

## КОМБИНИРОВАННОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ БАКТЕРИОФАГА VB\_SAUM-515A1 И АНТИБИОТИКОВ НА КЛИНИЧЕСКИЕ ИЗОЛЯТЫ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Н. К. Абдраймова, М. А. Корниенко <sup>✉</sup>, Д. А. Беспятых, Н. С. Купцов, Р. Б. Городничев, Е. А. Шитиков

Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

Поиск новых вариантов терапии инфекционных заболеваний, вызванных *Staphylococcus aureus* с множественной лекарственной устойчивостью, на сегодняшний день является приоритетной задачей. В качестве одной из перспективных альтернатив классической антибиотикотерапии может быть рассмотрена комбинация антибиотиков с вирулентными (литическими) бактериофагами. Целью работы было оценить результат совместного воздействия литического бактериофага vB\_SauM-515A1 семейства *Herelleviridae* и антибиотиков различных классов на клинические штаммы *Staphylococcus aureus*. Штаммы ( $n = 4$ ) относятся к клинически значимым сиквенс-типам ST1, ST8, ST121 и характеризуются множественной лекарственной устойчивостью. Эффективность комбинированного воздействия двух антибактериальных агентов оценивали при сравнении значений оптической плотности опытных и контрольных образцов после 24 ч инкубации. Наличие взаимодополняющих эффектов было показано при совместном использовании бактериофага с оксациллином, тетрациклином и линезолидом, по сравнению с использованием каждого из агентов по отдельности. Эффективность повышалась в основном в рамках подобранных оптимальных значений множественности инфекции. Антагонистические эффекты комбинации фага и антибиотиков не были выявлены. Таким образом, вирулентный бактериофаг vB\_SauM-515A1 можно рассматривать в качестве возможного вспомогательного терапевтического агента против устойчивых к антибактериальным препаратам штаммов *Staphylococcus aureus*.

**Ключевые слова:** бактериофаговая терапия, *Staphylococcus aureus*, *Herelleviridae*, комбинированное воздействие, гентамицин, тетрациклин, ванкомицин, оксациллин, линезолид, левофлоксацин

**Финансирование:** исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-15-00443, <https://rscf.ru/project/22-15-00443/>.

**Благодарности:** авторы благодарят Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России за помощь в секвенировании бактериальных генов для мультилокусного секвенирования-типирования штаммов.

**Вклад авторов:** Н. К. Абдраймова, М. А. Корниенко — план исследования, набор и обработка данных, написание статьи; Д. А. Беспятых — обработка данных, Н. С. Купцов — набор данных; Р. Б. Городничев — план исследования и обработка данных; Е. А. Шитиков — обработка данных, написание статьи.

**Соблюдение этических стандартов:** работа выполнена с соблюдением норм Санитарно-эпидемиологических правил «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» СП 1.3.2322-08; Санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2518-09 «Дополнения и изменения № 1 к санитарно-эпидемиологическим правилам «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» СП 1.3.2322-08; Санитарно-эпидемиологических правил «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» СанПиН 2.1.7.2790-10, а также Федеральных клинических рекомендаций «Рациональное применение бактериофагов в лечебной и противозидемической практике».

✉ **Для корреспонденции:** Мария Андреевна Корниенко  
ул. Малая Пироговская, д. 1а, г. Москва, 119435; [kornienkomariya@gmail.com](mailto:kornienkomariya@gmail.com)

**Статья получена:** 23.09.2022 **Статья принята к печати:** 18.10.2022 **Опубликована онлайн:** 26.10.2022

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2022.052

## COMBINED EFFECTS OF BACTERIOPHAGE VB\_SAUM-515A1 AND ANTIBIOTICS ON THE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* CLINICAL ISOLATES

Abdraimova NK, Kornienko MA <sup>✉</sup>, Bespiatykh DA, Kuptsov NS, Gorodnichev RB, Shitikov EA

Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

Currently, the search for new therapy options for infectious diseases caused by multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* is a priority. Combining antibiotics with virulent (lytic) bacteriophages may be considered a viable alternative to conventional antibiotic therapy. The study was aimed to assess the combined effects of the lytic bacteriophage vB\_SauM-515A1 of *Herelleviridae* family and antibiotics of various classes on the *Staphylococcus aureus* clinical strains. Strains ( $n = 4$ ) belong to the clinically significant sequence types ST1, ST8, ST121 and are characterized by multidrug resistance. Efficiency of the combination use of two antibacterial agents was assessed by comparison of optical densities of the test samples and controls after 24 hrs. of incubation. Mutually enhancing activities of bacteriophage used in combination with oxacillin, tetracycline and linezolid were revealed, in contrast to the separate use of each agent. Efficiency generally increased with the selected optimum multiplicity of infection values. No antagonism was revealed when combining the phage with antibiotics. Thus, virulent bacteriophage vB\_SauM-515A1 can be considered as a possible auxiliary therapeutic agent for antimicrobial-resistant strains of *Staphylococcus aureus*.

**Keywords:** bacteriophage therapy, *Staphylococcus aureus*, *Herelleviridae*, combined effects, gentamicin, tetracycline, vancomycin, oxacillin, linezolid, levofloxacin

**Funding:** the study was funded by the Russian Science Foundation, project number 22-15-00443, <https://rscf.ru/project/22-15-00443/>.

**Acknowledgements:** the authors express their gratitude to the Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of the Russian Federal Medical Biological Agency, for bacterial gene sequencing required for multilocus sequence typing of the strains.

**Author contribution:** Abdraimova NK, Kornienko MA — study plan, data acquisition and processing, manuscript writing; Bespiatykh DA — data processing, Kuptsov NS — data acquisition; Gorodnichev RB — study plan, data processing; Shitikov EA — data processing, manuscript writing.

