

КОМБИНАЦИЯ БАКТЕРИОФАГОВ И АНТИБИОТИКОВ КАК НАИБОЛЕЕ ЭФФЕКТИВНЫЙ ПОДХОД БОРЬБЫ СО *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Н. К. Абдраймова [✉], Е. А. Шитиков, 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 — бактериальный патоген, обладающий способностью к развитию антибиотикорезистентности и вызывающий ряд серьезных инфекций. Проблема терапии стафилококковых инфекций связана не только с устойчивостью штаммов к антибактериальным препаратам, но и со способностью бактерий формировать биопленки. Как альтернатива классической антибиотикотерапии рассматривается фаготерапия — использование вирулентных бактериофагов. Исследования, демонстрирующие действие бактериофагов против *S. aureus*, включают как отдельное использование фагов, так и их комбинацию с антибиотиками. Комбинированный подход представляется наиболее перспективным, так как позволяет значительно повысить эффективность терапии за счет синергического действия антибиотика и фага. В данном обзоре представлено обсуждение эффектов совместного применения двух агентов и методов их оценки. Обобщены результаты последних работ, посвященных комбинированному подходу против *S. aureus* в исследованиях *in vitro* и *in vivo*, а также в экспериментах по элиминации биопленки. Отдельное внимание уделено клиническим случаям лечения пациентов.

Ключевые слова: бактериофаги, *Staphylococcus aureus*, фаговая терапия, бактериофаговая терапия, комбинированная терапия, антибиотики, множественная лекарственная устойчивость, биопленки, синергизм антибиотиков и бактериофагов

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

Вклад авторов: Н. К. Абдраймова — анализ литературы, подготовка и редактирование текста, утверждение окончательного варианта статьи; Е. А. Шитиков — анализ литературы, подготовка и редактирование текста, утверждение окончательного варианта статьи; Р. Б. Городничев — редактирование текста, утверждение окончательного варианта статьи; М. А. Корниенко — разработка концепции, анализ литературы, подготовка и редактирование текста, утверждение окончательного варианта статьи.

✉ **Для корреспонденции:** Нарина Казбековна Абдраймова
ул. Малая Пироговская, д. 1а, г. Москва, 119435, Россия; abdramovanarina@gmail.com

Статья получена: 20.10.2023 **Статья принята к печати:** 05.12.2023 **Опубликована онлайн:** 31.12.2023

DOI: 10.47183/mes.2023.058

COMBINATION OF BACTERIOPHAGES AND ANTIBIOTICS AS THE MOST EFFECTIVE THERAPY AGAINST *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Abdraymova NK [✉], Shitikov EA, Gorodnichev RB, Kornienko MA

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

Staphylococcus aureus is a bacterial pathogen that is frequently associated with drug resistance and causes serious infectious diseases. The challenge in treating staphylococcal infections arises not only from the strains resistance to antibacterial drugs but also from the bacteria's capacity to form biofilms. As an alternative to traditional antibiotic therapy, phage therapy, employing virulent bacteriophages, is being explored. Research on bacteriophage's effectiveness against *S. aureus* encompasses both individual use and their combination with antibiotics. The combined approach appears most promising, enhancing therapeutic efficacy substantially through the synergistic action of both the antibiotic and the phage. This review discusses the effects of using both agents together and the methodologies for their evaluation. It summarizes the latest *in vitro* and *in vivo* research on the combined approach against *S. aureus*, including experiments focused on biofilm elimination. Special emphasis is placed on clinical case studies in treating patients.

Keywords: Bacteriophages, *Staphylococcus aureus*, phage therapy, bacteriophage therapy, combination therapy, antibiotics, multidrug resistance, biofilms, synergy between antibiotics and bacteriophages

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

Author contribution: Abdraymova NK — analysis of literature, article authoring and editing, approval of its final version; Shitikov EA — analysis of literature, article authoring and editing, approval of its final version; Gorodnichev RB — article editing, approval of its final version; Kornienko MA — conceptualization, analysis of literature, article authoring and editing, approval of its final version.

✉ **Correspondence should be addressed:** Narina K. Abdraymova
Malaya Pirogovskaya, 1a, Moscow, 119435, Russia; abdramovanarina@gmail.com

Received: 20.10.2023 **Accepted:** 05.12.2023 **Published online:** 31.12.2023

DOI: 10.47183/mes.2023.058

Золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*) — грамположительный микроорганизм, являющийся одним из основных патогенов человека и вызывающий широкий спектр клинических проявлений. Этот вид бактерий — основная причина бактериемии и инфекционного эндокардита, а также костно-суставных инфекций, поражений кожи и мягких тканей, плевропульмональных инфекций и инфекций, связанных с использованием медицинских изделий. Стафилококковые инфекции распространены как среди населения, так и в стационарах, а их лечение остается сложной задачей в связи с

появлением и широким распространением штаммов с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ). Показано, что золотистый стафилококк занимает второе место после *E. coli* по количеству смертей, ассоциированных с антибиотикоустойчивыми штаммами [1].

Штаммы *S. aureus* реализуют различные механизмы устойчивости к антибиотикам. Среди них выделяют синтез ферментов бета-лактамаз и продукцию белка Pwp2A — альтернативной транспептидазы [2, 3]. Последняя обеспечивает устойчивость к природным и синтетическим бета-лактамам, что привело к появлению клинически

важной группы устойчивых штаммов, названной MRSA (от англ. MRSA — methicillin resistant *Staphylococcus aureus*). Устойчивость к ванкомицину у *S. aureus* детерминирована образованием толстой клеточной стенки, препятствующей проникновению антибиотика внутрь клетки [4]. Наличие рРНК-метилтрансферазы и других ферментов, модифицирующих антибиотик, обеспечивает устойчивость к аминогликозидам. У штаммов, устойчивых к тетрациклину, часто обнаруживают защитные белки рибосом TetM и TetO [5]. *S. aureus* способен достигать устойчивости к линезолиду путем модификации мишени для антибиотика. Такая модификация возможна за счет появления и распространения мутантных вариантов гена 23S рРНК [6]. Важную роль в развитии антибиотикоустойчивости золотистого стафилококка играют эффлюксные помпы. Некоторые из них субстрат-специфичны, например, системы эффлюкса Tet(K) и Tet(L) [7]. Другие, напротив, способны распознавать и экспортировать широкий спектр препаратов. У *S. aureus* последние представлены мембранными белками, принадлежащими к нескольким семействам — ABC (от англ. ATP-binding cassette), MATE (от англ. multidrug and toxin extrusion), MFS (от англ. major facilitator superfamily), SMR (от англ. small multidrug resistance) и RND (от англ. resistance-nodulation-cell division) [8]. Отдельно стоит отметить способность *S. aureus* образовывать устойчивые клеточные агрегаты — биопленки, препятствующие проникновению молекул антибиотика к клеткам. Биопленки также способствуют колонизации золотистым стафилококком различных поверхностей, что обеспечивает протекание инфекций, ассоциированных с медицинскими изделиями [9].

