Received: 16.08.2024 | *Accepted: 23.08.2024*

Veterinary Sciences

doi: 10.31210/spi2024.27.03.15
UDC 579.62
ORIGINAL ARTICLE

Scientific Progress & Innovations
https://journals.pdaa.edu.ua/visnyk

27 (3)
2024

Characteristics of the latent period of staphylococcal phages isolated from pyoderma in dogs

V. Stroich | Y. Horiuk

Article info

Correspondence Author
Y. Horiuk
E-mail:
goruky@ukr.net

Podillia State University,
12, Shevchenko Str.,
Kamianets-Podilskyi, 32316,
Ukraine

Citation: 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. doi: 10.31210/spi2024.27.03.15

One of the diseases of dogs for which antibiotics are often used is pyoderma. The causative agents of this disease are usually autochthonous skin bacteria of the species *Staphylococcus* spp. (*S. pseudintermedius*, *S. aureus* and others). However, the ability to effectively treat pyoderma in dogs is now severely limited by the emergence of multidrug-resistant, methicillin-resistant staphylococci (*MRS*). Taking this trend into account, we set ourselves the task of developing a safe method of treating this disease without the use of antibiotics, but with the help of bacteriophages lytic to staphylococci isolated from the skin. The purpose of this work was to check the lytic cycle of the development of selected four bacteriophages active against species of bacteria of the genus *Staphylococcus*, which will later become the basis of a phage preparation for the treatment of pyoderma in dogs. Isolation, identification and production of staphylococcal bacteriophages was carried out according to the generally accepted method of Oliveira et al. To establish the latent period of the isolated phages, the method of a single cycle of phage reproduction was used. It was established that phage *S.a 4* during cultivation in a medium with Staphylococcus aureus was characterized by a gradual release of virions, and at 50 min of incubation, the maximum number of phage colonies in the medium was recorded – 7.65 log BUO/ml. The study of the dynamics of the development of phage *S.p 2* revealed a more intense infectious process than phage *S.a 4*. In particular, the latent period of phage *S.p 2* was 10 minutes shorter than that of phage *S.a 4* and was 40 minutes. During this time, phage development occurred with the destruction of staphylococcal cells and the release of a large number of phages of 7.91 log BUO/ml, which is considered good because it will contribute to the infection of other microbial cells in the inflammatory focus. The infection process with the participation of phage *S.she 3* was characterized by a short latent period, since the maximum number of vibrios was released at the 40 th minute of incubation. At the same time, during the development of this phage, a smaller number of virions is released, compared with the development of phages *S.a 4* and *S.p 2*. The lytic process with the participation of phage *S.e 5* was approximately similar to phage *S.she 3*. The only difference was that the phage *S.she 3* latent period was 10 min longer and amounted to 50 min, compared to phage *S.e 5* (40 min). Therefore, all isolated phages had a satisfactory latent period, which makes it possible to use them for the production of a bacteriophage preparation for the treatment of inflammatory processes on the skin of dogs.

Key words: bacteriophages, latent period of phages, pyoderma, dogs, antibiotic resistance, staphylococci.

Характеристика латентного періоду стафілококових фагів, виділених за піодермії у собак

В. В. Строїч | Ю. В. Горюк

Заклад вищої освіти
«Подільський державний
університет»,
м. Кам'янець-Подільський,
Україна

Одним із захворювань собак за якого часто застосовують антибіотики є піодермія. Збудниками даного захворювання зазвичай є автохтонні бактерії шкіри видів *Staphylococcus* spp. (*S. pseudintermedius*, *S. aureus* та інші). Однак здатність ефективно лікувати піодермії у собак зараз суттєво обмежена через появу мультирезистентних, метицилінрезистентних стафілококів (*MRS*). Враховуючи таку тенденцію нами було поставлено завдання розробити безпечний спосіб лікування даного захворювання без використання антибіотиків, а за допомогою виділених зі шкіри бактеріофагів літичних до стафілококів. Метою даної роботи було перевірити літичний цикл розвитку виділених чотирьох бактеріофагів активних щодо видів бактерій роду *Staphylococcus*, які в подальшому стануть основою у фаговому препараті для лікування піодермії собак. Виділення, ідентифікація та отримання стафілококових бактеріофагів проводили за загальновизнаною за методикою Oliveira. Для встановлення періоду латентного часу у виділених фагів використовували спосіб одиночного циклу розмноження фага. Встановлено, що фаг *S.a 4* під час культивування у середовищі із золотистим стафілококом характеризувався поступовим вивільненням віронів і на 50 хв інкубації реєстрували максимальну кількість фагових колоній в середовищі – 7,65 log БУО/мл. Дослідження динаміки розвитку фагу *S.p 2* виявило інтенсивніший інфекційний процес, ніж фагу *S.a 4*. Зокрема 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. Інфекційний процес за участі фагу *S.she 3* характеризувався коротким латентним періодом, оскільки максимальна кількість вібріонів 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*. Літичний процес за участі фагу *S.e 5* був приблизно аналогічний як і фага *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). Отже, усі виділені фаги мали задовільний латентний період, що дає можливість їх використовувати для виробництва бактеріофагового препарату для лікування запальних процесів на шкірі собак.