**Compliance with ethical standards:** the study was carried out in accordance with the sanitary and hygienic guidelines SP 1.3.2322-08 "Safety of Working With Microorganisms of III-IV Groups of Pathogenicity (Danger) and Causative Agents of Parasitic Diseases"; sanitary and hygienic guidelines SP 1.3.2518-09 "Additions and Amendments № 1 to the guidelines SP 1.3.2322-08 "Safety of Working With Microorganisms of III-IV Groups of Pathogenicity (Danger) and Causative Agents of Parasitic Diseases"; sanitary and hygienic guidelines "Sanitary and Epidemiologic Requirements for the Handling of Medical Waste" (SanPiN 2.1.7.2790-10); Federal Clinical Guidelines "Rational Use of Bacteriophages in Clinical and Epidemiological Practice".

✉ **Correspondence should be addressed:** Maria A. Kornienko  
Malaya Pirogovskaya, 1a, Moscow, 119435; [kornienkomariya@gmail.com](mailto:kornienkomariya@gmail.com)

**Received:** 23.09.2022 **Accepted:** 18.10.2022 **Published online:** 26.10.2022

**DOI:** 10.24075/brsmu.2022.052

Золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*) — патогенный микроорганизм, вызывающий серьезные инфекционные заболевания кожи и мягких тканей, а также инвазивные инфекции, такие как пневмония, эндокардит, остеомиелит и другие [1]. Терапия подобных заболеваний затруднена в связи с широким распространением штаммов с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), среди которых наиболее клинически значим метициллин-устойчивый золотистый стафилококк (MRSA, от англ. *methicillin resistant Staphylococcus aureus*). В 2019 г. из-за проблемы антибиотикоустойчивости умерло около 4,95 млн человек; одной из ведущих причин летальных исходов были стафилококковые инфекции, причем на метициллин-устойчивые штаммы пришлось более 100 000 смертей [2]. В России на 2020 г. доля бактерий рода *Staphylococcus*, устойчивых к таким антибиотикам, как тетрациклин, гентамицин, эритромицин и оксациллин, составила 15–25%, а к левофлоксацину и ципрофлоксацину подавляющее большинство штаммов проявляли промежуточный уровень устойчивости [3]. В последнее время зафиксированы отдельные случаи возникновения устойчивости к ванкомицину и линезолиду, являющихся препаратами выбора в терапии MRSA-инфекций [4, 5]. Подобная статистика подчеркивает необходимость поиска альтернативных антимикробных агентов, в качестве которых могут быть рассмотрены препараты бактериофагов [6, 7].

Бактериофаги (фаги) — вирусы, естественным путем заражающие клетки прокариот. В качестве терапевтических агентов используют только вирулентные (литические) фаги, что необходимо для исключения возможной передачи детерминант антибиотикоустойчивости, а также генов бактериальных токсинов посредством горизонтального переноса [8]. Фаговые препараты имеют ряд преимуществ по сравнению с антибиотиками. Так, вирулентные бактериофаги способны вызывать лизис бактерий вне зависимости от их чувствительности к антибиотикам, что делает фаги мощным средством борьбы с устойчивыми штаммами. Другое преимущество — в отсутствии побочных эффектов на организм пациента, что позволяет безопасно применять препараты на основе вирулентных бактериофагов даже в сложных клинических случаях [9].

В настоящее время использование бактериофагов является одним из многообещающих подходов в лечении стафилококковых инфекций, вызванных штаммами с МЛУ [10]. Успешность их применения подтверждена клиническими экспериментами как на животных моделях [11], так и на человеке [12]. Отдельно стоит отметить эффективность использования препаратов бактериофагов против биопленок, образуемых золотистыми стафилококками [10].

Наиболее перспективной стратегией терапии заболеваний, вызванных штаммами с лекарственной устойчивостью, представляется комбинированное использование бактериофагов и антибиотиков [13, 14]. В ряде публикаций для различных патогенов показано, что совместное применение полулетальных доз антибиотиков и бактериофагов эффективнее, чем их отдельное использование [13, 15]. Впервые положительный эффект такой комбинации был описан в 2007 г. [13]. В настоящее время показано, что совместное использование бактериофага и антибиотика может также приводить к нейтральным и отрицательным эффектам [16, 17].

Повышение эффективности при совместном использовании (взаимодополняющее влияние) антибактериальных агентов можно объяснить наличием

одного из эффектов — аддитивного или синергетического. При аддитивном эффекте более активное подавление роста клеток достигается за счет суммирования антибактериального действия агентов. При синергизме эффективность комбинации значимо выше, чем при использовании каждого компонента индивидуально и их суммы. В случае нейтрального эффекта результат совместного использования препаратов значимо не отличается от результата действия хотя бы одного из антимикробных агентов. При антагонизме действие одного агента может подавлять действие другого. Надо отметить, что антагонистическое взаимное воздействие бактериофагов и антибиотиков показано лишь в единичных случаях [17].

На сегодняшний день описываемые эффекты обнаружены при комбинированном применении бактериофагов и некоторых антибиотиков (ванкомицина, даптомицина, оксациллина) против *S. aureus* [12, 17]. Однако, учитывая генетическую и фенотипическую гетерогенность патогена и даже лабораторных штаммов, для выявления закономерностей возникновения того или иного результирующего эффекта важно проверять пригодность потенциальных пар фаг-антибиотик на большом наборе бактериальных изолятов.

Целью настоящей работы было оценить эффект комбинированного воздействия литического бактериофага семейства *Herelleviridae* и антибиотиков различных классов на клинические штаммы *Staphylococcus aureus* с МЛУ.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Бактериальные штаммы

В исследовании использовали штаммы *S. aureus* (SA64, SA413, SA1050 и SA515/1) из коллекции лаборатории молекулярной генетики микроорганизмов Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства России. Культивирование бактерий проводили в течение 18–24 ч на питательной среде LB (от англ. *lysogeny broth*) (Oxoid; Великобритания) при температуре 37 °С. Типирование штаммов проводили методом мультилокусного секвенирования-типирования (МЛСТ) с использованием стандартной схемы [14]. Определение минимальных ингибирующих концентраций (МИК) антибиотиков проводили методом серийных разведений в соответствии с стандартами CLSI [18]. МИК определяли для шести антибиотиков: оксациллина, ванкомицина, гентамицина, тетрациклина, левофлоксацина, линезолида (Sigma-Aldrich; США).