Для эффективного лечения инфекций, вызванных штаммами с МЛУ, в последние годы разрабатывают альтернативные терапевтические подходы, среди которых можно выделить фаготерапию (терапию на основе вирулентных бактериофагов). Бактериофаги (фаги) — вирусы, способные инфицировать бактериальные клетки. Использование фагов как терапевтических агентов имеет ряд преимуществ по сравнению с классической терапией антибиотиками [10]. Так, необходимо отметить высокую специфичность фагов, которая исключает их воздействие на нормофлору и способность к саморепликации, что с высокой вероятностью обеспечивает присутствие агента в очаге инфекции. Механизм действия бактериофагов, как правило, отличен от антибиотиков, что позволяет их применять против антибиотикоустойчивых штаммов. Немаловажным преимуществом считается относительная простота выделения бактериофагов и производства терапевтических препаратов на их основе [11].

Несмотря на потенциальную возможность замены классических антибиотиков бактериофагами, существует ряд сложностей, которые затрудняют массовое использование фаготерапии в клинической практике. Главные ограничения — сложность и высокая стоимость процедур регистрации препаратов на основе бактериофагов и отсутствие утвержденных схем их применения [12]. Следует также отметить возможность развития у бактерий устойчивости к действию фагов и узкий спектр действия бактериофагов или, другими словами, штаммовую специфичность [13].

В качестве одного из основных путей применения бактериофагов в терапии рассматривают их комбинированное использование с антибиотиками. В настоящее время многие эксперименты *in vitro* и клинические исследования показывают эффективность

такого воздействия двух агентов [14, 15]. По мнению ряда специалистов, подобный подход должен существенно снизить нагрузку на процессы регистрации и патентования препаратов [16]. Более того, совместное применение двух разнонаправленных агентов актуально против штаммов с МЛУ [11].

Настоящая работа направлена на обзор актуальных результатов исследований, посвященных изучению терапии инфекций, вызванных *S. aureus*, с применением бактериофагов и их комбинаций с антибиотиками. Ниже будут рассмотрены исследования, посвященные изучению эффективности пар «фаг–антибиотик» как в лабораторных условиях *in vitro*, так и на животных моделях *in vivo*. Будут также продемонстрированы результаты работ по воздействию пары «фаг–антибиотик» на биопленки золотистого стафилококка и случаи комплексной терапии инфекций, вызванных *S. aureus*.

Результирующие эффекты комбинированного применения бактериофагов и антибиотиков и методы их оценки

Эффективность комбинации антибиотиков и литических бактериофагов впервые была показана в 1941 г. на примере совместного использования бактериофагов с сульфаниламидными препаратами против *S. aureus* и *Escherichia coli* [17]. Позже положительные эффекты совместного воздействия были продемонстрированы на животных моделях [18]. Аналогичные результаты были получены и с пенициллином [19]. В ходе комбинированной терапии были достигнуты успехи в лечении таких инфекционных заболеваний, как эндокардит, бактериемия, остеомиелит и перитонит [18, 20].

В свою очередь, сам термин «синергизм» («синергический эффект») был введен значительно позже, только в 2007 г. Было описано увеличение размера зон лизиса культуры *E. coli* под действием бактериофага в присутствии субингибирующих концентраций антибиотиков (азтреонам, цефотаксим, тикарциллин, пиперациллин, ампициллин, налидиксовая кислота, митомицин С) [21]. Основным объяснением наблюдаемого явления стало повышение продукции частиц бактериофага за счет анормального роста бактериальных клеток в присутствии антибиотиков. Со временем термин «синергизм» приобрел более широкий смысл. Так, под ним стали понимать случаи, когда эффективность комбинации фага и антибиотика в целом значительно превышает сумму индивидуальных эффектов [15, 16]. В некоторых публикациях стали вводить дополнительную терминологию, касающуюся положительных эффектов комбинированного воздействия. Например, в одном из исследований такие эффекты подразделяют на аддитивный эффект (от англ. add — добавлять), синергизм и фасилитацию (от англ. facilitate — облегчать), где под аддитивным эффектом авторы понимают результат, при котором совместное применение двух агентов приводит к подавлению роста клеток, равному сумме эффектов каждого компонента по отдельности, под синергизмом — превышение аддитивного эффекта, а под фасилитацией — эффект, когда комбинированное действие дает более значимое подавление бактериального роста, чем наиболее эффективный агент при отдельном введении, но меньшему в сравнении с аддитивным эффектом [15]. Помимо положительного, авторы описывают нейтральный эффект комбинированной терапии, когда совместное использование агентов приводит к снижению

Таблица 1. Исследования *in vitro* комбинированного воздействия бактериофагов и антибиотиков на штаммы *S. aureus*

Год	Фаг	Семейство	Антибиотик	Результат	Ссылка
2012	SA5	<i>Herelleviridae</i>	Гентамицин	Синергизм	[25]
2018	SA11	<i>Herelleviridae</i>	Ампициллин, цефотаксим, канамицин, тетрациклин, ципрофлоксацин, митомицин С, сульфаметоксазол, триметоприм	Синергизм (ампициллин, цефотаксим, тетрациклин, ципрофлоксацин, митомицин С, триметоприм)	[32]
2020	Sb-1	<i>Herelleviridae</i>	Даптомицин, ванкомицин, цефтаролин, цефазолин	Синергизм	[33]
2021	Коктейль AB-SA01	<i>Herelleviridae</i>	Ванкомицин, цефтаролин, цефазолин	Синергизм (ванкомицин, цефазолин)	[13]
2021	Henu2	Умеренный неклассифицируемый	Кларитромицин, линезолид, цефотаксим, тетрациклин, ципрофлоксацин	Синергизм	[31]
2021	PYOSa	<i>Herelleviridae</i>	Тетрациклин, оксациллин, ванкомицин, канамицин, азитромицин, даптомицин, рифампин, линезолид, стрептомицин	Антагонизм (тетрациклин, азитромицин, линезолид, ванкомицин, даптомицин, канамицин)	[34]
2021	Sb-1	<i>Herelleviridae</i>	Оксациллин	Синергизм, аддитивный эффект, фасилитация, антагонизм	[15]
2022	φSA115, φSA116	<i>Herelleviridae</i>	Тетрациклин, гентамицин	Антагонизм	[22]
2022	vB_SauM-515A1	<i>Herelleviridae</i>	Оксациллин, ванкомицин, гентамицин, тетрациклин, левофлоксацин, линезолид	Синергизм (тетрациклин, линезолид, оксациллин)	[14]
2023	vB_Sau_S90	Умеренный неклассифицируемый	Фосфомицин, ципрофлоксацин, ванкомицин, оксациллин	Синергизм	[35]

количества бактерий, равному наилучшему действию одного препарата, а также антагонизм, при котором комбинированная терапия менее эффективна, чем индивидуальное использование агентов [15].

