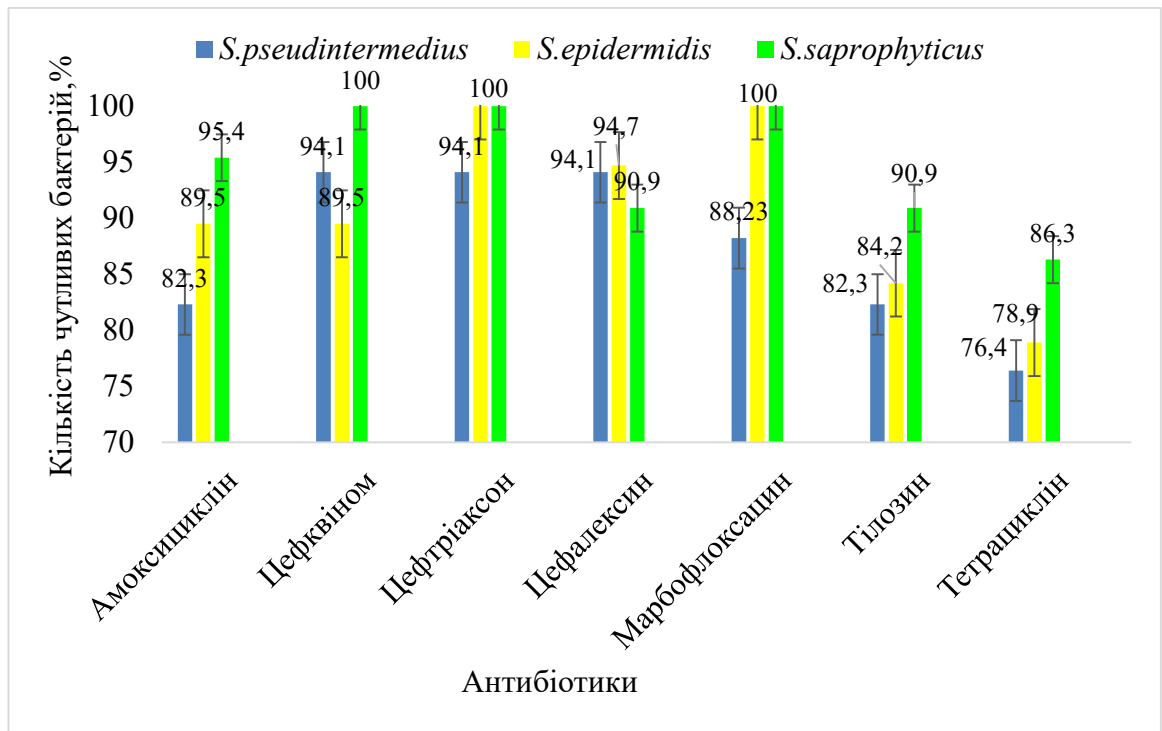


Рис. 3.7. Чутливість виділених стафілококів зі шкіри клінічно здорових собак

До антибіотиків бета-лактамів цефалоспоринового ряду I (цефалексин), III (цефтріаксон) й IV (цефквіном) поколінь були чутливими 94,1 % (n=16) культур *S. pseudintermedius* та в межах 90 – 100 % штамів *S. epidermidis* й практично всі бактерії *S. saprophyticus*. Фторхінолоновий антибіотик третього покоління марбофлоксацин, який використовується тільки у ветеринарній медицині, також добре проявляв антибактеріальну дію, оскільки 88,2 % (n=15) штамів *S. pseudintermedius* були чутливими, а серед коагулазонегативних видів стійких не виявлялося.

Чутливість стафілококів до макролідного антибіотику тілозину була дещо нижча, ніж до беталактамних цефалоспоринових та фторхінолонового, зокрема, кількість чутливих культур *S. pseudintermedius* і *S. epidermidis* становила 82,3 – 84,2 % відповідно. Клітини виду *S. saprophyticus* були чутливими до даного антибіотику у 90,9 % (n=20).

Найнижчу чутливість виділених стафілококів спостерігали до тетрацикліну, яка була на рівні 76,4 – 78,9 % у видів *S. pseudintermedius* і *S. epidermidis* та 86,3 % (n=19) у виду *S. saprophyticus*.

Отже, основні автохтонні коагулазопозитивні й коагулазонегативні види стафілококів шкіри клінічно здорових собак, зазвичай, проявляли високу чутливість до широковживаних антибактеріальних препаратів.

Наступним етапом експериментальної роботи було порівняти дані антибіотикограми у стафілококів, виділених за поверхневого фолікуліту та за шкірно-слизової піодермії собак. Адже попередні наші дослідження [195] показали, що з даних вогнищ виділялася практично така сама мікрофлора, як із шкіри здорових собак. Зокрема, за піодермії у монокультурі був виділений вид *S. pseudintermedius* в 85,8 % випадків. У 57,1 % випадків асоціація за піодермії була представлена коагулазопозитивними стафілококами та кишковою паличкою, у 4,0 раза рідше виявляли мікробну асоціацію з коагулазопозитивних стафілококів та синьогнійної палички – 14,3 % випадків. Тому результати, отримані в такому дослідженні, зможуть ґрунтовніше розкрити ефективність антибіотикотерапії за даного захворювання.

На рис. 3.8 наведено результати антибіотикограми стафілококів, ізольованих із запальних вогнищ собак, як первинно захворіли на шкірні захворювання. При цьому досліджено *S. pseudintermedius* (n=37), *S. epidermidis* (n=41), *E.coli* (n=29) та *P.aeruginosa* (n=38).

Встановлено (рис. 3.8), що основний мікроорганізм, який виділяється з вогнища запалення – *S. pseudintermedius* у більшості випадків був чутливим до перевірених антибіотиків. Чутливість даного виду до беталактамного антибіотика пеніцилінового ряду й макролідів становила по 75,7 % (n=28), до беталактамних антибіотиків цефалоспоринового ряду у межах 72,9 – 86,5 %, до марбофлораксацину – 86,5 (n=32) та найнижча була до тетрацикліну – 70,3 % (n=26). Це дає підставу вважати, що за піодермії у собак, яка виникає вперше, чутливість основних представників мікробіоти шкіри суттєво не

відрізняється від чутливості у цих мікроорганізмів, виділених від клінічно здорових собак.

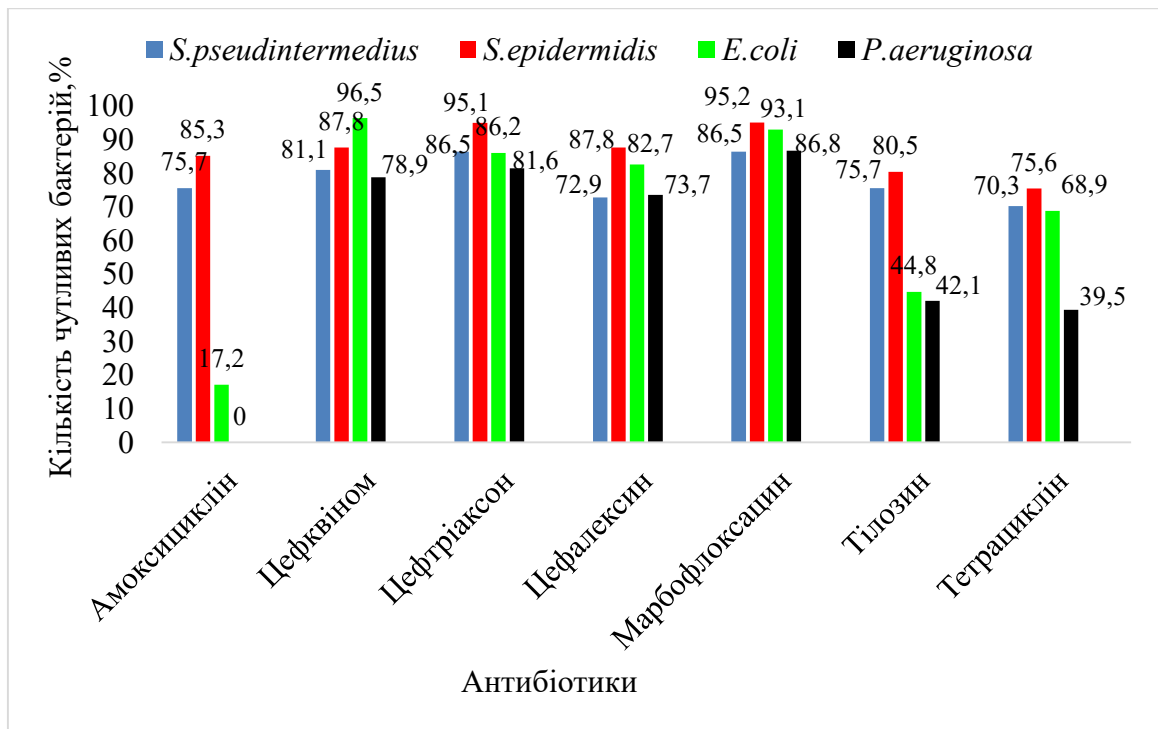


Рис. 3.8. Чутливість бактерій, виділених з шкіри за піодермії собак, у яких хвороба реєструвалася вперше

Чутливість у коагулазонегативного виду *S. epidermidis* до всіх беталактамних антибіотиків та фторхінолонового марбофлоксацину була дещо вища, ніж у *S. Pseudintermedius*, і становила в межах 85,3 – 95,2 %. До тілозину й макроліду чутливість була нижча, порівнюючи з попередніми антибіотиками і становила 80,5 – 70,3 % відповідно. Це вказує, що застосування даних антибіотиків за піодермії буде досить ефективним для знищення мікроорганізмів у вогнищі запалення.

Виділені з вогнища запалення бактерії *E. coli* виявилися досить високочутливими до беталактамних антибіотиків цефалоспоринового ряду й фторхінолонового антибіотика марбофлоксацину, оскільки чутливість була в межах 82,7 – 96,5 %, проте дуже низька до амоксициліну з клавулановою кислотою – 17,2 % (n=5). Менш дієві були антибіотики тілозин й тетрациклін щодо *E. coli*, так як чутливість до них становила 44,8 – 68,9 %.

Серед виділених бактерій *P.aeruginosa* була найстійкіша до антимікробних препаратів. Зокрема, препарати пеніцилінового ряду взагалі не дієві через природню стійкість синьогнійної палички до них, чутливість до беталактамів цефалоспоринового ряду становила в межах 73,7 – 81,6 %. Добре діяв на клітини *P.aeruginosa* препарат марбофлоксацин, так як чутливість до нього була 86,8 % (n=33), а найменший антимікробний ефект проявляли препарати тілозин й тетрациклін – лише 42,1 – 39,5 % культур синьогнійної палички були чутливими до них відповідно.

Антибіотикограма бактерій, виділених за піодермії у собак у яких спостерігалися рецидиви, наведена на рис. 3.9. При цьому досліджено *S. pseudintermedius* (n=31), *S. epidermidis* (n=27), *E.coli* (n=38) та *P.aeruginosa* (n=35).

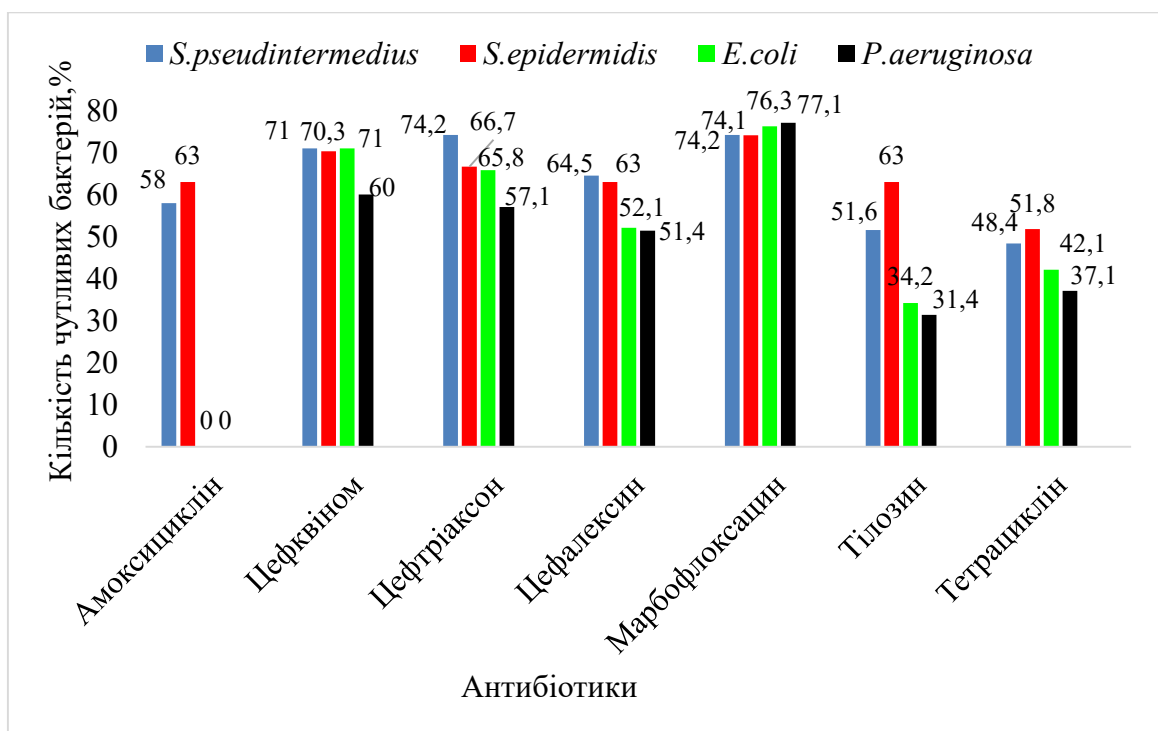


Рис. 3.9. Чутливість бактерій, виділених з шкіри за піодермії собак, у яких хвороба реєструвалася повторно

За повторної піодермії виділені збудники були стійкішими до антибактеріальних препаратів. Зокрема, чутливість *S. pseudintermedius* до амоксициліну з клавулановою кислотою була 58,0 % (n=18), до

цефалоспоринових антибіотиків й марбофлораксацину в діапазоні 64,5 – 74,2 %. Найменше чутливих культур *S. pseudintermedius* було до тілозину й тетрацикліну – на рівні 50 %. *S. epidermidis* за повторної піодермії також проявляв меншу чутливість до антибіотиків, порівнюючи з культурами виділеними зі шкіри клінічно-здорових собак та за піодермії, яка реєструвалася вперше. В середньому до беталактамних антибіотиків, фторхінолону та тілозину були чутливими близько 65 % культур *S. epidermidis*, а до тетрацикліну – 51,8 % (n=14).

Отже, якщо порівняти ці значення з результатами антибіотикограми бактерій ізольованих з шкіри здорових собак та за піодермії, яка реєструвалася повторно, то відмічаємо виділення на 20 – 25 % більше стійких клітин стафілококів.

Аналогічну тенденцію відмічали й при визначенні чутливості у *E.coli*, винятком були лише антибіотики тілозин й тетрациклін, до яких були чутливими 34,2 (n=13) та 42,1 % (n=16) відповідно даних культур. До того ж, амоксицилін з клавулановою кислотою зовсім не діяв на культури кишкової палички, виділені за піодермії при цих умовах.

Чутливість *P.aeruginosa* до цефалоспоринових антибіотиків була найнижча серед виділених культур і становила в межах 51,4 – 60 %, а чутливість даних бактерій до тілозину й тетрацикліну була ще меншою – 31,4 % (n=11) та 37,1 % (n=13), відповідно. Проте, виявили досить високу протимікробну активність у марбофлораксацину до ізольованих культур синьогнійної палички, чутливість була 77,1 % (n=27).

Отже узагальнюємо наступне. Основні види мікробіоценозу шкіри здорових собак *S. pseudintermedius*, *S. epidermidis* та *S. saprophyticus* були високочутливими до беталактамного антибіотику пеніцилінового ряду амоксициліну з клавулановою кислотою, цефалоспоринових антибіотиків I – IV покоління (цефалексину, цефтріаксону й цефквіному) та фторхінолонового антибіотику марбофлораксацину, так як чутливість бактерій становила від 82,3 до 100 %.

За піодермії собак, яка реєструвалася повторно, виявляли стійкіші до антибіотиків стафілококи, кишкову й синьогнійну палички. Чутливість *S. pseudintermedius* до амоксициліну з клавулановою кислотою була 58,0 %, до цефалоспоринових антибіотиків й марбофлоксацину в діапазоні 64,5 – 74,2 %. Аналогічну тенденцію відмічали при визначенні чутливості у *E.coli* й *P.aeruginosa*, винятком були лише антибіотики тілозин й тетрациклін, до яких були чутливими 30 – 40 % даних культур.

Результати дослідження опубліковано в статті:

Строїч, В. В., & Горюк, Ю. В. (2023). Аналіз чутливості до антибіотиків мікробіоти шкіри здорових собак та за піодермії. *Podilian Bulletin Agriculture Engineering Economics*, (41), 75–82. <https://doi.org/10.37406/2706-9052-2023-4.11> [18].

3.3. Розробка препарату для лікування піодермії у собак на основі специфічних фагів

У даний час вважається, що наступила епоха розвитку антибіотикорезистентності у мікроорганізмів в різних галузях, де застосовують антибактеріальні препарати. Науковці в цілому світі [35, 84, 114], вказують, що проблема антибіотикорезистентних штамів мікроорганізмів стала глобальною і потребує нових підходів щодо лікувальних і профілактичних процедур в медицині, ветеринарії та сільському господарстві. Особливо дана проблема гостро стоїть у ветеринарії, адже тваринам переважно застосовують ті самі групи антибактеріальних препаратів, що й людям. Відповідно, у тварин формуються антибіотикорезистентні штами, які за допомогою різних механізмів передачі можуть контамінувати середовище існування людей. Тому все частіше перед науковцями стоїть актуальна задача щодо розроблення безпечних способів лікування з використанням природних інгредієнтів, які не впливають на формування антибіотикорезистентності у бактерій. У результаті такої ситуації

нами здійснено пошук та обґрунтування способу лікування піодермії у собак за допомогою фагів специфічних до основних збудників даного захворювання.

3.3.1. Оцінка наявних бактеріофагових препаратів на ринку України та виділення фагів специфічних до збудників піодермії собак

Використання фагів з лікувальною метою у медицині тема не нова, водночас вона була призабута, оскільки ефект від застосування антибіотиків був набагато кращий. Однак, з розвитком антибіотикорезистентності у бактерій в світі все частіше звертають увагу на застосування фагів – літичних до збудників багатьох запальних процесів. На даний час на ринку України наявні два комерційні препарати бактеріофагів «Піофаг» та «Інтестіфаг» канадсько-української компанії ТОВ Неопробіокеар – Україна. Ці два бактеріофагові препарати містять у своєму складі специфічні фаги до декількох умовно-патогенних бактерій, які спричиняють запальні процеси у людей. В обох препаратах наявний у складі фаг літичний до *S. aureus*. До того ж, наданий нам для дослідження нещодавно розроблений препарат «Фагомаст», який застосовують для лікування маститу у корів, він містить також фаг активний до *S. aureus*. Враховуючи те, що збудниками піодермії у собак, за нашими даними, в основному є стафілококи, було проведено дослідження щодо ефективності літичної дії Піофагу, Інтестіфагу та Фагомасту на клітини *S. aureus*, *S. pseudintermedius*, *S. schleiferi subsp. coagulans* та *S. Epidermidis*, виділених від хворих собак, в лабораторних умовах у методі «стікаючої краплі» (табл. 3.1).

Серед взятих у дослід коагулазопозитивних й коагулазонегативних видів стафілококів, виділених від собак, жодна культура не лізувалася бактеріофаговими препаратами Піофаг, Інтестіфаг та Фагомаст (табл. 3.1). Очевидно, відсутність літичного ефекту даних препаратів щодо збудників піодермії пов'язано з біотипами золотистого стафілококу. Препарати Піофаг та Інтестіфаг містять у своєму складі специфічні фаги до золотистого стафілококу біотипу людини (*S. aureus var. hominis*), а препарат Фагомаст – до біотипу

великої рогатої худоби (*S. aureus* var. *bovis*). Наші збудники були виділені від собак, тобто золотистий стафілокок належить до біотипу собаки (*S. aureus* var. *canis*), власне цим пояснюється неактивність даних препаратів. Це підтверджує також те, що Піофаг та Інтестіфаг у 100 % проявляли літичну активність щодо музейного штаму *S. aureus*.

Таблиця 3.1

**Чутливість стафілококів, виділених з шкіри собак до
бактеріофагових препаратів, $M \pm m$, $n=5$**

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

Примітка. «—» відсутність літичної дії

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

Тому нами в якості клітин-господарів для розмноження фагових частин використано виділені культури КПС і КНС, які наявні на шкірі хворих собак за піодермії. Для цього після виділення та ідентифікації культур стафілококів

проведено їх культуральну, тинкторіальну, морфологічну, біохімічну, тощо, характеристику. Зокрема, КПС: *S. aureus*, *S. pseudintermedius* та *S. schleiferi subsp. coagulans* – мали біле забарвлення колоній, продукували бета-гемолізину, швидко коагулювали плазму кроля (протягом 12 год), водночас за молекулярно-біохімічними властивостями вони відрізнялися між собою, що дозволило їх розрізнити. Крім того, для виключення наявності профагів у клітинах виділених стафілококів, було проведено дослідження із використанням фізичних та хімічних методів, відповідно до загальноприйнятих методів [85]. Використовували обробку культур стафілококів ультрафіолетовими променями та Мітоміцин С (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Визначення продукції профагів у стафілококів, призначених для культивування літичних фагів, $M \pm m$, $n=5$

Виділені культури	К-сть культур	Продукція профагів після обробки	
		мітоміцином С	ультрафіолетовими променями
<i>S. aureus</i>	5	Не виявлено	Не виявлено
<i>S. pseudintermedius</i>	5	Не виявлено	Не виявлено
<i>S. schleiferi subsp. coagulans</i>	5	Не виявлено	Не виявлено
<i>S. epidermidis</i>	5	Не виявлено	Не виявлено

З табл. 3.2 спостерігаємо, що застосовані фізичні й хімічні методи для стимулювання явища лізогенії не спричиняли вивільнення активних літичних фагів, що вказує на можливість використання даних культур у якості клітин-господарів з метою накопичення фагів та створення бактеріофагового препарату для лікування піодермій у собак.

Отже, дані культури виділених стафілококів були використані для виявлення фагів у змивах зі шкіри собак. Результати досліджень змивів зі шкіри здорових та хворих на піодермію собак на наявність літичних фагів наведено в табл. 3.3.

Таблиця 3.3

**Виявлення літичних фагів активних до стафілококів різних видів
виділених із шкіри собак, $M \pm m$, $n=44$**

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

Примітка: *— $p \leq 0,05$ порівняно із здоровою шкірою

З табл. 3.3 відмічається частіше виявлення фагів коагулазопозитивних стафілококів із змивів зі шкіри хворих на піодермію тварин, ніж від здорових, що очевидно пов'язано переважанням їх у запальному вогнищі. Серед трьох КПС найбільше проб було із вмістом літичних фагів до клітин *S. pseudintermedius* – 21,7 % у змивах зі здорової шкіри, та 28,6 % у змивах від хворих тварин. Змивів, у яких були літичні фаги до *S. aureus* було 8,7 та 14,3 %, відповідно, також частіше в 1,8 раза виділялися фаги із вогнищ запалень, які лізували клітини *S. schleiferi subsp. coagulans*. Водночас, із здорової шкіри собак частіше в 1,4 раза виділялися фаги літичні до КНС *S. epidermidis*, ніж зі шкіри за піодермії.

Отже, із вогнищ запалення за піодермії виділяються найчастіше фаги, активні до клітин стафілококів видів *S. pseudintermedius* та *S. schleiferi subsp. coagulans*, які можна використати в препараті для лікування даного захворювання. Тому, враховуючи результати табл. 3.3, перспективним є конструювання фагового коктейлю із фагів літичних до різних видів

стафілококів. Для цього ми відібрали по 5 колоній фагів літичних до кожного із чотирьох видів стафілококів.

Результати дослідження опубліковано в статті:

Строїч, В. В., & Горюк, Ю. В. (2024). Оцінка наявних бактеріофагових препаратів на ринку України та виділення фагів специфічних до збудників піодермії собак. *Podilian Bulletin Agriculture Engineering Economics*, (43), 230–236. <https://doi.org/10.37406/2706-9052-2024-2.33> [19].

3.3.2. Характеристика властивостей та оцінка впливу фізичних факторів на життєдіяльність виділених фагів

Характеристика негативних колоній фагів КПС й КНС виділених зі шкіри собак наведена в табл. 3.4.

При аналізі п'ятьох фагів *S.a* (табл. 3.4) відмічаємо, що діаметр колоній коливався в межах від 1,2 до 1,8 мм, всі вони (колонії) були круглої форми, з прозорою та напівпрозорою зоною та переважно чітким краєм. Для подальших лабораторних досліджень з відбору фагів активних до *S. aureus* взято фаг *S.a 4* з діаметром колонії $1,8 \pm 0,1$ мм та прозорою зоною лізису. Характеризуючи фаги *S.p.* відмічаємо більшу величину колоній, ніж у фагів *S.a.*, зокрема два фаги *S.p 1* та *S.p 2* мали найбільшу величину колоній $2,0 \pm 0,1$ мм з прозорою круглої форми та чіткими краями колонії.

Інші три фаги *S.p* мали менший розмір колоній та прозорі або напівпрозорі зони лізису з рівними або нечіткими краями. Тому для досліджень відібрано Фаг *S.p 2*.

Фаги *S.she* за характером колоній практично були подібні до фагів Фаг *S.p.*, зокрема, вони мали величину колоній від 1,6 до 2,0 мм, в основному з круглими та чіткими краями колоній, а зона лізису була у двох прозора, а в трьох напівпрозора. Для подальшого використання було взято фаг із найбільшою чистою зоною колонії $2,0 \pm 0,1$ мм та рівними чіткими краями – Фаги *S.she 3*.

Таблиця 3.4

Характеристика стафілококових фагів, ізольованих із шкіри здорових і хворих собак, $M \pm m$, $n=20$

Виділені фаги	Діаметр колоній, мм	Форма колоній	Міра прозорості	Характер і чіткість країв колоній
Фаг <i>S.a 1</i>	$1,3 \pm 0,1$	кругла	напівпрозора	рівний, чітка
Фаг <i>S.a 2</i>	$1,2 \pm 0,1$	кругла	напівпрозора	рівний, нечітка
Фаг <i>S.a 3</i>	$1,6 \pm 0,1$	кругла	прозора	рівний, чітка
Фаг <i>S.a 4</i>	$1,8 \pm 0,1$	кругла	прозора	рівний, чітка
Фаг <i>S.a 5</i>	$1,5 \pm 0,1$	кругла	напівпрозора	рівний, чітка
Фаг <i>S.p 1</i>	$2,0 \pm 0,1$	кругла	прозора	рівний, чітка
Фаг <i>S.p 2</i>	$2,0 \pm 0,1$	кругла	прозора	рівний, чітка
Фаг <i>S.p 3</i>	$1,6 \pm 0,1$	кругла	напівпрозора	рівний, чітка
Фаг <i>S.p 4</i>	$1,4 \pm 0,1$	кругла	напівпрозора	рівний, нечітка
Фаг <i>S.p 5</i>	$1,8 \pm 0,1$	кругла	прозора	рівний, чітка
Фаг <i>S.she 1</i>	$1,7 \pm 0,1$	кругла	прозора	рівний, чітка
Фаг <i>S.she 2</i>	$1,6 \pm 0,1$	кругла	напівпрозора	рівний, чітка
Фаг <i>S.she 3</i>	$2,0 \pm 0,1$	кругла	прозора	рівний, чітка
Фаг <i>S.she 4</i>	$1,9 \pm 0,1$	кругла	напівпрозора	рівний, чітка
Фаг <i>S.she 5</i>	$1,8 \pm 0,1$	кругла	напівпрозора	рівний, чітка
Фаг <i>S.e 1</i>	$1,4 \pm 0,1$	кругла	прозора	рівний, чітка
Фаг <i>S.e 2</i>	$1,6 \pm 0,1$	кругла	напівпрозора	рівний, чітка
Фаг <i>S.e 3</i>	$1,5 \pm 0,1$	кругла	напівпрозора	рівний, нечітка
Фаг <i>S.e 4</i>	$1,8 \pm 0,1$	кругла	напівпрозора	рівний, нечітка
Фаг <i>S.e 5</i>	$1,9 \pm 0,1$	кругла	прозора	рівний, чітка

Фаги літичні до епідермального стафілококу також характеризувалися доволі великою величиною колоній від 1,4 до 1,9 мм, усі з круглими та переважно з чіткими й напівпрозорими колоніями. У результаті цього для

досліджень взято фаг *S.e* 3 з величиною негативної колонії $1,9 \pm 0,1$ мм та прозорою лізисною зоною.

Таким чином, на основі аналізу колоній літичних стафілококових фагів було відібрано п'ять по кожному активному до певного виду стафілококу.

Відомо, що однією із найважливіших характеристик фагів – це їх специфічність, тобто один фаг діє переважно на оди вид бактерій. У зв'язку з цим нами було досліджено спектр літичної активності виділених зі шкіри собак стафілококових фагів до представників КПС і КНС мікробіоти шкіри. Для цього у дослід взято наступні фаги: Фаг *S.a* 4, Фаг *S.p* 2, Фаг *S.she* 3 й Фаг *S.e* 5, тобто ті, які малий найбільший діаметр негативних колоній з прозорим лізисом та чітко круглою формою. Дані результати наведено в табл. 3.5.

Таблиця 3.5

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

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

Дослідження спектру літичної активності чотирьох стафілококових фагів виявило переважну їх специфічність щодо конкретного виду бактерій (табл. 3.5). Зокрема, Фаг *S.a* 4 у 100 % випадків лізував клітини *S. aureus*, 52,0 % бактерій виду *S. pseudintermedius*, 17,6 % – *S. schleiferi subsp. coagulans*, водночас не проявляв літичної активності до бактерій виду *S. epidermidis*. Такий спектр літичної активності можна пояснити, очевидно тим, що фаг *S.a* 4 діяв на найбільш споріднені між собою види коагулазопозитивних стафілококів.