### Бактериофаг

Бактериофаг vB\_SauM-515A1 (семейство *Herelleviridae*) был ранее выделен из коммерческого комплексного фагового препарата «Бактериофаг стафилококковый» серии P332 («Микроген»; Россия) на штамме-хозяине *S. aureus* SA515. Детальная характеристика бактериофага представлена ранее [19, 20].

### Определение титра исследуемого бактериофага на тестируемых штаммах

Титр определяли методом титрования по Грациа, как описано ранее [21]. Для этого аликвоты (5 мкл) десятикратных последовательных разведений препарата

бактериофага (сток  $2 \times 10^9$  бляшкообразующих единиц/мл, или БОЕ/мл) наносили на поверхность чашек с полужидким LB-агаром (0,6% агара), содержащих 0,1 мл ночной культуры тестируемого штамма ( $10^6$  колониеобразующих единиц/мл, или КОЕ/мл), и инкубировали при температуре 37 °C в течение 24 ч. Для тестируемых штаммов оценивали концентрацию фаговых частиц в БОЕ/мл. Эффективность лизиса бактериофагом исследуемых штаммов оценивали на основании расчета эффективности посева (EOP, от англ. *efficiency of plating*) [19]. EOP представляет собой отношение титра бактериофага на исследуемом штамме к титру бактериофага на штамме-хозяине (SA515/1), выраженное в процентах. Оценку эффективности посева проводили в трех повторностях.

### Изучение комбинированного воздействия антибиотиков и бактериофага

Совместное воздействие антибиотиков и бактериофагов изучали как описано ранее [17]. Эксперименты проводили в плоскостонных 96-луночных планшетах (Thermo Scientific; США) в объеме 200 мкл в среде LB. Инокулировали бактериальными клетками в экспоненциальной фазе роста ( $OD_{620} = 0,2$ ;  $5 \times 10^8$  КОЕ/мл) до конечной концентрации  $10^4$  клеток в лунке. Бактерии инфицировали отдельно фагом в четырех различных значениях множественности инфекции (MOI, от англ. *multiplicity of infection*) (0,01; 0,001; 0,0001; 0,00001), воздействовали отдельно антибиотиками, а также комбинацией двух антибактериальных агентов в различных концентрациях. Препараты антибиотиков использовали в концентрациях 1/8 МИК, 1/4 МИК, 1/2 МИК. В качестве положительного контроля использовали инокулированную питательную среду без добавления антибактериальных агентов; в качестве отрицательного — чистую среду. Динамику воздействия фагов и антибиотиков на бактерии определяли с помощью измерений оптической плотности непрерывно в течение 10 ч и после 24 ч инкубации при 37 °C с помощью микропланшетного фотометра Multiscan Ascent (Thermo electron corporation; Финляндия) при 620 нм. На основании значений оптических плотностей построены кривые роста штаммов *S. aureus*, инфицированных бактериофагом при различных значениях MOI. Наличие взаимодополняющего эффекта в отдельных случаях подтверждали на основании сравнения конечных значений OD в последней точке (24 ч), как было описано ранее [15].

### Статистический анализ

Статистический анализ проводили с помощью программы Graph Pad Prism версии 8.0.1 (GraphPad Software Inc.; США) на основании данных *t*-теста. В ходе анализа сравнивали значения оптической плотности, полученные через 24 ч инкубации для проб, обработанных только одним из антимикробных агентов (антибиотик/бактериофаг) с

аналогичными значениями для проб, обработанных одновременно обоими агентами.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Бактериальные штаммы были охарактеризованы по сиквенс-типам (ST, от англ. *sequence type*), проверены на чувствительность к бактериофагу и антибиотикам (табл. 1). По результатам МЛСТ было показано, что штаммы *S. aureus* принадлежали к сиквенс-типам ST1, ST8 и ST121. Все образцы характеризовались МЛУ, среди них были выявлены штаммы, устойчивые к оксациллину (SA515/1), гентамицину (SA64, SA413, SA515/1), левофлоксацину (SA64, SA413) и линезолиду (SA413). К тетрациклину были устойчивы все исследуемые бактерии. Для трех штаммов выявлен промежуточный уровень устойчивости к ванкомицину и линезолиду (SA64, SA1050, SA515/1). Бактериофаг vB\_SauM-515A1 вызывал лизис всех исследуемых бактерий. Наибольшая эффективность лизиса, превышающая значения для штамма-хозяина (SA515/1) более чем в 2,5 раза, показана для штаммов SA64 (267%) и SA413 (283%). Менее активно бактериофаг лизировал штамм SA1050 (72%).

Для изучения комбинированного воздействия антимикробных агентов были определены оптимальные значения MOI при помощи кривых роста бактериальных культур, инфицированных бактериофагом (рис. 1). Для штамма хозяина SA515/1 наблюдали снижение оптической плотности по сравнению с неинфицированным контролем при значении MOI, равном 0,01 и 0,001, при этом соотношение бактериофага и клеток, соответствующее MOI 0,01, к 24 ч вызывало полное подавление роста. Таким образом, наиболее интересными для исследования взаимного влияния бактериофага и антибиотика на культуру клеток штамма SA515/1 являются эксперименты с использованием MOI 0,001. Эффективность лизиса штамма SA1050 бактериофагом vB\_SauM-515A1 была ниже, чем у штамма-хозяина, в связи с чем при MOI = 0,01 и MOI = 0,001 происходит лишь частичное подавление роста клеток: к 24 ч по сравнению с неинфицированным контролем оптическая плотность падает с 0,6 до 0,44 и 0,4 соответственно. Для штаммов SA413 и SA64 показана большая эффективность лизиса, чем для штамма хозяина, оптимальным соотношением vB\_SauM-515A1 и клеток SA413 является MOI 0,001, а для штамма SA64 — 0,0001 и 0,00001.