Ключові слова: бактеріофаги, латентний період фагів, піодермія, собаки, антибіотикорезестентність, стафілококи.

Бібліографічний опис для цитування: *Строїч В. В., Горюк Ю. В.* Характеристика латентного періоду стафілококових фагів, виділених за піодермії у собак. *Scientific Progress & Innovations*. 2024. № 27 (3). С. 95–99.

Вступ

Для профілактики та лікування запальних захворювань звичайною практикою протягом десятиліть було використання антибіотиків [1–3]. Це призвело до надмірного використання антибіотиків, що спричинило зниження їх ефективності через появу та поширення стійких бактерій [4–6]. У даний час кількість антибіотиків, що використовуються у тваринництві, є найбільшою частиною серед усіх антибіотиків, що використовуються у всьому світі, перевищуючи ті, що використовуються в медицині [7]. Зокрема в останні роки в тваринництві по всьому світу використовується протягом одного року приблизно 65 тонн протимікробних препаратів [8, 9]. До 2030 року споживання антибіотиків очікується зросте на 65 % [10, 11]. Враховуючи наявну тенденцію до широкомасштабного використання антимікробних препаратів, очевидним є факт, що сьогодні світ стикається зі зростаючою появою бактерій, стійких до антибіотиків. Водночас заборона до використання деяких існуючих антибіотиків й відсутність розробки нових протимікробних засобів, викликали нагальну потребу в пошуку нових альтернатив проти збудників запалення тварин [12–14].

Бактеріофаги та їх похідні (ендолізини) вважаються цінними альтернативними антимікробними речовинами [15, 16]. Бактеріофаги (фаги) – це віруси, які специфічно заражають бактерії, які можуть вбивати та лізувати бактерії, які вони інфікують [17, 18], будучи нешкідливими для людини, тварин і рослин. Бактеріофаги є природними хижаками бактерій, всюдисущими в навколишньому середовищі, з високою специфічністю до господаря та нешкідливими для тварин. З цих причин фаги та їх похідні вважаються цінними антимікробними альтернативами, що в перспективі дадуть можливість скоротити поточне використання антибіотиків у ветеринарії та медицині [19].

Одним із захворювань серед собак за якого часто застосовують антибіотики є піодермія. Збудниками даного захворювання зазвичай є автохтонні бактерії шкіри видів *Staphylococcus* spp. (*S. pseudintermedius*, *S. aureus* та інші) [20]. 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 [21, 22]. Враховуючи таку тенденцію нами було поставлено завдання розробити безпечний спосіб лікування даного захворювання без використання антибіотиків, а за допомогою виділених зі шкіри бактеріофагів літичних до стафілококів.

Мета дослідження

Метою даної роботи було перевірити літичний цикл розвитку виділених чотирьох бактеріофагів активних щодо видів бактерій роду *Staphylococcus,* які в подальшому стануть основою у фаговому препараті для лікування піодермії собак.

Матеріали і методи

Дослідження проведено в Закладі вищої освіти «Подільський державний університет». Виділення, ідентифікація та отримання стафілококових бактеріофагів проводили за загальновизнаною методикою Oliveira et al. [23]. Для встановлення періоду латентного часу у виділених фагів використовували спосіб одиночного циклу розмноження фага [24].

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

Результати та їх обговорення

У попередніх дослідженнях нами з вогнищ запалення за піодермії собак виділено та ідентифіковано чотири літичних стафілококових фагів, 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* [25]. Водночас використання фагів у лікувальному препараті передбачає необхідність їх всебічного дослідження, а одним із методів, який характеризує швидкість накопичення вібріонів в середовищі застосування є визначення їх латентного періоду. Саме такі дослідження було проведено із відібраними чотирма фагами.

