

## ВОЗДЕЙСТВИЕ ЛИТИЧЕСКИХ БАКТЕРИОФАГОВ СЕМЕЙСТВ *HERELLEVIIRIDAE* И *ROUNTREEVIRIDAE* НА БИОПЛЕНКИ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Н. К. Абдраймова<sup>✉</sup>, Е. А. Шитиков, М. В. Малахова, Р. Б. Городничев, М. А. Корниенко

Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени Ю. М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

*Staphylococcus aureus* вызывает широкий спектр инфекций и часто характеризуется множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ). Лечение стафилококковых инфекций дополнительно осложнено способностью бактерии формировать биопленку, которая защищает ее от антимикробных агентов и иммунной системы. Одной из перспективных стратегий борьбы с бактериями, обладающими МЛУ и биопленкообразующей активностью, является применение бактериофагов. Целью исследования было оценить влияние литических фагов vB\_SauM-515A1 (род *Kayvirus*, семейство *Herelleviridae*) и vB\_SauP-436A (род *Rosenblumvirus*, семейство *Rountreeviridae*) на биопленки клинических штаммов *S. aureus*. Исследование включало 20 штаммов восьми сиквенс-типов, из которых 45% (9/20) относились к MRSA, а 35% (7/20) обладали МЛУ. Все штаммы продемонстрировали способность к биопленкообразованию, причем 65% (13/20) являлись сильными продуцентами биопленки. В геномах всех образцов обнаружены гены *icaADBC*-оперона, ответственного за синтез полисахаридного межклеточного адгезина. Воздействие бактериофагов на планктонные клетки бактерий показало, что 70% (14/20) штаммов были чувствительны к фагу vB\_SauM-515A1, а 50% (10/20) — к фагу vB\_SauP-436A. При этом 24-часовая обработка биопленок чувствительных штаммов фагом vB\_SauM-515A1 в 64,3% (9/14) случаев приводила к увеличению биомассы биопленки, тогда как фаг vB\_SauP-436A, напротив, достоверно снижал количество биопленки у 40% (4/10) штаммов. Полученные результаты подчеркивают неоднозначность взаимодействия бактериофагов с биопленками *S. aureus* и указывают на необходимость дальнейших исследований для оптимизации фаговой терапии в отношении биопленкообразующих штаммов.

**Ключевые слова:** *Staphylococcus aureus*, бактериофаг, фаговая терапия, биопленки, *Herelleviridae*, *Rountreeviridae*, *Kayvirus*, *Rosenblumvirus*

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

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

**Соблюдение этических стандартов:** исследование выполнено 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:** Нарина Казбековна Абдраймова  
ул. Малая Пироговская, д. 1а, г. Москва, 119435, Россия; [abdramovanarina@gmail.com](mailto:abdramovanarina@gmail.com)

**Статья получена:** 14.11.2024 **Статья принята к печати:** 30.11.2024 **Опубликована онлайн:** 24.12.2024

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2024.061

## EFFECTS OF LYTIC BACTERIOPHAGES OF THE FAMILIES *HERELLEVIIRIDAE* AND *ROUNTREEVIRIDAE* ON THE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* BIOFILMS

Abdraimova NK<sup>✉</sup>, Shitikov EA, Malakhova MV, Gorodnichev RB, Kornienko MA

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

*Staphylococcus aureus* causes a broad range of infections and is often characterized by multidrug resistance (MDR). Treatment of staphylococcal infections is further complicated by the ability of bacterium to form biofilms protecting it against antimicrobial agents and the immune system. The use of bacteriophages is one of the promising strategies for combating the bacteria showing MDR and biofilm formation activity. The study aimed to assess the effects of the lytic phages vB\_SauM-515A1 (genus *Kayvirus*, family *Herelleviridae*) and vB\_SauP-436A (genus *Rosenblumvirus*, family *Rountreeviridae*) on biofilms of the *S. aureus* clinical strains. The study involved 20 strains of eight sequence types, among which 45% (9/20) belonged to MRSA, and 35% (7/20) showed MDR. All the strains demonstrated the ability to form biofilms, and 65% (13/20) were strong biofilm producers. Genes of the *icaADBC* operon responsible for synthesis of polysaccharide intercellular adhesin were found in genomes of all samples. The exposure of planktonic bacterial cells to bacteriophages showed that 70% (14/20) of strains were sensitive to phage vB\_SauM-515A1 and 50% (10/20) were sensitive to phage vB\_SauP-436A. Furthermore, the 24-h treatment of biofilms of sensitive strains with phage vB\_SauM-515A1 led to the biofilm biomass increase in 64.3% (9/14) of cases, while phage vB\_SauP-436A, on the contrary, significantly reduced the quantity of biofilm in 40% (4/10) of strains. The results obtained highlight the ambiguity of interaction between bacteriophages and *S. aureus* biofilms and suggest the need for further research aimed at optimizing phage therapy targeting the biofilm-forming strains.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*, bacteriophage, phage therapy, biofilm, *Herelleviridae*, *Rountreeviridae*

**Funding:** the study was supported by the Russian Science Foundation grant No. 22-15-00443, <https://rscf.ru/project/22-15-00443/>

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

**Compliance with ethical standards:** the study was compliant with 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"; guidelines SP 1.3.2518-09 "Additions and Amendments No. 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"; guidelines "Sanitary and Epidemiologic Requirements for the Handling of Medical Waste" (SanPIN 2.1.7.2790-10), as well as Federal Clinical Guidelines "Rational Use of Bacteriophages in Clinical and Epidemiological Practice".