Эффективность влияния комбинированного воздействия антибиотика (оксациллина, ванкомицина, тетрациклина, гентамицина, левофлоксацина и линезолида) с бактериофагом vB\_SauM-515A1 оценивали для штаммов, устойчивых к выбранному антибиотику или проявляющих промежуточный уровень устойчивости. Взаимодополняющие эффекты оксациллина и бактериофага vB\_SauM-515A1 рассматривали на примере единственного устойчивого

Таблица 1. Характеристика штаммов *Staphylococcus aureus*

Штамм	ST	EOP	Чувствительность к антибиотикам, мкг/мл					
			Оксациллин	Ванкомицин	Гентамицин	Тетрациклин	Левофлоксацин	Линезолид
SA64	1	267%	< 0,125 (S)	8 (I)	128 (R)	64 (R)	8 (R)	4 (I)
SA413	8	283%	< 0,125 (S)	0,5 (S)	128 (R)	32 (R)	4 (R)	8 (R)
SA1050	121	72%	< 0,125 (S)	8 (I)	< 0,125 (S)	64 (R)	< 0,125 (S)	4 (I)
SA515/1	8	100%	4 (R)	8 (I)	128 (R)	32 (R)	< 0,125 (S)	4 (I)

Примечание: R — устойчивые штаммы, I — штаммы с промежуточной устойчивостью, S — чувствительные штаммы.

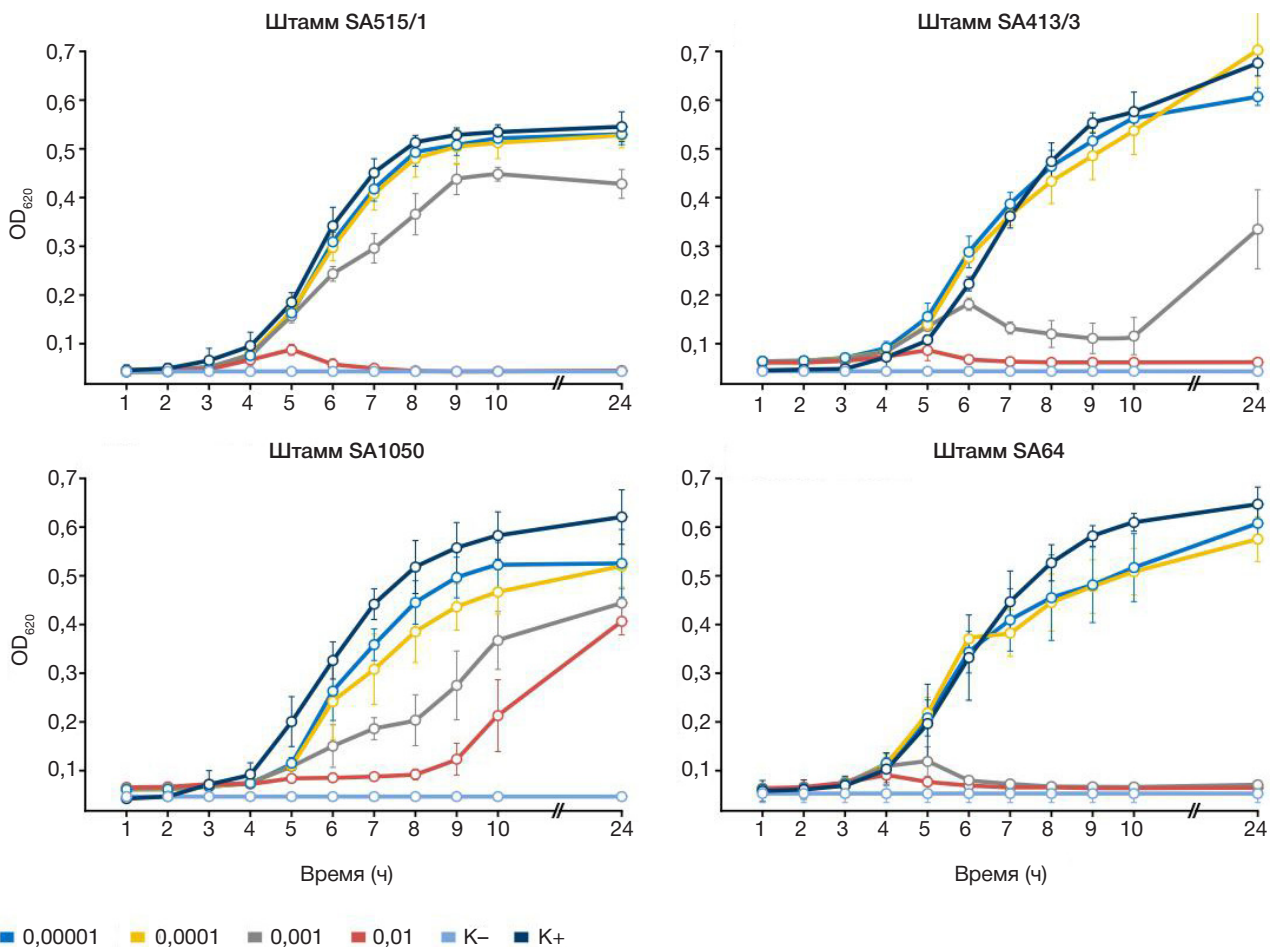


Рис. 1. Кривые роста штаммов *S. aureus*, инфицированных бактериофагом vB\_SauM-515A1 при различных значениях MOI

к оксациллину штамма SA515/1. Бактериофаг усиливал действие антибиотика при оптимальном для этого штамма MOI, равном 0,001, и концентрации антибиотика 1/4 и 1/8 МИК (рис. 2, табл. 2). Похожий эффект наблюдали и для концентрации оксациллина 1/2 МИК, но данный результат статистически не достоверен.

Для других штаммов большинство случаев взаимодополняющих эффектов было зарегистрировано при совместном использовании бактериофага с тетрациклином либо линезолидом (рис. 2, табл. 2). В случае с SA64, SA413 и SA1050 данные антибиотики совместно с бактериофагом вызвали более эффективный лизис, чем каждый из антимикробных агентов по отдельности, причем в различных сочетаниях концентраций (табл. 2). Надо отметить, что взаимодополняющие эффекты чаще всего были выявлены при оптимальном значении MOI для каждого из штаммов и концентрации антибиотика в 1/2 МИК.