Виявлено (***рис. 1***), що фаг *S.a 4* під час культивування в середовищі із золотистим стафілококом характеризувався поступовим вивільненням віронів і на 50 хв інкубації 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.

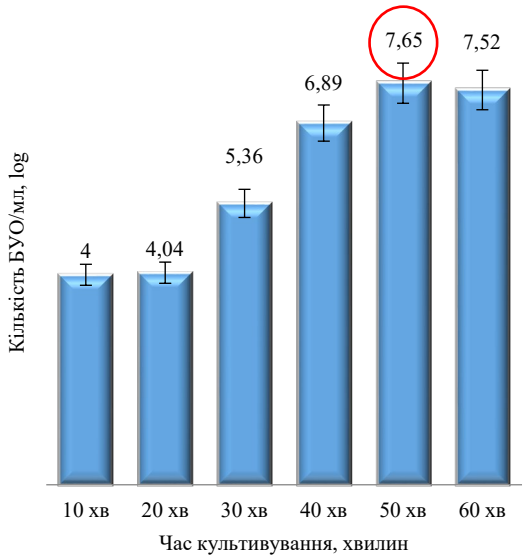

Рис. 1. Латентний період фагу *S.a 4*

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

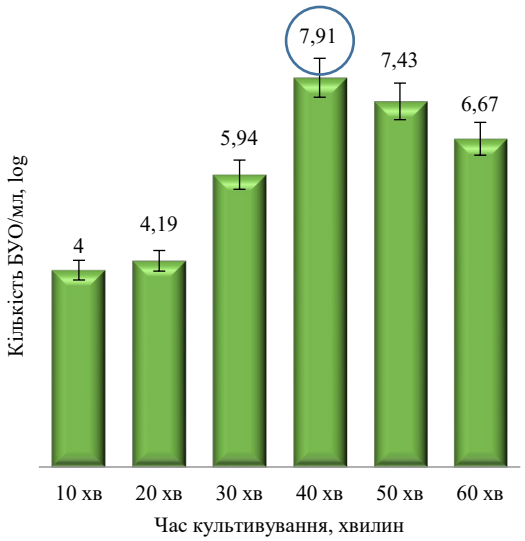

Рис. 2. Латентний період фагу *S.p 2*

Зокрема 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***) відмічаємо, що інфекційний процес характеризувався коротким латентним періодом, оскільки максимальна кількість вібріонів вивільнялася на 40-ву хв 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 порядка, а фагів *S.a 4* й *S.p 2* на 3,6 та 3,9 порядка, відповідно.

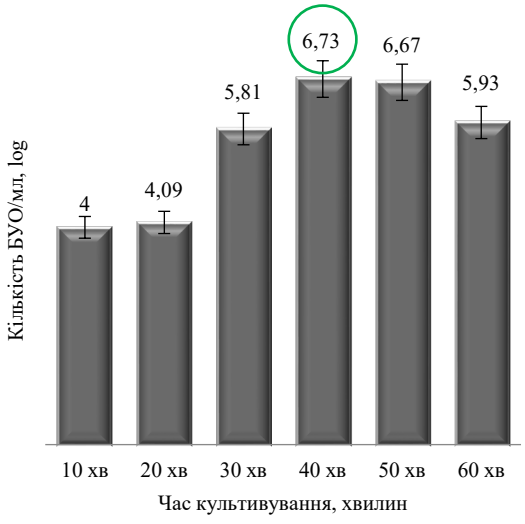

Рис. 3. Латентний період фагу *S.she 3*

Характеристика літичного процесу за участі фагу *S.e 5* (***рис. 4***) 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).

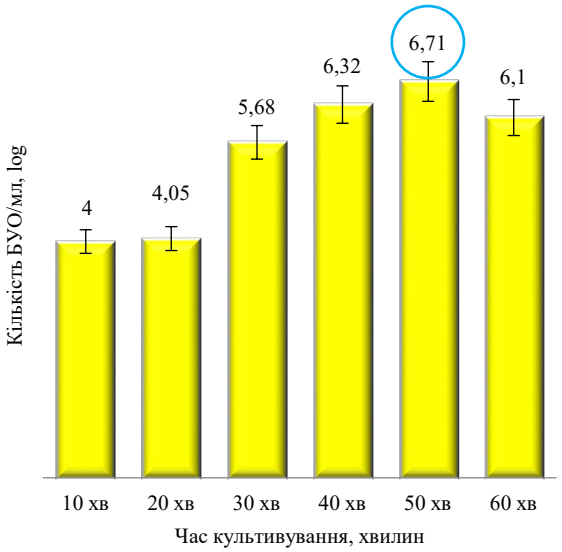

Рис. 4. Латентний період фагу *S.e 5*

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 з лікувальною метою проти стафілококів.