Развитие интереса к комбинированной терапии привело к разнообразию лабораторных методов оценки ее эффективности. В первых работах по тематике определяли изменения диаметра зоны лизиса, сформированной под действием фага в комбинации с субингибирующей концентрацией антибиотика [21], такой традиционный метод встречается и в современных работах [22]. Однако в настоящее время чаще используют методы, связанные с измерением оптической плотности клеток, зараженных антибактериальными агентами совместно или независимо [13, 15]. Оценка подавляющего эффекта проводят при помощи подсчета площадей под кривыми роста или при оценке оптической плотности культуры через 16–24 ч [13, 15]. Высокая частота применения этого метода обусловлена наглядностью и удобством проведения экспериментов. Менее распространены колориметрические измерения для оценки количества живых клеток после обработки антибактериальными агентами, в том числе и при воздействии на биопленку [23, 24]. Была разработана экспериментальная система непрерывного культивирования, которая позволила не только оценить эффективность комбинированной терапии, но и проследить фармакодинамику процесса [25]. Встречается также описание метода изотермической микрокалориметрии для оценки воздействия фагов и антибиотиков на бактериальную биопленку [26]. Для изучения комбинированной терапии в экспериментах *in vivo* на животных моделях проводят оценку выживаемости, бактериальной нагрузки, длительности процесса инфекции, измерение размера поражения (отека), гистопатологическое исследование и др. [27–29].

Таким образом, ввиду повышения интереса к совместному применению бактериофагов и антибиотиков, за последнее время были введены новые термины для описания результирующих эффектов и был адаптирован ряд методик для изучения комбинированного подхода.

Комбинированное применение бактериофагов и антибиотиков против *S. aureus* в экспериментах *in vitro*

Комбинированный подход с применением бактериофагов и антибиотиков для элиминации *S. aureus* был продемонстрирован в экспериментах *in vitro* практически со всеми коммерчески доступными антибиотиками: аминогликозидами (гентамицин), бета-лактамами (оксациллин), гликопептидами (ванкомицин), макролидами (кларитромицин), оксазолидинонами (линезолид), тетрациклинами (тетрациклин), цефалоспорины (цефтаролин, цефазолин), циклическими пептидами (даптомицин) и др. (табл. 1). В рамках данного подхода, как правило, используют вирулентные бактериофаги семейств *Herelleviridae* (ранее *Myoviridae*) и *Rountreeviridae* (бывшие *Podoviridae*). При этом бактериофагам семейств *Herelleviridae* отдают предпочтение, что связано с их широким спектром литической активности (способны лизировать 80–95% штаммов) [30]. В некоторых работах по комбинированному воздействию исследователи используют и умеренные бактериофаги, но только в рамках *in vitro* экспериментов [31].

Как видно из табл. 1, в качестве антибиотиков в эксперименты включают бактерицидные и бактериостатические препараты различных классов, при этом в значительном количестве работ рассматривают влияние ванкомицина и оксациллина, что связано с их клинической значимостью. Например, было показано, что совместное применение фага Sb-1 (сем. *Herelleviridae*) с ванкомицином против штаммов VISA (от англ. *vancomycin intermediate S. aureus*) приводит к синергическому эффекту [33]. Авторы также установили, что использование сочетания двух антибиотиков различных классов (даптомицина либо ванкомицина с цефтаролином; даптомицина либо ванкомицина с цефазолином) с бактериофагом ведет к синергическому эффекту. При этом нужно отметить, что эффект от комбинации «фаг и два различных антибиотика» незначительно отличается от комбинации «фаг и антибиотик» при наличии синергизма в последнем случае. Повышение ингибирования

Таблица 2. Исследования комбинированной терапии биопленок *S. aureus*

Год	Фаг	Семейство	Антибиотик	Результат	Ссылка
2011	SAP-26	<i>Rountreeviridae</i>	Азитромицин, ванкомицин, рифампицин	Синергизм (рифампицин)	[23]
2014	MR-5	<i>Herelleviridae</i>	Линезолид	Синергизм	[41]
2018	SATA-8505	<i>Herelleviridae</i>	Цефазолин, ванкомицин, диклосациллин, тетрациклин, линезолид	Синергизм (ванкомицин, цефазолин) Антагонизм (ванкомицин, цефазолин, диклосациллин, линезолид, тетрациклин) Аддитивный эффект (диклосациллин, цефазолин, тетрациклин, линезолид)"	[24]
2019	PYO	<i>Herelleviridae</i>	Ципрофлоксацин, даптомицин, эритромицин, гентамицин, линезолид, оксациллин, тетрациклин, ванкомицин	Синергизм (ципрофлоксацин, тетрациклин) Антагонизм (ципрофлоксацин, ванкомицин, тетрациклин, гентамицин, эритромицин, линезолид)	[16]
2020	Sb-1	<i>Herelleviridae</i>	Доксициклин, левофлоксацин, линезолид, клиндамицин, рифампин	Синергизм	[26]
2023	Фаг K	<i>Herelleviridae</i>	Ванкомицин	Синергизм	[42]
2023	vB_SauM_Remus	<i>Herelleviridae</i>	Ванкомицин	Синергизм	[43]

бактериального роста наблюдали и при применении ванкомицина с умеренным бактериофагом Henu2 [31]. На выборке из 27 штаммов было показано, что совместное воздействие фага Sb-1 (сем. *Herelleviridae*) с различными концентрациями оксациллина в большинстве случаев приводило к положительным эффектам ингибирования бактериального роста, таким как синергизм, аддитивный эффект и фасилитация [15]. Исследователи отмечают, что негативные случаи так называемого антагонизма были крайне редки. Схожие результаты были показаны и для литического бактериофага vB_SauM-515A1: его комбинация с оксациллином в определенных концентрациях улучшала антибактериальный эффект, а антагонизма во всех рассмотренных случаях не наблюдали [14].