✉ **Correspondence should be addressed:** Narina K. Abdraimova  
Malaya Pirogovskaya, 1a, Moscow, 119435, Russia; [abdramovanarina@gmail.com](mailto:abdramovanarina@gmail.com)

**Received:** 14.11.2024 **Accepted:** 30.11.2024 **Published online:** 24.12.2024

**DOI:** 10.24075/brsmu.2024.061

Золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*) — один из ведущих бактериальных патогенов, ответственный за широкий спектр инфекций: от поверхностных кожных воспалений до тяжелых, жизнеугрожающих состояний, таких как пневмония, сепсис и эндокардит [1]. Особое внимание к микроорганизму уделяют вследствие его устойчивости к широкому спектру антибиотиков, причем наибольшую значимость имеют метициллин-резистентные штаммы *S. aureus* (MRSA, от англ. methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*).

Лечение стафилококковых инфекций осложнено не только антибиотикорезистентностью, но и обилием факторов вирулентности, один из которых — способность стафилококков образовывать биопленку. Подобно биопленкам других бактерий, биопленка *S. aureus* состоит из двух основных компонентов: воды (около 97%) и органических веществ, представленных внеклеточными полимерами и колониями микроорганизмов. Внеклеточные полимеры составляют 50–90% от всей органической массы биопленки и включают комплекс различных соединений, таких как внеклеточная ДНК (внДНК), белки и полисахариды. Оставшаяся часть биопленки представлена бактериальными клетками [2, 3].

Биопленка обеспечивает прочное прикрепление бактерий к различным поверхностям, включая ткани организма и медицинские изделия [2]. Кроме того, она существенно повышает устойчивость бактерий к факторам иммунной системы и антимикробным препаратам: минимальные ингибирующие концентрации антибиотиков, необходимые для разрушения бактерий в биопленках, могут в 1000 раз превышать концентрации, достаточные для уничтожения планктонных клеток [3, 4].

Бактериофаги все чаще рассматривают как перспективное средство для лечения бактериальных инфекций, вызванных устойчивыми к антибиотикам штаммами. В медицинской практике применяют исключительно вирулентные бактериофаги, которые реализуют только литический жизненный цикл. К числу таких фагов, способных инфицировать и разрушать клетки *S. aureus*, относятся представители семейств *Herelleviridae* и *Rountreeviridae*. Они демонстрируют высокую эффективность как в *in vitro* экспериментах, так и в *in vivo* моделях, а также уже успешно применяются в терапии, что обеспечивает снижение бактериальной нагрузки и улучшение клинических исходов [5].

В этом контексте особый интерес вызывают исследования, направленные на оценку действия фагов на биопленку. Показано, что некоторые фаги *S. aureus* могут эффективно снижать количество биомассы биопленки [6, 7]. Тем не менее ряд исследований указывает на возможность стимуляции образования биопленки под воздействием фагов, что может быть связано с особенностями их взаимодействия с бактериальными клетками [8, 9]. Подобные эффекты, вероятно, зависят от ряда факторов: непосредственно от бактериального штамма, используемого бактериофага и их концентраций, от физиологического состояния клеток, а также от морфологических и структурных характеристик самой биопленки.

Цель настоящей работы — исследовать влияние литических бактериофагов vB\_SauM-515A1 (семейство *Herelleviridae*) и vB\_SauP-436A (семейство *Rountreeviridae*) на биопленки, сформированные клиническими изолятами *S. aureus*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Бактериальные штаммы и бактериофаги

В работе использовали 20 наиболее различающихся по происхождению и локусу выделения штаммов *S. aureus* из коллекции ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю. М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства». Штаммы были собраны в период с 2015 по 2020 г. из стационаров различных регионов России.

Бактериальную культуру выращивали в жидкой среде LB (от англ. lysogeny broth) (Oxoid, Великобритания) или на LB-агаре (Oxoid) в модификации Миллера при 37 °С в течение 18 ч. Клетки, выращенные в жидкой среде, использовали для получения ночных культур, которые затем применяли в качестве инокулята как в экспериментах по определению чувствительности к антибиотикам, так и во всех исследованиях, связанных с оценкой образования биопленок и влиянием на них антибактериальных агентов. Культивирование бактерий на LB-агаре проводили для поддержания бактериальной культуры, а также для подсчета клеток в экспериментах по оценке влияния бактериофагов на сформированные биопленки.

Чувствительность к оксациллину (бета-лактамы антибиотик), ванкомицину (гликопептид), гентамицину (аминогликозид), тетрациклину (тетрациклиновый антибиотик), левофлоксацину (фторхинолон) и эритромицину (макролид) (все препараты производства Sigma-Aldrich, США) определяли методом последовательных разведений в соответствии с рекомендациями EUCAST (v.14.0) [10]. Штаммы с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) определяли как устойчивые к трем и более антибиотикам различных классов.

В работе использовали литические бактериофаги vB\_SauM-515A1 (род *Kayvirus* семейства *Herelleviridae*) и vB\_SauP-436A (род *Rosenblumvirus* семейства *Rountreeviridae*), которые применяли в виде стерильных фильтратов фаголизатов в среде LB. Бактериофаги ранее были выделены из коммерческого комплексного фагового препарата «Бактериофаг стафилококковый» серии P332 («Микроген», Россия) на штаммах *S. aureus* SA515 (ST8 (ST, от англ. sequence type)) и SA436 (ST1) и детально охарактеризованы [11]. Выращивание фагов проводили на соответствующих штаммах-хозяевах.

### Молекулярно-генетическая характеристика бактериальных штаммов

Выделение ДНК проводили с использованием набора ДНК-экспресс (Литех, Россия) в соответствии с прилагаемыми инструкциями. Пробы ДНК хранили при –20 °С.