Вид *S. pseudintermedius* колись не ідентифікувався як самостійний вид, а входив до виду *S. aureus*, втім в результаті розвитку молекулярно-генетичних методів виявлено деякі відмінності між даними видами бактерій, тому в 52 % випадків він лізувався фагом *S.a 4*. У меншій кількості руйнувалися даним фагом клітини виду *S. schleiferi subsp. coagulans* через більшу їх віддаленість від золотистого стафілококу.

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

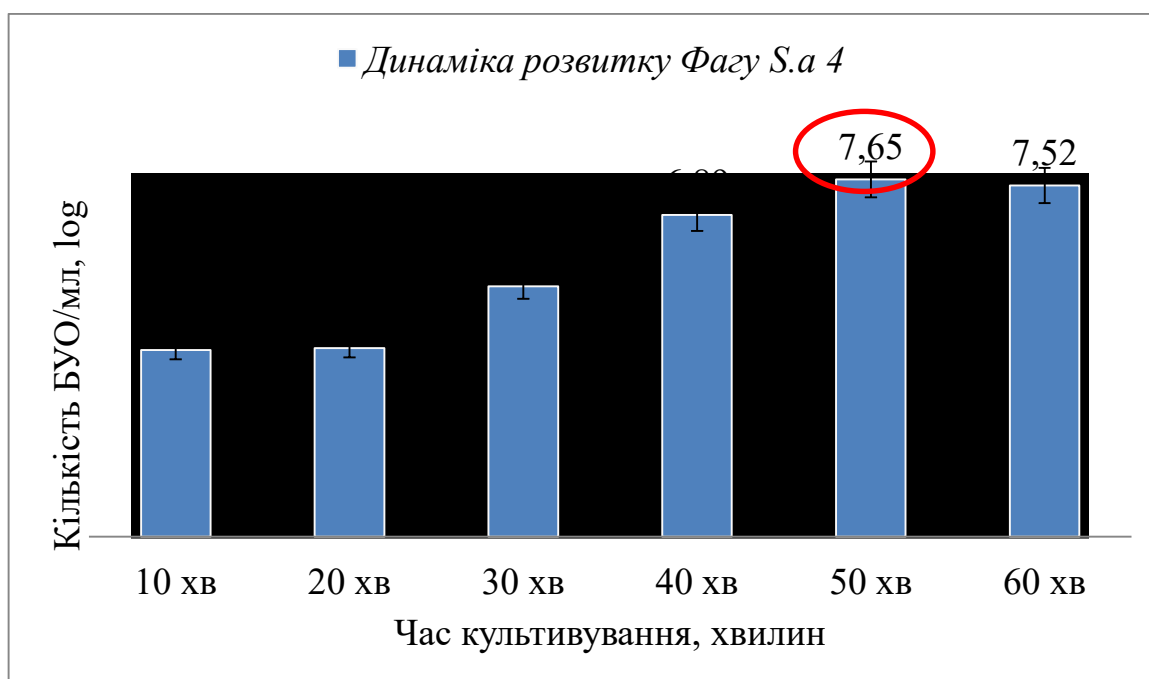
Фаг *S.she 3* лізував в 100 % випадків на бактерії свого господаря, водночас не лізував *S. aureus* та проявляв слабку специфічність лізису на клітини видів *S. pseudintermedius* й *S. epidermidis* – 8,0 % та 12,5 %, відповідно.

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

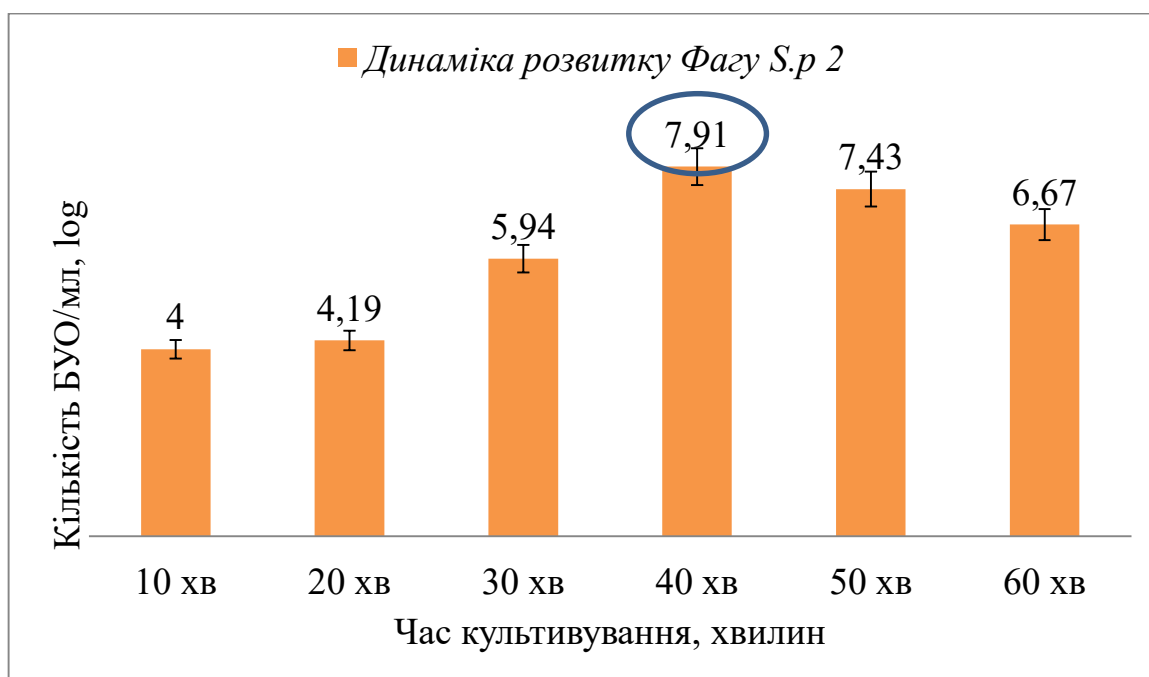
Отже, для лізису більшої кількості збудників піодермії стафілококової етіології необхідно розробляти фаговий препарат «коктейльного» типу із вмістом різних фагів.

Використання фагів у лікувальному препараті передбачає необхідність їх всебічного дослідження, а одним із методів, який характеризує швидкість накопичення віріонів в середовищі застосування є визначення їх латентного періоду. Саме такі дослідження було проведено із відібраними чотирма фагами (рис. 3.10 а, б, в, г).

Виявлено (рис. 3.10 а), що фаг *S.a 4* під час культивування в середовищі із золотистим стафілококом характеризувався поступовим вивільненням віронів і на 50 хв реєстрували максимальну кількість фагових колоній в середовищі – 7,65 log БУО/мл. Це вказує, що латентний період для даного фагу становить приблизно 50 хв, за цей час кількість активних вірусних частин збільшується приблизно на 4 порядки, що вважається задовільним для розвитку фагу.

а) Фаг *S.a 4*

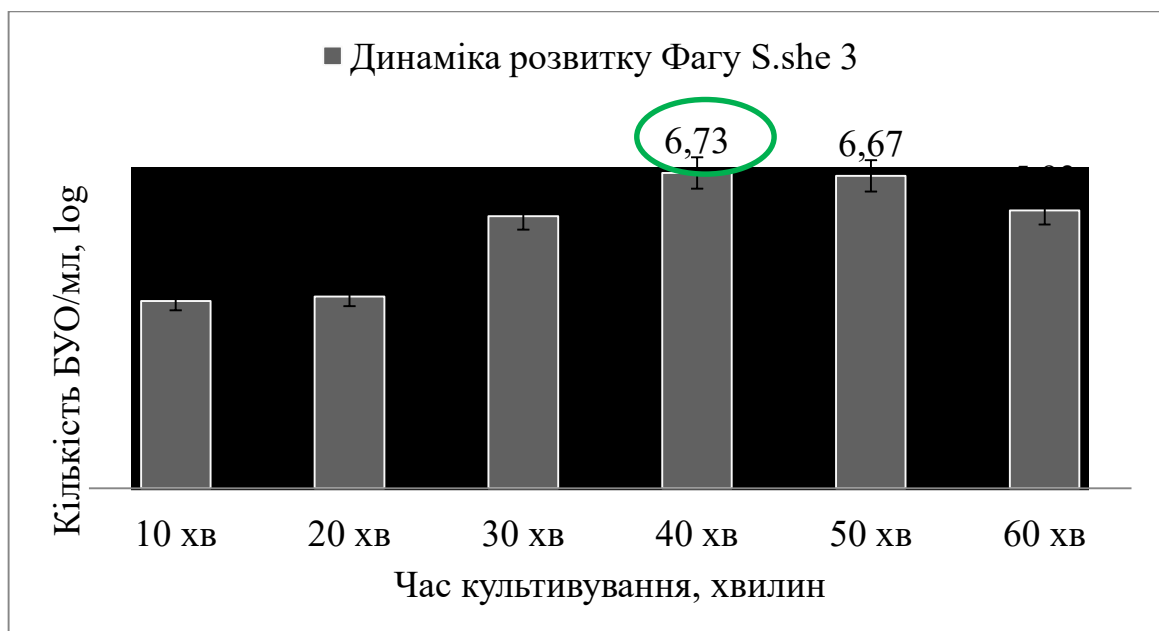
Дослідження динаміки розвитку фагу *S.p 2* виявило (рис. 3.10 б) інтенсивніший інфекційний процес, якщо порівнювати із розвитком фагу *S.a 4*.

б) Фаг *S.p 2*

До того ж латентний період у фагу *S.p 2* був на 10 хв коротший, ніж фагу *S.a 4* і становив 40 хв. Протягом цього часу відбувався розвиток фагу з руйнуванням клітин стафілококів і вивільненням великої кількості фагів 7,91 log

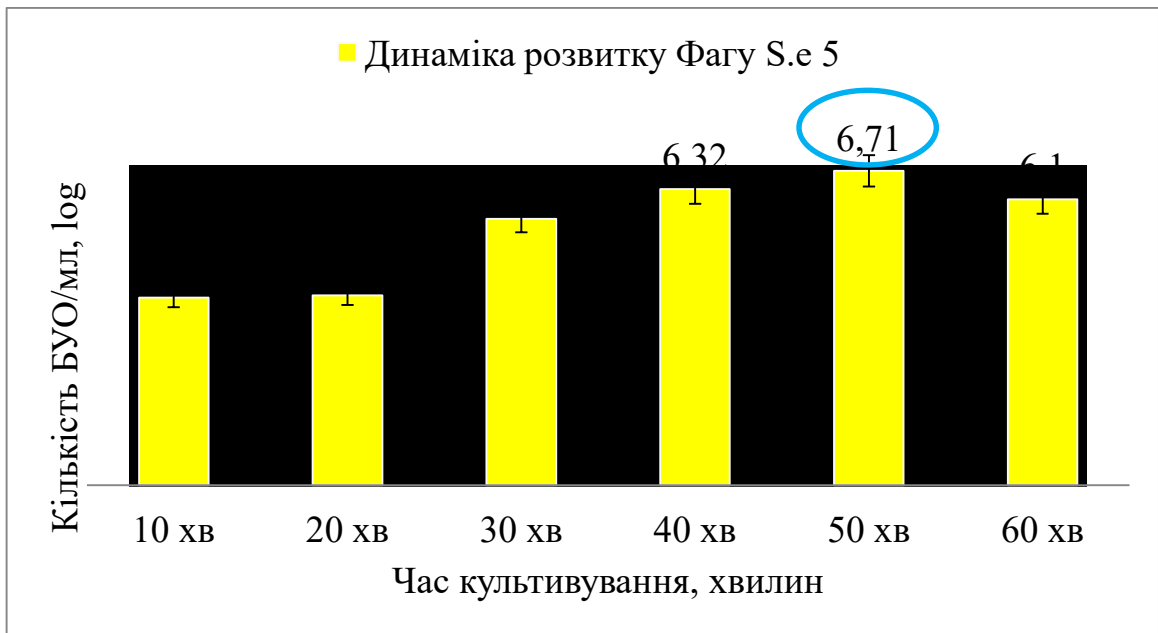
БУО/мл, що вважається добрим, оскільки буде сприяти зараженню інших мікробних клітин у запальному вогнищі.

Аналізуючи динаміку розвитку фагу *S.she 3* (рис. 3.10 в) відмічаємо, що інфекційний процес характеризувався коротким латентним періодом, оскільки максимальна кількість віріонів вивільнялася на 40-ву хвилину інкубації. Водночас, під час розвитку даного фагу вивільняється менша кількість віріонів, порівнюючи з розвитком фагів *S.a 4* й *S.p 2*. Так, під час латентного періоду розвитку фагу *S.she 3* кількість віріонів становила 6,73 log БУО/мл, тобто збільшилася на 2,7 порядку, а фагів *S.a 4* й *S.p 2* – на 3,6 та 3,9 порядку, відповідно.



в) Фаг *S.she 3*

Характеристика фагового процесу за участі фагу *S.e 5* (рис. 3.10 г) виявила приблизно ту ж саму закономірність щодо кількості вивільнених віріонів, як і за розвитку фагу *S.she 3*. Відмінність полягала тільки в тому, що у фагу *S.she 3* латентний період був на 10 хв довший і становив 50 хв, порівнюючи з фагом *S.e 5* (40 хв).



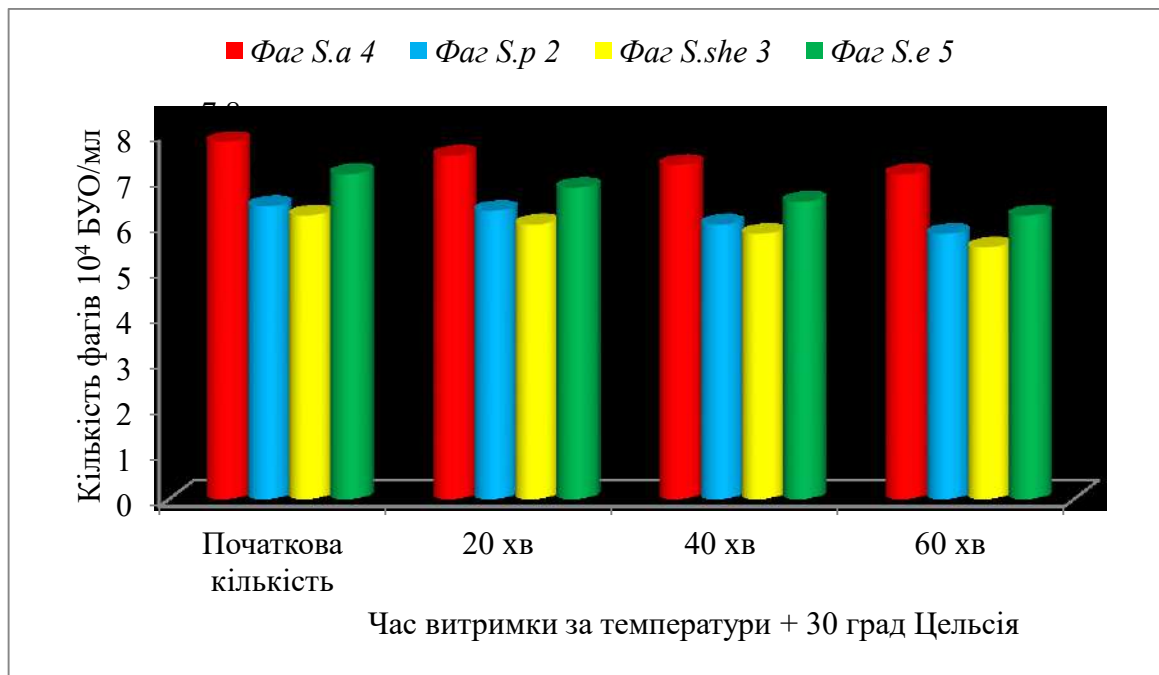
г) Фаг *S.e 5*

Рис. 3.10 (а, б, в, г). Визначення латентного періоду часу у виділених фагів

Отже, узагальнюючи даний дослід, відзначаємо, що виділені чотири літичні фаги до культур стафілококів, які виявляються у запальному процесі за піодермії, мали латентний період від 40 до 50 хв, при цьому кількість вивільнених віріонів становила від 6,71 до 7,91 log БУО/мл. Такий латентний період та кількість вивільнених віріонів є цілком задовільним для використання даних фагів у технології виробництва фагового препарату.

У природніх умовах фаги живуть за різного коливання температур, при цьому в діапазоні певних температур вони можуть проявляти підвищену або сповільнену свою активність. Також температура є тим фактором, який визначає оптимальні умови зберігання фагів до використання. У технології виготовлення фагового препарату бажано, щоб фаги проявляли терморезистентність до високих і низьких температур. Було проведено дослідження з оцінки впливу на виділені стафілококові фаги різних температур (рис. 3. 11 а, б, в). Для цього готували суспензію фагів з приблизним вмістом в 1 мл бульйону 10^7 – 10^8 БУО, розливали у пробірки та ставили у водяну баню за різних температур: $+ 30 \pm 1$ °C; $+ 45 \pm 1$ °C; та $+ 55 \pm 1$ °C через проміжок часу 20 хв, 40 хв та 50 хв відсівали

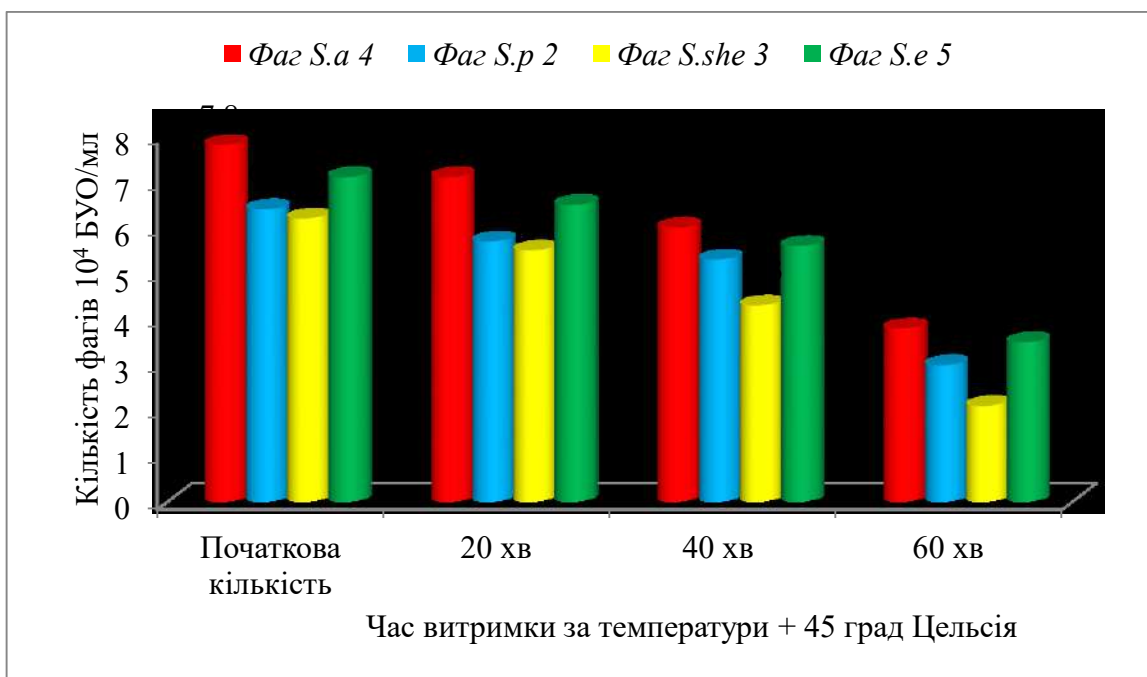
на середовище для підрахунку кількості життєздатних фагів. Зберігання активності фагів за $+30 \pm 1^\circ\text{C}$ наведено на рис. 3.11 а.



а) температура $+30 \pm 1^\circ\text{C}$

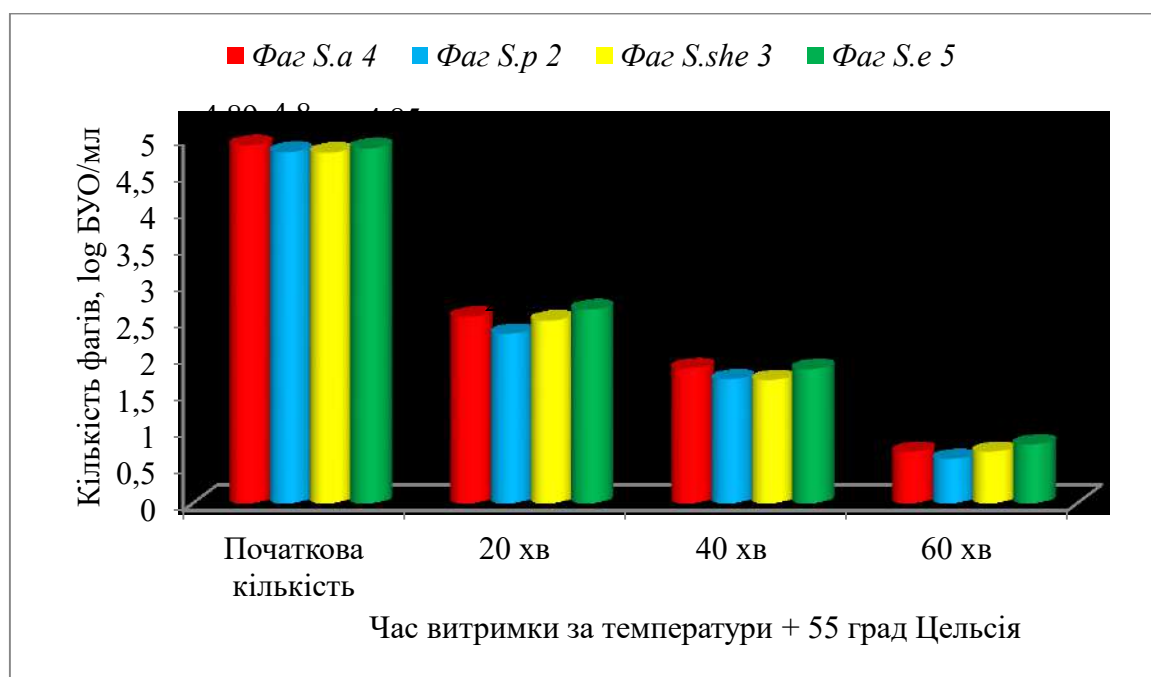
З рис. 3.11 (а) видно, що витримування дослідних фагів за температури $+30 \pm 1^\circ\text{C}$ не спричиняє статистично вірогідних змін у їх кількості протягом 60 хв тривалості експерименту. Це вказує, що виділені стафілококові фаги мають добре зберігати життєздатність перебуваючи на шкірному покриві тварин у випадку їх застосування з лікувальною метою. Крім цього, відмінності у стійкості між виділеними фагами активних щодо коагулазопозитивних, так і коагулазонегативних стафілококів не реєстрували.

Підвищення температури витримки фагів до $+45^\circ\text{C}$ зумовило повільне зниження життєздатності протягом часу дії експерименту (рис. 3.11 б). Водночас, вірогідна різниця у зниженні кількості відмічалася через 40 – 60 хв витримки, зокрема через 40 хв кількість фагів, в середньому, зменшувалася в 1,3 раза, а через 60 хв в 2 – 3 рази. При цьому відмінності у зменшенні між окремими фагами суттєво не встановлено. Це вказує, що літичні фаги, які виділені з одного біотопу мають однакову стійкість до дії навколишніх факторів, а для зупинки зменшення кількості фагових частин необхідно, щоб відбувався контакт фагу з їхніми цільовими клітинами.



б) температура $+45 \pm 1$ °C

Моделювання експерименту щодо стійкості фагів за температурою $+55$ °C наведено на рис. 3.11 г.



в) температура $+55 \pm 1$ °C

Рис. 3.11 (а, б, в). Стійкість виділених фагів до різних температур

За температури витримки фагів при $+55$ °C відбувається віруцидний вплив тепла на всі бактеріофаги, оскільки вже протягом 20-хвилинного періоду

відбулося зменшення їх більше, як на 2 порядки, а через 40 хв дії із бульйону виділялися віруси у кількості 50 – 70 БУО/мл. Через 60 хв експозиції кількість фагів у середовищі інкубування становила, в середньому 5 БУО/мл.

Таким чином з дослідів спостерігається, що умови приготування бактеріофагового препарату не повинні передбачати теплової обробки вище 45 °С, оскільки відбудеться поступове зниження їх життєздатності.

Для конструювання фагового препарату, який має діяти на поверхні ураженої шкіри собак, необхідно знати стійкість дослідних бактеріофагів до рН середовища, адже оптимальне рН шкіри собак близько 6 од [6]. Тому ефективною буде вважатися фагова композиція, яка буде діяти саме за цих умов. Визначення стійкості до рН середовища у виділених штамів фагів дозволить визначити їх оптимальний діапазон ефективності. Для визначення літичної дії виділених фагів за різних рН середовища ми відбирали фаги, вносили у бульйон з маточною культурою стафілококу з відповідним рН та вирощували протягом 24 год. Після закінчення інкубації в дослідних пробірках визначали кількість життєздатних фагів (рис. 12).

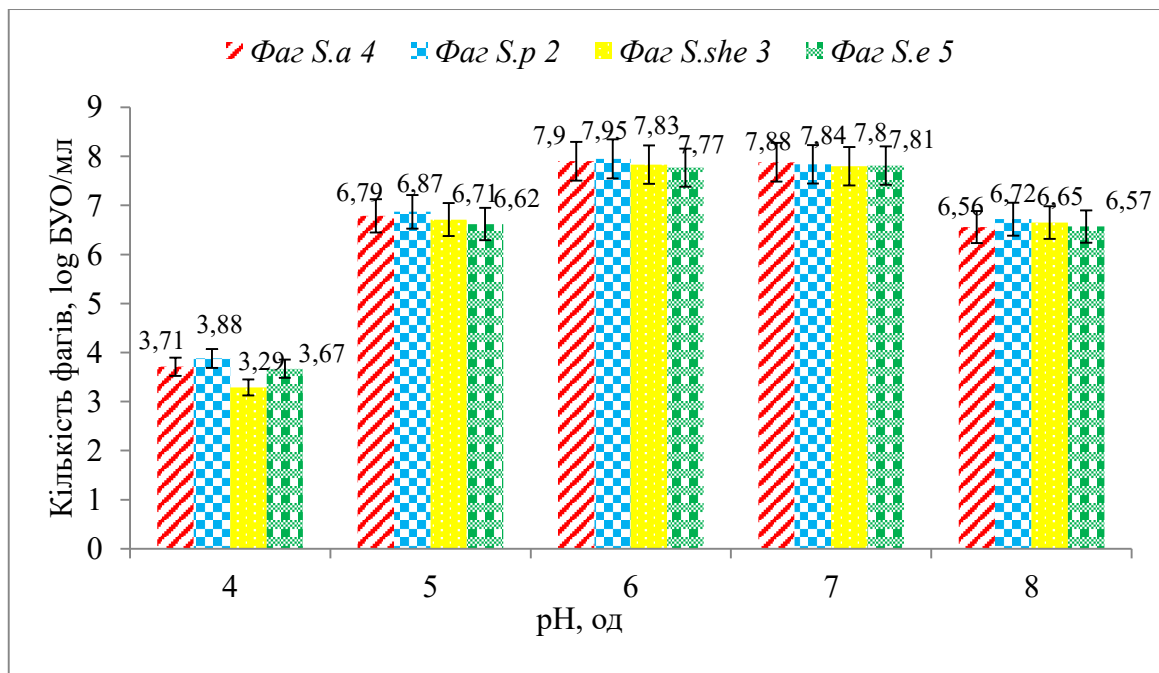


Рис. 12. Розвиток дослідних стафілококових фагів за різних рН середовища

Встановлено, що активність мікробної культури стафілококів за наявності фагової інфекції залежала від кислотності середовища вирощування. Зокрема, за кислого рН бульйону кількість літичних фагів була, в середньому, на 3,1 порядки менша, порівнюючи з рН 6 та 7 од, за якого відмічали найбільшу кількість життєздатних вірусів – до $7,9 \log$ БУО/мл. Даний процес, очевидно, більш пов'язаний з можливістю розвитку стафілококів як клітин-господарів фагів за кислого рН середовища, ніж з стійкістю фагів до даної величини рН. Також відмічено, що слаболужне рН середовища менш згубно впливало на кількість фагів у бульйоні, ніж кисле, оскільки за рН бульйону 8 од титр бактеріофагів становив $6,5 - 6,7 \log$ БУО/мл.

Отже, рН середовища, особливо нижче 5 од, буде негативно впливати на фагову інфекцію, тому фаговий препарат для боротьби зі збудниками піодермії собак має мати рН середовища в межах від 5 до 8 од, однак найбажаніше, щоб величина рН була 6 – 7 од, тобто як і шкіри собак.

3.3.3. Визначення літичної дії стафілококових фагів в залежності від кількості їх та цільових клітин у середовищі

Успішність та ефективність фаготерапії залежить не тільки від наявності в середовищі дії високолітичних специфічних бактеріофагів, але не менш важливим чинником є титр даних фагів та кількість цільових бактеріальних клітин, на які спрямована дія вірусу. Враховуючи даний інфекційний процес нами було проведено дослідження з визначення максимально ефективного титру фагів на основі лізису клітин стафілококів у середовищі. З цією метою відбирали 24-годинну бульйонну культуру чотирьох видів стафілококів, кожний вид в окремій пробірці та вносили у ці пробірки по 1 мл специфічного для даної культури виділеного фагу з різним титром. Інкубували до 12 год та визначали кількість клітин стафілококів у бульйоні, порівнюючи з бульйоном зі стафілококами але без фагів. Використовували фаги з трьома титрами: 10^6 БУО/мл, 10^7 БУО/мл, 10^8 БУО/мл. Тобто проведено три серії дослідів. Результати

впливу виділених фагів у титрі 10^6 БУО/мл на розвиток бульйонної стафілокової культури наведено на рис. 13 (а, б, в).