Точные механизмы, лежащие в основе синергического эффекта совместного применения фагов и антибиотиков против штаммов *S. aureus*, до сих пор остаются неясными. Для объяснения данного феномена предлагают различные гипотезы. Например, увеличение выработки фаговых частиц под действием сублетальных концентраций антибиотика, что было показано на примере тетрациклина, линезолида, телитромицина, кларитромицина, цефотаксима и ципрофлоксацина. Сублетальные концентрации этих антибиотиков способствовали увеличению зон фагового лизиса, что может свидетельствовать о повышенной продукции частиц бактериофага [31]. Было показано, что под действием сублетальных концентраций антибиотиков клетки *S. aureus* демонстрируют набухание, которое в ряде случаев сопровождалось увеличенной продукцией бактериофага SA11 (сем. *Herelleviridae*) [32]. По мнению авторов, такой синергизм — результат задержки лизиса, вызванной недостатком холина, который необходим для лизиса клетки и дальнейшего высвобождения дочерних вирусных частиц. Другим объяснением синергического эффекта стало преодоление устойчивости к фагам при воздействии антибиотиком. Так, комбинация бактериофага Sb-1 с ванкомицином/даптомицином предотвращала развитие устойчивости к бактериофагам [33]. Кроме того, в системе непрерывного культивирования было показано, что гентамицин индуцирует образование клеток с фенотипом, склонным к агрегации и образованию конгломератов, которые, в свою очередь, наиболее чувствительны к действию бактериофага [25].

В сравнении с синергическим эффектом, антагонизм был отмечен в значительно меньшем количестве публикаций [15, 22, 34]. В отдельных исследованиях антагонизм связывают с применением бактериостатических антибиотиков [22, 34]. Высказанная закономерность кажется вполне разумной, поскольку известно, что бактериостатические антибиотики направлены на ограничение размножения и жизнедеятельности бактериальных клеток без последующего уничтожения путем воздействия на системы биосинтеза белка и нуклеиновых кислот. Не исключено, что ингибирующему воздействию в таком случае могут подвергаться и жизненно важные процессы бактериофага. Дополнительно стоит отметить, что антибиотики в целом снижают плотность бактерий и тем самым — способность фага к репликации.

В то же время можно увидеть противоречия, возникающие при сравнении исследовательских работ разных авторов. С одной стороны, некоторые результаты экспериментов подтверждают идею о штаммо- и фагоспецифичности результирующего эффекта [15]. С другой стороны, разницу эффектов можно связать с концентрациями антибиотика. Так, при использовании бактериостатического антибиотика линезолида в концентрации 10 мкг/мл и фага PYOSa (сем. *Herelleviridae*) наблюдают антагонистический эффект [34], в то время как в других работах при применении более низких концентраций (1–2 мкг/мл) и фагов Henu2 (умеренный неклассифицируемый) [31] или vB_SauM-515A1 (сем. *Herelleviridae*) [14], наоборот, проявляется синергизм.

Таким образом, комбинированная терапия имеет весомый потенциал, и в большинстве случаев использование одновременно бактериофага и антибиотиков не снижает их результативности, а в некоторых случаях и повышает ее. В то же время очевидно, что комбинированное воздействие бактериофагов и антибиотиков многомерно и тип результирующего эффекта зависит от ряда параметров: концентраций выбранных агентов, типа антибиотика и штамма бактерии. Для более полного обобщения данных необходимо проведение дополнительных исследований, связанных с поиском корреляций между вышеперечисленными факторами, например, с учетом данных типирования штаммов.

Таблица 3. Исследования *in vivo* и клинические случаи комбинированной терапии инфекций, вызванных *S. aureus*

Год	Фаг	Семейство	Объект	Инфекция	Антибиотик	Результат	Ссылка
Исследования <i>in vivo</i>							
2013	Sb-1	<i>Herelleviridae</i>	Крысы	Имплантат-ассоциированная инфекция	Тейкопланин	Синергизм	[46]
2013	MR-10	<i>Herellevirida</i>	Мыши	Инфекции задней лапы у мышей с диабетом	Линезолид	Синергизм	[27]
2019	2003, 2002, 3A, and K	Коктейль из фагов различных семейств	Крысы	Пневмония	Тейкопланин	Нейтральный эффект	[28]
2022	vB_SauH_2002, phage 66	<i>Herelleviridae</i> , <i>Rountreeviridae</i>	Крысы	Эндокардит	Флуоксациллин	Синергизм	[29]
2023	vB_SauM_Remus	<i>Herelleviridae</i>	Личинки <i>Galleria mellonella</i>	–	Ванкомицин	Синергизм	[43]
Клинические случаи							
2019	Коктейль AB-SA01	<i>Herelleviridae</i>	–	Инфекционный эндокардит протезированного клапана	Флуоксациллин, ципрофлоксацин, рифампицин	Выздоровление пациента	[47]
2019	Коктейль AB-SA01	<i>Herelleviridae</i>	–	Инфекционный эндокардит, ассоциированный с вспомогательным устройством в левом желудочке, осложненный стерильным остеомиелитом и бактериемией	Цефазолин, миноциклин	Выздоровление пациента	[48]
2021	Коктейль AB-SA01	<i>Herelleviridae</i>	–	Инфекция протезного сустава	Цефазолин	Выздоровление пациента	[49]
2022	Mallokai	нет данных	–	Инфекция протезного сустава	Даптомицин и цефтаролин	Выздоровление пациента	[45]

Комбинированное воздействие бактериофагов и антибиотиков на биопленки, сформированные *S. aureus*

Многие штаммы *S. aureus* характеризуются способностью образовывать биопленки. Биопленки проявляют повышенную устойчивость к противомикробным средствам за счет наличия сложной пространственной структуры, механически препятствующей проникновению антибиотика, а также изменения фенотипа клеток (образование медленно растущих клеток и клеток-персистеров) [36]. Большинство клинических случаев инфекций *S. aureus* связаны с образованием биопленок, которые способны колонизировать поверхности органов и медицинских изделий [37–40].

Применение комбинированного подхода против биопленок *S. aureus* в настоящее время активно изучают (табл. 2).

Ключевой момент для эффективной обработки биопленок антимикробными агентами — это последовательность их введения. Наибольшая эффективность комбинированной терапии показана при последовательной обработке биопленки сначала бактериофагом, а затем антибиотиком. Такой результат предположительно связан со способностью фагов проникать в матрикс биопленки и разрушать его, что приводит к высвобождению планктонных клеток и их последующему уничтожению как антибиотиком, так и фагом [23]. Эти данные подтверждены во многих работах [16, 24]. Были продемонстрированы не только эффективность последовательной обработки биопленки сначала фагом (сем. *Herelleviridae*), а затем антибиотиком (ванкомицин, цефазолин), но и отсутствие эффекта действия антимикробных агентов при их одновременном использовании, и более того, в случае внесения фага после антибиотиков (ванкомицин, цефазолин, тетрацилин, линезолид) — антагонистический эффект [24]. Описаны

также случаи антагонизма при одновременном введении агентов (ванкомицин или тетрацилин с бактериофагом PYO (сем. *Herelleviridae*)) и синергизма для большинства тестируемых препаратов при их введении после фага [16].