Штаммы типировали методом мультислокусного секвенирования-типирования (МЛСТ) с использованием стандартной схемы [12]. Детекцию генов *icaA*, *icaB*, *icaC* и *icaD*, ответственных за образование биопленки, выполняли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием ранее описанных праймеров [13]. Реакционная смесь (25 мкл) для ПЦР содержала 66 мМ Tris-HCl (pH = 9), 16,6 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 250 мкМ каждого dNTP, 1 ед. Taq ДНК-полимеразы («Литех», Россия) и по 10 пмоль соответствующих праймеров. Реакцию амплификации выполняли с использованием прибора DNA Engine Tetrad 2 (MJ Research, США) согласно ранее предложенным режимам [13]. Продукты амплификации

анализировали методом горизонтального гель-электрофореза в 2% агарозном геле с визуализацией бромистым этидием.

### Оценка биопленкообразования

Оценку проводили согласно ранее описанной методике [14] с некоторыми модификациями. Для этого суспензию бактериальных клеток в экспоненциальной фазе роста (оптическая плотность (ОП) при 620 нм — 0,12) инокулировали в лунки 96-луночного плоскодонного вентилируемого планшета без покрытия (Thermo Scientific, США), содержащего TSBg (tryptic soy broth с добавлением 1% глюкозы) (HiMedia, Индия) до конечной концентрации  $10^4$  клеток на лунку и инкубировали при 37 °С в течение 24 ч без встряхивания. Конечный объем в каждой лунке составил 200 мкл. В качестве отрицательного контроля использовали стерильную среду. После инкубации лунки трижды аккуратно промывали стерильным фосфатным буфером (PBS, pH = 7,4) для удаления планктонных клеток, затем окрашивали 0,1% водно-спиртовым раствором кристаллического фиолетового (КФ) (Sigma-Aldrich, США) в течение 30 мин при комнатной температуре. После инкубации краситель промывали стерильным PBS трижды. Для последующего анализа связанный краситель в каждой лунке элюировали добавлением 200 мкл 96%-го этанола и измеряли оптическую плотность раствора на спектрофотометре Microplate Reader Flex-A (Allsheng, China) при 570 нм. Все эксперименты были выполнены в трех биологических повторах.

Определение способности бактерии к биопленкообразованию проводили согласно ранее предложенным критериям:  $ОП \leq ОПс$  — штамм не образует биопленку;  $ОПс < ОП \leq 2 \times ОПс$  — штамм слабо образует биопленку;  $2 \times ОПс < ОП \leq 4 \times ОПс$  — штамм является умеренным продуцентом биопленки;  $4 \times ОПс < ОП$  — штамм сильно продуцирует биопленку, где ОПс — средняя ОП отрицательного контроля +  $3 \times CO$  (стандартное отклонение). В качестве отрицательного контроля использовали стерильную среду [15].

### Чувствительность планктонных форм штаммов к бактериофагам

Чувствительность штаммов к бактериофагам определяли в ходе оценки эффективности посева (EOP, от англ. efficiency of plating), как было описано ранее [11]. EOP представляет собой отношение титра бактериофага на тестируемом штамме к титру бактериофага на штамме-хозяине (*S. aureus* SA515 для фага vB\_SauM-515A1; *S. aureus* SA436 для фага vB\_SauP-436A), выраженное в процентах. Титр бактериофага на исследуемом штамме определяли методом титрования по Грациа, как описано ранее [16]. Для этого аликвоты (5 мкл) десятикратных последовательных разведений каждого 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 °С в течение 24 ч. Концентрацию фаговых частиц в БОЕ/мл оценивали для каждого тестируемого штамма. Оценку эффективности посева проводили в трех повторностях.

### Оценка влияния бактериофагов на сформированные биопленки

Для экспериментов использовали 24-часовые биопленки, сформированные и промытые в соответствии с описанным

выше способом. После промывки в лунку добавляли TSBg и фаговый лизат до конечной концентрации  $10^8$  БОЕ/мл, объем каждой лунки составил 200 мкл. В контрольные образцы вместо фагового лизата вносили стерильный PBS. Инкубацию проводили в течение 24 ч при 37 °С. Далее проводили окрашивание КФ, как описано выше, с последующим измерением ОП при 570 нм. Все эксперименты выполняли в трех биологических повторах.

В предварительных экспериментах определяли количество клеток в биопленке, добавляя 200 мкл стерильного PBS к промытой биопленке и разрушая ее с помощью активного пипетирования. Серийные разведения суспензии клеток высевали на LB-агар. После 24-часовой инкубации при 37 °С подсчитывали количество колоний.

### Статистический анализ

Статистический анализ проводили с помощью программы GraphPad Prism версии 8.0.1 (GraphPad Software Inc., США) на основании данных *t*-теста. В ходе анализа сравнивали значения оптических плотностей, полученных через 24 ч инкубации биопленок, обработанных и необработанных бактериофагом. Различия считали значимыми при  $p < 0,05$ . Для подтверждения нормального распределения данных использовали метод Шапиро–Уилка, данные в выборках считали близкими к нормальному распределению при  $p > 0,05$ .

Для выявления достоверных корреляций по двум номинальным признакам в небольших выборках использовали критерий Фишера. Корреляции считали достоверными при  $p < 0,05$ .