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 [26, 27]. 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 [24] повідомляють про використання фагу *Phage SAvB14* з латентним періодом 30–50 хв у ветеринарному препараті для лікування запалення вимені в корів. Водночас дослідники повідомляють, що для впровадження у практику бактеріофагових препаратів вони повинні ґрунтовно піддаватися дослідженню. Зокрема до таких досліджень відносять визначення стійкості виділених фагів до різних

температур та pH навколишнього середовища [18, 19]. Крім того для виключення наявності профагів у маточних бактеріальних-клітинах проводять експерименти із використанням фізичних та хімічних методів (обробку культур стафілококів ультрафіолетовими променями, Мітоміцин С, молекулярно-генетичні дослідження фагів з визначення генів стійкості до антибіотиків, тощо).

Отже, виявлена здатність до активного розмноження у бактеріальних клітинах у виділених зі шкіри чотирьох літичних бактеріофагів дає змогу використати їх для подальших досліджень з розробки фагового препарату для лікування запальних захворювань шкіри у собак.

Висновки

У виділених з ураженої за піодермії фагів *S.a 4, S.p 2, S.she 3* та *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. Така інтенсивність інфекційного процесу за участі даних бактеріофагів вважається позитивною для використання їх у подальших дослідженнях з метою розробки фагового препарату.

Перспективи подальших досліджень полягають у визначені впливу на розвиток фагів фізичних і хімічних чинників з метою відбору найефективніших для розробки фагового препарату активного щодо збудників піодермії собак.

Конфлікт інтересів

Автори стверджують про відсутність конфлікту інтересів щодо їхнього викладу та результатів досліджень.