Эффективность поэтапного введения агентов была показана и при применении бактериофагов и антибиотиков против биопленок, образованных двумя видами бактерий (*S. aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*). Так, введение гентамицина или ципрофлоксацина после бактериофага приводит к полному подавлению роста биопленки [44]. Авторы подчеркнули, что максимальный эффект достигается при введении антибиотиков в высоких концентрациях (8 МИК (минимальная ингибирующая концентрация)). Применение высоких концентраций антибиотиков в случае инфекций, ассоциированных с биопленкообразованием, характерно и для классической антибиотикотерапии. Необходимость использования высоких концентраций антибиотиков в сочетании с бактериофагом для достижения элиминации биопленки также продемонстрирована во многих работах [16, 22, 45]. Концентрации антибиотика в работах варьируют от 2 [16] до 250 МИК [43]. Кроме того, была показана зависимость эффекта элиминации биопленки от концентрации антибиотика, а именно: подавление развития биопленки было прямо пропорционально концентрациям линезолида и тетрацилина и обратно пропорционально концентрациям ванкомицина и цефазолина (до концентрации 128 мкг/мл); в случае других антибиотиков (диклоксацилина и тетрацилина) явной линейной зависимости не наблюдали [24].

Как упоминалось ранее, биопленки играют значимую роль в имплантат-ассоциированных инфекциях. Авторы работы, в которой был успешно применен комбинированный подход для борьбы с биопленками, ассоциированными с медицинскими изделиями, предложили проводить покрытие ортопедических проволок полимером гидроксипропилметилцеллюлозой, несущим смесь бактериофага MR-5 (сем. *Herelleviridae*) и линезолида. В

результате наблюдали не только эрадикацию биопленок, но и снижение адгезии бактериальных клеток. Помимо этого, в данном исследовании было показано, что частота образования устойчивых к бактериофагу мутантов при совместном применении двух агентов снижалась [41].

Исходя из вышесказанного, последовательное введение бактериофага с антибиотиком в высоких концентрациях позволяет достичь элиминации биопленок, и более того, смесь двух агентов может быть применена совместно с полимерным покрытием медицинских изделий. Полученные результаты могут стать основой для создания новых подходов при использовании имплантатов и катетеров.

Исследования комбинированного применения бактериофагов и антибиотиков на моделях инфекций *S. aureus* и клинические случаи

Разработка новых терапевтических подходов требует подтверждения их эффективности на животных моделях. Оценку совместного использования бактериофагов и антибиотиков проводят как на позвоночных животных, так и беспозвоночных. В случае первых исследователи воссоздают модели различных инфекционных заболеваний, в том числе имплантат-ассоциированные инфекции, пневмонию, эндокардит и инфекции мягких тканей, индуцированных сахарным диабетом. В исследования включают наиболее актуальные на сегодняшний день антибиотики, такие как линезолид, тейкопланин, ванкомицин (табл. 3).

Результаты анализа представленных в таблице работ на животных моделях демонстрируют успешное применение комбинированного подхода для терапии инфекций, вызванных *S. aureus*. Было показано, что комбинация тейкопланина с литическим бактериофагом Sb-1 способна уничтожать биопленки на катетере, введенном внутривенно [46]. Перспективность комбинированного применения фаговой терапии с антибиотиками была продемонстрирована и в исследовании на крысиной модели эндокардита [29]. В публикации наибольший успех терапии показало сочетание флуоксациллина с фаговым коктейлем, содержащим представителей двух семейств — *Herelleviridae* и *Rountreeviridae*. Исследователи отмечают, что у животных, получающих бактериофаг совместно с антибиотиками, инфекционный процесс протекает значительно мягче и длится значительно меньше в сравнении с животными, получающими только антибиотик или бактериофаг [27]. Из представленных исследований исключением стала работа 2018 г., в которой не было обнаружено существенных различий между индивидуальным применением фага или антибиотика с совместным введением двух агентов в модели вентилятор-ассоциированной пневмонии [28].

В настоящее время все чаще сообщают о клинических случаях применения комбинированной терапии различных инфекций, вызванных золотистым стафилококком. В 2019 г. появилось первое сообщение об успехе комбинированной терапии фаговым коктейлем AB-SA01 (сем. *Herelleviridae*) в сочетании с антибиотиками (флуоксациллин, цiproфлоксацин и рифампицин) в случае пациента с инфекционным эндокардитом искусственного клапана [47]. После начала внутривенного введения препарата бактериофагов исследователи наблюдали

существенное подавление симптомов (лихорадки, тахикардии, гипотонии и сыпи) с последующим полным выздоровлением. Этот же препарат бактериофагов был успешно использован совместно с цефазолином и миноциклином в случае пациента с инфекционным эндокардитом, ассоциированным со вспомогательным устройством в левом желудочке [48]. Описан также случай успешной терапии инфекции суставного протеза с применением внутривенных инфузий фагового коктейля AB-SA01 и цефазолина в сочетании с хирургическим вмешательством [49]. Во всех вышеупомянутых исследованиях авторы отмечали безопасность использования бактериофагов и не сообщали о побочных эффектах.

Ввиду сообщений об успешном тестировании комбинированной терапии на животных моделях и положительных результатах в клинической практике можно сделать заключение, что совместное применение литических бактериофагов с антибиотиками — многообещающий подход для лечения инфекций золотистого стафилококка различной тяжести.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение литических бактериофагов в качестве дополнительного агента к классическим антибиотикам при терапии инфекций *S. aureus* с МЛУ в последние десятилетия стало актуальным направлением исследований. Эксперименты *in vitro* и *in vivo* демонстрируют, что во многих случаях комбинированное введение фага и антибиотика приводит к значительному снижению роста численности бактерий, в то время как обратный антагонистический эффект встречается значительно реже. Важное преимущество такого подхода состоит, несомненно, в его эффективности в элиминации не только планктонных клеток, но и биопленок, активно формируемых многими штаммами золотистого стафилококка. Обработка бактериофагами и антибиотиками *in vitro* позволяет значительно повысить восприимчивость и ресенсибилизацию штаммов *S. aureus* с МЛУ к антибиотикам. В то же время результаты, полученные на сегодняшний день в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, не являются исчерпывающими и содержат много противоречий, что делает актуальными дальнейшие исследования, направленные на накопление и обобщение данных. Кроме того, для эффективного использования представленного подхода необходим фундаментальный базис, объясняющий механизмы, задействованные в элиминации *S. aureus* при комбинированном влиянии бактериофага и конкретных антибиотиков. Таким образом, дальнейшие исследования должны включать изучение взаимодействия системы «фаг–антибиотик–бактерия» с привлечением методов системной биологии и омиксных технологий.