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### Характеристика штаммов и их способности к биопленкообразованию

Согласно результатам МЛСТ, штаммы коллекции относились к восьми сиквент-типам, наиболее представленным из которых был ST8 (4/20, 20%) (табл. 1). На ST1, ST121, ST5 и ST25 приходилось по три штамма (по 15%). По чувствительности к антибиотикам значительная часть штаммов относилась к MRSA (9/20, 45%). Кроме того, семь штаммов (35%) характеризовались МЛУ.

Все проанализированные штаммы обладали способностью к биопленкообразованию, причем более половины являлись ее сильными продуцентами (13/20, 65%). В оставшихся случаях (7/20, 35%) штаммы умеренно образовывали биопленку. Подсчет КОЕ показал, что количество клеток в составе 24-часовых биопленок достигает  $10^8$  КОЕ/мл для всех исследуемых штаммов. Результаты амплификации продемонстрировали, что все изоляты содержали полный набор генов оперона *icaADBC*.

#### Воздействие бактериофагов различных таксономических групп на планктонные клетки и биопленки *S. aureus*

По результатам оценки действия бактериофагов vB\_SauM-515A1 и vB\_SauP-436A на планктонные клетки штаммов коллекции было установлено, что 14 (70%) штаммов проявляли чувствительность к фагу vB\_SauM-515A1, тогда как к фагу vB\_SauP-436A чувствительными были 10 штаммов (50%). Три штамма коллекции (15%) оказались устойчивыми к обоим фагам. Эффективность посева фага vB\_SauM-515A1

Таблица 1. Характер пленкообразования штаммов *S. aureus*

Штамм	Происхождение	Локус	ST	Устойчивость к антибиотикам						Тип пленкообразования	EOP (vB_SauM-515A1),%	EOP (vB_SauP-436A),%
				ОКС	ВАНК	ГЕНТ	ТЕТР	ЛЕВОФЛ	ЭРИТ			
SA515	Новосибирск	Раневое отделяемое	8	R	I	R	R	S	S	сильно	100	–
SA64	Санкт-Петербург	Кровь	8	R	S	S	R	R	S	сильно	267	400
SA412	Липецк	Кожа и мягкие ткани	8	R	S	R	I	S	R	сильно	–	150
SA2242	Новосибирск	Кости и суставы	239	R	S	R	S	S	S	сильно	300	–
SA191	Москва	Ликвор	239	R	S	R	R	R	R	сильно	–	–
SA364	Санкт-Петербург	Кожа и мягкие ткани	764	R	S	R	R	n/d	R	сильно	–	–
SA436	Нижний Новгород	Отделяемое из носоглотки	1	R	S	R	R	S	S	умеренно	–	100
SA402	Липецк	Кости и суставы	5	R	S	R	R	R	R	умеренно	183	83
SA88	Краснодар	Раневое отделяемое	25	R	S	S	S	S	S	умеренно	183	167
SA103	Краснодар	Кровь	1	S	S	S	S	S	S	сильно	250	133
SA172	Москва	Раневое отделяемое	1	S	S	S	S	S	S	сильно	–	200
SA2153	Смоленск	Мокрота	5	S	S	S	S	S	R	сильно	250	–
SA2464	Якутск	Кожа и мягкие ткани	5	S	S	S	S	S	S	сильно	190	–
SA54	Иркутск	Отделяемое конъюнктивы	25	S	n/d	S	S	S	S	сильно	500	90
SA2003	Воронеж	Кожа и мягкие ткани	25	S	S	S	S	S	S	сильно	245	–
SA837	Смоленск	Кожа и мягкие ткани	8	S	S	S	S	S	S	сильно	200	–
SA117	Вологда	Отделяемое века	121	S	n/d	S	S	S	S	умеренно	90	75
SA156	Смоленск	Отделяемое конъюнктивы	121	S	n/d	S	S	S	S	умеренно	383	–
Sa226	Москва	Отделяемое века	121	S	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	умеренно	150	200
SA606	Орел	Кожа и мягкие ткани	398	S	S	S	S	S	S	умеренно	–	–

**Примечание:** «→» — штамм устойчив к бактериофагу; S — штамм чувствителен к антибиотику; R — штамм устойчив к антибиотику; ОКС — оксациллин; ВАНК — ванкомицин; ГЕНТ — гентамицин; ТЕТР — тетрациклин; ЛЕВОФЛ — левофлоксацин; ЭРИТ — эритромицин.

на чувствительных штаммах варьировалась от 90 до 500%, а для фага vB\_SauP-436A — от 75 до 400%.

Оценку воздействия бактериофагов на сформированную биопленку проводили только для штаммов, чувствительных к соответствующему бактериофагу по данным экспериментов на планктонных клетках. Обработку биопленок проводили бактериофагом в титре  $10^8$  БОЕ/мл, что на основании подсчета количества КОЕ в необработанных биопленках соответствует значению множественности инфекции 1 (MOI, от англ. multiplicity of infection).

Согласно результатам экспериментов (рис. 1), в большинстве случаев (9/14, 64,3%) обработка бактериофагом vB\_SauM-515A1 в течение 24 ч не вызывала снижения биомассы биопленок, а, наоборот, стимулировала ее образование. Для оставшихся пяти штаммов (5/14, 35,7%) воздействие бактериофага vB\_SauM-515A1 не оказывало достоверного влияния на биопленку. Воздействие бактериофага vB\_SauP-436A, напротив, достоверно снижало биомассу биопленки для четырех штаммов (4/10, 40%). На биопленки, сформированные остальными штаммами, данный бактериофаг не влиял.

Следует отметить, что по результатам статистического анализа не было выявлено значимых корреляций между принадлежностью штамма к MRSA или какому-либо сиквенс-типу и способностью бактериофагов стимулировать (в случае vB\_SauM-515A1) либо разрушать (в случае vB\_SauP-436A) биопленку. Эти эффекты также не зависели от исходной способности штаммов к биопленкообразованию.