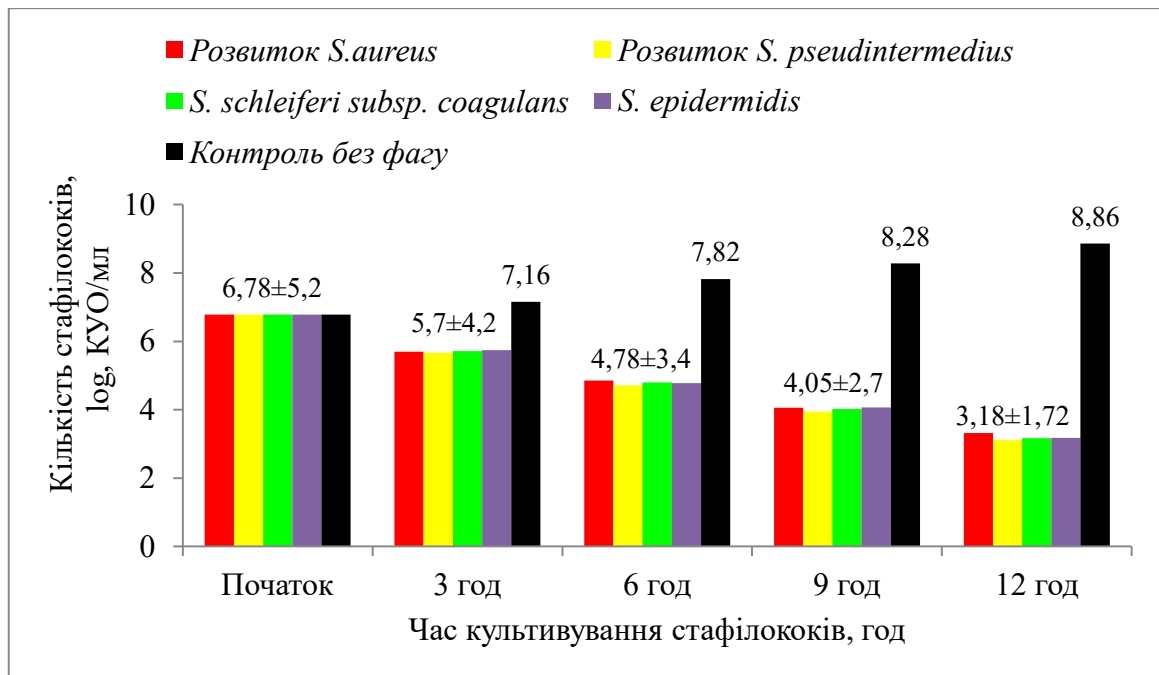


Рис. 13 (а). Розвиток стафілококів у бульйоні при додаванні фагів у кількості 10^6 БУО/мл

З рис. 13 (а) спостерігаємо зменшення кількості клітин стафілококів у бульйоні, до якого додавали специфічні фаги у кількості 10^6 БУО/мл протягом 12 год тривалості досліджу, що є свідченням розвитку інфекційного процесу за участі фаг-бактерія. Зокрема, наявна динаміка, яка характеризує поступовий процес розвитку фагів, оскільки через 3 год дослідження вміст стафілококів зменшувався, в середньому в 11,4 раза, а через 6 год – приблизно в 118 разів. Надалі з 6 по 9 та до 12 год інфекційний процес продовжувався, однак динаміка зниження кількості стафілококів була меншою через значне зменшення бактеріальних клітин у середовищі. Водночас, через 9 год інкубації культур стафілококів із специфічними фагами кількість життєздатних клітин становила, в середньому, $4,05 \pm 2,7 \log$ КУО/мл, а через 12 год – $3,18 \pm 1,72 \log$ КУО/мл, в межах від 10 тис. до 1 тис. бактерій.

Отже, відзначаємо, що за титру стафілококових фагів 10^6 БУО/мл проходить інтенсивний фаголітичний процес із значним лізисом бактеріальних

клітин протягом 12 год. Це вказує, що дану концентрацію можна використовувати у бактеріофаговому препараті, як таку, що істотно впливає на зменшення стафілококів у середовищі.

Динаміка розвитку бульйонної культури стафілококів за зараження її стафілококовими фагами у титрі 10^7 БУО/мл наведена на рис. 3.13 (б).

Виявлено (рис. 13 б) подібну закономірність щодо динаміки зменшення вмісту стафілококів у середовищі з літичними фагами, як за умови контамінації їх у титрі 10^6 БУО/мл. Водночас, й наявні деякі особливості, порівнюючи з попередньою концентрацією. Зокрема, при зараженні бульйонної культури титром фагів 10^7 БУО/мл відбувався інтенсивніший процес лізису клітин стафілококів, ніж за кількості 10^6 БУО/мл. Це пояснюється більшою вірогідністю контакту літичного фагу з цільовими клітинами-господарями для розвитку фагу. У цьому випадку через 9 та 12 год інкубації бульйонної культури кількість життєздатних бактерій стафілококів становила, в середньому, 3,57 та 2,8 log КУО/мл (4100 та 658 КУО/мл), тобто приблизно в 2 рази була менша кількість стафілококів у бульйоні, ніж у такому за зараження фагами з початковим титром 10^6 БУО/мл.

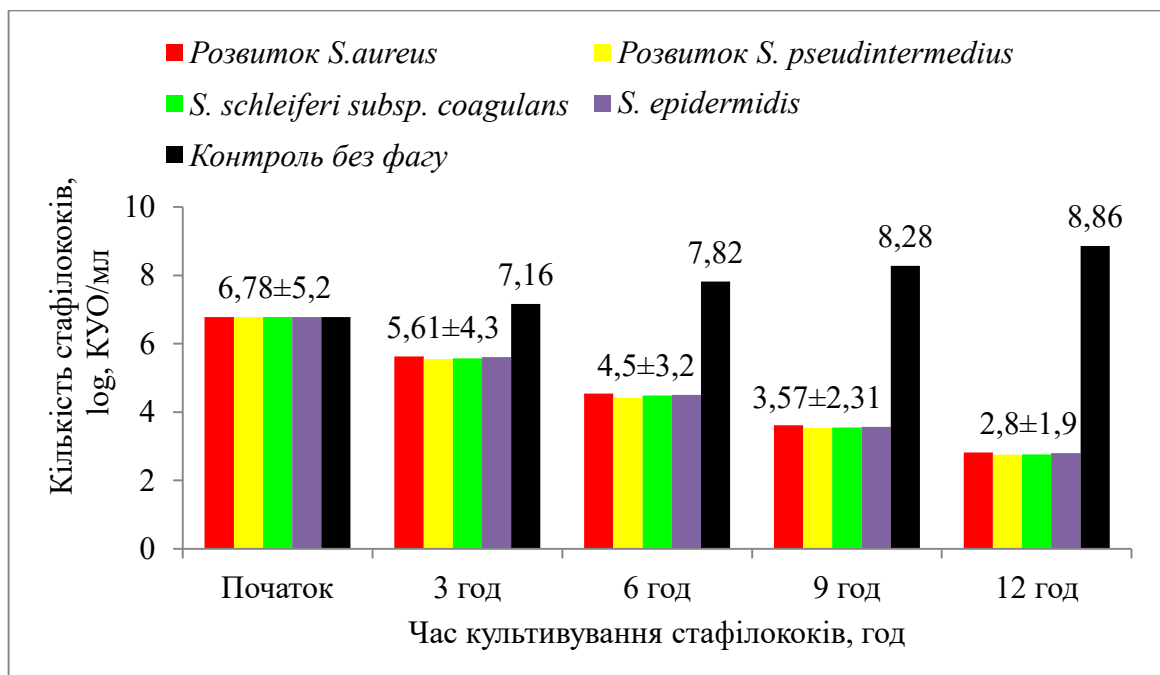


Рис. 13 (б). Розвиток стафілококів у бульйоні при додаванні фагів у кількості 10^7 БУО/мл

Отже, із збільшенням початкової кількості фагу в середовищі із стафілококами з 10^6 до 10^7 БУО/мл зростає інтенсивність лізису мікробних клітин.

У дослідженнях повідомляється, що бактеріофагові препарати містять у своєму складі літичні фаги, в основному в кількості від 10^7 до 10^9 БУО/мл. Вважається, що чим більша кількість фагових частин у препараті, тим інтенсивніше буде відбуватися зараження цільових клітин [6]. Незважаючи на те, що виділені нами чотири стафілококових фаги добре проявляли літичну активність щодо збудників піодермії у титрі 10^{6-7} БУО/мл, було досліджено вплив кількості 10^8 БУО/мл на розвиток бульйонної культури (рис. 13 в).

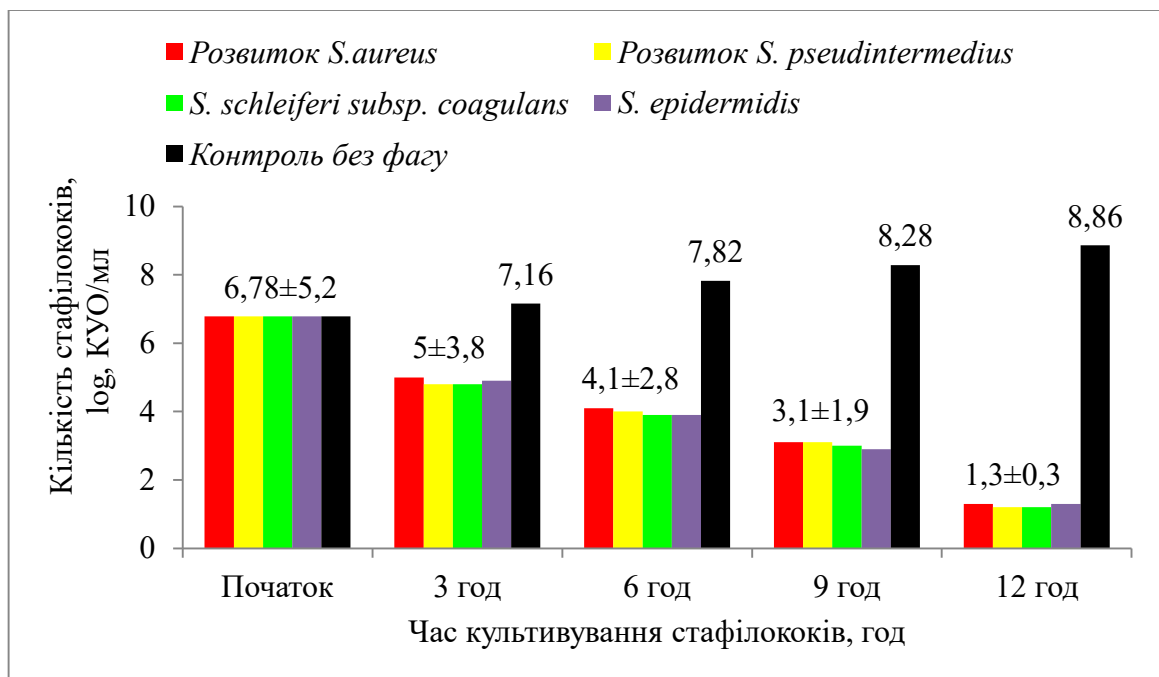


Рис. 13 (в). Розвиток стафілококів у бульйоні при додаванні фагів у кількості 10^8 БУО/мл

З рис. 13 (в) спостерігаємо надзвичайно сильну інтенсивність зменшення бактеріальних клітин у бульйоні, що свідчить про контамінацію стафілококів бактеріофагами та руйнування бактерій. Про інтенсивнішу динаміку розвитку стафілококових бактеріофагів за цієї початкової кількості їх у бульйоні вказує кількісне зменшення стафілококів на 9 годину тривалості досліду. Зокрема, на

цей період часу у бульйоні реєстрували, в середньому, в 3,7 раза меншу кількість стафілококів, ніж за контамінації бульйону титром фагів 10^7 БУО/мл та в 8,8 раза меншу, ніж при початковій кількості 10^6 КУО/мл. До того ж, через 12 год інкубації фагів з стафілококами з середовища виділяли $1,3 \pm 0,3 \log$ КУО/мл ($22,5 \pm 2,0$) бактеріальних клітин.

Отже, зараження бульйонної культури стафілококів бактеріофагами: Фаг *S.a* 4, Фаг *S.p* 2, Фаг *S.she* 3, Фаг *S.e* 5 у кількості від 10^7 до 10^8 БУО/мл дозволяє викликати інтенсивний інфекційний процес лізису бактерій протягом 12 год періоду. Це вказує, що у створену композицію бактеріофагового препарату необхідно вводити дану кількість літичних фагів.

Дослідження у попередніх дослідах виявили, що виділені літичні фаги *S.a* 4, Фаг *S.p* 2, Фаг *S.she* 3, Фаг *S.e* 5, які були специфічні до збудників стафілококів за піодермії, проявляли практично однакову стійкість до температури та рН середовища. До того ж, не виявлено вірогідної різниці між ними щодо впливу на динаміку розвитку бактеріальної культури у кількостях від 10^6 до 10^8 БУО/мл. Тому, враховуючи таку біологічну подібність у виділених фагів, для подальшого обґрунтування дії бактеріофагів на клітини стафілококів проводили дослідження тільки з фагом *S.p* 2, специфічного до *S. pseudintermedius*, основного представника, який виділяється в найбільшій кількості з шкіри собак за піодермії.

Перша умова, яка необхідна для ураження бактерійної клітини літичними фагами – це контакт із специфічним фагом. У присутності незначної кількості бактеріальних клітин у середовищі дії бактеріофагу ймовірність зустрічі один з одним знижується, а отже фагова інфекція не буде поширюватися. Тому для інфікування бактерій у середовищі, які знаходяться в ньому в невеликій кількості необхідно збільшувати концентрацію фагів, тобто забезпечувати пасивну імунізацію мікроорганізмів. У випадку значної контамінації об'єкта чутливими бактеріальними клітинами концентрація фагів може бути й нижча, водночас інфекційний процес за участі фагів буде відбуватися динамічніше – активна імунізація. Під час піодермії собак, яка може проходити гостро й хронічно

збудники можуть бути у великій та незначній кількостях на поверхні ураженої шкіри. Враховуючи такий процес, ми дослідили вплив бактеріофагу *S.p 2* внесеного у кількості від 10^7 та 10^8 БУО/мл, на клітини *S. pseudintermedius*, які перебувають у бульйоні в кількості від 10^3 та 10^7 КУО/мл (табл. 3.6 та 3.7). Для цього готували стерильний поживний бульйон, розливали у пробірки та вносили у нього 24-годинну культуру *S. pseudintermedius* у різній кількості, до кожної пробірки додавали фаг *S.p 2* у концентрації 10^7 або 10^8 БУО/мл та ставили на інкубацію в термостат з періодичним струшуванням пробірок на термошейкері. Через 12, 24 та 36 год з пробірок проводили відсів на гемосольовий агар для підрахунку кількості *S. pseudintermedius*.

Таблиця 3.6

Вплив бактеріофагу *S.p 2* у кількості 10^7 БУО/мл на стафілококи виду *S. pseudintermedius*, $M \pm m$, $n=3$

Початкова кількість <i>S. pseudintermedius</i> в бульйоні, КУО/мл	Кількість виживших стафілококів (КУО/мл) після впливу фагу, протягом, год		
	12	24	36
$6,2 \pm 0,2 \times 10^3$	0	0	0
$5,7 \pm 0,2 \times 10^4$	0	0	0
$8,8 \pm 0,3 \times 10^5$	$3,4 \pm 0,1 \times 10^2$	0	0
$7,1 \pm 0,3 \times 10^6$	$7,8 \pm 0,3 \times 10^2$	$6,9 \pm 0,3 \times 10^1$	0
$4,5 \pm 0,2 \times 10^7$	$5,2 \pm 0,2 \times 10^4$	$7,0 \pm 0,3 \times 10^2$	$6,2 \pm 0,1 \times 10^2$

Внесення у поживний бульйон стафілококів у кількості 10^3 та 10^4 КУО/мл та стафілококового бактеріофагу *S.p 2* у кількості 10^7 БУО/мл забезпечує інтенсивний інфекційний процес уже протягом 12 год інкубації, оскільки з бульйону стафілококів виду *S. pseudintermedius* не виділяли (табл. 3.6).

За початкової кількості стафілококів у бульйоні $8,8 \pm 0,3 \times 10^5$ КУО/мл повний лізис усіх культур протягом 12 год не відбувся, оскільки з середовища за цей час виділяли $3,4 \pm 0,1 \times 10^2$ КУО/мл. Водночас, продовження часу інкубації

стафілоkokів з фагом протягом 24 год підтримало активний інфекційний процес до повного лізису *S. pseudintermedius*.

Додавання у живильний бульйон стафілоkokів у кількості $7,1 \pm 0,3 \times 10^6$ КУО/мл також зумовлювало інтенсивний розвиток бактеріофагу *S.p* 2, оскільки протягом 12 год інкубації кількість бактерійних клітин зменшилася на 4 порядки, через 24 год інкубації – на 5 порядків, а через 36 годин з бульйону життєздатних клітин не реєстрували.

За найбільшої доданої кількості *S. pseudintermedius* у живильний бульйон – $4,5 \pm 0,2 \times 10^7$ КУО/мл повного лізису усіх бактерійних клітин не відбувся навіть після 36 год дії бактеріофагу. Хоча на закінчення тривалості досліду з бульйону виділялася незначна кількість стафілоkokів – $6,2 \pm 0,1 \times 10^2$ КУО/мл, очевидно для повного зниження їх необхідно продовжити час інкубації.

Отже, за наявності у середовищі початкової кількості стафілоkokів виду *S. pseudintermedius* від 10^3 до 10^6 КУО/мл та бактеріофагу *S.p* 2 у кількості 10^7 БУО/мл, відмічали руйнування усіх бактерій протягом 12 – 36 год. За внесення у бульйон початкової кількості бактерій 10^7 КУО/мл лізис стафілоkokів проходив інтенсивно під дією фагу *S.p* 2, але період часу у 36 годин є недостатнім для повного руйнування всіх бактерій.

Збільшення у середовищі культивування бактеріофагу *S.p* 2 до 10^8 БУО/мл дещо підвищило перебіг інфекційного процесу з контамінації та лізису *S. pseudintermedius* (табл. 3.7).

Зокрема, за початкового внесення в поживний бульйон *S. pseudintermedius* у кількості 10^3 – 10^4 КУО/мл інфекційний процес за участі фага *S.p* 2 завершувався протягом 12 год з повним лізисом усіх бактерій. За кількості стафілоkokів у бульйоні від 10^5 до 10^6 КУО/мл через 12 год культивування їх вміст зменшився, в середньому на 4 порядки, а через 24 год бактерії із середовища не ізолювалися. Найдовше тривав інфекційний процес за наявності початкового вмісту *S. pseudintermedius* у бульйоні в 10^7 КУО/мл, так як навіть через 36 год були виділені стафілококи в 10^1 в мл.

Таблиця 3.7

Вплив бактеріофагу *S.p 2* у кількості 10^8 БУО/мл на стафілококи виду *S. pseudintermedius*, $M \pm m$, $n=3$

Початкова кількість <i>S. pseudintermedius</i> в бульйоні, КУО/мл	Кількість виживших стафілококів (КУО/мл) після впливу фагу, протягом, год		
	12	24	36
$6,2 \pm 0,2 \times 10^3$	0	0	0
$5,7 \pm 0,2 \times 10^4$	0	0	0
$8,8 \pm 0,3 \times 10^5$	$6,1 \pm 0,3 \times 10^1$	0	0
$7,1 \pm 0,3 \times 10^6$	$4,5 \pm 0,2 \times 10^2$	0	0
$4,5 \pm 0,2 \times 10^7$	$3,7 \pm 0,3 \times 10^3$	$5,9 \pm 0,3 \times 10^2$	$7,3 \pm 0,3 \times 10^1$

Отже, з даних досліджень ми узагальнюємо, що контамінація середовища фагом *S.p 2* у кількості $10^7 - 10^8$ БУО/мл дозволяє протягом короткого часу розвинути інтенсивний інфекційний процес з ураженням стафілококів виду *S. pseudintermedius*. Тому дані дослідження вказують, що фаг *S.p 2*, та очевидно аналогічні йому фаги *S.a 4*, Фаг *S.she 3*, Фаг *S.e 5* мають добре діяти на збудників піодермії собак на поверхні шкіри у клінічних випадках.

3.4. Опис технологічного процесу виробництва бактеріофагового препарату літичного до збудників піодермії собак та оцінка його стабільності за зберігання

3.4.1. Технологія виробництва бактеріофагового препарату Фагодерм

Під час розробки бактеріофагового препарату проти збудників піодермії собак було розглянуто та проаналізовано технології виробництва аналогічних фагових препаратів з різними збудниками. У переважній більшості дані антимікробні препарати являють собою прозорий розчин для зрошування або обробки слизових оболонок чи уражених ділянок. На нашу думку, за піодермії собак при комплексному лікуванні даного захворювання для кращого контакту

бактеріофагу із бактеріями на поверхні шкірного покриву буде найефективнішим препарат у вигляді водного розчину. Такий препарат можна буде наносити на уражені ділянки за допомогою спрею, а приготовлену суміш фагів легко розфасувати у флакони. За допомогою спрею можна зручно й рівномірно зрошувати шкіру навіть у домашніх умовах. Тому технологію виробництва бактеріофагового препарату, у склад якого входитимуть чотири фаги ми запропонували наступну (рис. 3.14).

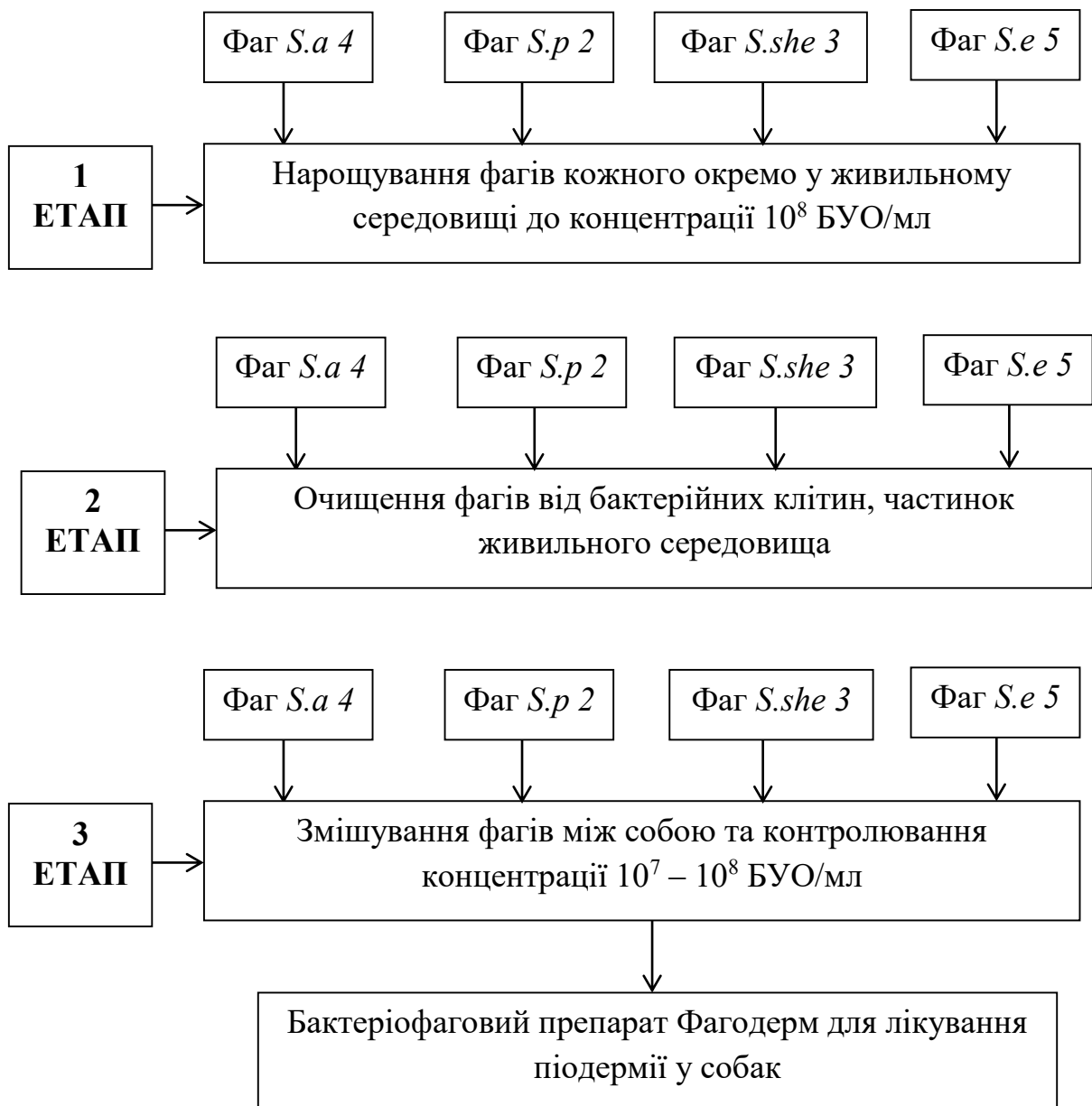


Рис. 3.14. Блок-схема виробництва бактеріофагового препарату Фагодерм

Увесь технологічний процес виробництва бактеріофагового препарату в основному проходить у мікробіологічній лабораторії, оскільки більшість технологічних операцій пов'язано з культивуванням фагу та стафілококів.

З рис. 3.14 видно, що наша технологія виробництва фагового препарату умовно складається з трьох етапів. На першому ми проводили нарощування фагів методом багаторазового пасажування окремо виділеного специфічного фагу із певним видом стафілококів до концентрації 10^8 БУО/мл. Зокрема, фаг *S.a 4* інкубували в бульйоні з 24-годинною культурою *S. aureus*, фаг *S.p 2* з *S. pseudintermedius*, фаг *S.she 3* з *S. schleiferi subsp. coagulans*, фаг *S.e 5* з *S. epidermidis*.

На другому етапі виробництва проводили очищення накопичених фагів трьохетапним способом, спершу центрифугували для грубого відділення фаголізату від бульйонної суспензії, потім фаголізат двічі фільтрували від клітин стафілококів через бактеріальні фільтри з різним діаметром пор. Використовували спершу фільтри з порами величиною 0,45 мкм, а потім фільтри з порами 0,22 мкм. Після цього у фаголізаті визначали концентрацію фагів за методом Грація та його стерильність шляхом посіву на середовище сольовий гемоагар.

Отриманий фаголізат кожного окремо взятого бактеріофагу на третьому етапі змішували в однаковому співвідношенні між собою та розливали у стерильні флакони або колби. За такою технологією було отримано бактеріофаговий препарат, у складі якого були наявні чотири фаги специфічні до збудників піодермії собак: фаг *S.a 4*, фаг *S.p 2*, фаг *S.she 3* та *S.e 5* у кількості 10^7 – 10^8 БУО/мл. Розроблений таким чином бактеріофаговий препарат було названо «Фагодерм» для лікування піодермії собак.

3.4.2. Оцінка стабільності бактеріофагового препарату Фагодерм до зберігання

Для встановлення здатності зберігати свою літичну активність розробленого бактеріофагового препарату Фагодерм протягом певного терміну нами було проведено дослідження із визначення його стабільності за двома способами. У першому способі визначали показники стабільності (кількість літичних фагів, рН препарату та його стерильність) шляхом «прискореного старіння» (витримування готового бактеріофагу, розфасованого у тару за температури $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 10 діб), у другому способі витримували за умов холодильника ($+5\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) протягом 6 місяців. Результати цих досліджень наведено в табл. 3.8 та 3.9.

Результати дослідження Фагодерму за його зберігання при температурі $+37\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 10 діб виявили наступне (табл. 3.8).

Таблиця 3.8

Показники стабільності препарату Фагодерм за зберігання при $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 10 діб, $M\pm m$, $n=3$

Показники	Дослідження через, діб		
	1	5	10
Титр фагу, БУО/мл	$7,5\pm 0,2\times 10^7$	$1,8\pm 0,1\times 10^7$	$2,9\pm 0,1\times 10^6$
рН, од	$6,2\pm 0,1$	$6,2\pm 0,1$	$6,2\pm 0,1$
Стерильність	+	+	+
Прозорість	прозорий	прозорий	прозорий

Примітка. «+» – відсутність росту мікроорганізмів

Дані табл. 3.9 показують, що за використання методу «прискореного старіння» протягом 5 діб зберігання концентрація фагів у препараті суттєво не зменшилася (в 1,6 раза) та все ще становила більше 10^7 БУО/мл. Дослідження на 10 добу зберігання Фагодерму виявили зменшення концентрації фагів більше як

на один порядок, проте їх титр був більшим вище мінімально допустимої кількості 10^4 БУО/мл [4].

Показники рН бактеріофагового розчину, його стерильність та прозорість не змінювалися протягом усього досліджуваного терміну зберігання та відповідали значенням першої доби визначення.

Дослідження показників стабільності препарату Фагодерм за традиційного холодильного зберігання наведено в табл. 3.9.

Спостерігаємо стабільні показники щодо концентрації фагів у препараті протягом двохмісячного часу зберігання в умовах холодильника, а через 4 місяці їх кількість зменшилася в 3,6 раза до $2,1 \pm 0,1 \times 10^7$ БУО/мл. Через 6 місяців титр фагів у препараті зменшився, в середньому, на один порядок. Інші досліджувані нами показники, які характеризують стабільність бактеріофагового препарату не зазнавали вірогідних змін протягом усього періоду дослідження.