Отдельно следует подчеркнуть, что на сегодняшний день продемонстрированы многообещающие результаты применения комплексной терапии на пациентах. Несмотря на это, для ее массового использования необходимо оптимизировать подбираемые дозы двух агентов и проводить дальнейшие клинические исследования (в том числе и двойное слепое плацебо-контролируемое исследование), подтверждающие эффективность и безопасность использования препаратов бактериофагов, произведенных надлежащим образом. Данные работы должны стать основой для разработки рекомендаций по применению бактериофагов в клинической практике.

Литература

1. Wagenlehner FME, Dittmar F. Re: global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Eur Urol*. 2022; 82 (6): 658.
2. Gherardi G. Staphylococcus aureus infection: pathogenesis and antimicrobial resistance. *Int J Mol Sci*. 2023; 24 (9): 81–82.
3. Fishovitz J, Hermoso JA, Chang M., Mobashery S. Penicillin-Binding Protein 2a of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. *IUBMB Life*. 2014; 66: 572–7.
4. McGuinness WA, Malachowa N, DeLeo FR. Vancomycin resistance in Staphylococcus aureus. *Yale J. Biol. Med*. 2017; 90: 269–81.
5. Burdett V. Tet(M)-promoted release of tetracycline from ribosomes is GTP dependent. *J Bacteriol*. 1996; 178: 3246–51.
6. Locke JB, Hilgers M, Shaw, KJ. Novel Ribosomal Mutations in Staphylococcus aureus Strains Identified through Selection with the Oxazolidinones Linezolid and Torezolid (TR-700). *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53: 5265–74.
7. Jensen SO, Lyon BR. Genetics of antimicrobial resistance in Staphylococcus aureus. *Future Microbiol*. 2009; 4: 565–82.
8. Dashtbani-Roozbehani A, Brown MH. Efflux Pump Mediated Antimicrobial Resistance by Staphylococci in Health-Related Environments: Challenges and the Quest for Inhibition. *Antibiot Basel Switz*. 2021; 10: 1502.
9. 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.
10. Тикунова Н. В., Ворошилова Н. Н., Полягач О. А., Морозова В. В., Тикунов А. Ю., Курильщиков А. М. и др. Генетическая характеристика и спектр антибактериальной активности бактериофагов, входящих в состав промышленных серий лекарственного препарата лиобактериофаг поливалентный очищенный. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2016; 15 (2 (87)): 93–100.
11. Nikolich MP, Filippov AA. Bacteriophage therapy: developments and directions. *Antibiotics*. 2020; 9: 135.
12. Lin DM, Koskella B, Lin HC. Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World J Gastrointest Pharmacol. Ther*. 2017; 8: 162–73.
13. Kebriaei R, Lev KL, Stamper KC, Lehman SM, Morales S, Rybak MJ. Bacteriophage AB-SA01 Cocktail in Combination with Antibiotics against MRSA-VISA Strain in an In Vitro Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2021; 65 (1): e01863-20.
14. Абдраймова Н. К., Корниенко М. А., Беспятых Д. А., Кулцов Н. С., Городничев Р. Б., Шитиков Е. А. Комбинированное воздействие бактериофага vB_SauM-515A1 и антибиотиков на клинические изоляты Staphylococcus aureus. *Вестник РГМУ*. 2022; (5): 23–30.
15. 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.
16. 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.
17. Zaytzeff-Jern H, Meleney FL. Studies in bacteriophage VI: The effect of sulfapyridine and sulfanilamide on staphylococci and E. Coli and their respective bacteriophages. *J Lab Clin Med*. 1941; 26: 1756–67.
18. Macneal WJ, Spence MJ, Blevins A. Cure of experimental staphylococcal meningitis. *Exp Biol Med*. 1942; 50: 176–9.
19. Himmelweit F. Combined action of penicillin and phage on staphylococci. *Lancet*. 1945; 246: 104–5.
20. Diallo K, Dublanche A. A century of clinical use of phages: a literature review. *Antibiotics (Basel)*. 2023; 12 (4): 751.
21. 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.
22. Vashisth M, Yashveer S, Anand T, Virmani N, Bera BC, Vaid RK. Antibiotics targeting bacterial protein synthesis reduce the lytic activity of bacteriophages. *Virus Res*. 2022; 321: 198909.
23. Rahman M, Kim S, Kim SM, Seol SY, Kim J. Characterization of induced Staphylococcus aureus bacteriophage SAP-26 and its anti-biofilm activity with rifampicin. *Biofouling*. 2011; 27 (10): 1087–93.
24. Kumaran D, Taha M, Yi Q, et al. Does treatment order matter? Investigating the ability of bacteriophage to augment antibiotic activity against Staphylococcus aureus biofilms. *Front Microbiol*. 2018; 9: 127.
25. Kirby AE. Synergistic action of gentamicin and bacteriophage in a continuous culture population of Staphylococcus aureus. *PLoS One*. 2012; 7 (11): e51017.
26. 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. *Antibiotics (Basel)*. 2020; 9 (11): 749.
27. Chhibber S, Kaur T, Sandeep Kaur. Co-therapy using lytic bacteriophage and linezolid: effective treatment in eliminating methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) from diabetic foot infections. *PLoS One*. 2013; 8 (2): e56022.
28. Prazak J, Iten M, Cameron DR, et al. Bacteriophages Improve Outcomes in Experimental Staphylococcus aureus Ventilator-associated Pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019; 200 (9): 1126–33.
29. Save J, Que YA, Entenza JM, Kolenda C, Laurent F, Resch G. Bacteriophages combined with subtherapeutic doses of flucloxacillin act synergistically against Staphylococcus aureus experimental infective endocarditis. *J Am Heart Assoc*. 2022; 11 (3): e023080.
30. Kornienko M, Kuptsov N, Gorodnichev R, et al. Contribution of Podoviridae and Myoviridae bacteriophages to the effectiveness of anti-staphylococcal therapeutic cocktails. *Sci Rep*. 2020; 10 (1): 18612.
31. Li X, Hu T, Wei J, et al. Characterization of a Novel Bacteriophage Henu2 and Evaluation of the Synergistic Antibacterial Activity of Phage-Antibiotics. *Antibiotics (Basel)*. 2021; 10 (2): 174.
32. Kim M, Jo Y, Hwang YJ, et al. Phage-Antibiotic Synergy via Delayed Lysis. *Appl Environ Microbiol*. 2018; 84 (22): e02085-18.
33. 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.
34. 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 USA*. 2021; 118 (10): e2008007118.
35. Loganathan A, Manohar P, Nachimuthu R. Phage-antibiotic combination: an effective method for eradication of Staphylococcus aureus. *bioRxiv*. Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.03.27.534482v2>.
36. Gilbert P, Maira-Litran T, McBain AJ, Rickard AH, Whyte FW. The physiology and collective recalcitrance of microbial biofilm communities. *Adv Microb Physiol*. 2002; 46: 202–56.
37. Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Shirliff ME. Staphylococcus aureus biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence*. 2011; 2 (5): 445–59.
38. Costerton JW, Montanaro L, Arciola CR. Biofilm in implant infections: its production and regulation. *Int J Artif Organs*. 2005; 28 (11): 1062–8.
39. Oliveira WF, Silva PMS, Silva RCS, et al. Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis infections on implants. *J Hosp Infect*. 2018; 98 (2): 111–7.
40. Cho OH, Bae IG, Moon SM, Park SY, Kwak YG, Kim BN, et al. Therapeutic outcome of spinal implant infections caused by Staphylococcus aureus: A retrospective observational study. *Medicine (Baltimore)*. 2018; 97 (40): e12629.
41. Kaur S, Harjai K, Chhibber S. Bacteriophage mediated killing of Staphylococcus aureus in vitro on orthopaedic K wires in presence of linezolid prevents implant colonization. *PLoS One*. 2014; 9 (3): e90411.
42. Joo H, Wu SM, Soni I, Wang-Crocker C, Matern T, Beck JP, et al. Phage and Antibiotic Combinations Reduce Staphylococcus