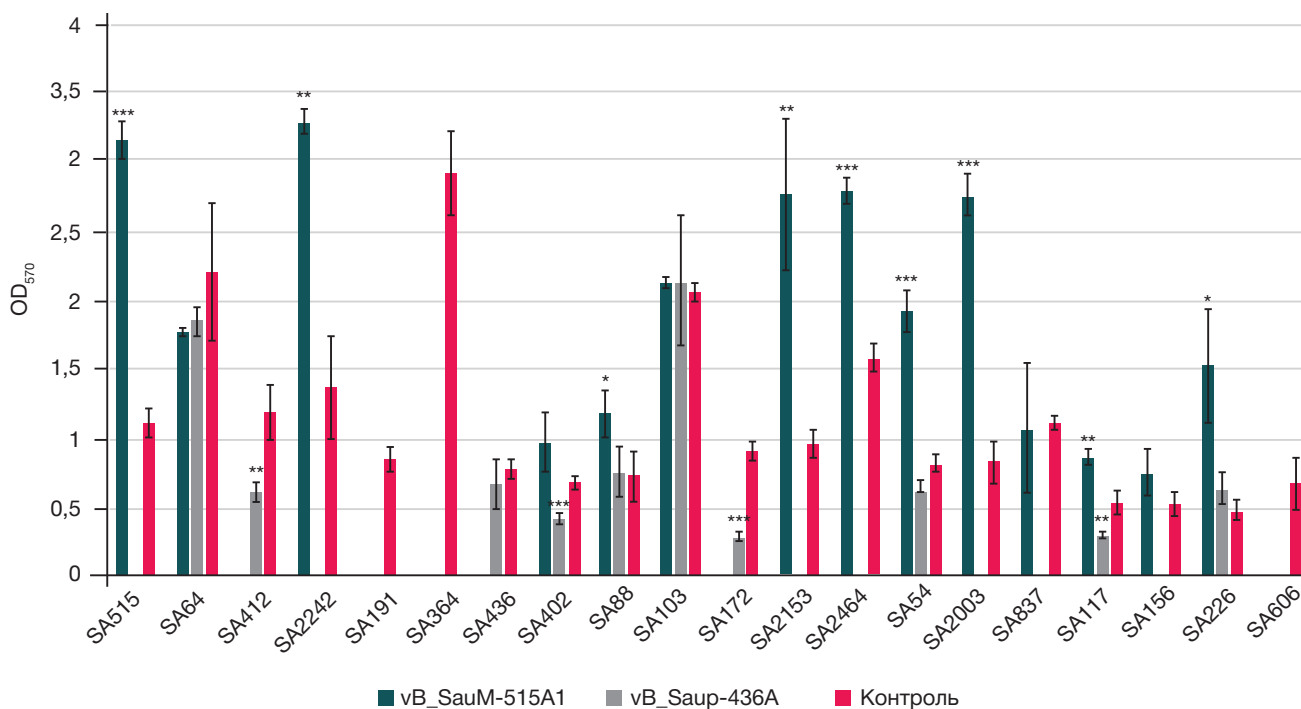
## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В рамках данного исследования рассматривали штаммы, выделенные из разнородного клинического материала и

относящиеся к эпидемиологически значимым сиквенс-типам (табл. 1). Среди них наибольшую представленность имел ST8 — один из наиболее распространенных сиквенс-типов на территории России и во всем мире среди госпитальных штаммов [17, 18]. Штаммы данного сиквенс-типа включают пандемические клоны, например, USA300, вызывающие многочисленные вспышки инфекции и часто относящиеся к MRSA [19]. Помимо ST8 были выявлены штаммы ST1, ST5 и ST121, которые, согласно литературным данным, характеризуются устойчивостью к антибиотикам и обладают способностью вызывать серьезные инфекции [20–22].

Полученные результаты продемонстрировали способность всех исследуемых образцов, независимо от происхождения и принадлежности к сиквенс-типу, образовывать биопленки. При этом все штаммы характеризовались наличием в геноме *icaADBC*-оперона, ответственного за биосинтез полисахаридного межклеточного адгезина (PIA, от англ. polysaccharide intercellular adhesion) — основного и наиболее изученного компонента матрикса биопленок клинических штаммов *S. aureus* [23, 24]. Следует также отметить, что большинство штаммов оказались сильными продуцентами биопленки. В сочетании с антибиотикорезистентностью это еще раз подчеркивает серьезность проблемы терапии инфекций, вызванных ими.

Для оценки эффективности бактериофагов использовали представителей семейств *Herelleviridae* и *Rountreeviridae*. Выбор фагов был обусловлен их различиями в морфологических (миовирусы и подовирусы), микробиологических (спектр хозяев, параметры инфекции на основании кривой единичного цикла роста) и генетических (размер генома и количество кодируемых генов) характеристиках [11]. Согласно



**Рис.** Результаты воздействия бактериофагов vB\_SauM-515A1 и vB\_Saup-436A на биомассу биопленок. Зеленым цветом отмечены биопленки, обработанные бактериофагом vB\_SauM-515A1; синим — обработанные бактериофагом vB\_Saup-436A; оранжевым — необработанный контроль. Отсутствие данных в столбце говорит об устойчивости штамма к действию соответствующего бактериофага. Разбросы показывают среднее квадратичное отклонение. \* —  $p \leq 0,05$ ; \*\* —  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* —  $p \leq 0,001$

полученным результатам, vB\_SauM-515A1 (род *Kayvirus*, семейство *Herelleviridae*) показал большую эффективность против планктонных клеток, в сравнении с vB\_Saup-436A (род *Rosenblumvirus*, семейство *Rountreeviridae*), что согласуется с ранее опубликованной информацией по этим бактериофагам [11]. Для других литических бактериофагов семейства *Herelleviridae* (ранее *Myoviridae*) также показано, что спектр их литической активности в зависимости от коллекции варьируется от 85,3 до 99,2%, в то время как для представителей семейства *Rountreeviridae* (ранее *Podoviridae*) этот показатель составляет 64–68% [11, 25, 26].