Таблиця 3.9

Показники стабільності препарату Фагодерм за зберігання при $+ 5 \pm 1$ °C протягом 6 місяців, $M \pm m$, $n=3$

Показники	1 доба	Дослідження через, міс		
		2	4	6
Титр фагу БУО/мл	$7,5 \pm 0,2 \times 10^7$	$5,3 \pm 0,1 \times 10^7$	$2,1 \pm 0,1 \times 10^7$	$5,8 \pm 0,1 \times 10^6$
рН, од	$6,2 \pm 0,1$	$6,2 \pm 0,1$	$6,2 \pm 0,1$	$6,2 \pm 0,1$
Стерильність	+	+	+	+
Прозорість	прозорий	прозорий	прозорий	прозорий

Примітка. «+» – відсутність росту мікроорганізмів

Отже, дослідження показує, що показники, які характеризують стабільність фагового препарату Фагодерм суттєво не змінюються протягом 6 місяців його зберігання у побутовому холодильнику ($+ 5 \pm 1$ °C). Тому ми можемо стверджувати, що після 6 місяців зберігання Фагодерму літична

активність бактеріофагів не зменшиться, і його лікувальний ефект не знизиться щодо основних збудників піодермії собак.

3.5. Токсикологічна характеристика розробленого бактеріофагового препарату Фагодерм для лікування піодермії у собак

У літературі повідомляється, що бактеріофагові препарати не мають негативної і побічної дії на організм у випадку їх внутрішнього та поверхневого застосування. Ці антимікробні препарати вважаються безпечними, як при лікуванні хворих тварин, так і при застосуванні у медицині [5, 15]. Водночас, згідно сучасного законодавства кожен антимікробний препарат, який виходить на ринок, перш за все має бути безпечним [132, 68]. Тому такі препарати повинні системно перевірятися у лабораторних умовах з використанням достатньої кількості піддослідних тварин з метою визначення міри токсичності, подразнюючої, сенсibiliзуючої, кумулятивної дії та впливу на біохімічні й морфологічні показники лабораторних тварин.

У зв'язку з тим, що новостворений бактеріофаговий препарат Фагодерм призначений для зовнішнього застосування шляхом обробки ураженої шкіри способом зрошення, нами було проведено дослідження з оцінки його впливу як місцево, так і системно.

3.5.1. Визначення гострої токсичності Фагодерму

За загальноприйнятою методикою [13] було визначено показники гострої токсичності Фагодерму на лабораторних мишах. Дослідження з визначення гострої токсичності проводили на таких дослідних тваринах, як білі миші, які були однієї популяції. Миші мали масу від 27 до 32 г, використовували по 3 тварини у досліді, та 3 у контролі, яким вipoювали бактеріофаговий препарат Фагодерм. Кожну групу тварин витримували в окремій клітці, воду і корм у другій половині дня їм не давали. Розраховану дозу Фагодерму у кількості 10000 мг/кг маси кожної миші дослідної групи розводили з молоком та

випоювали їм. Після випоювання всього молока з бактеріофаговим препаратом мишам давали пити водопровідну воду. Тваринами у контрольній групі випоювали молоко з водою. Клінічне спостереження за тваринами в дослідній та контрольній групі здійснювали протягом 14 діб. Встановлено, що усі миші, як в дослідній, так і контрольній групі на початку проведення досліду та протягом усього періоду його тривалості були рухливі, активні, добре споживали корм, без видимих розладів центральної нервової та травної системи. При цьому жодна тварина у дослідній групі не загинула, а під час щоденного зважування встановлено збільшення маси тіла мишей.

Отже, досліджуваний бактеріофаговий препарат Фагодерм з титром 10^8 БУО/мл літичних фагів до стафілококів збудників піодермії в дозі від 5500 і до 10000 мг/кг живої маси мишей мав ЛД₀, тобто є переносимим і нетоксичним антибактеріальним засобом. Під час розтину тварин дослідної групи видимих змін внутрішніх органів не відмічали. Тому можемо стверджувати, що фаговий препарат Фагодерм не проявляв гострої токсичності на організм мишей.

3.5.2. Визначення хронічної токсичності Фагодерму

Для визначення хронічної токсичності бактеріофагового препарату Фагодерм у дослід також було взято три білих миші та три миші у контролі, які утримувалися в двох клітках. Миші мали масу від 27 до 32 г. Для випоювання мишам контрольної групи бактеріофагового препарату, щоденно розраховували дозу у кількості 5500 мг/кг Фагодерму з титром фагів 10^8 БУО/мл, змішували з молоком і давали тваринам на голодний шлунок. Випоювання препарату таким чином проводили протягом 30 діб. Під час цього періоду спостерігали за дослідними тваринами, жодна миша не загинула, всі вони були без видимих ознак порушення центральної нервової системи (активні, енергійні, добре споживали корм) та травної системи. Під час зважування протягом досліду маса мишей збільшилася, а одна миша народила здорових мишенят. Після завершення 30-денного періоду досліду було проведено розтин мишей дослідної групи. Видимих патологічних змін у них не було виявлено. Тому можемо стверджувати,

що фаговий препарат Фагодерм у випадку його довготривалого застосування піддослідним тваринам не проявляв хронічної токсичності на організм мишей.

3.5.3. Визначення подразнюючої й сенсibiliзуючої дії Фагодерму

Подразнюючу й сенсibiliзуючу дію фагового препарату Фагодерм визначали на морських свинках. У дослід було взято 3 тварини, в контролі також було 3 тварини. Усі дослідні морські свинки були клінічно здоровими й мали не пігментовану шкіру. Для проведення дослідів попередньо тваринам (в ділянці лопатки) вистригали шерсть розміром 3×3 см². Потім дані ділянки зрошували препаратом Фагодерм з титром 10^8 БУО/мл тричі на день, у контрольній групі морських свинок зрошення шкіри проводили водою. Тривалість дослідів становила 14 діб. Кожного дня проводили клінічний огляд морських свинок і оброблених ділянок шкіри. Встановлено, що протягом усього періоду Фагодерм не спричиняв будь-яких видимих змін у поведінці та фізіологічних функціях тварин, а ділянка шкіри у дослідних тварин була аналогічна, як у контрольній групі. При цьому не відмічали гіперемії, набряку, місцевої температури. Тому можемо вважати, що бактеріофаговий препарат Фагодерм не чинить подразнюючої дії на шкіру морських свинок.

Для встановлення можливої сенсibiliзуючої дії у даного фагового препарату морським свинкам з іншої сторони тіла вистригали шерсть аналогічного розміру (3×3 см²) і зрошували Фагодермом тричі на день та спостерігали за місцевою реакцією шкіри протягом двох діб. Встановлено, що поведінка тварин у дослідній групі була така ж сама, як у контрольній групі, тобто без будь-яких відхилень з боку нервової та травної системи, а ознак запалення шкіри не виявлено.

Отже, розроблений антибактеріальний препарат, який містить чотири фаги літичних до різних видів стафілококів – збудників піодермії собак не проявляв подразнюючої та сенсibiliзуючої дії протягом 15 добового нанесення на шкіру морських свинок.

3.5.4. Визначення шкірно-резорбтивної дії Фагодерму

Також було досліджено чи розроблений препарат Фагодерм не спричиняє шкірно-резорбтивної дії. Для цього сформували дві групи тварин по три миші в кожній, одна група дослідна, а одна була контрольна. Мишам дослідної групи хвосту занурювали у препарат Фагодерм на дві години кожен день протягом 14 діб тривалості досліду, а мишам контрольної групи в питну воду також протягом 14 діб. Після виймання хвостів оцінювали колір хвостів, наявність гіперемії, подразнення та зміни в кількості рідини. Дослідження засвідчили, що розроблений препарат Фагодерм не спричиняв ознак запалення шкіри хвостів у дослідній групі мишей, оскільки вона не відрізнялася від шкіри в контрольній групі тварин. При цьому зміни в кількості рідини також не виявлено, що є свідченням відсутності всмоктування препарату та те, що він не проявляв шкірно-резорбтивної дії на організм білих мишей через шкіру.

Як підсумок усіх проведених токсикологічних досліджень препарату Фагодерм у табл. 3.10 наведена узагальнена інформація щодо класу токсичності та його шкідливості.

Таблиця 3.10

Токсикологічні дослідження фагового препарату Фагодерм

Вид дослідження	Піддослідні тварини	Спосіб застосування	Отримані результати
Гостра токсичність	Білі миші	Випоювання з молоком	Не токсичний
Хронічна токсичність	Білі миші		Не токсичний
Подразнююча дія	Морські свинки	Зрошування вистриженої шкіри	Не спричиняє подразнення шкіри
Сенсибілізуюча дія	Морські свинки		Не спричиняє сенсибілізації
Шкірно-резорбтивна дія	Білі миші	Занурення хвостів	Всмоктування через шкіру немає

3.6. Клінічне дослідження бактеріофагового препарату Фагодерм для лікування собак за піодермії

Незважаючи на те, що піодермія рідко загрожує життю тварин, вона значною мірою викликає дискомфорт у собак через наявний свербіж або біль і розвиток важких запальних процесів шкіри [129, 150]. Тому практичні лікарі ветеринарної медицини під час лікування собак за піодермії, зазвичай, в 100 % випадків назначають місцеву та системну протимікробну терапію антибіотиками широкого спектру дії [197]. Піодермія, в основному, є вторинною інфекцією по відношенню до основного захворювання, тому часто відмічається рецидив, якщо первинне захворювання або причину не було усунено [75]. При цьому застосування антибіотиків базується на емпіричному характері, тоді як на основі даних антибіотикограми лише, в середньому 5 % [34, 141, 196]. Це обумовлено тим, що у минулому лікування піодермії собак рідко було складним, оскільки збудники (зазвичай стафілококи) були широко чутливими до антибактеріальних препаратів широкого спектру дії [125, 126, 153, 162]. Такий підхід, як звичайне лікування системними протимікробними препаратами збільшило кількість мультирезистентних бактерій, зокрема стійких до метициліну *S. pseudintermedius*. У стафілококів резистентність до бета-лактамних антибіотиків, таких як метицилін, виникає внаслідок набуття мобільного сегмента гена, який називається *staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec)* [106].

Отже, застосування для лікування піодермії собак бактеріофагового препарату Фагодерм літично-активного до основної мікробіоти шкіри дасть змогу в перспективі зменшити використання антибіотиків і тим самим формування антибіотикорезистентності у бактерій серед тварин-компаньйонів. Власне через те, що протокол лікування піодермії залежить від глибини ураження шкіри, розрізняють поверхневу й глибоку її форми у собак. Враховуючи це, ми для більш детальної характеристики терапевтичного ефекту бактеріофагового препарату Фагодерм застосовували його собакам як за поверхневої, так й за глибокої форми піодермії. Тому після встановлення

діагнозу на піодермію поверхневу чи глибоку був запроваджений певний протокол лікування із застосуванням Фагодерму. Результати експериментального застосування препарату Фагодерм протягом 2023 – 2024 року наведено в розділах 3.6.1 та 3.6.2.

3.6.1. Ефективність застосування фагового препарату Фагодерм за поверхневої піодермії у собак

Розроблений нами бактеріофаговий препарат Фагодерм ми пропонуємо використовувати у концентрації фагів у кількості 10^7 – 10^8 БУО/мл. Для цього ми готували його відповідно до технології, описаної в підрозділі 3.4.1 та розфасовували у флакони із дозатором для розпилення. Приготовлені зразки препарату перед застосуванням перевіряли на концентрацію літичних фагів. Тобто готували препарат у двох концентраціях 10^7 та 10^8 БУО/мл для клінічного випробування на тваринах, у яких була діагностована поверхнева піодермія.

Алгоритм діагностування поверхневої піодермії був наступний: після звернення власників з собаками у клініки ветеринарної медицини проведено огляд тварин, збір анамнезу та певні діагностичні дослідження для виключення інших захворювань шкіри. Зокрема, з метою виключення ектопаразитів використовували класичний метод із застосуванням вологого білого паперу, на який вичісували бруд з волосяного та шкірного покриву. Наявність чорних фекалій бліх із червоно-коричневим відтінком вказувало на зараження блохами.

Проводили цитологічне дослідження поверхневих й глибоких зіскрібів зі шкіри за допомогою стерильного скальпеля на предметне скло для диференціації корости, дермафітозів, а під час глибокого зішкрібу для виключення мікроскопічного демодекозу.

Також відбирали мазки-відбитки із ексудативних уражень чи витікань, змиви з поверхневих і глибоких уражень для ідентифікації мікробіоти шкіри й встановлення її чутливості до антибіотиків. До того ж, відбирали кров для морфологічних й біохімічних досліджень.

Тварин вважали хворими на піодермію у випадку наявності гнійного запалення шкіри собак (локального або генералізованого характеру), нейтрофільних інфільтратів у зіскрібах та мазках-відбитках зі шкіри, за поверхневої і глибокої у мазках була присутня мікрофлора. Під час мікробіологічного дослідження змивів зі шкіри виділяли характерну для даного захворювання кокову мікробіоту: стафілококи (*S. pseudintermedius*, *S. epidermidis*, *S. aureus*, інші види); *Escherichia coli* та *Pseudomonas aeruginosa*.

Схема проведення дослідів з лікування поверхневої піодермії собак із використанням бактеріофагового препарату Фагодерм у дослідній групі була наступна:

- гіпоалергенна дієта;
- застосування внутрішньо протиалергічного препарату Апоквель;
- зрошування уражених піодермією місць бактеріофаговим препаратом Фагодерм 3 – 5 разів на добу.

Схема лікування поверхневої піодермії у контрольній групі собак:

- гіпоалергенна дієта;
- застосування внутрішньо протиалергічного препарату Апоквель;
- обробка уражених локалізованих місць шампунями з антисептиками два рази в день.

Попередні наші дослідження засвідчили, що у лабораторних умовах літична активність Фагодерму добре була виражена за концентрації віріонів 10^7 та 10^8 БУО/мл. Тому для лікування поверхневої піодермії методом багаторазового зрошення уражених локалізованих вогнищ препаратом Фагодерм порівняли дві концентрації. Терапевтична ефективність даних двох концентрацій Фагодерму за лікування поверхневої форми піодермії собак наведена в табл. 3.11.

З табл. 3.11 спостерігаємо 100 % терапевтичний ефект за лікування поверхневої піодермії, як у дослідних тварин, так і в контрольній групі. Водночас, у першій дослідній групі за поверхневого зрошення уражених ділянок Фагодермом у концентрації 10^7 БУО/мл тривалість лікування становила, в

середньому 19 діб. У другій дослідній групі, яких лікували Фагодермом з концентрацією фагів 10^8 БУО/мл, період повного одужання тварин становив 16 ± 1 діб. Тобто, за більшої концентрації фагу у препараті відбувається на три доби швидше загоювання уражених ділянок за піодермії. У контрольній групі тварин, обробку яким проводили антисептичними засобами, терапевтичний ефект також був добрий, так як повне загоювання відбувалося протягом 18 діб від початку процесу лікування.

Таблиця 3.11

**Ефективність лікування собак за поверхневої піодермії
бактеріофаговим препаратом Фагодерм у концентрації фагів 10^7 та 10^8
БУО/мл**

Групи тварин	Концентрація фагів у препараті, БУО/мл	Кількість тварин, яких лікували, n	Тривалість лікування, діб	Ефективність лікування, %
Дослідна:				
– перша	10^7	5	19 ± 1	100
– друга	10^8	5	16 ± 1	100
Контрольна	–	5	18 ± 1	100

Отже, препарат Фагодерм є досить ефективним для лікування поверхневої піодермії собак, оскільки за концентрації фагів 10^8 БУО/мл повний терапевтичний ефект досягався на дві доби швидше, ніж у контрольній групі собак.

Динаміка зміни кількості стафілококів та стафілококових фагів на уражених піодермією ділянках у процесі лікування наведена в табл. 3.12. При цьому для визначення кількості стафілококів у змивах з уражених ділянок матеріал висівали на селективне середовище сольовий гемоагар (7 % натрію хлориду), концентрацію стафілококових фагів за методом Грація.

З табл. 3.12 спостерігаємо, що до обробки з уражених ділянок шкіри виділялися стафілококи в кількості $6,4 \pm 0,2 \times 10^6 - 2,3 \pm 0,1 \times 10^7$ КУО/мл змиву. Через дві доби від початку зрошення уражених ділянок шкіри Фагодермом кількість стафілококів зменшилася, в середньому, на три порядки, що вказує на літичну активність застосованих бактеріофагів та розвиток на даній ділянці шкіри фагової інфекції. У змивах зі шкіри першої групи собак на другу добу виділяли $4,1 \pm 0,1 \times 10^4$ КУО/мл бактерій та $5,5 \pm 0,2 \times 10^3$ КУО/мл стафілококів у другій групі. Концентрація бактеріофагів у даний час також підтримується на високому рівні – $2,1 \pm 0,1 \times 10^5$ БУО/мл у змивах першої групи та на один порядок більше у змивах другої групи. Це вказує, що нанесені фаги знаходять на ураженій ділянці специфічні клітини-господарі для свого розвитку.

Таблиця 3.12

Кількісні зміни стафілококів та фагів на ураженій ділянці під час лікування поверхневої піодермії собак бактеріофаговим препаратом Фагодерм у концентрації фагів 10^7 та 10^8 БУО/мл, $M \pm m$

Час відби- рання проб	Групи тварин				
	Перша дослідна, n=5		Друга дослідна, n=5		Контроль
	к-сть стафілококів, КУО/мл змиву	к-сть стафілококових фагів, БУО/мл змиву	к-сть стафілококів, КУО/мл змиву	к-сть стафілококових фагів, БУО/мл змиву	к-сть стафілококів, КУО/мл змиву
До обробки	$2,3 \pm 0,1 \times 10^7$	—	$8,7 \pm 0,3 \times 10^6$	—	$6,4 \pm 0,2 \times 10^6$
2 доба після обробки	$4,1 \pm 0,1 \times 10^4$	$2,1 \pm 0,1 \times 10^5$	$5,5 \pm 0,2 \times 10^3$	$1,0 \pm 0,1 \times 10^6$	$7,9 \pm 0,3 \times 10^4$
5 доба	$6,1 \pm 0,2 \times 10^3$	$5,5 \pm 0,2 \times 10^3$	$7,4 \pm 0,2 \times 10^2$	$3,8 \pm 0,1 \times 10^4$	$1,4 \pm 0,1 \times 10^4$
10 доба	$8,3 \pm 0,2 \times 10^2$	$7,3 \pm 0,2 \times 10^2$	$3,9 \pm 0,1 \times 10^2$	$6,8 \pm 0,3 \times 10^2$	$3,6 \pm 0,1 \times 10^3$
15 доба	$6,4 \pm 0,2 \times 10^2$	$4,8 \pm 0,1 \times 10^2$	$1,9 \pm 0,1 \times 10^2$	$3,3 \pm 0,1 \times 10^2$	$8,3 \pm 0,2 \times 10^2$
20 доба	$4,5 \pm 0,1 \times 10^2$	$5,2 \pm 0,2 \times 10^1$	$1,5 \pm 0,1 \times 10^2$	$2,5 \pm 0,1 \times 10^1$	$7,8 \pm 0,3 \times 10^2$

Протягом п'яти діб лікування піодермії бактеріофаговим препаратом Фагодерм відмічаємо, в середньому, на один порядок зменшення стафілококів на ураженій ділянці, порівнюючи з їхньою кількістю на другу добу від початку лікування. При цьому у другій дослідній групі (титр фагів у препараті 10^8 БУО/мл) кількість стафілококів становила $7,4 \pm 0,2 \times 10^2$ КУО/мл змиву, що на один порядок менше, ніж у змивах першої групи собак (титр фагів у препараті 10^7 БУО/мл). Це вказує, що за більшого початкового вмісту фагів у препараті відбувається швидша колонізація і лізис бактеріальних клітин господарів фагів, тобто швидкість поширення фагової інфекції.

Подальше лікування уражених ділянок собак Фагодермом з 5 до 10 та до 20 доби не забезпечувала істотного зменшення вмісту стафілококів, оскільки їх кількість у даний період становила, в середньому 10^2 КУО/мл змиву, як в першій, так в другій дослідній групі собак. Це свідчить про можливу контамінацію стафілококами з інших частин тіла, або наявності в даному біотопі стафілококів (інших видів), які не чутливі до дії даних фагів, так як у препараті Фагодерм наявні специфічні фаги тільки до чотирьох видів стафілококів, виділених від собак. Разом з тим, кількість стафілококів не чинить патогенної дії на ділянки шкіри які заживають, а навпаки, на нашу думку, стимулюють регенеративні процеси, оскільки стафілококи як рід відносяться до нормомікробіоти шкіри здорових собак. До того ж необхідно відзначити, що протягом періоду часу з 5 по 20 добу концентрація фагів на ураженій ділянці поступово зменшувалася, що вказує на відсутність цільових клітин для розвитку фагової інфекції. Після відміни препарату Фагодерм на 20 добу із шкіри виділяли не більше як 10^1 літичних стафілококових фагів.

У контрольній групі собак, яким уражені ділянки обробляли антисептичними засобами деконтамінація стафілококової мікробіоти також відбувалася поступово. Хоча через п'ять діб лікування вміст стафілококів був на один – два порядки більший, ніж при зрошуванні Фагодермом в першій та другій контрольній групі собак, відповідно. Під час дослідження на 20 добу вміст

стафілококів не перевищував 10^2 КУО/мл змиву, проте в 1,5 та 5,2 раза більший, порівнюючи з вмістом в першій та другій дослідній групі собак, відповідно.

Таким чином, мікробіологічна характеристика процесу лікування поверхневої піодермії собак зрошенням уражених ділянок новоствореним бактеріофаговим препаратом Фагодерм у концентрації вірусів 10^7 й 10^8 БУО/мл сприяє суттєвому зменшенню стафілококів внаслідок їх лізису під час розвитку фагової інфекції. При цьому кількість стафілококів на шкірі після загоювання уражених ділянок відповідає вмісту нормомікробіоценозу даного біотопу.

Піодермія у собак – це поліетіологічне захворювання і для інтенсивного розвитку мікрофлори на шкірі практично завжди є першочергова причина, яка запускає запальний процес. Тому для ґрунтовнішого розуміння процесу регенерації на ураженій ділянці за лікування бактеріофаговим препаратом Фагодерм та можливого впливу його на загальний стан організму собак нами досліджено динаміку морфологічних й біохімічних показників крові до та після місцевої та загальної терапії (табл. 3.13 та 3.14). Морфологічні та біохімічні показники крові собак у контрольній та у дослідній групі визначали на автоматичних аналізаторах Element ht5 та FUJI DRI-CHEM NX600. При цьому було визначено показники крові собак у першій дослідній групі, уражені ділянки шкіри яких обробляли препаратом Фагодерм з кількістю вірусів 10^7 БУО/мл. Результати морфологічних змін крові собак наведено в табл. 3.13.

З аналізу даних табл. 3.13 відмічаємо, що у хворих на поверхневу піодермію собак до лікування, в основному, морфологічні показники були у межах фізіологічних значень, або на верхній межі норми. Зокрема, відносний вміст нейтрофілів становив $92,4 \pm 2,9$ %, що на 11,4 % більше верхнього значення фізіологічної норми. Це вказує про наявність запальної реакції в організмі на дію внутрішнього або зовнішнього подразника. До того ж, кількість еозинофілів та базофілів у крові становила $1,51 \pm 0,27 \times 10^9/\text{л}$ та $0,11 \pm 0,02 \times 10^9/\text{л}$, що також вважається граничною фізіологічною нормою. Збільшення відсоткового вмісту еозинофілів й базофілів свідчить про розвиток в організмі

процесу гіперчутливості. Аналогічні морфологічні показники у крові собак реєстрували у собак контрольної групи.

Таблиця 3.13

**Морфологічні показники крові собак під час лікування поверхневої
піодермії бактеріофаговим препаратом Фагодерм, $M \pm m$**

Показники	Дослідна група, n=5		Контрольна група, n=5		Фізіологічна норма
	до лікування	після лікування	до лікування	після лікування	
Лейкоцити, $10^9/\text{л}$	11,41±0,63	9,76±0,47	10,97±0,71	9,11±0,34	6,0-17,0
Нейтрофіли, $10^9/\text{л}$	12,1±0,27	7,4±0,21	11,8±0,30	6,9±0,25	3,62-12,3
Лімфоцити, $10^9/\text{л}$	2,2±0,35	1,7±0,24	2,1±0,32	1,6±0,22	0,83-4,91
Моноцити, $10^9/\text{л}$	0,97±0,14	0,85±0,11	1,1±0,2	0,87±0,08	0,14-1,97
Еозинофіли, $10^9/\text{л}$	1,51±0,27	0,87±0,1	1,48±0,33	0,92±0,1	0,04-1,62
Базофіли, $10^9/\text{л}$	0,11±0,02	0,07±0,01	0,09±0,01	0,08±0,01	0,00-0,12
Відносний вміст нейтрофілів, %	92,4±2,9	68,5±2,1	90,7±2,5	67,3±2,2	52,0-81,0
Відносний вміст лімфоцитів, %	24,9±3,1	21,8±1,8	22,8±2,9	20,7±1,6	12,0-33,0
Відносний вміст моноцитів, %	4,6±0,4	4,8±0,3	4,3±0,3	4,6±0,2	2,0-13,0
Відносний вміст еозинофілів, %	9,7±0,7	5,1±0,3	9,3±0,5	5,4±0,2	0,5-10,0
Відносний вміст базофілів, %	1,1±0,2	0,6±0,1	0,8±0,2	0,5±0,1	0,0-1,3
Еритроцити, $10^{12}/\text{л}$	7,52±0,58	7,80±0,32	7,34±0,46	7,51±0,33	5,1-8,5

Продовж. табл. 3.13

Гемоглобін, г/л	139,4±7,1	146,2±5,2	144,8±6,9	151,6±6,7	110-190
Гематокрит, %	39,5±0,8	40,8±0,6	37,2±0,7	39,4±0,8	33,0-56,0
Середній об'єм еритроцитів, 10 ¹⁵ /л	65,7±0,6	66,4±0,4	64,3±0,5	64,9±0,5	60,0-76,0
Середній корпускулярний гемоглобін, пг	25,1±0,3	25,2±0,3	25,6±0,2	25,8±0,2	20,0-27,0
Середня корпускулярна концентрація гемоглобіну, г/л	361,2±4,8	363,5±4,4	367,5±5,1	368,6±4,9	300-380
Міра відхилення розміру еритроциту, %	14,3±0,2	14,1±0,2	14,8±0,2	14,5±0,2	12,5-17,2
Кількість тромбоцитів, 10 ⁹ /л	387,4±11,5	375,2±9,4	369,7±12,6	354,1±10,5	117-490
Середній об'єм тромбоцитів, 10 ¹⁵ /л	9,4±0,3	9,3±0,2	9,7±0,3	9,5±0,3	8,0-14,1

Після лікування бактеріофаговим препаратом Фагодерм спостерігаємо зниження морфологічних показників до середніх значень фізіологічної норми. Зокрема, такий показник, як вміст нейтрофілів зменшився в 1,6 раза і становив $7,4 \pm 0,21 \times 10^9/\text{л}$, що вказує на відсутність запальних процесів в організмі дослідної групи собак. На фоні застосування комплексного лікування вміст еозинофілів й базофілів також зменшився в 1,7 – 1,6 раза до середніх значень фізіологічної норми, що вказує на зниження алергічних реакцій.

Отже, з оцінки морфологічних показників крові собак за поверхневої піодермії впливає, що застосування стафілококових бактеріофагів у комплексній терапії забезпечує нормалізацію вмісту нейтрофілів, еозинофілів та базофілів, які найчастіше зростають за даного захворювання.

Значення біохімічних показників крові собак за поверхневої піодермії наведено в табл. 3.14.

Таблиця 3.14

Біохімічні показники крові собак під час лікування поверхневої піодермії бактеріофазовим препаратом Фагодерм, $M \pm m$

Показники	Дослідна група, n=5		Контрольна група, n=5		Фізіологічна норма
	до лікування	після лікування	до лікування	після лікування	
Сечовина ммоль, л	6,88±0,09	4,91±0,08	7,45±1,13	5,38±1,0	3,28-10,42
Креатинін, мікромоль/л	37,2±0,5	37,1±0,4	38,3±0,7	38,0±0,6	35-124
Загальний білок, г/л	59,3±0,7	60,2±0,6	63,6±0,5	65,1±0,4	50-72
Глюкоза, мікромоль/л	4,4±0,2	4,4±0,3	4,5±0,2	4,6±0,3	4,2-7,1
АЛТ, Од/л	71,3±4,6	60,5±4,1	73,5±4,4	61,7±3,8	17-78
АСТ, Од/л	39,5±1,7	31,3±1,5	41,7±1,5	30,8±1,4	17-44
Лужна фосфатаза, Од/л	78,6±3,3	67,1±3,0	80,9±3,5	65,6±3,1	13-83
Загальний білірубін, мікромоль/л	8,1±1,2	6,5±1,1	9,3±1,0	6,7±1,2	1-9

З даних табл. 3.14 не спостерігаємо суттєвих відхилень від фізіологічної норми біохімічних показників крові собак за поверхневої піодермії як у дослідній, так у контрольній групі. Водночас показники, які характеризують діяльність печінки (вміст АЛТ, АСТ та загального білірубіну) були на верхній межі фізіологічної норми, що свідчить про можливе зниження детоксикаційної функції та прояв алергічних реакцій. Застосування комплексної терапії із зрошенням уражених піодермією ділянок Фагодермом мало позитивний вплив на біохімічні показники крові собак, оскільки всі вони мали середні значення фізіологічної норми.

Отже, Фагодерм у комплексній терапії поверхневої піодермії собак забезпечував загоювання уражених ділянок шкіри та сприяв нормалізації біохімічних показників крові.

3.6.2. Ефективність застосування фагового препарату Фагодерм за глибокої піодермії собак

Схема проведення досліджень з лікування глибокої піодермії собак із використанням бактеріофагового препарату Фагодерм у дослідній групі була наступна:

- гіпоалергенна дієта;
- антибіотикотерапія (амоксиклав);;
- застосування кортикостероїдних препаратів;
- зрошування уражених піодермією місць бактеріофаговим препаратом Фагодерм 5 – 8 разів на добу. При цьому використовували Фагодерм з кількістю літичних фагів у мінімально дозволений нами кількості 10^7 БУО/мл. Отже, при лікуванні глибокої піодермії у собак у нас була одна дослідна група собак у кількості 5 тварин.