Взаимодополняющие эффекты при использовании бактериофага с ванкомицином, гентамицином и левофлоксацином на исследуемых штаммах *S. aureus* выявлены не были. Кроме того, ни для одного из исследуемых штаммов не были показаны эффекты антагонизма при совместном использовании антибиотика (оксациллина, ванкомицина, тетрациклина, гентамицина, линезолида и левофлоксацина) и бактериофага vB\_SauM-515A1 (табл. 2).

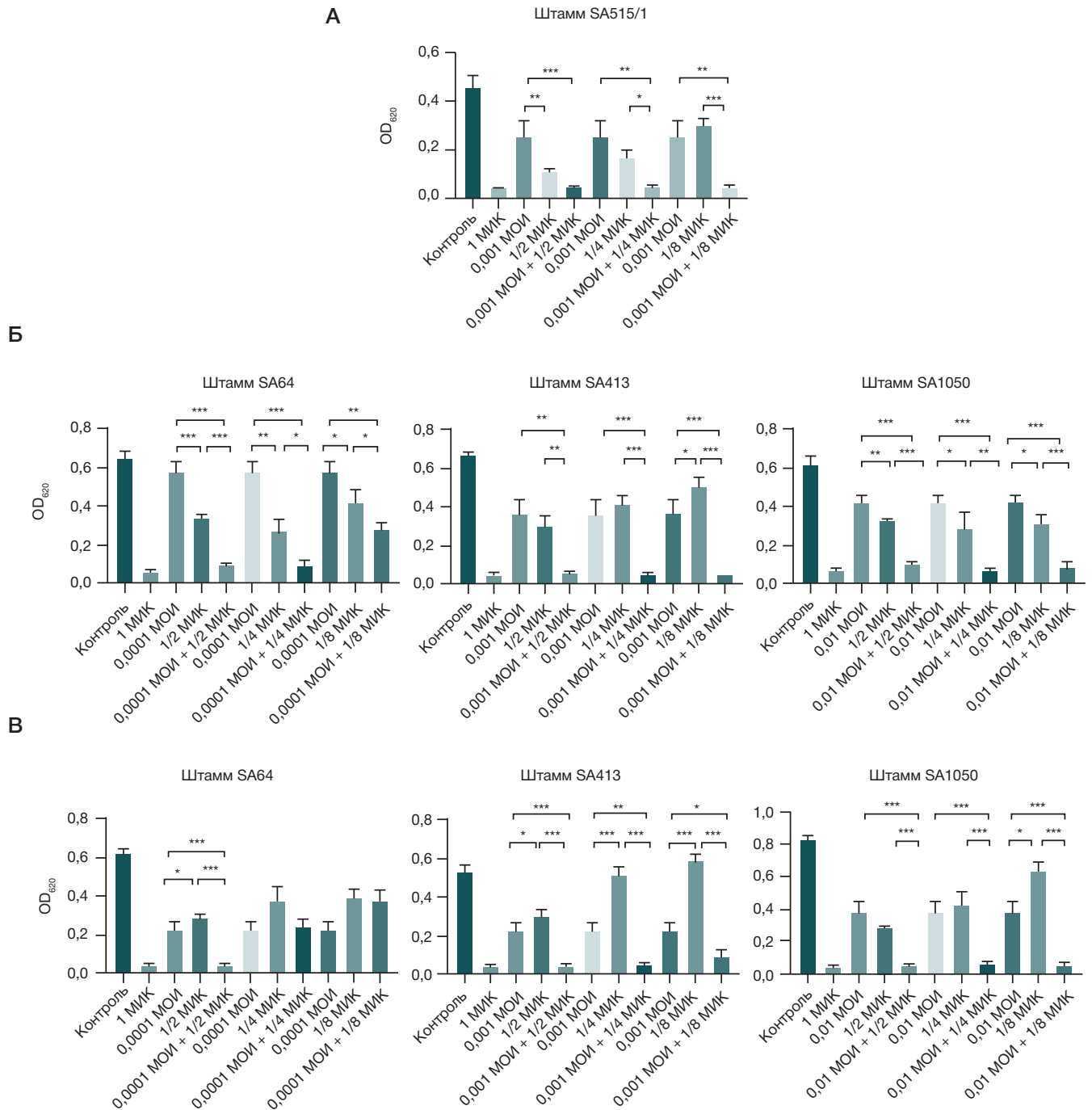
## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Широкое распространение инфекций, вызванных штаммами *S. aureus* с МЛУ, является серьезной проблемой

современного здравоохранения. Один из вариантов ее решения — совместное использование антибиотиков с бактериофагами. В настоящей работе для изучения комбинированного воздействия двух агентов на штаммы *S. aureus* с МЛУ был использован ранее охарактеризованный представитель семейства *Herelleviridae* — литический бактериофаг vB\_SauM-515A1 [20, 22]. Стафилофаги семейства *Herelleviridae* — одни из наиболее эффективно применяемых в терапии [19]. Они облигатно вирулентны и обладают широким спектром литической активности [19]. Последнее согласуется с результатами настоящего исследования: бактериофаг vB\_SauM-515A1 эффективно подавлял рост всех исследуемых штаммов *S. aureus*, принадлежащих к клинически значимым сиквенс-типам с высокой частотой встречаемости (табл. 1) [23, 24].

Для оценки комбинированного действия литического бактериофага и антибиотиков были выбраны препараты, используемые в терапии различных инфекционных заболеваний, вызванных стафилококками (оксациллин, ванкомицин, гентамицин, тетрациклин, левофлоксацин, линезолид) [25, 26]. Вышеперечисленные антибиотики относятся к разным классам, для каждого из которых характерен свой механизм действия на бактериальную клетку. Важно отметить, что в работе были исследованы препараты как с бактериостатическим (тетрациклин, гентамицин, линезолид), так и с бактерицидным действием (оксациллин, ванкомицин, левофлоксацин). Исследуемые штаммы в большинстве случаев были устойчивы к данным антибиотикам.