В случае биопленок было показано, что бактериофаг vB\_SauM-515A1 стимулировал увеличение биомассы биопленки, тогда как фаг vB\_Saup-436A способствовал снижению ее количества (рис. 1). Ранее сообщалось о способности миовируса phiPLA-RODI, относящегося к тому же роду, что и vB\_SauM-515A1, стимулировать образование биопленок у *S. aureus* [9]. Авторы объясняют наблюдаемые результаты увеличением количества вДНК в матриксе, что, в свою очередь, связано с высокой литической активностью бактериофагов этого семейства. Увеличенное количество вДНК способствует структурной целостности и стабильности биопленки, а также модулирует образование амилоидных волокон, необходимых для поддержания архитектуры биопленки [27]. В другой работе исследователи показали, что использование фагов родов *Kayvirus* и *Rosenblumvirus* (отдельно и в комбинации) на начальных стадиях формирования или на зрелой биопленке не приводит к снижению ее количества [8]. Авторы наблюдали такой эффект при использовании фагов как при низких (0,1), так и при высоких (10) значениях MOI. При этом спустя 24 ч инкубации наблюдалось увеличение количества биопленки, за исключением случая обработки зрелой биопленки смесью фагов в MOI 10.

Стоит отметить, что в обсуждаемых работах авторы ограничились тестированием одного и двух бактериальных

изолятов, что накладывает ограничение на полноценное сравнение результатов. Тем не менее имеющиеся данные указывают на тенденцию фагов рода *Kayvirus* к стимуляции биопленкообразования у штаммов *S. aureus*. В случае обработки биопленок бактериофагом рода *Rosenblumvirus*, согласно нашим данным, наблюдалось либо снижение количества биомассы, либо отсутствие значимого воздействия. Возможно, vB\_Saup-436A вызывает менее активный лизис клеток и меньшее высвобождение вДНК, что препятствует стимуляции образования биопленок. В связи с этим перспективным подходом в борьбе с биопленками представляется комбинированное применение бактериофагов, как в виде коктейля из нескольких фагов, так и в сочетании с агентами, разрушающими матрикс, такими как деполимеразы [28].

Необходимо также отметить, что в настоящей работе оценку эффективности фагов проводили методом окраски кристаллическим фиолетовым биомассы биопленок, включающей матрикс и клетки (как живые, так и мертвые). Такой метод не позволяет оценить долю жизнеспособных клеток после обработки антибактериальными агентами, поэтому для более полного представления о влиянии фагов на биопленки необходимо проводить дополнительные исследования.

## ВЫВОДЫ

Проведенное исследование подчеркивает сложность и неоднозначность влияния бактериофагов на биопленку *S. aureus*, особенно в случае клинических изолятов с высокой антибиотикорезистентностью. Несмотря на способность фагов vB\_SauM-515A1 и vB\_Saup-436A подавлять рост планктонных клеток, их эффективность против биопленок штаммов *S. aureus* оказалась низкой. Полученные результаты подчеркивают важность подбора фагов с учетом их специфических характеристик и показателей эффективности против биопленок, а также

возможную необходимость комбинированных подходов, включающих бактериофаги и агенты, разрушающие матрикс биопленки. Вместе с тем, следует учитывать, что результаты данной работы получены в эксперименте *in vitro* с использованием ограниченного набора методов.

Для трансляции полученных результатов в клиническую практику необходимы дальнейшие исследования, включая эксперименты на моделях *in vivo*, которые позволят более точно оценить эффективность и безопасность предложенных подходов в условиях, приближенных к реальным.