Схема лікування глибокої піодермії у контрольній групі собак:

- гіпоалергенна дієта;
- антибіотикотерапія (амоксиклав);
- застосування кортикостероїдних препаратів;

– місцева обробка уражених піодермією місць антибактеріальною маззю Санодерм.

Перед початком лікування собак з уражених ділянок було відібрано змиви для ідентифікації мікробіоти, щоб можна було з'ясувати, які збудники приймають участь у запальному процесі. Адже новостворений фаговий препарат Фагодерм містить у своєму складі тільки специфічні фаги до стафілококів збудників піодермії собак. Склад мікрофлори уражених ділянок за глибокої піодермії у собак дослідної та контрольної групи перед початком лікування наведено в табл. 3.15.

З досліджень табл. 3.15 видно, що за глибокої піодермії собак з уражених ділянок виділяється асоціативна мікробіота в двох собак дослідної та в двох контрольної групи тварин. У складі асоціацій були присутні стафілококи різних видів, кишкова й синьогнійна палички та в однієї собаки ідентифікувався протей. У трьох собак з кожної групи мікрофлора, в основному, була представлена стафілококовими видами.

Таблиця 3.15

Характеристика мікробіоти уражених ділянок шкіри собак за глибокої піодермії

№п/п	Дослідна група собак, n=5	№п/п	Контрольна група собак, n=5
1	В основному види <i>Staphylococcus spp.</i>	1	<i>Staphylococcus spp.</i> , <i>E. coli</i> , <i>Proteus spp.</i>
2	<i>Staphylococcus spp.</i> , <i>E. coli</i>	2	В основному види <i>Staphylococcus spp.</i>
3	В основному види <i>Staphylococcus spp.</i>	3	В основному види <i>Staphylococcus spp.</i>
4	<i>Staphylococcus spp.</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i>	4	<i>Staphylococcus spp.</i> <i>P. aeruginosa</i>
5	В основному види <i>Staphylococcus spp.</i>	5	В основному види <i>Staphylococcus spp.</i>

Таким чином, за глибокої піодермії з уражених ділянок виділяються представники грамнегативної мікробіоти, на які розроблений нами стафілококовий бактеріофаговий препарат не буде діяти. Проте, у складі комплексної терапії нами застосовується антибіотик загальної дії, який має впливати на бактеріальні збудники в глибоких уражених ділянках шкіри.

Ефективність запропонованої нами терапії глибокої піодермії у дослідній та контрольній групі собак визначали окремо для кожної тварини (табл. 3.16).

Таблиця 3.16

Ефективність лікування собак за глибокої піодермії бактеріофаговим препаратом Фагодерм у концентрації фагів 10^7 БУО/мл

Групи тварин, №п/п собаки	К-сть фагів у препараті, БУО/мл	Кількість тварин, яких лікували, n	Тривалість лікування, діб	Ефективність лікування, %
Дослідна		5		100
1	10^7		25	
2	10^7		29	
3	10^7		24	
4	10^7		28	
5	10^7		25	
Контрольна	—	5		100
1			27	
2			24	
3			28	
4			23	
5			26	

З даних досліджень табл. 3.16 та 3.15 спостерігається, що найменший термін повного одужання тварин був у дослідній групі, який становив 24 – 25 діб. У даних собак з уражених ділянок, в основному, виділялися збудники стафілококової мікробіоти, відносно якої проявляється добра літична дія нашого

бактеріофагового препарату Фагодерм. У двох собак дослідної групи №2 та №4 у складі мікробіоти були присутні крім стафілококів кишкова та синьогнійна палички, на які не діє наш препарат тому, на нашу думку, термін повного одужання був на 3 – 5 діб більший, порівнюючи з тваринами №1, №3 та №5. Водночас ми вважаємо, що грамнегативна мікрофлора на шкірі собак є транзиторною і за умови покращення загального стану тварин комплексною терапією та усунення первинної причини піодермії дана мікрофлора елімінується або зменшується до некритичного значення.

У контрольній групі тварин, яким обробляли уражені ділянки шкіри антибактеріальною маззю, термін одужання становив 23 – 28 діб. При цьому суттєвої різниці між терміном одужання тварин і складом мікробіоти на ураженій ділянці не спостерігається. Тому ми вважаємо, що під час терапії глибокої піодермії собак необхідно застосовувати комплексний підхід щодо вибору методів лікування, які б передбачали використання препаратів загальної дії на організм та місцевого впливу на мікрофлору.

Результати дослідження розвитку фагової інфекції на ураженій ділянці за глибокої піодермії наведено в табл. 3.17.

Загальна кількість стафілококів на поверхні ураженої шкіри собак до обробки становила, в середньому, $6,8 \pm 0,3 \times 10^7$ КУО/мл змиву в обох групах тварин. Через дві доби від початку загального лікування й зрошення уражених ділянок шкіри стафілококовим бактеріофаговим препаратом кількість стафілококів зменшилася на два порядки – до $5,4 \pm 0,1 \times 10^5$ КУО/мл, що є доказом розвитку фагової інфекції серед стафілококів, так як кількість стафілококових фагів підтримувалася на високому рівні – $7,2 \pm 0,3 \times 10^5$ БУО/мл. У контрольній групі тварин загальна кількість стафілококів протягом даного часу зменшилася на три порядки – до $1,1 \pm 0,1 \times 10^4$ КУО/мл, що є свідченням прояву доброї бактерицидної дії антибактеріальної мазі на мікробіоту уражених ділянок за піодермії.

Таблиця 3.17

Кількісні зміни стафілококів та фагів на ураженій ділянці під час лікування глибокої піодермії собак бактеріофаговим препаратом Фагодерм у концентрації фагів 10^7 БУО/мл, $M \pm m$

Час відбирання проб	Групи тварин		
	Дослідна, n=5		Контроль, n=5
	к-сть стафілококів, КУО/мл змиву	к-сть стафілококових фагів, БУО/мл змиву	к-сть стафілококів, КУО/мл змиву
До обробки	$7,9 \pm 0,3 \times 10^7$	—	$5,7 \pm 0,2 \times 10^7$
2 доба після обробки	$5,4 \pm 0,1 \times 10^5$	$7,2 \pm 0,3 \times 10^5$	$1,1 \pm 0,1 \times 10^4$
5 доба	$7,5 \pm 0,2 \times 10^4$	$6,1 \pm 0,2 \times 10^5$	$7,3 \pm 0,3 \times 10^3$
10 доба	$1,4 \pm 0,1 \times 10^4$	$5,7 \pm 0,2 \times 10^4$	$2,8 \pm 0,1 \times 10^3$
15 доба	$5,8 \pm 0,2 \times 10^3$	$3,6 \pm 0,1 \times 10^4$	$3,5 \pm 0,1 \times 10^3$
20 доба	$2,1 \pm 0,1 \times 10^3$	$4,9 \pm 0,2 \times 10^4$	$6,6 \pm 0,2 \times 10^2$
На завершення видужання (24-29 доба)	$2,2 \pm 0,1 \times 10^2$	$6,5 \pm 0,2 \times 10^1$	$3,4 \pm 0,1 \times 10^2$

Дослідження змивів з уражених ділянок на п'яту та десятую добу від початку лікування виявило зменшення стафілококів у вогнищі запалення на один порядок, порівнюючи з другою добою. Водночас, вміст бактеріофагів був практично на тому ж рівні ($6,1 \pm 0,2 \times 10^5$ БУО/мл), що на другу добу лікування. Це вказує, що на ураженій шкірі ще достатня кількість стафілококів, які підтримують запальний процес, можуть перебувати у глибоких шарах шкіри, або заноситися з інших ділянок. У контрольній групі тварин загальна кількість стафілококів підтримувалася, практично, на однаковому рівні протягом часу з 5 по 15 добу лікування.

У дослідній групі на 15 та 20 добу дослідження змивів виявляли зменшення кількості стафілококів ще на один порядок, порівнюючи з попереднім періодом – до $5,8 - 2,1 \times 10^3$ КУО/мл. Водночас, вміст стафілококових фагів був приблизно 10^4 БУО/мл, які очевидно ще знаходять своїх специфічних господарів-стафілококів і розмножуються в них. До того ж, нами ще проводилася обробка ураженої шкіри стафілококовим бактеріофагом 5 – 8 разів на добу. У контрольній групі тварин на 20 добу від початку лікування кількість стафілококів становила $6,6 \pm 0,2 \times 10^2$ КУО/мл змиву. Така кількість відповідає вмісту практично здоровій шкірі собак, тобто проходить добре заживлення шкіри, адже дослідження змивів зі шкіри після повного одужання тварин і відміни застосування місцевої терапії на 24 – 29 добу виявило вміст стафілококів в обох групах 10^2 КУО/мл.

Отже, за глибокої піодермії собак, місцеве застосування стафілококових бактеріофагів дозволяє зменшувати контамінацію стафілококами та прискорити процес регенерації ураженої шкіри. Це дозволяє зменшити використання місцевих антибактеріальних мазей.

Зміни показників формених елементів крові до та після терапії Фагодермом, порівняно з традиційним лікуванням наведено в табл. 3.18.

Дані табл. 3.18 показують суттєві зміни морфологічних показників крові за глибокої піодермії до лікування собак. Зокрема, у контрольній групі тварин реєструється збільшення на 23,6 % відносного вмісту нейтрофілів, на 1,5 % лімфоцитів, на 2,8 та 2,0 % еозинофілів та базофілів, порівнюючи до верхньої межі фізіологічної норми.

Такі результати є свідченням запального процесу в організмі та алергічної реакції на подразник. Практично такі ж самі початкові показники крові були в контрольній групі тварин.

Водночас, дослідження даних показників крові після завершення курсу комплексного лікування із застосуванням місцево розробленого стафілококового бактеріофагу призвело до нормалізації усіх досліджених морфологічних показників крові. Це дає підставу до висновку, що зрошування ураженої

піодермією шкіри стафілококовим бактеріофагом Фагодерм забезпечує видужування тварини та нормалізації показників крові.

Тому ми вважаємо дуже ефективним застосування Фагодерму, особливо за піодермії, яка спричиняється стафілококами.

Таблиця 3.18

Морфологічні показники крові собак під час лікування глибокої піодермії бактеріофаговим препаратом Фагодерм, $M \pm m$

Показники	Дослідна група, n=5		Контрольна група, n=5		Фізіологічна норма
	до лікування	після лікування	до лікування	після лікування	
Лейкоцити, $10^9/\text{л}$	$15,64 \pm 0,87$	$10,15 \pm 0,36$	$16,08 \pm 0,80$	$9,56 \pm 0,24$	6,0-17,0
Нейтрофіли, $10^9/\text{л}$	$14,5 \pm 0,31$	$8,9 \pm 0,18$	$15,7 \pm 0,34$	$8,5 \pm 0,21$	3,62-12,3
Лімфоцити, $10^9/\text{л}$	$4,1 \pm 0,27$	$2,6 \pm 0,21$	$4,5 \pm 0,40$	$2,8 \pm 0,18$	0,83-4,91
Моноцити, $10^9/\text{л}$	$1,22 \pm 0,18$	$0,91 \pm 0,10$	$1,31 \pm 0,17$	$0,96 \pm 0,07$	0,14-1,97
Еозинофіли, $10^9/\text{л}$	$2,95 \pm 0,30$	$1,13 \pm 0,12$	$3,84 \pm 0,36$	$1,24 \pm 0,14$	0,04-1,62
Базофіли, $10^9/\text{л}$	$0,23 \pm 0,03$	$0,09 \pm 0,02$	$0,37 \pm 0,02$	$0,10 \pm 0,01$	0,00-0,12
Відносний вміст нейтрофілів, %	$104,6 \pm 3,4$	$73,4 \pm 2,5$	$111,5 \pm 2,9$	$70,7 \pm 2,5$	52,0-81,0
Відносний вміст лімфоцитів, %	$34,5 \pm 3,2$	$26,5 \pm 2,1$	$37,7 \pm 3,6$	$25,9 \pm 2,8$	12,0-33,0
Відносний вміст моноцитів, %	$7,6 \pm 0,3$	$6,1 \pm 0,2$	$8,2 \pm 0,2$	$7,7 \pm 0,3$	2,0-13,0
Відносний вміст еозинофілів, %	$12,8 \pm 0,6$	$7,4 \pm 0,3$	$14,4 \pm 0,7$	$6,9 \pm 0,3$	0,5-10,0
Відносний вміст базофілів, %	$1,5 \pm 0,2$	$0,9 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,3$	$0,8 \pm 0,2$	0,0-1,3

Продовж. табл. 3.18

Еритроцити, 10 ¹² /л	7,38±0,41	7,64±0,24	7,15±0,38	7,48±0,26	5,1-8,5
Гемоглобін, г/л	124,5±6,4	135,8±5,8	121,6±5,8	140,4±6,9	110-190
Гематокрит, %	35,8±0,6	38,6±0,6	34,9±0,6	37,8±0,9	33,0-56,0
Середній об'єм еритроцитів, 10 ¹⁵ /л	65,1±0,5	66,8±0,5	64,8±0,4	66,1±0,7	60,0-76,0
Середній корпускулярний гемоглобін, пг	24,3±0,3	25,7±0,3	25,1±0,2	25,9±0,3	20,0-27,0
Середня корпускулярна концентрація гемоглобіну, г/л	352,3±4,1	358,6±3,3	346,3±4,9	357,3±5,1	300-380
Міра відхилення розміру еритроциту, %	14,0±0,3	14,2±0,3	13,7±0,2	14,0±0,2	12,5-17,2
Кількість тромбоцитів, 10 ⁹ /л	408,7±10,3	384,8±8,5	419,6±13,5	391,6±9,3	117-490
Середній об'єм тромбоцитів, 10 ¹⁵ /л	9,8±0,2	9,9±0,2	9,6±0,2	9,8±0,3	8,0-14,1

Аналіз біохімічних показників крові собак за глибокої піодермії виявив подібну тенденцію до зміни їх у позитивну сторону за комплексного лікування препаратом Фагодерм табл. 3.19.

З отриманих даних спостерігаємо зміни в біохімічних показниках крові собак до лікування проти фізіологічної норми. Зокрема, відмічаємо зростання

біохімічних показників крові, які характеризують роботу печінки. Так, у хворих собак дослідної групи вміст АЛТ був на 11,5 Од/л, АСТ на 12,1 Од/л та загального білірубину на 4,4 мікромоль/л більший проти верхньої межі фізіологічної норми.

Таблиця 3.19

**Біохімічні показники крові собак під час лікування глибокої піодермії
бактеріофаговим препаратом Фагодерм, $M \pm m$**

Показники	Дослідна група, n=5		Контрольна група, n=5		Фізіологічна норма
	до лікування	після лікування	до лікування	після лікування	
Сечовина ммоль, л	6,54±0,71	5,77±0,07	7,12±0,63	6,57±0,06	3,28-10,42
Креатинін, мікромоль/л	37,8±0,6	36,9±0,5	38,1±0,8	37,8±0,7	35-124
Загальний білок, г/л	57,5±0,6	61,3±0,7	61,8±0,7	64,5±0,8	50-72
Глюкоза, мікромоль/л	4,6±0,3	4,5±0,3	4,8±0,3	4,9±0,4	4,2-7,1
АЛТ, Од/л	89,5±5,1	65,7±4,6	92,6±4,9	66,1±3,9	17-78
АСТ, Од/л	51,6±1,8	34,9±1,6	55,5±1,7	36,2±1,3	17-44
Лужна фосфатаза, Од/л	85,1±3,8	69,5±3,3	87,7±4,2	67,5±3,9	13-83
Загальний білірубін, мікромоль/л	13,4±1,3	6,9±1,0	15,5±1,3	6,9±1,0	1-9

Аналогічні показники біохімії крові реєстрували у контрольній групі тварин, які вказують на порушення функції печінки. Це вказує, що за глибокої піодермії відбувається інтоксикація організму різними токсинами, внаслідок

чого детоксикаційна функція її погіршується. До того ж, появу глибоких уражень шкіри у собак можна пояснити дією внутрішніх чинників, які знижують загальну резистентність організму, а мікробний фактор виступає як вторинний, який сприяє розвитку запалення шкіри. Тому, на нашу думку, біохімічне дослідження крові собак за піодермії необхідно робити для удосконалення напрямків комплексної терапії.

Після проведення комплексного лікування собак у дослідній та в контрольній групі спостерігаємо відновлення функції печінки до фізіологічних значень. Ззовні спостерігали загоєння уражених ділянок та відновлення шерстного покриву (рис. 3.15).



а) до лікування



б) після лікування

Рис. 3.15. Результати лікування собак з використанням препарату Фагодерм.

Загалом підсумовуючи результати третього розділу можна констатувати, що застосування місцево з лікувальною метою піодермії собак, розробленого нами бактеріофагового препарату Фагодерм, який складається з чотирьох фагів: *S.a 4*, *S.p 2*, *S.she 3*, *S.e 5* є ефективним, оскільки основна мікробіота уражених ділянок шкіри собак – це стафілококова. Даний препарат добре сприяв розвитку фагової інфекції серед стафілококів та зменшував їх популяцію на ураженій ділянці, як за поверхневої, так глибокої піодермії. До того ж, застосування бактеріофагових препаратів взамін антибіотиків для лікування піодермії собак навіть місцево дозволяє скоротити загальне використання антибіотиків й тим

самим внести певну лепту в зниженні формування антибіотикорезистентних штамів у ветеринарній медицині.

Результати дослідження, які висвітлені в даному підроздіді опубліковано в наступних наукових працях та рекомендаціях:

Stroich, V., & Horiuk, Y. (2024). Characteristics of the latent period of staphylococcal phages isolated from pyoderma in dogs. *Scientific Progress & Innovations*, 27 (3), 95–99. <https://doi.org/10.31210/spi2024.27.03.15> [20].

Строїч, В. В., & Горюк, Ю. В. Лікування піодермії собак бактеріофаговим препаратом «Фагодерм»: методичні рекомендації. Кам'янець-Подільський: ЗВО «ПДУ», 2024. 22 с. [21]

Строїч, В. В., & Горюк, Ю. В. Технічні умови ТУ У 21.2–22769675–002:2024. Препарат ветеринарний «Фагодерм». Кам'янець-Подільський, 2024. 18 с. [22].

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Шкірні захворювання є однією з найпоширеніших причин звернення власників домашніх собак у ветеринарні клініки [76, 196], а серед них піодермія вважається відносно поширеним діагнозом [37, 129, 150, 152]. У даному дослідженні було проведено ідентифікацію мікробіоти шкіри клінічно здорових собак та за піодермії. Встановлено, що мікробний пейзаж різних ділянок здорової шкіри собак представлений грампозитивною коковою мікрофлорою, серед якої КНС і КПС відносять до автохтонної мікрофлори, оскільки вони виділяються в 100 %, та більше як в 60 % випадків, відповідно. Інші представники грампозитивної мікробіоти (ентерококи, стафілококи, паличковидні форми) та грамнегативні палички за частотою виділення у більшості випадків не перевищують 10 %. Збільшення виділення грамнегативних бактерій можна відмічати із здорової шкіри з ділянок ближче до нижньої частини живота та ануса, що відносить дану мікрофлору шкіри до транзиторної і вказує на фекальне походження.

При ідентифікації стафілококової мікрофлори шкіри здорових собак встановлено, що серед КПС 57,3 % припадало на зоонозний вид *S. pseudintermedius*, 6,7 % – на частку *S. schleiferi subsp. coagulans* і тільки 2,2 % припадало на убіквітарний вид *S. aureus*, тобто до 70 % мікробіоти шкіри становлять стафілококи, які проявляють плазмокоагулюючі властивості. Наші результати узгоджуються з даними дослідників [55, 165], які повідомляють, що домінуючою мікрофлорою шкіри здорових собак є різні види коагулазопозитивних стафілококів, які колись відносилися до *S. aureus*, але завдяки розвитку молекулярно-генетичних методів ідентифікації був виокремлений вид *S. pseudintermedius*. Тому отримані дані вказують, що виділення коагулазопозитивних стафілококів зі здорової шкіри які, зазвичай, вважаються збудниками запальних процесів, ймовірно не вказує на їх патогенний потенціал.

За піодермії у наших дослідженнях КПС виділяли з ураженої шкіри в 100% випадків у монокультурі, зокрема, вид *S. pseudintermedius* – 85,8 %. Це дає підставу вважати, що мікробіоту здорової і ураженої шкіри за піодермії важко диференціювати, оскільки вид *S. pseudintermedius* є основним мікроорганізмом, який виділяється з даних біотопів. Дослідники [102, 129, 197] вважають, що етіологія і розвиток піодермії пов'язані із основною причиною, такою як зараження ектопаразитами, алергічні захворювання шкіри та ендокринопатії, які спричиняють порушення функції шкіри. При цьому надмірне розмноження бактерій на поверхні шкіри розглядається як другорядний чинник у патогенезі, що запускається домінантною причинною запалення. Враховуючи даний факт, ми погоджуємося з даними [36, 123, 191, 198], що зазвичай збудниками піодермії є мікроорганізми, які становлять резидентну мікробіоту здорової шкіри та слизових оболонок власне тварини. Оскільки наші дослідження виявили, що у складі мікробних асоціацій за піодермії завжди були присутні коагулазопозитивні види стафілококів, при цьому серед них вид *S. pseudintermedius* становив до 80 %. Очевидно питання, чому розвивається піодермія, особливо поверхнева її форма, яка часто рецидивує, ще повністю не вивчене. Це дає підставу до проведення наукових досліджень із застосуванням сучасних молекулярно-генетичних методів з вивчення вірулентних властивостей у коагулазопозитивних видів стафілококів, виділених від здорових тварин, так і за піодермії. Оскільки за даними [129, 196] у 95 % лікування піодермії передбачає застосування антибактеріальних препаратів як загального, так і місцевого впливу, для зменшення колонізації та вірулентної дії збудників запалення, які вважаються нормальною мікрофлорою здорової шкіри. До того ж, часте застосування антибіотиків загальної дії за піодермії вважається однією з причин розповсюдження антибіотикорезистентних бактерій у середовищі мешкання собак [121, 122, 144, 145]. Тому питання пошуку нових альтернативних антибіотикам методам лікування та профілактики даного захворювання є й надалі актуальним.

Отже, зважаючи на накопичений значний теоретичний та практичний матеріал з етіології, патогенезу, лікування та профілактики піодермії в собак, на даний час проблема полягає в тому, що тваринам застосовують антибіотики ідентичні як в гуманній медицині, що призводить до формування стійких збудників, особливо за даної патології *MRSP*.

Поверхнева піодермія собак – це шкірна інфекція, спричинена такими бактеріями як: *S. pseudintermedius*, *S. schleiferi*, *S. epidermidis*, *Escherichia coli* та видами родів *Pseudomonas* і *Proteus* [121, 122]. Хоча вважається, що піодермія у собак виникає як вторинний симптом і є проявом основної хвороби, разом з тим під час лікування даного гнійно-запального процесу застосовують антибіотики системної дії [75, 196]. У наших дослідженнях, які мали на меті порівняти чутливість до антибіотиків у бактерій, виділених зі шкіри здорових собак та основних збудників, які виділяються за піодермії, встановлено наступне. Основні види мікробіоценозу шкіри здорових собак *S. pseudintermedius*, *S. epidermidis* та *S. saprophyticus* були високочутливими до беталактамного антибіотику пеніцилінового ряду амоксициліну з клавулановою кислотою, цефалоспоринових антибіотиків I – IV покоління (цефалексину, цефтріаксону й цефквіному) та фторхінолонового антибіотику марбофлоксацину, так як чутливість бактерій становила від 82,3 до 100 %. Дещо нижча чутливість була у даних бактерій до тілозину та тетрацикліну – в межах 76,4 – 90,9 %. Це дає підставу вважати, що дані представники бактерій нормобіоценозу шкіри собак не піддавалися дії антимікробних препаратів і в них не відбулося формування антибіотикостійкості. Про високу чутливість мікрофлори шкіри здорових собак до антимікробних препаратів повідомляють й інші дослідники [106, 122], які вважають, що мікробна флора на поверхні шкіри є важливим захисним шаром для підтримки здоров'я шкіри та всього мікросередовища. Ці бактерії можуть активно виділяти певні речовини з антибіотичними властивостями, щоб пригнічувати проліферацію чужорідних мікроорганізмів або здійснювати очисний ефект [48, 66].

Під час оцінки антибіотикограми у бактерій, виділених за піодермії, яка проявлялася вперше у собак, встановлено, що основний мікроорганізм, який виділяється з вогнища запалення – *S. pseudintermedius* у більшості випадків був високочутливий (72,9 – 86,5 %) до найбільш часто застосованих антибіотиків (амоксициліну з клавулановою кислотою, цифалоспоринів і фторхінолонів), що суттєво не відрізняється від антибіотикограми здорових собак. До того ж, виділені за поверхневої піодермії кишкова та синьогнійна палички також були високочутливі до цефалоспоринових й фторхінолонового антибіотику – від 73,7 до 96,5 %. Проте, проявляли помірну стійкість до тілозину й тетрацикліну, оскільки чутливість була в межах 40 – 70 %. Такі результати подібні до даних [25, 29], які вказують на високу ефективність таких системних антибіотиків за піодермії собак як амокцицилін з клавулановою кислотою, цефалексин, кліндоміцин. Однак необхідно відмітити, що комбіновані антибіотики пеніцилінового ряду амокцицилін з клавулановою кислотою є малоефективними до збудників *E.coli* й *P.aeruginosa* [88, 114, 129].

Тому можна припустити, що бактеріальний посів з вогнищ запалення має обмежене значення для первинної діагностики піодермії, оскільки мікрофлора практично ідентична, як у здорової шкіри собак. Водночас з іншого боку, ідентифікація бактеріальної культури та проведення тесту на чутливість до антибактеріальних препаратів є важливим для вибору ефективної системної терапії [89, 144]. Застосування антибіотиків емпірично призводить до формування антибіотикорезистентності [90, 175], адже стійкість бактеріальних популяцій до антимікробних засобів є явищем природним й життєво важливим для виживання бактерій [91, 115].

Оцінка антибіотикограми у виділених збудників за піодермії, яка реєструвалася у собак повторно, виявила стійкіші стафілококи, кишкову й синьогнійну паличку до антибіотиків. Зокрема, чутливість *S. pseudintermedius* до амокцициліну з клавулановою кислотою була 58,0 %, до цефалоспоринових антибіотиків й марбофлораксацину в діапазоні 64,5 – 74,2 %. Найменше чутливих культур *S. pseudintermedius* було до тілозину й тетрацикліну – на рівні 50 %.

Аналогічну тенденцію відмічали при визначенні чутливості у *E.coli* й *P.aeruginosa*, винятком були лише антибіотики тілозин й тетрациклін, до яких були чутливими 30 – 40 % даних культур. До того ж, амоксицилін з клавулановою кислотою зовсім не діяв на культури кишкової палички, виділені за піодермії при цих умовах. Про виділення стійких штамів стафілококів за піодермії в собак повідомляють багато дослідників [34, 122, 162, 196], зокрема [122], вказує, що *S. pseudintermedius* був стійкий у 76,6 % випадків до ампіциліну, 72,3 % до пеніциліну G, 55,3 % до доксицикліну, 48,9% до гентаміцину, 40,4 % до кліндаміцину, 31,9% до енрофлосацину, 25,5 % до цефалексину та цефазоліну та 21,2 % до аугментину. Під час аналізу множинної лікарської стійкості 70,2 % штамів *S. pseudintermedius* і 83,3 % інших штамів стафілококів були полістійкими. Саме набуття генів з множинною лікарською стійкістю у бактеріальних патогенів за піодермії є проблемою, яка спричинили жахливу загрозу для здоров'я людей і тварин [41, 112]. До того ж, ситуація ускладнюється тим, що собакам у більшості випадків назначають антибіотики, які використовують у гуманній медицині, як наслідок, з'явився MRSP метицилінрезистентний *S. pseudintermedius* [29, 121, 150, 172].

Отже, піодермія собак потребує відповідного антимікробного лікування, щоб зменшити симптоми і обмежити поширення патогенів потенційно стійких до множинних лікарських засобів серед домашніх тварин і людей. Застосування мікробіологічних посівів з ізоляцією збудників та визначення антимікробної чутливості є однією з умов зменшення розповсюдження резистентних мікроорганізмів та ефективного лікування. До того ж, на законодавчому рівні вводяться різні обмеження щодо використання антимікробних препаратів у ветеринарній медицині, тому пошук нових високоефективних та безпечних методів лікування інфікованих вогнищ є альтернативою за піодермії собак.