References

1. 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. https://doi.org/10.1080/1040841x.2016.1271309
2. Horiuk, Y., Kukhtyn, M., Perkiy, Y., & Horiuk, V. (2018). Distribution of main pathogens of mastitis in cows on dairy farms in the western region of Ukraine. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*, 20 (83), 115–119. https://doi.org/10.15421/nvlvet8322
3. Kisera, Ya., Bozhyk, L., Grynevych, N., & Martyniv, Yu. (2021). Species composition of circulation microflora and its resistance to antibacterial drugs in the conditions of the impulse veterinary clinic of the city of Lviv. *Naukovij Visnik Veterinarnoї Medicini*, 2 (168), 65–71. https://doi.org/10.33245/2310-4902-2021-168-2-65-71
4. Paul, N. C., Damborg, P., & Guardabassi, L. (2013). Dam-to-offspring transmission and persistence of *Staphylococcus pseudintermediusclones* within dog families. *Veterinary Dermatology*, 25 (1), 3. https://doi.org/10.1111/vde.12090
5. Kukhtyn, M. D., Kovalenko, V. L., Horyuk, Y. V., Horyuk, V. V., & Stravskyy, Y. S. (2016). Bacterial biofilms formation of Cattle mastitis pathogens. *Journal for Veterinary Medicine, Biotechnology and Biosafety*, 2 (4), 30–32.
6. 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. https://doi.org/10.15421/021789
7. Oliver, S. P., Murinda, S. E., & Jayarao, Bhushan. 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. https://doi.org/10.1089/fpd.2010.0730
8. 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 ϕAB2 endolysin (LysAB2) against both gram-positive and gram-negative bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90 (2), 529–539. https://doi.org/10.1007/s00253-011-3104-y
9. Gortel, K. (2013). Recognizing pyoderma. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 43 (1), 1–18. https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2012.09.004
10. Scarafile, G. (2016). Antibiotic resistance: current issues and future strategies. *Reviews in Health Care*, 7 (1), 3–16. https://doi.org/10.7175/rhc.v7i1.1226
11. 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. https://doi.org/10.3390/antibiotics9120918
12. Pires, J., Huisman, J. S., Bonhoeffer, S., & Van Boeckel, T. P. (2021). 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. https://doi.org/10.1093/jac/dkab451
13. 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. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2024.106170
14. Mocherniuk, M. M., Kukhtyn, M. D., Horiuk, Y. V., Horiuk, V. V., Tsvigun, O. A., & Tokarchuk, T. S. (2022). Microflora of boxes for holding veterinary patients in clinics. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 13 (3), 257–264. https://doi.org/10.15421/022233
15. Horiuk, Y., Kukhtyn, M., Horiuk, V., Kernychnyi, S., & Tarasenko, L. (2020). Characteristics of bacteriophages of the *Staphylococcus aureus* variant bovis. *Veterinární Medicína*, 65 (10), 421–426. https://doi.org/10.17221/55/2020-vetmed
16. Vasylkiv, O., & Kukhtyn, M. (2023). Isolation and characterization of bacteriophages Salmonella spp. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies*, 25 (111), 48–53. https://doi.org/10.32718/nvlvet11108
17. Duckworth, D. H., & Gulig, P. A. (2002). Bacteriophages. *BioDrugs*, 16 (1), 57–62. https://doi.org/10.2165/00063030-200216010-00006
18. Horiuk, Y. V., Kukhtyn, M. D., Horiuk, V. V., & Mizyk, V. P. (2019). Effect of Temperature on the lytic activity of Bacteriophage phage SAVB14, specific for *Staphylococcus aureus* variant *bovis*. *Veterinary Science, Technologies of Animal Husbandry and Nature Management*, 4, 37–40. https://doi.org/10.31890/vttp.2019.04.07
19. Esmael, A., Azab, E., Gobouri, A. A., Nasr-Eldin, M. A., Moustafa, M. M. A., Mohamed, S. A., Badr, O. A. M., & 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. https://doi.org/10.3390/microorganisms9020423
20. Banovic, F., Linder, K., & Olivry, T. (2016). Clinical, microscopic and microbial characterization of exfoliative superficial pyoderma-associated epidermal collarettes in dogs. *Veterinary Dermatology*, 28 (1), 107. https://doi.org/10.1111/vde.12352
21. Chaudhary, A. K., Kumar, A., & shrivastva, M. (2019). Study on prevalence and resistance patterns of bacterial pathogens isolated from canine pyoderma. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 8 (01), 2305–2311. https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.801.241
22. Frosini, S., Bond, R., King, R., Feudi, C., Schwarz, S., & Loeffler, A. (2021). Effect of topical antimicrobial therapy and household cleaning on meticillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* carriage in dogs. *Veterinary Record*, 190 (8), 1–10. https://doi.org/10.1002/vetr.937
23. Merabishvili, M., Pirnay, J.-P., Verbeken, G., Chanishvili, N., Tediashvili, M., Lashkhi, N., Glonti, T., Krylov, V., Mast, J., Van Parys, L., Lavigne, R., Volckaert, G., Mattheus, W., Verween, G., De Corte, P., Rose, T., Jennes, S., Zizi, M., De Vos, D., & Vaneechoutte, M. (2009). Quality-controlled small-scale production of a well-defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials. *PLoS ONE*, 4 (3), 4944. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004944

24. Horiuk, Y., Kukhtyn, M., Kernychnyi, S., Laiter-Moskaliuk, S., Prosyanyi, S., & Boltyk, N. (2021). Sensitivity of *Staphylococcus aureus* cultures of different biological origin to commercial bacteriophages and phages of *Staphylococcus aureus* var. *bovis*. *Veterinary World*, 1588–1593. https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.1588-1593
25. Stroich, V. V., & Horiuk, Yu. V. (2024). Evaluation of available bacteriophage preparations on the market of ukraine and selection of phages specific to causative agents of canine pyoderma. *Podilian Bulletin: Agriculture, Engineering, Economics*, 43, 230–236. https://doi.org/10.37406/2706-9052-2024-2.33
26. Dong, Q., Wang, J., Yang, H., Wei, C., Yu, J., Zhang, Y., Huang, Y., Zhang, X., & Wei, H. (2014). Construction of a chimeric lysin Ply187N-V12C with extended lytic activity against staphylococci and streptococci. *Microbial Biotechnology*, 8 (2), 210–220. https://doi.org/10.1111/1751-7915.12166
27. Park, H., Kim, J., Kim, H., Cho, E., Park, H., Jeon, B., & Ryu, S. (2023). Characterization of the lytic phage MSP1 for the inhibition of multidrug-resistant Salmonella enterica serovars Thompson and its biofilm. *International Journal of Food Microbiology*, 385, 110010. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.110010

ORCID
V. Stroich https://orcid.org/0009-0009-3076-542X
Y. Horiuk https://orcid.org/0000-0002-7162-8992

2024 Stroich V. and Horiuk Y. This is an open-access article distributed under the Creative Commons Attribution License http://creativecommons.org/licenses/by/4.0, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.