- aureus in Static and Dynamic Biofilms Grown on an Implant Material. *Viruses*. 2023; 15 (2): 460.
43. Taha M, Arnaud T, Lightly TJ, Peters D, Wang L, Chen W, et al. Combining bacteriophage and vancomycin is efficacious against MRSA biofilm-like aggregates formed in synovial fluid. *Front Med (Lausanne)*. 2023; 10: 1134912.
 44. Akturk E, Oliveira H, Santos SB, Costa S, Kuyumcu S, Melo LDR, et al. Synergistic Action of Phage and Antibiotics: Parameters to Enhance the Killing Efficacy Against Mono and Dual-Species Biofilms. *Antibiotics (Basel)*. 2019; 8 (3): 103.
 45. Doub JB, Ng VY, Lee M, Chi A, Lee A, Würstle S, et al. Salphage: Salvage Bacteriophage Therapy for Recalcitrant MRSA Prosthetic Joint Infection. *Antibiotics (Basel)*. 2022; 11 (5): 616.
 46. Yilmaz C, Colak M, Yilmaz BC, Ersoz G, Kutateladze M, Gozlugol M. Bacteriophage therapy in implant-related infections: an experimental study. *J Bone Joint Surg Am*. 2013; 95 (2): 117–25.
 47. Gilbey T, Ho J, Cooley LA, Petrovic Fabijan A, Iredell JR. Adjunctive bacteriophage therapy for prosthetic valve endocarditis due to *Staphylococcus aureus*. *Med J Aust*. 2019; 211 (3): 142-143.e1.
 48. Aslam S, Pretorius V, Lehman SM, Morales S, Schooley RT. Novel bacteriophage therapy for treatment of left ventricular assist device infection. *J Heart Lung Transplant*. 2019; 38 (4): 475–6.
 49. Ramirez-Sanchez C, Gonzales F, Buckley M, Biswas B, Henry M, Deschenes MV, et al. Successful treatment of *Staphylococcus aureus* prosthetic joint infection with bacteriophage therapy. *Viruses*. 2021; 13 (6): 1182.