Фаготерапія відноситься до актуального і перспективного способу лікування багатьох запальних процесів з мікробним чинником. Основною запорукою позитивного лікувального ефекту є використання високолітичних фагів, наявність фагів у вогнищі запалення специфічних до даних збудників,

висока концентрація фагів у середовищі дії та відсутність лізогенного процесу у фагів [50, 62]. Тому для підтримування активної літичної фагової індукції на конкретному біотопі найдоцільніше є виділення з даного вогнища специфічних фагів до збудників, які викликають запальний процес. Це чітко проглядається з результатів наших досліджень, які виявили, що коагулазопозитивні й коагулазонегативні види стафілококів, які виділені від собак, не лізувалися бактеріофаговими препаратами, призначеними для лікування людей Піофаг, Інтестіфаг та препаратом для лікування маститу корів Фагомаст. Водночас, препарати Піофаг та Інтестіфаг лізували музейний штам *S. aureus* ATCC 6538. Таку літичну дію фагів можна пояснити наявністю різних біотипів коагулазопозитивних стафілококів в природі: *S. aureus* var. *hominis*, *S. aureus* var. *bovis*, *S. aureus* var. *canis*, *S. aureus* var. *canis* [91, 92, 116]. Тому враховуючи специфічність літичних фагів до коагулазопозитивних стафілококів навіть в межах біологічного походження нами для створення бактеріофагового препарату, активного до основних збудників (стафілококів) піодермії собак проведено дослідження з виділення фагів зі шкіри здорових та хворих на піодермію собак. Встановлено частіше виявлення фагів коагулазопозитивних стафілококів із змивів зі шкіри хворих на піодермію тварин, ніж від здорових. При цьому найбільше проб було із вмістом літичних фагів до клітин *S. pseudintermedius* – 21,7 % у змивах зі здорової шкіри, та 28,6 % у змивах від хворих тварин. Змивів, у яких були літичні фаги до *S. aureus* було 8,7 та 14,3 %, відповідно, також частіше в 1,8 раза виділялися фаги із вогнищ запалень, які лізували клітини *S. schleiferi* subsp. *coagulans*. Водночас, із здорової шкіри собак частіше в 1,4 раза виділялися фаги літичні до КНС *S. epidermidis*, ніж із шкіри за піодермії. Отримані результати узгоджуються з думкою дослідників [199, 201] про те, що під час створення фагового препарату доцільніше використовувати композицію фагів, специфічних до декількох збудників, які вважаються етіологічним фактором розвитку запалення. У нашому випадку ми пропонуємо у фаговий препарат для лікування піодермії собак використати чотири ізольовані та ідентифіковані фаги, такі як *S.a 4* активний щодо *S. aureus*; *фаг S.p 2* літичний

щодо *S. pseudintermedius*; фаг *S.she 3* – щодо *S. schleiferi subsp. coagulans*; фаг *S.e 5* – щодо *S. epidermidis*. За даними багатьох дослідників [29, 32] із уражених ділянок шкіри за поверхневої й глибокої піодермії собак найчастіше виділяються коагулазопозитивні стафілококи видів *S. pseudintermedius*, *S. schleiferi subsp. coagulans*, *S. aureus*. Тому у подальших дослідженнях було важливо виявити чи проявляють літичну активність ізольовані нами чотири фаги до виділених видів стафілококів з уражених ділянок за піодермії, оскільки у фаговий препарат можна відбирати тільки високолітичні фаги, які не перебувають у лізигенному стані [28, 96].

Встановлено, що виділені чотири фаги *S.a 4*, *S.p 2*, *S.she 3* й *S.e 5* проявляли 100 % активність щодо лізису клітин своїх господарів. У межах 50 % спостерігалася перехресна літична дія фагів *S.a 4*, *S.p 2* на види *S. aureus* та *S. pseudintermedius* та в середньому 20 % вони лізували клітини виду *S. schleiferi subsp. coagulans*. У фагів *S.she 3* та *S.e 5* перехресна літична активність щодо інших видів стафілококів була менш виражена. У дослідженнях [87] наводяться дані про високу специфічність стафілококового фагу *Phage SAvB14*, щодо збуднику маститу *S. aureus* та його слабка літична активність відносно інших стафілококів. Під час розроблення фагового препарату для профілактики сальмонельозів у птиці дослідники [33] виявили, що бактеріофаговий коктейль, що складався з кількох фагів, був більш ефективним щодо лізису *Salmonella spp.*, ніж один фаг. До того ж, коктейль, отриманий з *Salmonella enterica* серовар *Enteritidis* і серовар *Typhimurium*, також був здатний сприяти лізису інших сероварів *Salmonella*. Це узгоджується з нашими даними, що навіть в межах одного роду й виду бактерій існує велика специфічність щодо дії літичних фагів на цільові клітини. Тому під час розробки препаратів фагів необхідно проводити ґрунтовний аналіз літичних властивостей виділених бактеріофагів та підбирати ті, які проявляють широкий спектр лізису різних видів цільових бактерій.

Отже, отримані дані вказують, що фаготерапія може бути ефективною щодо збудників піодермії собак, за якої місцево застосовують антибактеріальні мазі на основі антибіотиків. Виділені чотири стафілококові фаги проявляли

добру літичну активність щодо своїх клітин-господарів та навіть перехресну між видами коагулазопозитивних стафілококів. Такі результати є обнадійливими щодо можливого використання ізольованих нами стафілококових фагів *S.a 4*, *S.p 2*, *S.she 3* й *S.e 5* у препараті для лікування стафілококової піодермії в собак.

Фаги можуть бути використані з лікувальною метою лише в тому випадку, якщо вони проявляють літичний цикл розвитку у клітинах своїх господарів, адже лізогенні штами вірусу не здатні до лізису бактеріальних клітин [117, 187]. Тому виділені нами чотири стафілококові фаги були перевірені на інтенсивність розвитку фагової інфекції в умовах *in vitro*. Встановлено, що виділені чотири літичні фаги до культур стафілококів, які виявляються у запальному процесі за піодермії, мали латентний період від 40 до 50 хв, при цьому кількість вивільнених віріонів становила від 6,71 до 7,91 log БУО/мл. Такий латентний період та кількість вивільнених віріонів є цілком задовільним для використання даних фагів у технології виробництва фагового препарату, оскільки результати [4] повідомляють про використання фагу *Phage SAvB14* з латентним періодом 30 – 50 хв у ветеринарному препараті для лікування запалення вимені в корів.

Важливою частиною роботи було з'ясувати температурні межі стійкості виділених бактеріофагів, перспективних для створення препарату для лікування піодермії [4, 5]. Це необхідно для того, щоб визначити за якої температури фаги будуть проявляти найкращий інфекційний процес, до того ж, для вибору безпечного режиму зберігання. Встановлено, що витримування дослідних фагів за температури $+30 \pm 1$ °C не спричиняє статистично вірогідних змін у їх кількості протягом 60 хв тривалості експерименту. Водночас, підвищення температури витримки фагів до $+45$ °C зумовило повільне зниження життєздатності протягом часу дії експерименту 60 хв. Зокрема, через 40 хв кількість фагів, в середньому зменшувалася в 1,3 раза, а через 60 хв – у 2 – 3 рази. При цьому відмінності у зменшенні між окремими фагами суттєво не виявлено. Це дає підставу вважати, що виділені чотири стафілококових фаги будуть добре проявляти літичну активність на шкірі хворих піодермією собак за умов навколишнього середовища. Водночас, зберігання бактеріофагів за температури

вище + 45 °C буде суттєво знижуватись їх активність з поступовим відмиранням. Отримані такі результати узгоджуються з дослідженнями [86, 87], проте що активність фагів у бактеріофаговому препараті Фагомаст зменшувалася за культивування вірусів за температури + 45 °C і практично не проявлялася за температури + 65 °C.

Оскільки наш бактеріофаговий препарат має проявляти свою протимікробну активність на поверхні шкіри собак, яка має рН близько 6 од [6], то важливо було визначити оптимальне значення рН середовища, за якого будуть активні фаги. Виявлено, за кислого рН бульйону кількість літичних фагів була, в середньому, на 3,1 порядки менша, порівнюючи з рН 6 та 7 од, за якого відмічали найбільшу кількість життєздатних вірусів до 7,9 log БУО/мл. Також відмічено, що слаболужне рН середовища менш згубно впливало на кількість фагів у бульйоні, ніж кисле, оскільки за рН бульйону 8 од титр бактеріофагів становив 6,5 – 6,7 log БУО/мл.

Отже, виділені чотири літичні фаги проти КПС й КНС максимально будуть проявляти свою активність за рН шкіри собак. Тому бактеріофаговий препарат для нанесення на уражену шкіру собак для максимальної літичної дії необхідно конструювати з рН в межах 6 – 7 од.

Дослідники [52, 81, 146, 178] вказують, що ефективність будь-якої фаготерапії залежить від контакту застосованого фагу й цільової бактеріальної клітини. При цьому фагову інфекцію на ураженій ділянці можна підтримувати двома способами: активним, коли за великої кількості бактерій у середовищі вірус лізує їх і проходить інтенсивне розмноження фагу із зараженням нових бактерій; або пасивним, коли постійно вноситься у середовище нова кількість активних літичних фагів, які заражають наявні бактеріальні клітини. Враховуючи такий фаговий процес, нами досліджено літичну дію виділених стафілококових фагів в залежності від кількості їх та цільових клітин у середовищі. Встановлено, що зараження бульйонної культури стафілококів фагами *S.a* 4, *S.p* 2, *S.she* 3 та *S.e* 5 у кількості від 10^7 до 10^8 БУО/мл дозволяє підтримувати інтенсивний інфекційний процес до 12 год з практично повним

лізисом бактерій. Внесення у поживний бульйон стафілококів у кількості 10^3 та 10^4 КУО/мл та стафілококового бактеріофагу *S.p 2* у кількості 10^7 – 10^8 БУО/мл забезпечує повний лізис бактерій протягом 12 год, а за початкової кількості стафілококів у бульйоні 10^6 – 10^7 КУО/мл активний інфекційний процес з повним лізисом *S. pseudintermedius* проходив 24–36 год.

Отже, інфікування бульйонної культури бактеріофагами: *S.a 4*, *S.p 2*, *S.she 3* та *S.e 5* у кількості від 10^7 до 10^8 БУО/мл спричиняє активний інфекційний процес лізису бактерій протягом 12 год періоду. Тому при створенні композиції бактеріофагового препарату необхідно, щоб кількість цих літичних фагів була 10^7 – 10^8 БУО/мл. Повідомляється [2, 9, 24, 49, 214,], що такі комерційні бактеріофагові препарати, як Фагомаст[®], Інестіфаг[®], Піофаг[®], SalmoFREE[®], Bafasal[®], Biotector S1[®] містять у своєму складі не один фаг, а декілька активних щодо різних видів й родів бактерій у кількості не менше 10^6 БУО/мл. Це дозволяє розширити їх антибактеріальний спектр дії, оскільки збудники у більшій мірі на слизових оболонках знаходяться у змішаній мікробіоті. Тому ми підтримуємо думку даних дослідників, що у фагому препараті повинен бути вміст бактеріофагів, достатній для активної й пасивної фаготерапії.

Враховуючи дані літературних джерел [4, 3, 129, 150, 197] та на підставі системних лабораторних досліджень, нами розроблено стафілококовий бактеріофаговий препарат Фагодерм, у складі якого наявні чотири бактеріофаги специфічні до збудників піодермії собак: *S.a 4*, *S.p 2*, *S.she 3* та *S.e 5* у кількості 10^7 – 10^8 БУО/мл. Встановлено, що стабільність фагового препарату Фагодерм (прозорість, рН, стерильність, концентрація літичних фагів) суттєво не змінюються протягом 6 місяців його зберігання у побутовому холодильнику ($+5 \pm 1$ °C). За використання методу «прискореного старіння», зберігання при $+20$ °C протягом 5 діб, концентрація фагів у препараті зменшилася в 1,6 раза, водночас все ще становила більше 10^7 БУО/мл. Дослідження на 10 добу зберігання препарату Фагодерм виявили зменшення концентрації фагів, в середньому, на один порядок, проте їх титр був більшим вище мінімально допустимої кількості 10^4 БУО/мл. Такі результати співпадають з даними [4, 8,

16], про необхідність холодильного зберігання бактеріофагових препаратів для попередження поступового відмирання вірусів.

Нові фармакологічні препарати перш, ніж мають бути використані у клінічній практиці, обов'язково повинні бути досліджені токсикологічно за певними показниками [13, 68, 132,]. Практично усі дослідники вказують на нетоксичність бактеріофагових препаратів [1, 12, 17, 58, 156, 182], в чому і полягають їх основні переваги перед хімічними антибактеріальними препаратами. Проведені нами токсикологічні дослідження виявили, що препарат Фагодерм з титром літичних фагів 10^8 БУО/мл в дозі від 5500 до 10000 мг/кг живої маси мишей мав ЛД₀, тобто є переносимим і нетоксичним антибактеріальним засобом. Також у випадку довготривалого застосування піддослідним тваринам не відмічали ознак хронічної токсичності.

Розроблений препарат Фагодерм не проявляв подразнюючої та сенсibilізууючої дії протягом 15-добового нанесення на шкіру морських свинок. До того ж, не спричиняв шкірно-резорбтивної дії, оскільки ознак запалення шкіри хвостів у мишей не виявлено, при цьому зміни в кількості рідини також не було, що є свідченням відсутності всмоктування препарату через шкіру. Наші дослідження узгоджуються з даними [17] про використання гелю із стафілококовим бактеріофагом, який є нетоксичний і не спричиняв алергічних і шкірних реакцій [17]. Препарат Фагомаст, який містить стафілококовий бактеріофаг, також не чинив подразнюючої, шкірно-резорбтивної, сенсibilізууючої дії [4]. Бактеріофагові препарати SalmoFREE®, Bafasal®, Biotector S1® з вмістом «коктейлів» фагів, літичних до сальмонел для лікування птиці також є цілком безпечним і можна використовувати на будь якій стадії виробництва [2, 49, 214]. Тому ми на підставі наших результатів та даних інших дослідників, як вітчизняних, так закордонних узагальнюємо, що бактеріофагові препарати є нетоксичними і можуть використовуватися без ризику спричинення алергічних і токсичних реакцій у випадку їх застосування.

Розробка препарату має показати свою ефективність не тільки в умовах *in vitro*, але й за практичного застосування, зокрема, бактеріофаговий препарат

Фагодерм у ветеринарних клініках за лікування піодермії собак, де основними збудниками є КПС й КНС [54, 180]. Дослідження з вивчення терапевтичної дії препарату Фагодерм виявили, що він є ефективним для лікування поверхневої й глибокої піодермії собак, оскільки за концентрації фагів 10^7 – 10^8 БУО/мл повний терапевтичний ефект досягався на одну-дві доби швидше, або одночасно як у контрольній групі. Мікробіологічна характеристика процесу лікування способом зрошення уражених ділянок Фагодермом сприяє зменшенню стафілококів на 4–5 порядків до 10^2 КУО/мл змиву. При цьому кількість стафілококів на шкірі після загоювання уражених ділянок відповідала вмісту нормомікробіоценозу даного біотопу. Отже, бактеріофаговий препарат Фагодерм рекомендується застосовувати в комплексній терапії собак за піодермії способом зрошення уражених ділянок шкіри 5 – 8 разів на добу до повного загоєння.

Узагальнюючи увесь комплекс проведених досліджень за темою відзначаємо, що застосування стафілококових бактеріофагів у комплексній терапії піодермії собак забезпечувало нормалізацію вмісту нейтрофілів, еозинофілів та базофілів, які найчастіше зростають за даного захворювання та нормалізації біохімічних показників крові. До того ж, застосування бактеріофагових препаратів взамін антибіотиків для лікування піодермії собак навіть місцево дозволяє скоротити загальне використання антибіотиків й, тим самим, внести певну лепту в зниження формування антибіотикорезистентних штамів у ветеринарній медицині. Ми погоджуємося з думками [42, 44, 58, 156, 182, 213], що препарати бактеріофагів або на основі білків фагів мають перспективність застосування у ветеринарній медицині, оскільки є альтернативними антибіотикам антибактеріальними препаратами, які діють на суто специфічні збудники, не порушуючи мікробіоценоз біотопу та не спричиняючи розвитку антибіотикорезистентності серед бактерій. Впровадження препарату Фагодерм у ветеринарну медицину є цілком логічним і перспективним. Таким чином, мета нашого дослідження – експериментально обґрунтувати та розробити високолітичний бактеріофаговий препарат для лікування піодермії собак досягнена й виконана.

ВИСНОВКИ

У дисертаційному дослідженні на основі експериментальних даних щодо мікробіоти здорових та хворих на піодермію собак, результатів антибіотикограм, розроблено стафілококовий бактеріофаг Фагодерм літичний до основних збудників піодермії. Визначено його спектр літичної дії, стабільність за зберігання, проведено токсикологічні дослідження й клінічні випробування за лікування піодермії собак. Розроблено спосіб й режим застосування препарату Фагодерм.

1. Коагулазонегативні та коагулазопозитивні види стафілококів виділяються зі шкіри здорових собак у 100 та 60-68,5 % випадків, відповідно. Коагулазопозитивний вид *S. pseudintermedius* та коагулазо-варіабельний вид *S. schleiferi subsp. coagulans* займають основну нішу – до 65 %, на частку КНС припадає до 30 % від усіх ідентифікованих стафілококів.

2. Збудником за піодермії у монокультурі був вид *S. pseudintermedius* в 85,8% випадків. У 57,1 % випадків асоціація за піодермії була представлена КПС та кишковою паличкою, у 4,0 раза рідше виявляли мікробну асоціацію з КПС та синьогнійною паличкою – 14,3 % випадків. У 28,6 % випадків мікробних асоціацій входили КПС, протей у поєднанні з кишковою або синьогнійною паличками.

3. Основні види мікробіоценозу шкіри здорових собак *S. pseudintermedius*, *S. epidermidis* та *S. saprophyticus* були високочутливими до беталактамного антибіотику пеніцилінового ряду амоксициліну з клавулановою кислотою, цефалоспоринових антибіотиків I – IV покоління (цефалексину, цефтріаксону й цефквіному) та фторхінолонового антибіотику марбофлоксацину, так як чутливість бактерій становила від 82,3 до 100 %.

4. За піодермії собак, яка реєструвалася повторно, виявляли стійкіші до антибіотиків стафілококи, кишкову й синьогнійну палички. Чутливість *S. pseudintermedius* до амоксициліну з клавулановою кислотою була 58,0 %, до цефалоспоринових антибіотиків й марбофлоксацину – в діапазоні 64,5 – 74,2 %.

Аналогічну тенденцію відмічали при визначенні чутливості у *E.coli* й *P.aeruginosa*, винятком були лише антибіотики тілозин й тетрациклін, до яких були чутливими 30 – 40 % даних культур.

5. Наявні на ринку медичні бактеріофагові препарати Піофаг[®], Інестіфаг[®] та розроблений ветеринарний препарат Фагомаст[®] не проявляли літичної активності щодо основних збудників піодермії собак: *S. pseudintermedius*, *S. aureus*, та *S. schleiferi subsp. coagulans*. Очевидно в якості господарів вірусів у даних препаратах використано стафілококи біотипу людини (*S. aureus* var. *hominis*), а у препараті Фагомаст[®] – біотипу великої рогатої худоби (*S. aureus* var. *bovis*).

6. З вогнищ запалення за піодермії собак виділено та ідентифіковано чотири літичних стафілококових фаги, зокрема, фаг *S.a* 4 активний щодо *S. aureus*; фаг *S.p* 2 літичний щодо *S. pseudintermedius*; фаг *S.she* 3 – щодо *S. schleiferi subsp. coagulans*; фаг *S.e* 5 – щодо *S. epidermidis*. Дані фаги проявляли в 100 % активність щодо лізису клітин своїх господарів, у межах 50–55 % спостерігалася перехресна літична дія фагів *S.a* 4, *S.p* 2 на види *S. aureus* та *S. pseudintermedius* та в середньому 20 % вони лізували клітини виду *S. schleiferi subsp. coagulans*. Такий латентний період та кількість вивільнених віріонів є прийнятним для використання даних фагів у технології виробництва фагового препарату.

7. У виділених фагів *S.a* 4, *S.p* 2, *S.she* 3 та фаг *S.e* 5 латентний період становив від 40 до 50 хв, при цьому кількість вивільнених віріонів коливалася в межах 6,71–7,91 log БУО/мл. Оптимальна температура для розвитку даних фагів була від 30 до 40 °C, а за температури вище 45 °C відбувається поступове зниження їх життєдіяльності. За кислого рН середовища (4,0 од) кількість літичних фагів була, в середньому на 3,1 порядки менша, порівнюючи з рН 6 та 7 од, за якого відмічали найбільшу кількість життєздатних вірусів до 7,9 log БУО/мл.

8. Зараження бульйонної культури стафілококів фагами *S.a* 4, *S.p* 2, *S.she* 3 та *S.e* 5 у кількості від 10^7 до 10^8 БУО/мл дозволяє підтримувати інтенсивний

інфекційний процес до 12 год з практично повним лізисом бактерій. Внесення у поживний бульйон стафілококів у кількості 10^3 та 10^4 КУО/мл та стафілококового бактеріофагу *S.p 2* у кількості 10^7 – 10^8 БУО/мл забезпечує повний лізис бактерій протягом 12 год, а за початкової кількості стафілококів у бульйоні 10^6 – 10^7 КУО/мл активний інфекційний процес з повним лізисом *S. pseudintermedius* проходив 24–36 год.

9. Розроблено стафілококовий бактеріофаговий препарат Фагодерм, у складі якого наявні чотири фаги специфічні до збудників піодермії собак: фаг *S.a 4*, фаг *S.p 2*, фаг *S.she 3* та *S.e 5* у кількості 10^7 – 10^8 БУО/мл. Встановлено, що стабільність фагового препарату Фагодерм (прозорість, рН, стерильність, концентрація літичних фагів) суттєво не змінюються протягом 6 місяців його зберігання у побутовому холодильнику ($+ 5 \pm 1$ °C).

10. Препарат Фагодерм з титром літичних фагів 10^8 БУО/мл в дозі від 5500 до 10000 мг/кг живої маси мишей мав LD_{50} , тобто є переносимим і нетоксичним антибактеріальним засобом. Також у випадку довготривалого застосування піддослідним тваринам не відмічали ознак хронічної токсичності. Розроблений препарат Фагодерм не проявляв подразнюючої та сенсibiliзуючої дії протягом 15-добового нанесення на шкіру морських свинок. До того ж, не спричиняв шкірно-резорбтивної дії, оскільки ознак запалення шкіри хвостів у мишей не виявлено, при цьому зміни в кількості рідини також не було, що є свідченням відсутності всмоктування препарату через шкіру.

11. Препарат Фагодерм є ефективним для лікування поверхневої й глибокої піодермії собак, оскільки за концентрації фагів 10^7 – 10^8 БУО/мл повний терапевтичний ефект досягався на одну-дві доби швидше, або одночасно як у контрольній групі. Мікробіологічна характеристика процесу лікування способом зрошення уражених ділянок Фагодермом сприяє зменшенню стафілококів на 4–5 порядків до 10^2 КУО/мл змиву. При цьому кількість стафілококів на шкірі після загоювання уражених ділянок відповідала вмісту нормомікробіоценозу даного біотопу.

12. Застосування стафілококових бактеріофагів у комплексній терапії піодермії собак забезпечувало нормалізацію вмісту нейтрофілів, еозинофілів та базофілів, які найчастіше зростають за даного захворювання та нормалізації біохімічних показників крові.

ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

1. Бактеріофаговий препарат Фагодерм рекомендується застосовувати в комплексній терапії собак за піодермії способом зрошення уражених ділянок шкіри 5 – 8 разів на добу до повного загоєння. (Бактеріофаговий препарат «Фагодерм» ТУ У 21.2–22769675–002:2024).

2. Результати дисертаційної роботи пропонуються до впровадження у навчальний процес з підготовки магістрів за спеціальністю 211 – Ветеринарна медицина із навчальних дисциплін: ветеринарна фармакологія, ветеринарна мікробіологія, внутрішні незаразні хвороби тварин, загальна та спеціальна хірургія, тощо.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ЛІТЕРАТУРИ

1. Астаф'єва, О. Ю., Астаф'єва, О. Ю., Стрілець, О. П., Стрилець, О. П., Стрельніков, Л. С., & Стрельников, Л. С. (2014). Основні переваги використання бактеріофагів для лікування інфекційних захворювань. *Сучасні досягнення фармацевтичної технології: Матеріали IV науково-практичної конференції з міжнародною участю (16-17 жовтня 2014 р.). - Х.: Вид-во НФаУ*, 35.
2. Войчік, Е. А., Войтасік, А., Горечка, Е., Станчик, М., & Дастич, Я. (2015). Застосування препарату бактеріофага бафасал® у курчат-бройлерів, експериментально заражених *Salmonella spp.*. *Науково-технічний бюлетень Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок і Інституту біології тварин*, (16, № 2), 241-251.
3. Горюк, Ю. В. (2021). Визначення ефективності застосування препарату Фагомаст з різними титрами Phage SA_vB14. *Науковий вісник ветеринарної медицини*, 2, 57–64.
4. Горюк Ю. В. Обґрунтування, розробка та застосування бактеріофагового препарату для лікування корів, хворих на мастит [Електронний ресурс] : дисертація на здобуття наукового ступеня доктора ветеринарних наук за спеціальністю 16.00.04 – ветеринарна фармакологія та токсикологія. – Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького, Львів, 2023. 346 с.
5. Гуменюк, В. В. (2018). Біологія та екологія бактеріофагів (оглядова стаття). *Ветеринарна біотехнологія*, (32 (2)), 112-121.
6. Іванова, О. В., Иванова, Е. В., Гиль, М. І., Гиль, М. И., Литвиненко, Т. В., Шевченко, С. С., & Трофименко, А. О. (2010). Біологія собаки. Навчальний посібник: Миколаїв, 351 с.
7. Жила, М. І., Коцюмбас, І. Я., & Стронський, Ю. С. (2013). Основні підходи до вивчення ефективності ветеринарних препаратів імуномодулюючої дії. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій ім. Гжицького*, (15, № 1 (1)), 53-59.

8. Інтестіфаг® бактеріофаг полівалентний (Intestifag® polishing bacteriophag) <https://compendium.com.ua/dec/326589/>
9. Калініченко, С. В., Мартинов, А. В., Торяник, І. І., & Мелентьєва, Х. В. (2023, January). Визначення режимів фото динамічної інактивації вірусів на моделі стафілококового бактеріофагу. In *The 11 th International scientific and practical conference "Modern research in world science" (January 29-31, 2023) SPC "Sci-conf. com. ua", Lviv, Ukraine. 2023. 1579 p.* (p. 178).
10. Калашнікова, Ю. В., & Сухонос, В. П. (2014). Видовий склад та стійкість до антибіотиків мікрофлори шкіри здорових і хворих на піодермію собак. *Науковий вісник ветеринарної медицини*, (13), 102.
11. Климнюк, С. І., Ситник, І. О., Творко, М. С., Широбоков, В. П. (2004). Практична мікробіологія. *Посібник. Тернопіль: Укрмедкнига*, 440 с.
12. Коцар, О. В., Кочнєва, О. В., Долгова, Т. С., & Малюченко, А. Ю. (2016). Альтернативний засіб санації резидентних носіїв золотистого стафілокока. *Інфекційні хвороби*, (2), 54-57.
13. Коцюмбас, І. Я., Малик, О. Г., Патерега, І. П., Тішин, О. Л., & Косенко, Ю. М. (2006). Доклінічні дослідження ветеринарних лікарських засобів та ін.; За ред. ІЯ Коцюмбаса. In *Львів: Триада плюс*, 360 с.
14. Кухтин, М. Д., & Салата, В. З. (2023). Мікробіологічні та біохімічні процеси у м'ясі яловичини за холодильного зберігання: монографія. *Тернопіль: Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя*, 305 с.
15. Лігоненко, О. В., Борисенко, М. М., Дігтяр, І. І., Іващенко, Д. М., Зубаха, А. Б., Чорна, І. О., ... & Лігоненко, О. О. (2015). Використання бактеріофагів у комплексі лікування вогнепальних ран м'яких тканин у хворих за полівалентної алергії до антибіотиків. *Клінічна хірургія*, (10), 65-66.
16. Піофаг бактеріофаг полівалентний. (б. д.). <https://compendium.com.ua/uk/result/?term=ПІОФАГ%20БАКТЕРІОФАГ%20ПОЛІВАЛЕНТНИЙ>
17. Стрельников, Л. С., Ткач, М. М., Стрілець, О. П., Єрещенко, О. А., Кабачний, Г. І., Ткач, М. Н., ... & Кабачний, Г. И. (2011). Дослідження гострої

токсичності гелю з бактеріофагом стафілококовим. *Український біофармацевтичний журнал*, 3(14), 59-61.

18. Строїч, В. В., & Горюк, Ю. В. (2023). Аналіз чутливості до антибіотиків мікробіоти шкіри здорових собак та за піодермії. *Podilian Bulletin Agriculture Engineering Economics*, (41), 75–82.

19. Строїч, В. В., & Горюк, Ю. В. (2024). Оцінка наявних бактеріофагових препаратів на ринку України та виділення фагів специфічних до збудників піодермії собак. *Podilian Bulletin Agriculture Engineering Economics*, (43), 230–236.

20. **Stroich, V.**, & Horiuk, Y. (2024). Characteristics of the latent period of staphylococcal phages isolated from pyoderma in dogs. *Scientific Progress & Innovations*, 27 (3), 95–99. <https://doi.org/10.31210/spi2024.27.03.15>

21. Строїч, В. В., & Горюк, Ю. В. Лікування піодермії собак бактеріофаговим препаратом «Фагодерм»: методичні рекомендації. Кам'янець-Подільський: ЗВО «ПДУ», 2024. 22 с.

22. Строїч, В. В., & Горюк, Ю. В. Технічні умови ТУ У 21.2–22769675–002:2024. Препарат ветеринарний «Фагодерм». Кам'янець-Подільський, 2024. 18 с.

23. Супрович, Т. (2022). Ветеринарна мікробіологія для здобувачів другого (магістерського) рівня вищої освіти спеціальності 211 «Ветеринарна медицина». Кам'янець-Подільський: ЗВО «ПДУ», 313 с

24. Шевченко, Т. М., Воронкова, О. С., & Вінніков, А. І. (2014). Характеристика чутливості до антибіотиків та фагів штамів стафілококів, що виділені з репродуктивного тракту мишей. *Патологія*, (3), 68-72.

25. Abdulla, E. H., Abdoun, M. A., Mahmoud, W. S., & Alhamdani, F. (2019). Antibacterial activity of crude *Cinnamomum zeylanicum* ethanol extract on bacterial isolates from orofacial infections. *Acta Sci. Dent. Sci*, 3, 58-63.

26. Abedon, S. T., & Thomas-Abedon, C. (2010). Phage therapy pharmacology. *Current pharmaceutical biotechnology*, 11(1), 28-47.