## Литература

- Ikuta KS, Swetschinski LR, Robles Aguilar G, Sharara F, Mestrovic T, et al. Global Mortality Associated with 33 Bacterial Pathogens in 2019: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet*. 2022; 400: 2221–48.
- Idrees M, Sawant S, Karodia N, Rahman A. Staphylococcus Aureus Biofilm: Morphology, Genetics, Pathogenesis and Treatment Strategies. *Int J Environ Res Public Health*. 2021; 18: 7602.
- Tuon FF, Suss PH, Telles JP, Dantas LR, Borges NH, Ribeiro VST. Antimicrobial Treatment of Staphylococcus Aureus Biofilms. *Antibiotics*. 2023; 12: 87.
- Liu K, Wang C, Zhou X, Guo X, Yang Y, Liu W, et al. Bacteriophage Therapy for Drug-Resistant Staphylococcus Aureus Infections. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 2024; 14.
- Plumet L, Ahmad-Mansour N, Dunyach-Remy C, Kissa K, Sotto A, Lavigne J-P, et al. Bacteriophage Therapy for Staphylococcus Aureus Infections: A Review of Animal Models, Treatments, and Clinical Trials. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022; 12: 907314.
- Gordina E, Bozhkova S, Smirnova LN. Effects of Bacteriophages on Biofilms Formed by Staphylococcus Aureus Isolated from Patients with Orthopedic Infection. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2022; 24: 283–8.
- Totten KMC, Patel R. Phage Activity against Planktonic and Biofilm Staphylococcus Aureus Periprosthetic Joint Infection Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2022; 66: e01879.
- Hosseini Doust Z, Tufenkji N, van de Ven TGM. Formation of Biofilms under Phage Predation: Considerations Concerning a Biofilm Increase. *Biofouling*. 2013; 29: 457–68.
- Fernández L, González S, Campelo AB, Martínez B, Rodríguez A, García P. Low-Level Predation by Lytic Phage phiPLA-RODI Promotes Biofilm Formation and Triggers the Stringent Response in Staphylococcus Aureus. *Scientific Reports*. 2017; 7: 40965.
- Eucast: EUCAST Available from: <https://www.eucast.org/> (accessed on 13 November 2024).
- Komienko 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: 18612.
- 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.
- Ghasemian A, Peerayeh SN, Bakhshi B, Mirzaee M. High Prevalence of Icaadbc Genes Responsible for Biofilm Formation in Clinical Isolates of Staphylococcus Aureus From Hospitalized Children. *Archives of Pediatric Infectious Diseases*. 2015; 3.
- Cassat JE, Lee CY, Smeltzer MS. Investigation of Biofilm Formation in Clinical Isolates of Staphylococcus Aureus. *Methods Mol Biol*. 2007; 391: 127–44.
- Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Cirković I, et al. Quantification of Biofilm in Microtiter Plates: Overview of Testing Conditions and Practical Recommendations for Assessment of Biofilm Production by Staphylococci. *APMIS*. 2007; 115: 891–9.
- 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.
- Gostev V, Kruglov A, Kalinogorskaya O, Dmitrenko O, Khokhlova O, Yamamoto T, et al. Molecular Epidemiology and Antibiotic Resistance of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Circulating in the Russian Federation. *Infection, Genetics and Evolution*. 2017; 53: 189–94.
- Wang X, Zhao H, Wang B, Zhou Y, Xu Y, Rao L, et al. Identification of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus ST8 Isolates in China with Potential High Virulence. *Emerg Microbes Infect*. 2022; 11: 507–18.
- Strauß L, Stegger M, Akpaka PE, Alabi A, Breurec S, Coombs G, et al. Origin, Evolution, and Global Transmission of Community-Acquired Staphylococcus Aureus ST8. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017; 114: E10596–E10604.
- Xu K, Wang Y, Jian Y, Chen T, Liu Q, Wang H, et al. Staphylococcus Aureus ST1 Promotes Persistent Urinary Tract Infection by Highly Expressing the Urease. *Front Microbiol*. 2023; 14: 1101754.
- Smith JT, Eckhardt EM, Hansel NB, Rahmani Eliato T, Martin IW, Andam CP. Genome Evolution of Invasive Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus in the Americas. *Microbiol Spectr*. 2022; 10: e0020122.
- Kurt K, Rasigade J-P, Laurent F, Goering RV, Žemličková H, Machova I, et al. Subpopulations of Staphylococcus Aureus Clonal Complex 121 Are Associated with Distinct Clinical Entities. *PLoS One*. 2013; 8: e58155.
- Cramton SE, Gerke C, Schnell NF, Nichols WW, Götz F. The Intercellular Adhesion (Ica) Locus Is Present in Staphylococcus Aureus and Is Required for Biofilm Formation. *Infect Immun*. 1999; 67: 5427–33.
- Peng Q, Tang X, Dong W, Sun N, Yuan W. A Review of Biofilm Formation of Staphylococcus aureus and Its Regulation Mechanism. *Antibiotics (Basel)*. 2022; 12 (1): 12.
- Moller AG, Winston K, Ji S, Wang J, Davis MNH, Solís-Lemus CR, et al. Genes Influencing Phage Host Range in Staphylococcus Aureus on a Species-Wide Scale. *mSphere*. 2021; (6): e01263.
- Göller PC, Elsener T, Lorgé D, Radulovic N, Bernardi V, Naumann A, et al. Multi-Species Host Range of Staphylococcal Phages Isolated from Wastewater. *Nat Commun*. 2021; 12: 6965.
- Schwartz K, Ganesan M, Payne DE, Solomon MJ, Boles BR. Extracellular DNA facilitates the formation of functional amyloids in Staphylococcus aureus biofilms. *Molecular microbiology*. 2016; 99 (1): 123–34.
- Duarte AC, Fernández L, Jurado A, Campelo AB, Shen Y, Rodríguez A, et al. Synergistic Removal of Staphylococcus Aureus Biofilms by Using a Combination of Phage Kayvirus Rodi with the Exopolysaccharide Depolymerase Dpo7. *Front Microbiol*. 2024; 15: 1438022.

## References

- Ikuta KS, Swetschinski LR, Robles Aguilar G, Sharara F, Mestrovic T, et al. Global Mortality Associated with 33 Bacterial Pathogens in 2019: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet*. 2022; 400: 2221–48.
- Idrees M, Sawant S, Karodia N, Rahman A. Staphylococcus Aureus Biofilm: Morphology, Genetics, Pathogenesis and Treatment Strategies. *Int J Environ Res Public Health*. 2021; 18: 7602.
- Tuon FF, Suss PH, Telles JP, Dantas LR, Borges NH, Ribeiro VST. Antimicrobial Treatment of Staphylococcus Aureus Biofilms. *Antibiotics*. 2023; 12: 87.
- Liu K, Wang C, Zhou X, Guo X, Yang Y, Liu W, et al. Bacteriophage Therapy for Drug-Resistant Staphylococcus Aureus Infections.