В настоящем исследовании были выявлены случаи взаимодополняющего эффекта препаратов (оксациллина,



**Рис. 2.** Комбинированное воздействие литического бактериофага vB\_SauM-515A1 и антибиотиков (оксациллина (А), тетрациклина (Б), линезолида (В)) на штаммы *S. aureus* при оптимальных значениях MOI. Статистическая значимость: \* —  $p \leq 0,05$ ; \*\* —  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* —  $p \leq 0,001$

тетрациклина, линезолида) и бактериофага vB\_SauM-515A1, что согласуется с работами других авторов. Так, для оксациллина и линезолида ранее было показано, что совместное применение препаратов с литическим бактериофагом Sb-1 в большинстве случаев более эффективно ингибировало рост штаммов *S. aureus* [17, 25]. В свою очередь комбинация тетрациклина в определенной концентрации и бактериофага семейства *Herelleviridae* приводила к более эффективному подавлению роста устойчивых биопленкообразующих штаммов *S. aureus*, превосходя эффективность фага [27].

В недавно проведенном исследовании зарубежных коллег были получены противоположные результаты [28]. Авторы работы показали, что вне зависимости от типа антибиотика одновременное его использование с

литическим бактериофагом не приводит к значимому повышению эффективности ингибирования роста бактерий. Подобное расхождение можно объяснить зависимостью результата от использованного штамма бактерии-мишени [9]. Так, в настоящей работе комбинированное воздействие тетрациклина и линезолида с фагом на штамм SA515/1 не приводило к подавлению роста, в то время как при действии этих же комбинаций на другие штаммы взаимодополняющий эффект присутствовал.

При обнаружении положительных эффектов комбинированного использования антибиотиков и бактериофагов важным фактором является подбор оптимальных полулетальных концентраций обоих агентов. При соответствующих концентрациях вероятнее всего происходит суммирование их антибактериальных

**Таблица 2.** Результирующий эффект комбинированного воздействия различных концентраций бактериофага vB\_SauM-515A1 и антибиотиков на клинические штаммы *S. aureus*

Штамм	MOI	Оксациллин, доля МИК			Ванкомицин, доля МИК			Гентамицин, доля МИК			Тетрациклин, доля МИК			Левифлоксацин, доля МИК			Линезолид, доля МИК																			
		1/8	1/4	1/2	1/8	1/4	1/2	1/8	1/4	1/2	1/8	1/4	1/2	1/8	1/4	1/2	1/8	1/4	1/2																	
SA64	0,00001	S																																		
	0,0001																																			
	0,001																			L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
	0,01																			L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
SA413	0,00001	S			S																															
	0,0001																																			
	0,001																																			
	0,01																			L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
SA1050	0,00001	S						S						S																						
	0,0001																																			
	0,001																																			
	0,01																																			
SA515/1	0,00001													S																						
	0,0001																																			
	0,001																			+	+															
	0,01																			L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L

**Примечание:** + — взаимодополняющий эффект; пустая ячейка — отсутствие взаимодополняющего эффекта; L — полный лизис культуры бактериофагом; S — штамм чувствителен к антибиотику.

действий, что наблюдалось в ходе проводимых работ (рис. 2, табл. 2). Эффективность совместного использования бактериофагов с антибиотиками может быть также обусловлена преодолением механизмов антибиотикоустойчивости в процессе взаимодействия клетки с вирусной частицей. Ранее было показано, что литический фаг устойчивого штамма *Pseudomonas aeruginosa* использует в качестве рецептора мембранный белок порин, необходимый для оттока антибиотических препаратов. Чтобы приобрести устойчивость к фагу, бактерия вынуждена избавиться от системы эффлюкса, вновь становясь чувствительной к антибиотику [29]. Таким образом, воздействие бактериофага на клетку может обеспечивать селективный отбор клонов, повышая чувствительность бактериальной культуры к антибиотикам.

Важно отметить, что антагонизма, а именно снижения эффективности действия одного антибактериального агента (антибиотик/бактериофаг) в присутствии другого, во всех исследуемых комбинациях не наблюдалось. Низкая частота встречаемости подобных негативных случаев была показана и в других работах [17, 27].

На данный момент остается неясным, что лежит в основе взаимного воздействия фагов и антибиотиков на

бактериальную клетку. Более эффективное применение может быть обусловлено как простым суммированием действий каждого из антибактериальных агентов, так и их более сложным взаимным влиянием друг на друга, приводящим к более активному подавлению роста клеток. Для дальнейшего практического применения фагов в качестве терапевтических агентов в комбинации с антибиотиками необходимо детальное изучение причин проявления взаимодополняющих эффектов, что требует проведения дополнительных исследований.

## ВЫВОДЫ

Результаты исследования показывают, что комбинация литического бактериофага vB\_SauM-515A1 с антибиотиками различных классов может быть более эффективна по сравнению с отдельным использованием антибактериальных агентов. Таким образом, исследуемый фаг может быть рассмотрен в качестве перспективного терапевтического агента против штаммов *S. aureus* с МЛУ. Полученные данные могут быть использованы при дальнейшем изучении эффектов комбинированного применения двух антибактериальных агентов различной природы.

## Литература

- Balasubramanian D, Harper L, Shopsis B, Torres VJ. Staphylococcus aureus pathogenesis in diverse host environments. Pathog Dis. 2017; 75 (1): ftx005.
- Murray CJ, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Aguilar GR, Gray A, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. Lancet. 2022; 399 (10325): 629–55.
- Kuzmenkov AY, Trushin IV, Vinogradova AG, Avramenko AA, Sukhorukova MV, Malhotra-Kumar S, et al. AMRmap: An Interactive Web Platform for Analysis of Antimicrobial Resistance Surveillance Data in Russia. Front Microbiol Frontiers Media S.A. 2021; (12): 620002.
- McGuinness WA, Malachowa N, DeLeo FR. Vancomycin Resistance in Staphylococcus aureus. Yale J Biol Med. 2017; 90 (2): 269.
- Stefani S, Bongiorno D, Mongelli G, Campanile F. Linezolid Resistance in Staphylococci. Pharmaceuticals. 2010; 3 (7): 1988–2006.
- D'Accolti M, Soffritti I, Mazzacane S, Caselli E. Bacteriophages as a Potential 360-Degree Pathogen Control Strategy Microorganisms. 2021; 9 (2): 261.