27. Angus (2009). Pyoderma: A dermatologists secretes revealed. *81th Western Veterinary Conference*, 15-19.
28. Argov, T., Azulay, G., Pasechnek, A., Stadnyuk, O., Ran-Sapir, S., Borovok, I., ... & Herskovits, A. A. (2017). Temperate bacteriophages as regulators of host behavior. *Current opinion in microbiology*, 38, 81-87.
29. Azzariti, S., Bond, R., Loeffler, A., Zendri, F., Timofte, D., Chang, Y. M., & Pelligand, L. (2022). Investigation of In Vitro Susceptibility and Resistance Mechanisms in Skin Pathogens: Perspectives for Fluoroquinolone Therapy in Canine Pyoderma. *Antibiotics*, 11(9), 1204.
30. Bannoehr, J., & Guardabassi, L. (2012). Staphylococcus pseudintermedius in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. *Veterinary dermatology*, 23(4), 253-e52.
31. Bajwa, J. (2016). Canine superficial pyoderma and therapeutic considerations. *The Canadian veterinary journal*, 57(2), 204.
32. Banovic, F., Linder, K., & Olivry, T. (2017). Clinical, microscopic and microbial characterization of exfoliative superficial pyoderma-associated epidermal collarettes in dogs. *Veterinary Dermatology*, 28(1), 107-e23.
33. Bardina, C., Spricigo, D. A., Cortés, P., & Llagostera, M. (2012). Significance of the bacteriophage treatment schedule in reducing Salmonella colonization of poultry. *Applied and environmental microbiology*, 78(18), 6600-6607.
34. Beco, L., Guaguere, E., Méndez, C. L., Noli, C., Nuttall, T., & Vroom, M. (2013). Suggested guidelines for using systemic antimicrobials in bacterial skin infections: part 2-antimicrobial choice, treatment regimens and compliance. *Veterinary Record*, 172(6), 156-160.
35. Berhilevych, O. M., Kasianchuk, V. V., Kukhtyn, M. D., Lotskin I. M., Garkavenko, T. O., & Shubin, P. A. (2017). Characteristics of antibiotic sensitivity of Staphylococcus aureus isolated from dairy farms in Ukraine. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 8(4), 559–563.

36. Bloom, P. (2014). Canine superficial bacterial folliculitis: Current understanding of its etiology, diagnosis and treatment. *The Veterinary Journal*, 199(2), 217-222.
37. Buommino, E., Vollaro, A., Nocera, F. P., Lembo, F., DellaGreca, M., De Martino, L., & Catania, M. R. (2021). Synergistic effect of abietic acid with oxacillin against methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *Antibiotics*, 10(1), 80.
38. Borio, S., Colombo, S., La Rosa, G., De Lucia, M., Damborg, P., & Guardabassi, L. (2015). Effectiveness of a combined (4% chlorhexidine digluconate shampoo and solution) protocol in MRS and non-MRS canine superficial pyoderma: a randomized, blinded, antibiotic-controlled study. *Veterinary dermatology*, 26(5), 339-e72.
39. Briers, Y., Walmagh, M., & Lavigne, R. J. M. M. (2011). Use of bacteriophage endolysin EL188 and outer membrane permeabilizers against *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of applied microbiology*, 110(3), 778-785.
40. Briers, Y., & Lavigne, R. (2015). Breaking barriers: expansion of the use of endolysins as novel antibacterials against Gram-negative bacteria. *Future microbiology*, 10(3), 377-390.
41. Calabro, C., Sadhu, R., Xu, Y., Aprea, M., Guarino, C., & Cazer, C. L. (2024). Longitudinal antimicrobial susceptibility trends of canine *Staphylococcus pseudintermedius*. *Preventive Veterinary Medicine*, 226, 106170.
42. Carvalho, C., Costa, A. R., Silva, F., & Oliveira, A. (2017). Bacteriophages and their derivatives for the treatment and control of food-producing animal infections. *Critical reviews in microbiology*, 43(5), 583-601.
43. Carvalho, C. M., Santos, S. B., Kropinski, A. M., Ferreira, E. C., & Azeredo, J. (2012). *Phages as therapeutic tools to control major foodborne pathogens: Campylobacter and Salmonella* (pp. 179-214). Rijeka: InTech..
44. Chamakura, K., & Young, R. (2019). Phage single-gene lysis: Finding the weak spot in the bacterial cell wall. *Journal of Biological Chemistry*, 294(10), 3350-3358.

45. Chaudhary, A. K., Kumar, A., & Shrivastva, M. (2019). Study on prevalence and resistance patterns of bacterial pathogens isolated from canine pyoderma. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci*, 8(1), 2305-2311.
46. Chuang, C. Y., Yang, Y. L., Hsueh, P. R., & Lee, P. I. (2010). Catheter-related bacteremia caused by *Staphylococcus pseudintermedius* refractory to antibiotic-lock therapy in a hemophilic child with dog exposure. *Journal of clinical microbiology*, 48(4), 1497-1498.
47. CLSI. (2017). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Tests, 27th ed.; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA.
48. Cuscó, A., Sánchez, A., Altet, L., Ferrer, L., & Francino, O. (2017). Individual signatures define canine skin microbiota composition and variability. *Frontiers in veterinary science*, 4, 6.
49. Clavijo, V., Baquero, D., Hernandez, S., Farfan, J. C., Arias, J., Arévalo, A., ... & Vives-Flores, M. (2019). Phage cocktail SalmoFREE® reduces *Salmonella* on a commercial broiler farm. *Poultry science*, 98(10), 5054-5063.
50. Clavijo, V., Morales, T., Vives-Flores, M. J., & Reyes Muñoz, A. (2022). The gut microbiota of chickens in a commercial farm treated with a *Salmonella* phage cocktail. *Scientific reports*, 12(1), 991.
51. Clokie, M. R., Millard, A. D., Letarov, A. V., & Heaphy, S. (2011). Phages in nature. *Bacteriophage*, 1(1), 31-45.
52. Cui, H., Bai, M., Yuan, L., Surendhiran, D., & Lin, L. (2018). Sequential effect of phages and cold nitrogen plasma against *Escherichia coli* O157: H7 biofilms on different vegetables. *International journal of food microbiology*, 268, 1-9.
53. Cusco, A.; Sanchez, A.; Altet, L.; Ferrer, L.; Francino, O. Individual Signatures Define Canine Skin Microbiota Composition and Variability. *Front. Vet. Sci.* 2017, 4, 6.
54. Devriese, L. A., Vancanneyt, M., Baele, M., Vaneechoutte, M., De Graef, E., Snauwaert, C., ... & Haesebrouck, F. (2005). *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55(4), 1569-1573.

55. Doelle, M., Loeffler, A., Wolf, K., Kostka, V., & Linek, M. (2016). Clinical features, cytology and bacterial culture results in dogs with and without cheilitis and comparison of three sampling techniques. *Veterinary Dermatology*, 27(3), 140-e37.
56. Dong, Q., Wang, J., Yang, H., Wei, C., Yu, J., Zhang, Y., ... & Wei, H. (2015). Construction of a chimeric lysin Ply187N-V12C with extended lytic activity against staphylococci and streptococci. *Microbial biotechnology*, 8(2), 210-220.
57. Drake, D. R., Brogden, K. A., Dawson, D. V., & Wertz, P. W. (2008). Thematic review series: skin lipids. Antimicrobial lipids at the skin surface. *Journal of lipid research*, 49(1), 4-11.
58. Duckworth, D. H., & Gulig, P. A. (2002). Bacteriophages: potential treatment for bacterial infections. *BioDrugs*, 16, 57-62.
59. Drulis-Kawa, Z., Majkowska-Skrobek, G., Maciejewska, B., Delattre, A. S., & Lavigne, R. (2012). Learning from bacteriophages-advantages and limitations of phage and phage-encoded protein applications. *Current Protein and Peptide Science*, 13(8), 699-722.
60. El Zubeir, I. E. M., Kanbar, T., Alber, J., Lämmle, C., Akiniden, Ö., Weiss, R., & Zschöck, M. (2007). Phenotypic and genotypic characteristics of methicillin/oxacillin-resistant *Staphylococcus intermedius* isolated from clinical specimens during routine veterinary microbiological examinations. *Veterinary microbiology*, 121(1-2), 170-176.
61. Ehsani, A., Alizadeh, O., Hashemi, M., Afshari, A., & Aminzare, M. (2017). Phytochemical, antioxidant and antibacterial properties of *Melissa officinalis* and *Dracocephalum moldavica* essential oils. In *Veterinary Research Forum*, 8, (3), 223.
62. Esmael, A., Azab, E., Gobouri, A. A., Nasr-Eldin, M. A., Moustafa, M. M., Mohamed, S. A., ... & Abdelatty, A. M. (2021). Isolation and characterization of two lytic bacteriophages infecting a multi-drug resistant *Salmonella Typhimurium* and their efficacy to combat salmonellosis in ready-to-use foods. *Microorganisms*, 9(2), 423.

63. Fehér, T., Karcagi, I., Blattner, F. R., & Pósai, G. (2012). Bacteriophage recombineering in the lytic state using the lambda red recombinases. *Microbial biotechnology*, 5(4), 466-476.
64. Fernandes, S., Proença, D., Cantante, C., Silva, F. A., Leandro, C., Lourenço, S., ... & São-José, C. (2012). Novel chimerical endolysins with broad antimicrobial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbial drug resistance*, 18(3), 333-343.
65. Fischetti, V. A. (2005). Bacteriophage lytic enzymes: novel anti-infectives. *Trends in microbiology*, 13(10), 491-496.
66. Fischer, C. L., Drake, D. R., Dawson, D. V., Blanchette, D. R., Brogden, K. A., & Wertz, P. W. (2012). Antibacterial activity of sphingoid bases and fatty acids against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(3), 1157-1161.
67. Frosini, S. M., Bond, R., King, R., Feudi, C., Schwarz, S., & Loeffler, A. (2022). Effect of topical antimicrobial therapy and household cleaning on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* carriage in dogs. *Veterinary Record*, 190(8), no-no.
68. Furfaro, L. L., Chang, B. J., & Payne, M. S. (2018). Applications for bacteriophage therapy during pregnancy and the perinatal period. *Frontiers in Microbiology*, 8, 319215.
69. Gill, J. J., & Hyman, P. (2010). Phage choice, isolation, and preparation for phage therapy. *Current pharmaceutical biotechnology*, 11(1), 2-14.
70. Gilmer, D. B., Schmitz, J. E., Euler, C. W., & Fischetti, V. A. (2013). Novel bacteriophage lysin with broad lytic activity protects against mixed infection by *Streptococcus pyogenes* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(6), 2743-2750.
71. González-Domínguez, M. S., Carvajal, H. D., Calle-Echeverri, D. A., & Chinchilla-Cárdenas, D. (2020). Molecular detection and characterization of the *mecA* and *nuc* genes from *Staphylococcus* species (*S. aureus*, *S. pseudintermedius*, and *S.*

schleiferi) isolated from dogs suffering superficial pyoderma and their antimicrobial resistance profiles. *Frontiers in veterinary science*, 7, 376.

72. Gomez-Sanz, E., Torres, C., Ceballos, S., Lozano, C., & Zarazaga, M. (2013). Clonal dynamics of nasal *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in dog-owning household members. Detection of MSSA ST398. *PLoS One*, 8(7).

73. Goodridge, L. D., & Bisha, B. (2011). Phage-based biocontrol strategies to reduce foodborne pathogens in foods. *Bacteriophage*, 1(3), 130-137.

74. Goodridge, L. D. (2010). Designing phage therapeutics. *Current pharmaceutical biotechnology*, 11(1), 15-27.

75. Gortel, K. (2013). Recognizing pyoderma: more difficult than it may seem. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 43(1), 1-18.

76. Greco, I., Emborg, A. P., Jana, B., Molchanova, N., Oddo, A., Damborg, P., ... & Hansen, P. R. (2019). Characterization, mechanism of action and optimization of activity of a novel peptide-peptoid hybrid against bacterial pathogens involved in canine skin infections. *Scientific Reports*, 9(1), 1-12.

77. Guardabassi, L., Jensen, L. B., & Kruse, H. (Eds.). (2008). *Guide to antimicrobial use in animals* (pp. 183-206). Oxford, UK: Blackwell Pub..

78. Gu, J., Xu, W., Lei, L., Huang, J., Feng, X., Sun, C., ... & Han, W. (2011). LysGH15, a novel bacteriophage lysin, protects a murine bacteremia model efficiently against lethal methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Journal of clinical microbiology*, 49(1), 111-117.

79. Guardabassi, L., Loeber, M. E., & Jacobson, A. (2004). Transmission of multiple antimicrobial-resistant *Staphylococcus intermedius* between dogs affected by deep pyoderma and their owners. *Veterinary microbiology*, 98(1), 23-27.

80. Gupta, A., Duhan, J., Tewari, S., Sangwan, P., Yadav, A., Singh, G., ... & Saini, H. (2013). Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of *S yzygium aromaticum*, *O cimum sanctum* and *C innamomum zeylanicum* plant extracts against *E nterococcus faecalis*: a preliminary study. *International endodontic journal*, 46(8), 775-783.

81. Gutiérrez, D., Martínez, B., Rodríguez, A., & García, P. (2012). Genomic characterization of two *Staphylococcus epidermidis* bacteriophages with anti-biofilm potential. *BMC genomics*, 13, 1-10.
82. Haenni, M., Targant, H., Forest, K., Sévin, C., Tapprest, J., Laugier, C., & Madec, J. Y. (2010). Retrospective study of necropsy-associated coagulase-positive staphylococci in horses. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 22(6), 953-956.
83. Hillier, A., Lloyd, D. H., Weese, J. S., Blondeau, J. M., Boothe, D., Breitschwerdt, E., ... & Sykes, J. E. (2014). Guidelines for the diagnosis and antimicrobial therapy of canine superficial bacterial folliculitis (Antimicrobial Guidelines Working Group of the International Society for Companion Animal Infectious Diseases). *Veterinary dermatology*, 25(3), 163-e43.
84. Horyuk, Y. V., Kukhtyn, M. D., Perkiy, Y. B., Horyuk, V. V., & Semenyuk, V. I. (2016). Identification of *Enterococcus* isolated from raw milk and cottage cheese “home” production and study of their sensitivity to antibiotics. *Scientific Messenger LNUVMBT named after SZ Gzhytskyj*, 18(3), 70.
85. Horiuk, Y. V. (2019). Isolation of bacteriophages specific for *Staphylococcus aureus* var. *bovis*. *Theoretical and Applied Veterinary Medicine*, 7 (3), 143–146.
86. Horiuk, Y., Horiuk, V., Kukhtyn, M., Tsvihun, A., Kernychnyi, S. (2020). Characterization of lytic activity of *Phage SAvB14* on *Staphylococcus aureus* variant *bovis*. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 7 (3), 509–516. Doi: <http://doi.org/10.5455/javar.2020.g447>
87. Horiuk, Y., Kukhtyn, M., Horiuk, V., Kernychnyi, S., Tarasenko, L. (2020). Characteristics of bacteriophages of the *Staphylococcus aureus* variant *bovis*. *Veterinárni Medicina*, 65 (10), 421–426. Doi: <https://doi.org/10.17221/55/2020-VETMED>
88. Horiuk, Y. V., Havrylianchyk, R. Y., Horiuk, V. V., Kukhtyn, M. D., Stravskyy, Y. S., & Fotina, H. A. (2018). Comparison of the minimum bactericidal concentration of antibiotics on planktonic and biofilm forms of *Staphylococcus aureus*:

Mastitis causative agents. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 9(6), 616-622.

89. Horiuk, Y. V., Kukhtyn, M. D., Perkiy, Y. B., & Horiuk, V. V. (2018). Resistance of the main pathogens of mastitis of cows to modern antimicrobial drugs. *Science and Technology Bulletin of SRC for Biosafety and Environmental Control of AIC*, 6(2), 49-53.

90. Horiuk, Y. V., Kukhtyn, M. D., Vergeles, K. M., Kovalenko, V. L., Verkholiuk, M. M., Peleno, R. A., & Horiuk, V. V. (2018). Characteristics of enterococci isolated from raw milk and hand-made cottage cheese in Ukraine. *RESEARCH JOURNAL OF PHARMACEUTICAL BIOLOGICAL AND CHEMICAL SCIENCES*, 9(2), 1128-1133.

91. Horiuk, Y. V., Kukhtyn, M. D., Perkiy, Y. B., & Horiuk, V. V. (2018). Distribution of main pathogens of mastitis in cows on dairy farms in the western region of Ukraine. *Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies*, 20(83), 115-119.

92. Horiuk, Y. (2019). Lytic Activity of Staphylococcal Bacteriophage on Different Biotypes of *Staphylococcus aureus*. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*, 21(94), 115-120.

93. Hughes, L. A., Williams, N., Clegg, P., Callaby, R., Nuttall, T., Coyne, K., ... & Dawson, S. (2012). Cross-sectional survey of antimicrobial prescribing patterns in UK small animal veterinary practice. *Preventive Veterinary Medicine*, 104(3-4), 309-316.

94. Huerta, B., Maldonado, A., Ginel, P. J., Tarradas, C., Gómez-Gascón, L., Astorga, R. J., & Luque, I. (2011). Risk factors associated with the antimicrobial resistance of staphylococci in canine pyoderma. *Veterinary microbiology*, 150(3-4), 302-308.

95. Hyman, P. (2019). Phages for phage therapy: isolation, characterization, and host range breadth. *Pharmaceuticals*, 12(1), 35.

96. Jończyk, E., Kłak, M., Międzybrodzki, R., & Górski, A. (2011). The influence of external factors on bacteriophages. *Folia microbiologica*, 56, 191-200.
97. Jun, S. Y., Jung, G. M., Yoon, S. J., Oh, M. D., Choi, Y. J., Lee, W. J., ... & Kang, S. H. (2013). Antibacterial properties of a pre-formulated recombinant phage endolysin, SAL-1. *International journal of antimicrobial agents*, 41(2), 156-161.
98. Jun, S. Y., Jung, G. M., Yoon, S. J., Choi, Y. J., Koh, W. S., Moon, K. S., & Kang, S. H. (2014). Preclinical safety evaluation of intravenously administered SAL200 containing the recombinant phage endolysin SAL-1 as a pharmaceutical ingredient. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(4), 2084-2088.
99. Yang, H., Yu, J., & Wei, H. (2014). Engineered bacteriophage lysins as novel anti-infectives. *Frontiers in microbiology*, 5, 116242.
100. Kadlec, K., Schwarz, S., Goering, R. V., & Weese, J. S. (2015). Direct repeat unit (dru) typing of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* from dogs and cats. *Journal of clinical microbiology*, 53(12), 3760-3765.
101. Kadlec, K., Weiß, S., Wendlandt, S., Schwarz, S., & Tonpitak, W. (2016). Characterization of canine and feline methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) from Thailand. *Veterinary microbiology*, 194, 93-97.
102. Kamr, A., Arbaga, A., El-Bahrawy, A., Elsify, A., Khaled, H., & Hassan, H. (2020). The therapeutic efficacy of Aloe vera gel ointment on staphylococcal pyoderma in dogs. *Veterinary World*, 13(11), 2371.
103. Kang, J. H., & Hwang, C. Y. (2020). First detection of multiresistance pRE25-like elements from *Enterococcus* spp. in *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from canine pyoderma. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 20, 304-308.
104. Kang, J. H., Chung, T. H., & Hwang, C. Y. (2017). Clonal distribution of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from skin infection of dogs in Korea. *Veterinary microbiology*, 210, 32-37.
105. Kasai, T., Saegusa, S., Shirai, M., Murakami, M., & Kato, Y. (2016). New categories designated as healthcare-associated and community-associated methicillin-

resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in dogs. *Microbiology and immunology*, 60(8), 540-551.

106. Katayama, Y., Ito, T., & Hiramatsu, K. (2000). A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44(6), 1549-1555.

107. Hiramatsu, K., Katayama, Y., Matsuo, M., Sasaki, T., Morimoto, Y., Sekiguchi, A., & Baba, T. (2014). Multi-drug-resistant *Staphylococcus aureus* and future chemotherapy. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 20(10), 593-601.

108. Keen, E. C. (2012). Phage therapy: concept to cure. *Frontiers in microbiology*, 3, 238.

109. Khinchi, R. K., Sharma, S. K., Goklaney, D., Dhuria, R. K., Sharma, S., & Parashar, M. (2019). Superficial pyoderma in canines in southern part of Rajasthan- A detailed epidemiological study. *IJCS*, 7(3), 2737-2740.

110. Khinchi, R. K., Gaurav, A., Sharma, S. K., & Solanki, S. (2022). Antibiotic Susceptibility Pattern of Bacterial Pathogens Isolated from Canine Superficial Pyoderma. *Current Journal of Applied Science and Technology*, 41(43), 17-22.

111. Kiro, R., Shitrit, D., & Qimron, U. (2014). Efficient engineering of a bacteriophage genome using the type IE CRISPR-Cas system. *RNA biology*, 11(1), 42-44.

112. Kizerwetter-Świda, M., Chrobak-Chmiel, D., Stefańska, I., Kwiecień, E., & Rzewuska, M. (2024). In vitro activity of selected antimicrobials against methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* of canine origin in Poland. *Veterinary Medicine and Science*, 10(3), e1385.

113. Klūga, A., Terentjeva, M., Kántor, A., Kluz, M., Puchalski, C., & Kačániová, M. (2017). Antibacterial activity of *Melissa officinalis* L., *Mentha piperita* L., *Origanum vulgare* L. and *Malva mauritiana* against bacterial microflora isolated from fish. *Advanced Research in Life Sciences*, 1(1), 75-80.

114. Kozlovska, I. M., Romanjuk, N. Y., Romanjuk, L. M., Kukhtyn, M. D., Horiuk, Y. V., & Karpyk, G. V. (2017). The effect of antimicrobial agents on

planktonic and biofilm forms of bacteria that are isolated from chronic anal fissures. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 8(4), 577–582.

115. Kukhtyn, M. D., Kovalenko, V. L., Pokotylo, O. S., Horyuk, Y. V., Horyuk, V. V., & Pokotylo, O. O. (2017). Staphylococcal contamination of raw milk and handmade dairy products, which are realized at the markets of Ukraine. *Journal for Veterinary Medicine, Biotechnology and Biosafety*, (3, Iss. 1), 12-16.

116. Kukhtyn M., Horiuk Y., Salata V., Klymyk V., Vorozhbit N., Rushchinskaya T. (2021). Staphylococcus aureus of raw cow's milk. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*, 23 (102), 53–59.

117. Khurana, R., Kumar, T., Agnihotri, D., Sindhu, N. (2016). Dermatological disorders in canines - a detailed Epidemiological study. *Haryana Vet.* 55(1), 97-99.

118. Kutter, E., De Vos, D., Gvasalia, G., Alavidze, Z., Gogokhia, L., Kuhl, S., & Abedon, S. T. (2010). Phage therapy in clinical practice: treatment of human infections. *Current pharmaceutical biotechnology*, 11(1), 69-86.

119. Laarhoven, L. M., de Heus, P., van Luijn, J., Duim, B., Wagenaar, J. A., & van Duijkeren, E. (2011). Longitudinal study on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in households. *PLoS one*, 6(11), e27788.

120. Lai, M. J., Lin, N. T., Hu, A., Soo, P. C., Chen, L. K., Chen, L. H., & Chang, K. C. (2011). Antibacterial activity of *Acinetobacter baumannii* phage ϕ AB2 endolysin (LysAB2) against both gram-positive and gram-negative bacteria. *Applied microbiology and biotechnology*, 90, 529-539.

121. Lai, C. C., Chu, C. C., Cheng, A., Huang, Y. T., & Hsueh, P. R. (2015). Correlation between antimicrobial consumption and incidence of health-care-associated infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci at a university hospital in Taiwan from 2000 to 2010. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 48(4), 431-436.

122. Lai, C. H., Ma, Y. C., Shia, W. Y., Hsieh, Y. L., & Wang, C. M. (2022). Risk Factors for antimicrobial resistance of *Staphylococcus* Species isolated from dogs with superficial pyoderma and their owners. *Veterinary Sciences*, 9(7), 306.

123. Larsen, R. F., Boysen, L., Jessen, L. R., Guardabassi, L., & Damborg, P. (2018). Diversity of *Staphylococcus pseudintermedius* in carriage sites and skin lesions of dogs with superficial bacterial folliculitis: potential implications for diagnostic testing and therapy. *Veterinary dermatology*, 29(4), 291-e100.
124. Lim, J. A., Shin, H., Heu, S., & Ryu, S. (2014). Exogenous lytic activity of SPN9CC endolysin against gram-negative bacteria. *Journal of microbiology and biotechnology*, 24(6), 803-811.
125. Lloyd, D. H., & Garthwaite, G. (1982). Epidermal structure and surface topography of canine skin. *Research in veterinary science*, 33(1), 99-104.
126. Lloyd, D. (2008). The canine skin microbiota: habitats, acquisition, interactions and exchange. *Eur J Compan Anim Pract*, 18, 61-67.
127. Loc-Carrillo, C., & Abedon, S. T. (2011). Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage*, 1(2), 111-114.
128. Loeffler, A., & Lloyd, D. H. (2010). Companion animals: a reservoir for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the community?. *Epidemiology & Infection*, 138(5), 595-605.
129. Loeffler, A., & Lloyd, D. H. (2018). What has changed in canine pyoderma? A narrative review. *The Veterinary Journal*, 235, 73-82.
130. Loeffler, A., Scott, C., & Frosini, S. M. (2021). Canine pyoderma: *mecA* persists autogenous bacterin formulation from methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) and *S. aureus* (MRSA). *Tierärztliche Praxis Ausgabe K: Kleintiere/Heimtiere*, 49(06), 437-440.
131. Lood, R., Raz, A., Molina, H., Euler, C. W., & Fischetti, V. A. (2014). A highly active and negatively charged *Streptococcus pyogenes* lysin with a rare D-alanyl-L-alanine endopeptidase activity protects mice against streptococcal bacteremia. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(6), 3073-3084.
132. Lopetuso, L. R., Giorgio, M. E., Saviano, A., Scaldaferri, F., Gasbarrini, A., & Cammarota, G. (2019). Bacteriocins and bacteriophages: therapeutic weapons for gastrointestinal diseases?. *International journal of molecular sciences*, 20(1), 183.

133. Ly-Chatain, M. H. (2014). The factors affecting effectiveness of treatment in phages therapy. *Frontiers in microbiology*, 5, 51.
134. Lu, T. K., & Collins, J. J. (2009). Engineered bacteriophage targeting gene networks as adjuvants for antibiotic therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(12), 4629-4634.
135. Lu, T. K. T., Koeris, M. S., Chevalier, B. S., Holder, J. W., McKenzie, G. J., & Brownell, D. R. (2016). *U.S. Patent No. 9,234,227*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
136. Maluping, R. R., Paul, N. C., & Moodley, A. (2014). Antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from veterinary clinical cases in the UK. *British Journal of Biomedical Science*, 71(2), 55-57.
137. Marinelli, L. J., Piuri, M., Swigoňová, Z., Balachandran, A., Oldfield, L. M., van Kessel, J. C., & Hatfull, G. F. (2008). BRED: a simple and powerful tool for constructing mutant and recombinant bacteriophage genomes. *PLoS One*, 3(12), e3957.
138. Marinelli, L. J., Hatfull, G. F., & Piuri, M. (2012). Recombineering: A powerful tool for modification of bacteriophage genomes. *Bacteriophage*, 2(1), 5-14.
139. Martel, B., & Moineau, S. (2014). CRISPR-Cas: an efficient tool for genome engineering of virulent bacteriophages. *Nucleic acids research*, 42(14), 9504-9513.
140. Mao, J., Schmelcher, M., Harty, W. J., Foster-Frey, J., & Donovan, D. M. (2013). Chimeric Ply187 endolysin kills *Staphylococcus aureus* more effectively than the parental enzyme. *FEMS microbiology letters*, 342(1), 30-36.
141. Mateus, A., Brodbelt, D. C., Barber, N., & Stärk, K. D. C. (2011). Antimicrobial usage in dogs and cats in first opinion veterinary practices in the UK. *Journal of Small Animal Practice*, 52(10), 515-521.
142. Merabishvili, M., Pirnay, J. P., Verbeken, G., Chanishvili, N., Tediashvili, M., Lashkhi, N., ... & Vaneechoutte, M. (2009). Quality-controlled small-scale

production of a well-defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials. *PloS one*, 4(3), e4944.

143. Miller, W. H., Griffin, C. E., & Campbell, K. L. (2012). *Muller and Kirk's small animal dermatology*. Elsevier Health Sciences. 889 p.

144. Mocherniuk, M., & Kukhtyn, M. (2022a). Microbiological indicators of bioaerosol in veterinary medicine clinics. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*, 24(108), 3-10. <https://doi.org/10.32718/nvlvet10801>

145. Mocherniuk, M. M., Kukhtyn, M. D., Horiuk, Y. V., Horiuk, V. V., Tsvigun, O. A., & Tokarchuk, T. S. (2022b). Microflora of boxes for holding veterinary patients in clinics . *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 13(3), 257-264. <https://doi.org/10.15421/022233>

146. Morris, J., Kelly, N., Elliott, L., Grant, A., Wilkinson, M., Hazratwala, K., & McEwen, P. (2019). Evaluation of bacteriophage anti-biofilm activity for potential control of orthopedic implant-related infections caused by *Staphylococcus aureus*. *Surgical Infections*, 20(1), 16-24.

147. Nakaminami, H., Okamura, Y., Tanaka, S., Wajima, T., Murayama, N., & Noguchi, N. (2021). Prevalence of antimicrobial-resistant staphylococci in nares and affected sites of pet dogs with superficial pyoderma. *Journal of Veterinary Medical Science*, 83(2), 214-219.

148. Nelson, D., Loomis, L., & Fischetti, V. A. (2001). Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(7), 4107-4112.

149. Nienhoff, U., Kadlec, K., Chabernv, I. F., Verspohl, J., Gerlach, G. F., & Schwarz, S. (2011). Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* among cats admitted to a veterinary teaching hospital. *Veterinary microbiology (Amsterdam)*, 153(3-4), 414-416.