- Front. Cell. Infect. Microbiol. 2024; 14.
5. Plumet L, Ahmad-Mansour N, Dunyach-Remy C, Kissa K, Sotto A, Lavigne J-P, et al. Bacteriophage Therapy for Staphylococcus Aureus Infections: A Review of Animal Models, Treatments, and Clinical Trials. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022; 12: 907314.
  6. Gordina E, Bozhkova S, Smirnova LN. Effects of Bacteriophages on Biofilms Formed by Staphylococcus Aureus Isolated from Patients with Orthopedic Infection. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy.* 2022; 24: 283–8.
  7. Totten KMC, Patel R. Phage Activity against Planktonic and Biofilm Staphylococcus Aureus Periprosthetic Joint Infection Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2022; 66: e01879.
  8. Hosseini Doust Z, Tufenkji N, van de Ven TGM. Formation of Biofilms under Phage Predation: Considerations Concerning a Biofilm Increase. *Biofouling.* 2013; 29: 457–68.
  9. Fernández L, González S, Campelo AB, Martínez B, Rodríguez A, García P. Low-Level Predation by Lytic Phage phiPLA-RODI Promotes Biofilm Formation and Triggers the Stringent Response in Staphylococcus Aureus. *Scientific Reports.* 2017; 7: 40965.
  10. Eucast: EUCAST Available from: <https://www.eucast.org/> (accessed on 13 November 2024).
  11. Komiienko M, Kuptsov N, Gorodnichev R, Bespiatykh D, Guliaeva A, Letarova M, et al. Contribution of Podoviridae and Myoviridae Bacteriophages to the Effectiveness of Anti-Staphylococcal Therapeutic Cocktails. *Sci Rep.* 2020; 10: 18612.
  12. 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.
  13. Ghasemian A, Peerayeh SN, Bakhshi B, Mirzaee M. High Prevalence of Icaadbc Genes Responsible for Biofilm Formation in Clinical Isolates of Staphylococcus Aureus From Hospitalized Children. *Archives of Pediatric Infectious Diseases.* 2015; 3.
  14. Cassat JE, Lee CY, Smeltzer MS. Investigation of Biofilm Formation in Clinical Isolates of Staphylococcus Aureus. *Methods Mol Biol.* 2007; 391: 127–44.
  15. Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Cirković I, et al. Quantification of Biofilm in Microtiter Plates: Overview of Testing Conditions and Practical Recommendations for Assessment of Biofilm Production by Staphylococci. *APMIS.* 2007; 115: 891–9.
  16. 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.
  17. Gostev V, Kruglov A, Kalinogorskaya O, Dmitrenko O, Khokhlova O, Yamamoto T, et al. Molecular Epidemiology and Antibiotic Resistance of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Circulating in the Russian Federation. *Infection, Genetics and Evolution.* 2017; 53: 189–94.
  18. Wang X, Zhao H, Wang B, Zhou Y, Xu Y, Rao L, et al. Identification of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus ST8 Isolates in China with Potential High Virulence. *Emerg Microbes Infect.* 2022; 11: 507–18.
  19. Strauß L, Stegger M, Akpaka PE, Alabi A, Breurec S, Coombs G, et al. Origin, Evolution, and Global Transmission of Community-Acquired Staphylococcus Aureus ST8. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2017; 114: E10596–E10604.
  20. Xu K, Wang Y, Jian Y, Chen T, Liu Q, Wang H, et al. Staphylococcus Aureus ST1 Promotes Persistent Urinary Tract Infection by Highly Expressing the Urease. *Front Microbiol.* 2023; 14: 1101754.
  21. Smith JT, Eckhardt EM, Hansel NB, Rahmani Eliato T, Martin IW, Andam CP. Genome Evolution of Invasive Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus in the Americas. *Microbiol Spectr.* 2022; 10: e0020122.
  22. Kurt K, Rasigade J-P, Laurent F, Goering RV, Žemličková H, Machova I, et al. Subpopulations of Staphylococcus Aureus Clonal Complex 121 Are Associated with Distinct Clinical Entities. *PLoS One.* 2013; 8: e58155.
  23. Cramton SE, Gerke C, Schnell NF, Nichols WW, Götz F. The Intercellular Adhesion (Ica) Locus Is Present in Staphylococcus Aureus and Is Required for Biofilm Formation. *Infect Immun.* 1999; 67: 5427–33.
  24. Peng Q, Tang X, Dong W, Sun N, Yuan W. A Review of Biofilm Formation of Staphylococcus aureus and Its Regulation Mechanism. *Antibiotics (Basel).* 2022; 12 (1): 12.
  25. Moller AG, Winston K, Ji S, Wang J, Davis MNH, Solís-Lemus CR, et al. Genes Influencing Phage Host Range in Staphylococcus Aureus on a Species-Wide Scale. *mSphere.* 2021; (6): e01263.
  26. Göller PC, Elsener T, Lorgé D, Radulovic N, Bernardi V, Naumann A, et al. Multi-Species Host Range of Staphylococcal Phages Isolated from Wastewater. *Nat Commun.* 2021; 12: 6965.
  27. Schwartz K, Ganesan M, Payne DE, Solomon MJ, Boles BR. Extracellular DNA facilitates the formation of functional amyloids in Staphylococcus aureus biofilms. *Molecular microbiology.* 2016; 99 (1): 123–34.
  28. Duarte AC, Fernández L, Jurado A, Campelo AB, Shen Y, Rodríguez A, et al. Synergistic Removal of Staphylococcus Aureus Biofilms by Using a Combination of Phage Kayvirus Rodi with the Exopolysaccharide Depolymerase Dpo7. *Front Microbiol.* 2024; 15: 1438022.