7. Купцов Н. С., Корниенко М. А., Городничев Р. Б., Данилов Д. И., Малахова М., В., Парфенова Т. В. и др. Эффективность препаратов бактериофагов против патогенов группы ESKAPE. Вестник российского государственного медицинского университета. 2020; (3): 19–26.
8. Harper DR. Criteria for Selecting Suitable Infectious Diseases for Phage Therapy. *Viruses*. 2018; 10 (4): 177.
9. Nikolich MP, Filippov AA. Bacteriophage therapy: Developments and directions. *Antibiotics*. 2020; 9 (3): 135.
10. Kaźmierczak N, Grygorcewicz B, Roszak M, Bochentyn B, Piechowicz L. Comparative Assessment of Bacteriophage and Antibiotic Activity against Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Int J Mol Sci*. 2022; 23 (3): 1274.
11. Prazak J, Iten M, Cameron DR, Save J, Grandgirard D, Resch G, et al. Bacteriophages Improve Outcomes in Experimental *Staphylococcus aureus* Ventilator-associated Pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019; 200 (9): 1126–33.
12. Fabijan AP, Lin RCY, Ho J, Maddocks S, Ben Zakour NL, Iredell JR. Safety of bacteriophage therapy in severe *Staphylococcus aureus* infection. *Nat Microbiol*. 2020; 5 (3): 465–72.
13. Comeau AM, Tétart F, Trojet SN, Prère MF, Krisch HM. Phage-Antibiotic Synergy (PAS):  $\beta$ -Lactam and Quinolone Antibiotics Stimulate Virulent Phage Growth. *PLoS One*. 2007; 2 (8): e799.
14. Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 2000; 38 (3): 1008–15.
15. Jansen M, Wahida A, Latz S, Krüttgen A, Häfner H, Buhl EM, et al. Enhanced antibacterial effect of the novel T4-like bacteriophage KARL-1 in combination with antibiotics against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Sci Rep*. 2018; 8 (1): 14140.
16. Kebriaei R, Lev K, Morrisette T, Stamper KC, Abdul-Mutakabbir JC, Lehman SM, et al. Bacteriophage-Antibiotic Combination Strategy: an Alternative against Methicillin-Resistant Phenotypes of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2020; 64 (7): e00461–20.
17. Simon K, Pier W, Krüttgen A, Horz HP. Synergy between Phage Sb-1 and Oxacillin against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics*. 2021; 10 (7): 849.
18. M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing An informational supplement for global application developed through the Clinical and Laboratory Standards Institute consensus process. 29th Edition. January 2019.
19. Kornienko M, Kuptsov N, Gorodnichev R, Bespiatykh D, Guliaev A, Letarova M, et al. Contribution of Podoviridae and Myoviridae bacteriophages to the effectiveness of anti-staphylococcal therapeutic cocktails. *Sci Rep*. 2020; 10 (1): 18612.
20. Kornienko M, Fisunov G, Bespiatykh D, Kuptsov N, Gorodnichev R, Klimina K, et al. Transcriptional Landscape of *Staphylococcus aureus* Kayvirus Bacteriophage vB\_SauM-515A1. *Viruses*. 2020; 12 (11): 1320.
21. Mazzocco A, Waddell TE, Lingohr E, Johnson RP. Enumeration of bacteriophages using the small drop plaque assay system. *Methods Mol Biol*. 2009; (501): 81–85.
22. Kuptsov N, Kornienko M, Bespiatykh D, Gorodnichev R, Klimina K, Veselovsky V, et al. Global transcriptomic response of *staphylococcus aureus* to virulent bacteriophage infection. *Viruses*. 2022; 14 (3): 567.
23. Rao Q, Shang W, Hu X, Rao X. *Staphylococcus aureus* ST121: a globally disseminated hypervirulent clone. *J Med Microbiol*. 2015; 64 (12): 1462–73.
24. Ogura K, Kaji D, Sasaki M, Otsuka Y, Takemoto N, Miyoshi-Akiyama T, et al. Predominance of ST8 and CC1/spa-t1784 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in Japan and their genomic characteristics. *J Glob Antimicrob Resist*. 2022; (28): 195–202.
25. Wang L, Tkhilaishvili T, Trampuz A. Adjunctive Use of Phage Sb-1 in Antibiotics Enhances Inhibitory Biofilm Growth Activity versus Rifampin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. *Antibiot (Basel, Switzerland)*. 2020; 9 (11): 1–12.
26. Sorrell TC, Packham DR, Shanker S, Foldes M, Munro R. Vancomycin therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Ann Intern Med*. 1982; 97 (3): 344–51.
27. Dickey J, Perrot V. Adjunct phage treatment enhances the effectiveness of low antibiotic concentration against *Staphylococcus aureus* biofilms in vitro. *PLoS One*. 2019; 14 (1): e0209390.
28. Berryhill BA, Huseby DL, McCall IC, Hughes D, Levin BR. Evaluating the potential efficacy and limitations of a phage for joint antibiotic and phage therapy of *Staphylococcus aureus* infections. *Proc Natl Acad Sci*. 2021; 118 (10): e2008007118.
29. Chan BK, Siström M, Wertz JE, Kortright KE, Narayan D, Turner PE. Phage selection restores antibiotic sensitivity in MDR *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Reports*. 2016; 6 (1): 1–8.