References

1. Wagenlehner FME, Dittmar F. Re: global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Eur Urol*. 2022; 82 (6): 658.
2. Gherardi G. *Staphylococcus aureus* infection: pathogenesis and antimicrobial resistance. *Int. J. Mol. Sci.* 2023; 24 (9): 81–82.
3. Fishovitz J, Hermoso JA, Chang M, Mobashery S. Penicillin-Binding Protein 2a of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *IUBMB Life*. 2014; 66: 572–7.
4. McGuinness WA, Malachowa N, DeLeo FR. Vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Yale J Biol Med*. 2017; 90: 269–81.
5. Burdett V. Tet(M)-promoted release of tetracycline from ribosomes is GTP dependent. *J Bacteriol*. 1996; 178: 3246–51.
6. Locke JB, Hilgers M, Shaw, KJ. Novel Ribosomal Mutations in *Staphylococcus aureus* Strains Identified through Selection with the Oxazolidinones Linezolid and Torezolid (TR-700). *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53: 5265–74.
7. Jensen SO, Lyon BR. Genetics of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiol*. 2009; 4: 565–82.
8. Dashtbani-Roozbehani A, Brown MH. Efflux Pump Mediated Antimicrobial Resistance by *Staphylococci* in Health-Related Environments: Challenges and the Quest for Inhibition. *Antibiot Basel Switz*. 2021; 10: 1502.
9. 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.
10. Tikunova NV, Voroshilova NN, Polygach OA, Morozova VV, Tikunov AY, Kurilshnikov AM, et al. Genetic characteristics and range of antibacterial activity of the bacteriophages, which are a part of manufactured serie of drugs — pyobacteriophage polyvalent purified. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2016; 15 (2 (87)): 93–100. Russian.
11. Nikolich MP, Filipov AA. Bacteriophage therapy: developments and directions. *Antibiotics*. 2020; 9: 135.
12. Lin DM, Koskella B, Lin HC. Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World J Gastrointest Pharmacol. Ther*. 2017; 8: 162–73.
13. Kebriaei R, Lev KL, Stamper KC, Lehman SM, Morales S, Rybak MJ. Bacteriophage AB-SA01 Cocktail in Combination with Antibiotics against MRSA-VISA Strain in an In Vitro Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2021; 65 (1): e01863-20.
14. Abdraimova NK, Kornienko MA, Bespiatykh DA, Kuptsov NS, Gorodnichev RB, Shitikov EA. Combined effects of bacteriophage vB_SauM-515A1 and antibiotics on the *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Bulletin of RSMU*. 2022; (5): 23–30. Russian.
15. 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.
16. 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.
17. Zaytzeff-Jern H, Meleney FL. Studies in bacteriophage VI: The effect of sulfapyridine and sulfanilamide on staphylococci and *E. Coli* and their respective bacteriophages. *J Lab Clin Med*. 1941; 26: 1756–67.
18. Macneal WJ, Spence MJ, Blevins A. Cure of experimental staphylococcal meningitis. *Exp Biol Med*. 1942; 50: 176–9.
19. Himmelweit F. Combined action of penicillin and phage on staphylococci. *Lancet*. 1945; 246: 104–5.
20. Diallo K, Dublanquet A. A century of clinical use of phages: a literature review. *Antibiotics (Basel)*. 2023; 12 (4): 751.
21. 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.
22. Vashisth M, Yashveer S, Anand T, Virmani N, Bera BC, Vaid RK. Antibiotics targeting bacterial protein synthesis reduce the lytic activity of bacteriophages. *Virus Res*. 2022; 321: 198909.
23. Rahman M, Kim S, Kim SM, Seol SY, Kim J. Characterization of induced *Staphylococcus aureus* bacteriophage SAP-26 and its anti-biofilm activity with rifampicin. *Biofouling*. 2011; 27 (10): 1087–93.
24. Kumaran D, Taha M, Yi Q, et al. Does treatment order matter? Investigating the ability of bacteriophage to augment antibiotic activity against *Staphylococcus aureus* biofilms. *Front Microbiol*. 2018; 9: 127.
25. Kirby AE. Synergistic action of gentamicin and bacteriophage in a continuous culture population of *Staphylococcus aureus*. *PLoS One*. 2012; 7 (11): e51017.
26. 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. *Antibiotics (Basel)*. 2020; 9 (11): 749.
27. Chhibber S, Kaur T, Sandeep Kaur. Co-therapy using lytic bacteriophage and linezolid: effective treatment in eliminating methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from diabetic foot infections. *PLoS One*. 2013; 8 (2): e56022.
28. Prazak J, Iten M, Cameron DR, et al. Bacteriophages Improve Outcomes in Experimental *Staphylococcus aureus* Ventilator-associated Pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019; 200 (9): 1126–33.
29. Save J, Que YA, Entenza JM, Kolenda C, Laurent F, Resch G. Bacteriophages combined with subtherapeutic doses of flucloxacillin act synergistically against *Staphylococcus aureus* experimental infective endocarditis. *J Am Heart Assoc*. 2022; 11 (3): e023080.
30. Kornienko M, Kuptsov N, Gorodnichev R, et al. Contribution of Podoviridae and Myoviridae bacteriophages to the effectiveness of anti-staphylococcal therapeutic cocktails. *Sci Rep*. 2020; 10 (1): 18612.
31. Li X, Hu T, Wei J, et al. Characterization of a Novel Bacteriophage Henu2 and Evaluation of the Synergistic Antibacterial Activity of Phage-Antibiotics. *Antibiotics (Basel)*. 2021; 10 (2): 174.
32. Kim M, Jo Y, Hwang YJ, et al. Phage-Antibiotic Synergy via Delayed Lysis. *Appl Environ Microbiol*. 2018; 84 (22): e02085-18.
33. 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.

34. 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 USA*. 2021; 118 (10): e2008007118.
35. Loganathan A, Manohar P, Nachimuthu R. Phage-antibiotic combination: an effective method for eradication of *Staphylococcus aureus*. *bioRxiv*. Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.03.27.534482v2>.
36. Gilbert P, Maira-Litran T, McBain AJ, Rickard AH, Whyte FW. The physiology and collective recalcitrance of microbial biofilm communities. *Adv Microb Physiol*. 2002; 46: 202–56.
37. Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME. *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence*. 2011; 2 (5): 445–59.
38. Costerton JW, Montanaro L, Arciola CR. Biofilm in implant infections: its production and regulation. *Int J Artif Organs*. 2005; 28 (11): 1062–8.
39. Oliveira WF, Silva PMS, Silva RCS, et al. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* infections on implants. *J Hosp Infect*. 2018; 98 (2): 111–7.
40. Cho OH, Bae IG, Moon SM, Park SY, Kwak YG, Kim BN, et al. Therapeutic outcome of spinal implant infections caused by *Staphylococcus aureus*: A retrospective observational study. *Medicine (Baltimore)*. 2018; 97 (40): e12629.
41. Kaur S, Harjai K, Chhibber S. Bacteriophage mediated killing of *Staphylococcus aureus* in vitro on orthopaedic K wires in presence of linezolid prevents implant colonization. *PLoS One*. 2014; 9 (3): e90411.
42. Joo H, Wu SM, Soni I, Wang-Crocker C, Matern T, Beck JP, et al. Phage and Antibiotic Combinations Reduce *Staphylococcus aureus* in Static and Dynamic Biofilms Grown on an Implant Material. *Viruses*. 2023; 15 (2): 460.
43. Taha M, Arnaud T, Lightly TJ, Peters D, Wang L, Chen W, et al. Combining bacteriophage and vancomycin is efficacious against MRSA biofilm-like aggregates formed in synovial fluid. *Front Med (Lausanne)*. 2023; 10: 1134912.
44. Akturk E, Oliveira H, Santos SB, Costa S, Kuyumcu S, Melo LDR, et al. Synergistic Action of Phage and Antibiotics: Parameters to Enhance the Killing Efficacy Against Mono and Dual-Species Biofilms. *Antibiotics (Basel)*. 2019; 8 (3): 103.
45. Doub JB, Ng VY, Lee M, Chi A, Lee A, Würstle S, et al. Salphage: Salvage Bacteriophage Therapy for Recalcitrant MRSA Prosthetic Joint Infection. *Antibiotics (Basel)*. 2022; 11 (5): 616.
46. Yilmaz C, Colak M, Yilmaz BC, Ersoz G, Kutateladze M, Gozlugol M. Bacteriophage therapy in implant-related infections: an experimental study. *J Bone Joint Surg Am*. 2013; 95 (2): 117–25.
47. Gilbey T, Ho J, Cooley LA, Petrovic Fabijan A, Iredell JR. Adjunctive bacteriophage therapy for prosthetic valve endocarditis due to *Staphylococcus aureus*. *Med J Aust*. 2019; 211 (3): 142-143.e1.
48. Aslam S, Pretorius V, Lehman SM, Morales S, Schooley RT. Novel bacteriophage therapy for treatment of left ventricular assist device infection. *J Heart Lung Transplant*. 2019; 38 (4): 475–6.
49. Ramirez-Sanchez C, Gonzales F, Buckley M, Biswas B, Henry M, Deschenes MV, et al. Successful treatment of *Staphylococcus aureus* prosthetic joint infection with bacteriophage therapy. *Viruses*. 2021; 13 (6): 1182.