150. Ngo, J., Taminiau, B., Fall, P. A., Daube, G., & Fontaine, J. (2018). Ear canal microbiota—a comparison between healthy dogs and atopic dogs without clinical signs of otitis externa. *Veterinary dermatology*, 29(5), 425-e140.
151. Nobrega, F. L., Costa, A. R., Kluskens, L. D., & Azeredo, J. (2015). Revisiting phage therapy: new applications for old resources. *Trends in microbiology*, 23(4), 185-191.
152. Nocera, F. P., Mancini, S., Najar, B., Bertelloni, F., Pistelli, L., De Filippis, A., ... & Fratini, F. (2020). Antimicrobial activity of some essential oils against methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*-associated pyoderma in dogs. *Animals*, 10(10), 1782.
153. Normand, E. H., Gibson, N. R., Reid, S. W. J., Carmichael, S., & Taylor, D. J. (2000). Antimicrobial-resistance trends in bacterial isolates from companion-animal community practice in the UK. *Preventive Veterinary Medicine*, 46(4), 267-278.
154. O'Flaherty, S., Ross, R. P., & Coffey, A. (2009). Bacteriophage and their lysins for elimination of infectious bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 33(4), 801-819.
155. Older, C. E., Rodrigues Hoffmann, A., Hoover, K., & Banovic, F. (2020). Characterization of cutaneous bacterial microbiota from superficial pyoderma forms in atopic dogs. *Pathogens*, 9(8), 638.
156. Oliveira, H., Melo, L. D., Santos, S. B., Nóbrega, F. L., Ferreira, E. C., Cerca, N., ... & Kluskens, L. D. (2013). Molecular aspects and comparative genomics of bacteriophage endolysins. *Journal of virology*, 87(8), 4558-4570.
157. Oliver, S. P., Murinda, S. E., & Jayarao, B. M. (2011). Impact of antibiotic use in adult dairy cows on antimicrobial resistance of veterinary and human pathogens: a comprehensive review. *Foodborne pathogens and disease*, 8(3), 337-355.
158. Orito, Y., Morita, M., Hori, K., Unno, H., & Tanji, Y. (2004). *Bacillus amyloliquefaciens* phage endolysin can enhance permeability of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane and induce cell lysis. *Applied microbiology and biotechnology*, 65, 105-109.

159. Page, S. W., & Gautier, P. (2012). Use of antimicrobial agents in livestock. *Revue Scientifique et Technique-OIE*, 31(1), 145.
160. Paul, N. C., Moodley, A., Ghibaud, G., & Guardabassi, L. (2011). Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in small animal veterinarians: indirect evidence of zoonotic transmission. *Zoonoses and public health*, 58(8), 533-539
161. Paul, N. C., Damborg, P., & Guardabassi, L. (2014). Dam-to-offspring transmission and persistence of *S. taphylococcus pseudintermedius* clones within dog families. *Veterinary Dermatology*, 25(1), 3-e2.
162. Pellerin, J. L., Bourdeau, P., Sebbag, H., & Person, J. M. (1998). Epidemiological surveillance of antimicrobial compound resistance of *Staphylococcus intermedius* clinical isolates from canine pyodermas. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 21(2), 115-133.
163. Perreten, V., Kania, S. A., & Bemis, D. (2020). *Staphylococcus ursi* sp. nov., a new member of the ‘*Staphylococcus intermedius* group’ isolated from healthy black bears. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 70(8), 4637-4645.
164. Perreten, V., Kadlec, K., Schwarz, S., Grönlund Andersson, U., Finn, M., Greko, C., ... & Guardabassi, L. (2010). Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Europe and North America: an international multicentre study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(6), 1145-1154.
165. Pinchbeck, L. R., Cole, L. K., Hillier, A., Kowalski, J. J., Rajala-Schultz, P. J., Bannerman, T. L., & York, S. (2007). Pulsed-field gel electrophoresis patterns and antimicrobial susceptibility phenotypes for coagulase-positive staphylococcal isolates from pustules and carriage sites in dogs with superficial bacterial folliculitis. *American journal of veterinary research*, 68(5), 535-542.
166. Pinchbeck, L. R. (2010). New approaches to the management of canine pyoderma. In *82nd Western Veterinary Conference*, 73, 14-18).
167. Pires, J., Huisman, J. S., Bonhoeffer, S., & Van Boeckel, T. P. (2022). Increase in antimicrobial resistance in *Escherichia coli* in food animals between 1980

and 2018 assessed using genomes from public databases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 77(3), 646-655.

168. Pires, D. P., Cleto, S., Sillankorva, S., Azeredo, J., & Lu, T. K. (2016). Genetically engineered phages: a review of advances over the last decade. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(3), 523-543.

169. Ravens, P. A., Vogelnest, L. J., Ewen, E., Bosward, K. L., & Norris, J. M. (2014). Canine superficial bacterial pyoderma: evaluation of skin surface sampling methods and antimicrobial susceptibility of causal *Staphylococcus* isolates. *Australian veterinary journal*, 92(5), 149-155.

170. Riegel, P., Jesel-Morel, L., Laventie, B., Boisset, S., Vandenesch, F., & Prévost, G. (2011). Coagulase-positive *Staphylococcus pseudintermedius* from animals causing human endocarditis. *International Journal of Medical Microbiology*, 301(3), 237-239.

171. Robb, A. R., Wright, E. D., Foster, A. M. E., Walker, R., & Malone, C. (2017). Skin infection caused by a novel strain of *Staphylococcus pseudintermedius* in a Siberian husky dog owner. *JMM Case Reports*, 4(3), e005087.

172. Robb, A. (2008). An investigation of the occurrence of antibiotic resistance genes among strains of *Staphylococcus aureus* isolated from animals and their relationship to human strains of *Staphylococcus aureus*. Open University (United Kingdom).

173. Röhrig, C. (2019). *Application of Bacteriophage Proteins in Medicine and Foods* (Doctoral dissertation, ETH Zurich).

174. Saab, M. E., Weese, J. S., & McClure, J. T. (2017). Direct repeat unit (dru) typing and antimicrobial resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from dogs in Atlantic Canada. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 81(3), 192-198.

175. Salata, V., Kukhtyn, M., Pekriy, Y., Horiuk, Y., & Horiuk, V. (2018). Activity of washing-disinfecting means “San-active” for sanitary treatment of equipment of meat processing enterprises in laboratory and manufacturing conditions. *Ukrainian journal of veterinary and agricultural sciences*, 1(1), 10-16.

176. Salma, U., Saha, S. K., Sultana, S., Ahmed, S. M., Haque, S. D., & Mostaqim, S. (2019). The Antibacterial Activity of Ethanolic Extract of Cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) against two Food Borne Pathogens: *Staphylococcus aureus* And *Escherichia coli*. *Mymensingh medical journal: MMJ*, 28(4), 767-772.
177. Sarma, K., Mondal, D. B., Sarvanan, M., Kumar, M., & Vijaykumar, H. (2013). Incidence of dermatological disorders and its therapeutic management in canines. *Intas polivet*, 14(2), 186-192.
178. Sagar, S. S., Kumar, R., & Kaistha, S. D. (2017). Efficacy of phage and ciprofloxacin co-therapy on the formation and eradication of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 42(1), 95-103.
179. Scarafile, G. (2016). Antibiotic resistance: current issues and future strategies. *Reviews in Health Care*, 7(1), 3-16.
180. Sasaki, T., Kikuchi, K., Tanaka, Y., Takahashi, N., Kamata, S., & Hiramatsu, K. (2007). Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. *Journal of clinical microbiology*, 45(9), 2770-2778.
181. Sharma, S. K., Soodan, J. S., Dutta, T. K., Raina, B. B., & Tikoo, A. (2008). Occurrence of bacterial dermatitis in canines and their antibiogram. *Indian J. Vet. Med*, 28(2), 126-127.
182. Schmelcher, M., Donovan, D. M., & Loessner, M. J. (2012). Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials. *Future microbiology*, 7(10), 1147-1171.
183. Schmelcher, M., Shen, Y., Nelson, D. C., Eugster, M. R., Eichenseher, F., Hanke, D. C., ... & Donovan, D. M. (2015). Evolutionarily distinct bacteriophage endolysins featuring conserved peptidoglycan cleavage sites protect mice from MRSA infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(5), 1453-1465.
184. Schmelcher, M., Tchang, V. S., & Loessner, M. J. (2011). Domain shuffling and module engineering of *Listeria* phage endolysins for enhanced lytic activity and binding affinity. *Microbial biotechnology*, 4(5), 651-662.

185. Seckerdieck, F., & Mueller, R. S. (2018). Recurrent pyoderma and its underlying primary diseases: a retrospective evaluation of 157 dogs. *Veterinary Record*, 182(15), 434-434.
186. Senapati, S. K., Patra, R. C., & Panda, H. K. (2014). Prevalence and antibiogram of bacterial pathogens isolated from canine pyoderma. *Indian Journal of Field Veterinarians*, 9(3), 41-45.
187. Singh, R., Beigh, S. A., Soodan, J. S., Tikoo, A., & Tantaray, H. (2012). Clinico-epidemiological studies in canine dermatitis. *Indian journal of Canine Practice*, 4(2), 96-99.
188. Shi, Y., Li, N., Yan, Y., Wang, H., Li, Y., Lu, C., & Sun, J. (2012). Combined antibacterial activity of phage lytic proteins holin and lysin from *Streptococcus suis* bacteriophage SMP. *Current microbiology*, 65, 28-34.
189. Shi, Y., Chen, Y., Yang, Z., Zhang, Y., You, B., Liu, X., ... & Peng, Y. (2020). Characterization and genome sequencing of a novel T7-like lytic phage, kpssk3, infecting carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Archives of Virology*, 165, 97-104.
190. Shoda, M. (2019). *Biocontrol of plant diseases by Bacillus subtilis: basic and practical applications*. Taylor & Francis Group, 326 p.
191. Shumaker, A. K., Angus, J. C., Coyner, K. S., Loeffler, D. G., Rankin, S. C., & Lewis, T. P. (2008). Microbiological and histopathological features of canine acral lick dermatitis. *Veterinary dermatology*, 19(5), 288-298.
192. Soedarmanto, I., Kanbar, T., Ülbegi-Mohyla, H., Hijazin, M., Alber, J., Lämmler, C., ... & Zschöck, M. (2011). Genetic relatedness of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) isolated from a dog and the dog owner. *Research in veterinary science*, 91(3), e25-e27.
193. Stegmann, R., Burnens, A., Maranta, C. A., & Perreten, V. (2010). Human infection associated with methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* ST71. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(9), 2047-2048.
194. Strathdee, S. A., Hatfull, G. F., Mutalik, V. K., & Schooley, R. T. (2023). Phage therapy: From biological mechanisms to future directions. *Cell*, 186(1), 17-31.

195. Stroich, V. V., & Horiuk, Y. V. (2023). Identification of the skin microbiota of healthy dogs and those with pyoderma. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*, 25(110), 46-53.
196. Summers, J. F., Brodbelt, D. C., Forsythe, P. J., Loeffler, A., & Hendricks, A. (2012). The effectiveness of systemic antimicrobial treatment in canine superficial and deep pyoderma: a systematic review. *Veterinary Dermatology*, 23(4), 305-e61.
197. Summers, J. F., Hendricks, A., & Brodbelt, D. C. (2014). Prescribing practices of primary-care veterinary practitioners in dogs diagnosed with bacterial pyoderma. *BMC veterinary research*, 10(1), 1-10.
198. Szewczuk, M. A., Zych, S., Oster, N., & Karakulska, J. (2023). Activity of Patchouli and Tea Tree Essential Oils against Staphylococci Isolated from Pyoderma in Dogs and Their Synergistic Potential with Gentamicin and Enrofloxacin. *Animals*, 13(8), 1279.
199. Tagliaferri, T. L., Jansen, M., & Horz, H. P. (2019). Fighting pathogenic bacteria on two fronts: phages and antibiotics as combined strategy. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 9, 22.
200. Tiseo, K., Huber, L., Gilbert, M., Robinson, T. P., & Van Boeckel, T. P. (2020). Global trends in antimicrobial use in food animals from 2017 to 2030. *Antibiotics*, 9(12), 918.
201. Vasylykiv, O., & Kukhtyn, M. (2023). Isolation and characterization of bacteriophages Salmonella spp. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*, 25(111), 48-53.
202. Van Hoovels, L., Vankeerberghen, A., Boel, A., Van Vaerenbergh, K., & De Beenhouwer, H. (2006). First case of Staphylococcus pseudintermedius infection in a human. *Journal of clinical microbiology*, 44(12), 4609-4612.
203. Van Duijkeren, E., Kamphuis, M., Van der Mije, I. C., Laarhoven, L. M., Duim, B., Wagenaar, J. A., & Houwers, D. J. (2011). Transmission of methicillin-resistant Staphylococcus pseudintermedius between infected dogs and cats and contact

pets, humans and the environment in households and veterinary clinics. *Veterinary microbiology*, 150(3-4), 338-343.

204. Van Duijkeren, E., Catry, B., Greko, C., Moreno, M. A., Pomba, M. C., Pyörälä, S., ... & Törneke, K. (2011). Review on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 66(12), 2705-2714.

205. Ventrella, G., Moodley, A., Grandolfo, E., Parisi, A., Corrente, M., Buonavoglia, D., & Guardabassi, L. (2017). Frequency, antimicrobial susceptibility and clonal distribution of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in canine clinical samples submitted to a veterinary diagnostic laboratory in Italy: A 3-year retrospective investigation. *Veterinary microbiology*, 211, 103-106.

206. Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., & Whitman, W.B. (Eds.). (2011). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. New York: Springer Science & Business Media. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/b92997>.

207. Walmagh, M., Boczkowska, B., Grymonprez, B., Briers, Y., Drulis-Kawa, Z., & Lavigne, R. (2013). Characterization of five novel endolysins from Gram-negative infecting bacteriophages. *Applied microbiology and biotechnology*, 97, 4369-4375.

208. Walmagh M, Briers Y, Santos SBd, et al. (2012). Characterization of modular bacteriophage endolysins from Myoviridae phages OBP, 201u2-1 and PVP-SE1. *PLoS One*. 7, e36991.

209. Wang, I. N., Smith, D. L., & Young, R. (2000). Holins: the protein clocks of bacteriophage infections. *Annual Reviews in Microbiology*, 54(1), 799-825.

210. Weese, J. S., Sweetman, K., Edson, H., & Rousseau, J. (2013). Evaluation of minocycline susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *Veterinary microbiology*, 162(2-4), 968-971.

211. Windahl, U., Ågren, J., Holst, B. S., & Börjesson, S. (2016). Colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in multi-dog households: A longitudinal study using whole genome sequencing. *Veterinary microbiology*, 189, 8-14.

212. Yılmaz, N. K., & Baş, B. (2024). Superficial pyoderma in cats and dogs: A retrospective clinical study. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 71(2), 207-213.
213. Young, R. (2013). Phage lysis: do we have the hole story yet?. *Current opinion in microbiology*, 16(6), 790-797.
214. Żbikowska, K., Michalczuk, M., & Dolka, B. (2020). The use of bacteriophages in the poultry industry. *Animals*, 10(5), 872.

ДОДАТКИ

Додаток А

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

Статті у фахових наукових виданнях, включених до категорії Б:

1. **Stroich, V. V., & Horiuk, Y. V.** (2023). Identification of the skin microbiota of healthy dogs and those with pyoderma. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies*, 25(110), 46–53. <https://doi.org/10.32718/nvlvet11008> (Здобувач провів дослідження з визначення мікробіоценозу шкіри здорових та за піодермії собак та підготував матеріали до друку).

2. **Строїч, В. В., & Горюк, Ю. В.** (2023). Аналіз чутливості до антибіотиків мікробіоти шкіри здорових собак та за піодермії. *Podilian Bulletin Agriculture Engineering Economics*, (41), 75–82. <https://doi.org/10.37406/2706-9052-2023-4.11> (Здобувач провів визначення чутливості виділених мікроорганізмів зі шкіри здорових собак та за піодермії до антибіотиків та підготував матеріали до друку).

3. **Строїч, В. В., & Горюк, Ю. В.** (2024). Оцінка наявних бактеріофагових препаратів на ринку України та виділення фагів специфічних до збудників піодермії собак. *Podilian Bulletin Agriculture Engineering Economics*, (43), 230–236. <https://doi.org/10.37406/2706-9052-2024-2.33> (Здобувач провів дослідження з визначення літичної активності бактеріофагових препаратів наявних на ринку України, виділив специфічні фаги до збудників за піодермії та підготував матеріали до друку).

4. **Stroich, V., & Horiuk, Y.** (2024). Characteristics of the latent period of staphylococcal phages isolated from pyoderma in dogs. *Scientific Progress & Innovations*, 27 (3), 95–99. <https://doi.org/10.31210/spi2024.27.03.15> (Здобувач провів дослідження з визначення тривалості латентного періоду виділених багів з піодермії та підготував матеріали до друку).

Методичні рекомендації:

5. **Строїч, В. В., & Горюк, Ю. В.** Лікування піодермії собак бактеріофаговим препаратом «Фагодерм»: методичні рекомендації. Кам'янець-

Подільський: ЗВО «ПДУ», 2024. 22 с. *(Здобувач проводив експериментальні дослідження та оформлював методичні рекомендації).*

Технічні умови України:

6. **Строїч, В. В., & Горюк, Ю. В.** Технічні умови ТУ У 21.2–22769675–002:2024. Препарат ветеринарний «Фагодерм». Кам'янець-Подільський, 2024. 18 с. *(Здобувач приймав участь у розробці бактеріофагового препарату, організації і проведенні експериментальних досліджень та підготовці відповідної документації).*

Матеріали і тези наукових конференцій та інші наукові видання, які додатково відображають наукові результати дисертації:

7. **Строїч В. В., Горюк Ю. В.** Виділення фагів специфічних до збудників піодермії собак. Актуальні питання ветеринарної медицини: реалії та перспективи: збірник тез доповідей Міжнар. наук.-практ. конф. науковців, викладачів та аспірантів, 22 травня 2024 р.; Держ. біотехнологічний ун-т. Харків, 2024. С. 60-62.

8. **Stroich V., Horiuk Y.** The influence of commercial bacteriophage drugs on the causes of pyoderma in dogs. Science, technology, innovation: global trends and regional aspect: The 4th International scientific and practical conference, September 24 – 27, 2024, International Science Group Tallinn, Estonia, 2024. P. 280-281.

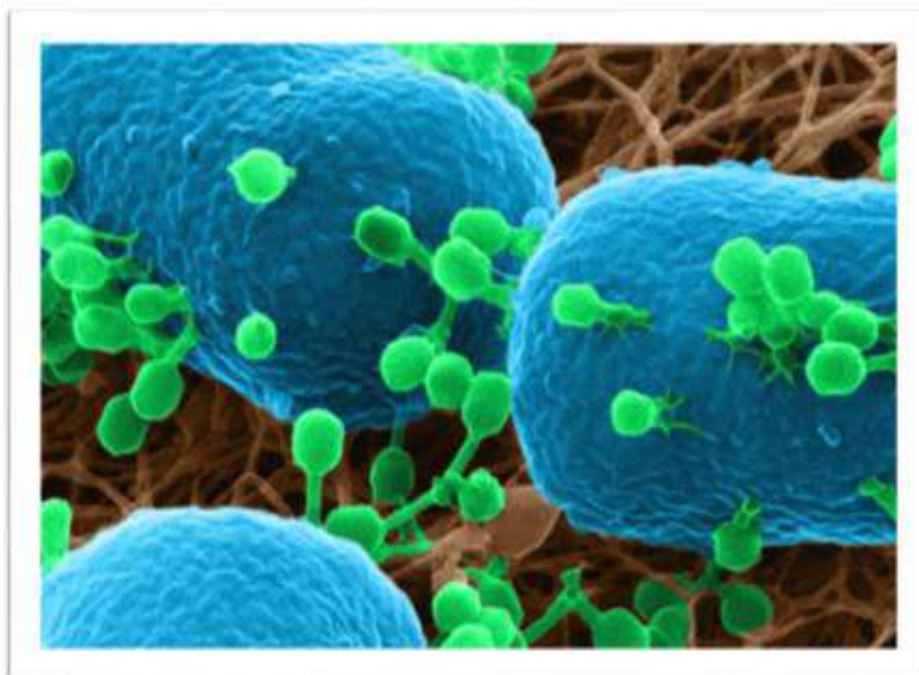
9. **Stroich V., Horiuk Y.** Characteristics of staphylococcal phages isolated during pyoderma in dogs: Science in the modern world: innovations and challenges. Proceedings of the 1st International scientific and practical conference. Perfect Publishing. Toronto, Canada. 2024. Pp. 30-32.

Методичні рекомендації

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЗАКЛАД ВИЩОЇ ОСВІТИ «ПОДІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ»
ФАКУЛЬТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ І ТЕХНОЛОГІЙ У ТВАРИННИЦТВІ

Методичні рекомендації

**Лікування собак за піодермії бактеріофаговим препаратом
«Фагодерм»**



м. Кам'янець-Подільський

2024 рік

Б. 2 – другий розділ додатка

УДК 619:616.636.

Розробники:

СТРОЇЧ Василь Васильович – аспірант кафедри ветеринарного акушерства, внутрішньої патології та хірургії, Заклад вищої освіти «Подільський державний університет»

ГОРЮК Юлія Вікторівна – доктор ветеринарних наук, доцент, професор кафедри ветеринарного акушерства, внутрішньої патології та хірургії, Заклад вищої освіти «Подільський державний університет»

Рецензенти:

КУХТИН Микола Дмитрович – доктор ветеринарних наук, професор, провідний науковий співробітник лабораторії тваринництва, ветеринарного акушерства та санітарії Тернопільської дослідної станції Інституту ветеринарної медицини НААН

ЛАЙТЕР-МОСКАЛЮК Світлана Василівна – кандидат ветеринарних наук, доцент, доцент кафедри гігієни тварин та ветеринарного забезпечення кінологічної служби Національної поліції України, Заклад вищої освіти «Подільський державний університет»

Лікування собак за піодермії бактеріофаговим препаратом «Фагодерм»: методичні рекомендації / В.В. Строїч, Ю.В. Горюк. Кам'янець-Подільський: ЗВО «ПДУ», 2024. – 22 с.

У методичних рекомендаціях наведені дані щодо складу, дії в лабораторних умовах та клінічне застосування бактеріофагового препарату «Фагодерм» для лікування піодермії у собак. Призначені для використання ветеринарними лікарями усіх форм власності.

© ЗВО «ПДУ», 2024

Додаток В

Технічні умови України

ДКПП 21.20.2

УКНД 11.220

ЗАТВЕРДЖУЮ



Т.В.О. ректора Закладу вищої освіти

«Іодіанський державний університет»

Андрій ЗЕЛЕНСЬКИЙ

25 вересня 2024 р.

Препарат ветеринарний

«ФАГОДЕРМ»

(суспензія для зовнішнього застосування)

Технічні умови

ТУ У 21.2-22769675-001:2024

(введено вперше)

Дата надання чинності 25.09.2024 р.

Чинні до _____

РОЗРОБЛЕНО:

Аспірант

Василь СТРОЇЧ

«25» вересня 2024 р.

Доктор ветеринарних наук, доцент

Юлія ГОРЮК

«25» вересня 2024 р.

Додаток Г

Акти впровадження результатів дисертаційної роботи у виробництво

Акт

впровадження результатів завершених наукових досліджень

1. **Назва впровадження:** препарат "Фагодерм" на основі бактеріофагів *S.a 4, S.p 2, S.she 3 та S.e 5*, який застосовується для лікування піодермії собак, яка спричиняється різними видами стафілококів.

2. **Назва завершеної НДР, що впроваджується і номер ДР:** препарат ветеринарний «Фагодерм» (суспензія для зовнішнього застосування) ТУ У 21.2–22769675–001:2024.

3. **Підрозділ установи-розробника:** кафедра ветеринарного акушерства, внутрішньої патології та хірургії Закладу вищої освіти «Подільський державний університет».

4. **Коротка характеристика впровадження:** ветеринарний препарат "Фагодерм" для лікування собак за піодермії на основі бактеріофагів *S.a 4, S.p 2, S.she 3 та S.e 5*, які є високолітичні щодо *S. aureus, S. pseudintermedius, S. schleiferi subsp. coagulans* та *S. epidermidis* основних збудників даного захворювання. Препарат "Фагодерм" в 1 мл містить специфічні бактеріофаги у концентрації не менше 1×10^7 фагових часток. «Фагодерм» є малотоксичним, відноситься до IV класу безпечності, не спричинює подразнюючої дії на шкіру та не проявляє шкірно-резорбтивну дію. Аналогів в Україні не має.

5. **Назва організації, де проведено впровадження:** Ветеринарна клініка «Vitae Vet», м. Кам'янець-Подільський.

6. **Рік та обсяг впровадження:** 2024 рік, 20 шт.

7. **Назва організації, де проведено впровадження:** Ветеринарна клініка «Vitae Vet», м. Кам'янець-Подільський.

8. **Результати впровадження:** Спосіб лікування піодермії собак з використанням бактеріофагового препарату «Фагодерм» на основі бактеріофагів *S.a 4, S.p 2, S.she 3 та S.e 5*, дозволяє ефективно лікувати піодермії собак, спричинені наступними видами стафілококів: *S. aureus, S. pseudintermedius, S. schleiferi subsp. coagulans* та *S. epidermidis*. Даний спосіб терапії попереджує розвиток антибіотикорезистентності у збудників піодермії.

9. **Відповідальні за впровадження:**

від розробника

Василь СТРОЇЧ, аспірант кафедри ветеринарного акушерства, внутрішньої патології та хірургії ЗВО «ПДУ»

від ветеринарної клініки

Віталій ЧУХНО, ветеринарний лікар клініки «Vitae Vet»



«09» листопада 2024 р.

Акт

впровадження результатів завершених наукових досліджень

1. **Назва впровадження:** препарат "Фагодерм" на основі бактеріофагів *S.a 4*, *S.p 2*, *S.she 3* та *S.e 5*, який застосовується для лікування піодермії собак, яка спричиняється різними видами стафілококів.

2. **Назва завершеної НДР, що впроваджується і номер ДР:** препарат ветеринарний «Фагодерм» (суспензія для зовнішнього застосування) ТУ У 21.2-22769675-001:2024.

3. **Підрозділ установи-розробника:** кафедра ветеринарного акушерства, внутрішньої патології та хірургії Закладу вищої освіти «Подільський державний університет».

4. **Коротка характеристика впровадження:** ветеринарний препарат "Фагодерм" для лікування собак за піодермії на основі бактеріофагів *S.a 4*, *S.p 2*, *S.she 3* та *S.e 5*, які є високолітичні щодо *S. aureus*, *S. pseudintermedius*, *S. schleiferi subsp. coagulans* та *S. epidermidis* основних збудників даного захворювання. Препарат "Фагодерм" в 1 мл містить специфічні бактеріофаги у концентрації не менше 1×10^7 фагових часток. «Фагодерм» є малотоксичним, відноситься до IV класу безпечності, не спричинює подразнюючої дії на шкіру та не проявляє шкірно-резорбтивну дію. Аналогів в Україні не має.

5. **Назва організації, де проведено впровадження:** Ветеринарна клініка «Doctor vet».

6. **Рік та обсяг впровадження:** 2024 рік, 20 шт.

7. **Назва організації, де проведено впровадження:** Ветеринарна клініка «Doctor vet».

8. **Результати впровадження:** Спосіб лікування піодермії собак з використанням бактеріофагового препарату «Фагодерм» на основі бактеріофагів *S.a 4*, *S.p 2*, *S.she 3* та *S.e 5*, дозволяє ефективно лікувати піодермії собак, спричинені наступними видами стафілококів: *S. aureus*, *S. pseudintermedius*, *S. schleiferi subsp. coagulans* та *S. epidermidis*. Даний спосіб терапії попереджує розвиток антибіотикорезистентності у збудників піодермії.

9. **Відповідальні за впровадження:**

від розробника

Василь СТРОЇЧ, аспірант кафедри ветеринарного акушерства, внутрішньої патології та хірургії ЗВО «ПДУ»

від ветеринарної клініки

Кузик Микола, ветеринарний лікар клініки «Doctor vet»

МП

«10» вересня 2024 р.



АКТ

впровадження результатів завершених наукових досліджень

1. Назва впровадження: препарат "Фагодерм" на основі бактеріофагів *S.a 4*, *S.p 2*, *S.she 3* та *S.e 5*, який застосовується для лікування піодермії собак, яка спричиняється різними видами стафілококів.

2. Назва завершеної НДР, що впроваджується і номер ДР: препарат ветеринарний «Фагодерм» (суспензія для зовнішнього застосування) ТУ У 21.2-22769675-001:2024.

3. Підрозділ установи-розробника: кафедра ветеринарного акушерства, внутрішньої патології та хірургії Закладу вищої освіти «Подільський державний університет».

4. Коротка характеристика впровадження: ветеринарний препарат "Фагодерм" для лікування собак за піодермії на основі бактеріофагів *S.a 4*, *S.p 2*, *S.she 3* та *S.e 5*, які є високолітичні щодо *S. aureus*, *S. pseudintermedius*, *S. schleiferi subsp. coagulans* та *S. epidermidis* основних збудників даного захворювання. Препарат "Фагодерм" в 1 мл містить специфічні бактеріофаги у концентрації не менше 1×10^7 фагових часток. «Фагодерм» є малотоксичним, відноситься до IV класу безпечності, не спричинює подразнюючої дії на шкіру та не проявляє шкірно-резорбтивну дію. Аналогів в Україні не має.

5. Назва організації, де проведено впровадження: Ветеринарна клініка «VetClinic».

6. Рік та обсяг впровадження: 2024 рік, 20 шт.

7. Назва організації, де проведено впровадження: Ветеринарна клініка «VetClinic».

8. Результати впровадження: Спосіб лікування піодермії собак з використанням бактеріофагового препарату «Фагодерм» на основі бактеріофагів *S.a 4*, *S.p 2*, *S.she 3* та *S.e 5*, дозволяє ефективно лікувати піодермії собак, спричинені наступними видами стафілококів: *S. aureus*, *S. pseudintermedius*, *S. schleiferi subsp. coagulans* та *S. epidermidis*. Даний спосіб терапії попереджує розвиток антибіотикорезистентності у збудників піодермії.

9. Відповідальні за впровадження:

від розробника

Василь СТРОЇЧ, аспірант кафедри ветеринарного акушерства, внутрішньої патології та хірургії ЗВО «ПДУ»

від ветеринарної клініки

Боднарюк Аліна, ветеринарний лікар клініки «VetClinic»

МП



«14» серпня 2024 р.