## References

1. Balasubramanian D, Harper L, Shopsis B, Torres VJ. *Staphylococcus aureus* pathogenesis in diverse host environments. *Pathog Dis*. 2017; 75 (1): ftx005.
2. Murray CJ, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Aguilar GR, Gray A, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet*. 2022; 399 (10325): 629–55.
3. Kuzmenkov AY, Trushin IV, Vinogradova AG, Avramenko AA, Sukhorukova MV, Malhotra-Kumar S, et al. AMRmap: An Interactive Web Platform for Analysis of Antimicrobial Resistance Surveillance Data in Russia. *Front Microbiol Frontiers Media S.A.* 2021; (12): 620002.
4. McGuinness WA, Malachowa N, DeLeo FR. Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Yale J Biol Med*. 2017; 90 (2): 269.
5. Stefani S, Bongiorno D, Mongelli G, Campanile F. Linezolid Resistance in *Staphylococci*. *Pharmaceuticals*. 2010; 3 (7): 1988–2006.
6. D'Accolti M, Soffritti I, Mazzacane S, Caselli E. Bacteriophages as a Potential 360-Degree Pathogen Control Strategy Microorganisms. 2021; 9 (2): 261.
7. Kuptsov NS, Kornienko MA, Gorodnichev RB, Danilov DI, Malakhova MV, Parfenova TV, et al. Efficacy of commercial bacteriophage products against ESKAPE pathogens. *Bulletin of RSMU*. 2020; (3): 18–25.
8. Harper DR. Criteria for Selecting Suitable Infectious Diseases for Phage Therapy. *Viruses*. 2018; 10 (4): 177.
9. Nikolich MP, Filippov AA. Bacteriophage therapy: Developments and directions. *Antibiotics*. 2020; 9 (3): 135.
10. Kaźmierczak N, Grygorcewicz B, Roszak M, Bochentyn B, Piechowicz L. Comparative Assessment of Bacteriophage and Antibiotic Activity against Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Int J Mol Sci*. 2022; 23 (3): 1274.
11. Prazak J, Iten M, Cameron DR, Save J, Grandgirard D, Resch G, et al. Bacteriophages Improve Outcomes in Experimental *Staphylococcus aureus* Ventilator-associated Pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019; 200 (9): 1126–33.
12. Fabijan AP, Lin RCY, Ho J, Maddocks S, Ben Zakour NL, Iredell JR. Safety of bacteriophage therapy in severe *Staphylococcus aureus* infection. *Nat Microbiol*. 2020; 5 (3): 465–72.
13. Comeau AM, Tétart F, Trojet SN, Prère MF, Krisch HM. Phage-Antibiotic Synergy (PAS):  $\beta$ -Lactam and Quinolone Antibiotics Stimulate Virulent Phage Growth. *PLoS One*. 2007; 2 (8): e799.
14. Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 2000; 38 (3): 1008–15.
15. Jansen M, Wahida A, Latz S, Krüttgen A, Häfner H, Buhl EM, et al. Enhanced antibacterial effect of the novel T4-like bacteriophage KARL-1 in combination with antibiotics against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Sci Rep*. 2018; 8 (1): 14140.
16. Kebriaei R, Lev K, Morrisette T, Stamper KC, Abdul-Mutakabbir JC, Lehman SM, et al. Bacteriophage-Antibiotic Combination

- Strategy: an Alternative against Methicillin-Resistant Phenotypes of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2020; 64 (7): e00461–20.
17. Simon K, Pier W, Krüttgen A, Horz HP. Synergy between Phage Sb-1 and Oxacillin against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics*. 2021; 10 (7): 849.
  18. M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing An informational supplement for global application developed through the Clinical and Laboratory Standards Institute consensus process. 29th Edition. January 2019.
  19. Kornienko M, Kuptsov N, Gorodnichev R, Bespiatykh D, Guliaev A, Letarova M, et al. Contribution of Podoviridae and Myoviridae bacteriophages to the effectiveness of anti-staphylococcal therapeutic cocktails. *Sci Rep*. 2020; 10 (1): 18612.
  20. Kornienko M, Fisunov G, Bespiatykh D, Kuptsov N, Gorodnichev R, Klimina K, et al. Transcriptional Landscape of *Staphylococcus aureus* Kayvirus Bacteriophage vB\_SauM-515A1. *Viruses*. 2020; 12 (11): 1320.
  21. Mazzocco A, Waddell TE, Lingohr E, Johnson RP. Enumeration of bacteriophages using the small drop plaque assay system. *Methods Mol Biol*. 2009; (501): 81–85.
  22. Kuptsov N, Kornienko M, Bespiatykh D, Gorodnichev R, Klimina K, Veselovsky V, et al. Global transcriptomic response of *staphylococcus aureus* to virulent bacteriophage infection. *Viruses*. 2022; 14 (3): 567.
  23. Rao Q, Shang W, Hu X, Rao X. *Staphylococcus aureus* ST121: a globally disseminated hypervirulent clone. *J Med Microbiol*. 2015; 64 (12): 1462–73.
  24. Ogura K, Kaji D, Sasaki M, Otsuka Y, Takemoto N, Miyoshi-Akiyama T, et al. Predominance of ST8 and CC1/spa-t1784 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in Japan and their genomic characteristics. *J Glob Antimicrob Resist*. 2022; (28): 195–202.
  25. Wang L, Tkhilaishvili T, Trampuz A. Adjunctive Use of Phage Sb-1 in Antibiotics Enhances Inhibitory Biofilm Growth Activity versus Rifampin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. *Antibiot (Basel, Switzerland)*. 2020; 9 (11): 1–12.
  26. Sorrell TC, Packham DR, Shanker S, Foldes M, Munro R. Vancomycin therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Ann Intern Med*. 1982; 97 (3): 344–51.
  27. Dickey J, Perrot V. Adjunct phage treatment enhances the effectiveness of low antibiotic concentration against *Staphylococcus aureus* biofilms in vitro. *PLoS One*. 2019; 14 (1): e0209390.
  28. Berryhill BA, Huseby DL, McCall IC, Hughes D, Levin BR. Evaluating the potential efficacy and limitations of a phage for joint antibiotic and phage therapy of *Staphylococcus aureus* infections. *Proc Natl Acad Sci*. 2021; 118 (10): e2008007118.
  29. Chan BK, Sistrom M, Wertz JE, Kortright KE, Narayan D, Turner PE. Phage selection restores antibiotic sensitivity in MDR *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Reports*. 2016; 6 (1): 1–8.