doi:10.25143/prom-rsu_2023-22_pd

Rīgas Stradiņa universitāte

Kārlis Rācenis

Bakteriofāgu antibakteriālā darbība multirezistentās un biofilmu veidojošās infekcijās

Promocijas darbs zinātnes doktora grāda
“zinātnes doktors (*Ph. D.*)” iegūšanai

Nozaru grupa – medicīnas un veselības zinātnes
Nozare – klīniskā medicīna
Apakšnozare – internā medicīna

Rīga, 2023

Kārlis Rācenis

ORCID 0000-0001-7123-4048

Bakteriofāgu antibakteriālā darbība multirezistentās un biofilmu veidojošās infekcijās

Promocijas darbs zinātnes doktora grāda
"zinātnes doktors (*Ph. D.*)" iegūšanai

Nozaru grupa – medicīnas un veselības zinātnes

Nozare – klīniskā medicīna

Apakšnozare – internā medicīna

Promocijas darba vadītāji:

Dr. med. profesore **Juta Kroiča**,
Rīgas Stradiņa universitāte, Bioloģijas un mikrobioloģijas katedra, Latvija

Dr. med. profesors **Aivars Pētersons**,
Rīgas Stradiņa universitāte, Iekšķīgo slimību katedra, Latvija

Rīga, 2023

Anotācija

Mūsdienās vērojama arvien pieaugoša multirezistento bakteriālo infekciju izplatība. Bakteriālu infekciju patoģenēzē liela nozīme ir dažādiem virulences faktoriem. Viens no tiem, kas rada recidivējošu un ilgstoši noritošu infekciju, ir baktēriju spēja veidot biofilmas. Multirezistenas un ar biofilmām asociētas infekcijas vērojamas pacientiem ar riska faktoriem, kā mākslīgi implantētām ierīcēm, hroniskām slimībām, imūnsupresiju, smagām audu strukturālām izmaiņām traumu gadījumā. Antibiotiku izmantošana šo infekciju ārstēšanā ne vienmēr spēj nodrošināt veiksmīgu iznākumu, tāpēc tiek vērtētas un izmantotas alternatīvas ārstēšanas metodes, kā viena no tām ir bakteriofāgu terapija. Bakteriofāgi jeb fāgi ir baktēriju vīrusi, kuri spēj iekļūt sev specifiskā baktērijā, tajā vairoties un dzīves cikla beigās to lizēt. Fāgu iedarbību neietekmē baktēriju rezistence pret antibiotiskām vielām jeb antibakteriālā rezistence, kā arī tiem ir potenciāls efekts baktēriju biofilmu noārdīšanā. Pēdējos gados ir aprakstīta baktēriju rezistence arī pret fāgiem, tāpēc fāgu terapija bieži tiek kombinēta ar antibiotikām. Šo līdzekļu mijiedarbība planktoniskās un biofilmu veidojošās šūnās ir ļoti dažāda, ņemot vērā dažādo fāgu mijiedarbību ar baktēriju un antibiotikas darbības mehānismu.

Šī pētījuma mērķis ir izvērtēt bakteriofāgu antibakteriālo efektu un mijiedarbību ar antibiotikām atsevišķu multirezistentu un biofilmu veidojošu infekciju *in vitro* modeļos un dzīvībai apdraudošo klīnisko situāciju ārstēšanā.

Promocijas pētījums ir veidots kā četru secīgu publikāciju kopa. Pētījuma struktūrā izdalāmas trīs daļas. Pirmajā daļā tika pētīts, kā *S. aureus* kolonizācija un biofilmas veidošana ietekmē peritoneālās dialīzes iznākumu divu gadu garumā, vērtētas iegūto *S. aureus* viena indivīda dažādu izolātu biofilmu veidošanas fenotipiskās atšķirības, noteikts bakteriofāgu darbības efekts izolētajās kultūrās, kā arī veikta fāgu adaptācijas procedūra, lai pārvarētu bakteriofāgu rezistenci.

Otrajā daļā tika pētīta uropatogēno *E. coli* izolātu biofilmas veidošanas spēja, noteikta antibiotiku un fāgu biofilmas eradikācijas spēja. Tika veikta bakteriofāgu adaptācija rezistences gadījumā un vērtēts adaptēto fāgu līdziskais efekts planktoniskās un biofilmu veidojošās šūnās.

Trešajā daļā tika izvērtēta bakteriofāgu klīniskā efektivitāte pacientiem ar komplicētu multirezistentu *P. aeruginosa* osteomielītu un kreisā kambara mehāniskās palīgcirkulācijas ierīces (LVAD, angliski *Left Ventricular Assist Device*) asociētu infekciju. Pacienti saņēma lokālu un sistēmisku fāgu terapiju, kura tika papildināta ar antibiotikām, kā arī veikta brūču revīzija. Tika analizēts slimības klīniskais iznākums un terapijas panesamība. Pirms tam veikta bakteriofāgu atlase, fāgu preparāta sagatavošana un izvērtēšana klīniskai lietošanai.

Laboratorijas apstākļos tika vērtēta arī bakteriofāgu iedarbība biofilmu modeļos, noteikta bakteriofāgu mijiedarbība ar izmantotajām antibiotikām un vērtēta fāgu rezistences attīstība.

Iegūtie rezultāti atspoguļo, ka pētāmajā pacienta grupā biofilmu veidojošie celmi ir bieži sastopami un to biofilmas veidošanas spēja var būt ļoti atšķirīga. Vienas un tās pašas baktērijas biofilmas veidošanas fenotips var atšķirties pat viena indivīda ietvaros. Bakteriofāgu antibakteriālais efekts izolētajās baktērijās bija ar plašu lītisko efektivitāti. *S. aureus* un *E. coli* izolātos, kuri bija rezistenti pret bakteriofāgu, to izdevās pārvarēt, veicot adaptācijas procedūru. Pēc bakteriofāgu adaptācijas *E. coli* kultūrā tika novērots arī izteikts adaptētā bakteriofāga biofilmas eradikācijas efekts.

Pacientu ārstēšana, izmantojot bakteriofāgus, rezultējās ar klīnisku izveseļošanos abos klīniskajos gadījumos. *P. aeruginosa* pilnīgu eradikāciju izdevās sasniegt pacientam ar LVAD infekciju, savukārt pacientam ar osteomielītu infekcija recidivēja pēc deviņiem mēnešiem citā kaula segmentā, kuru veiksmīgi izārstēja ar antibiotikām.

Pacientu ārstēšanā tika izmantoti dažādi bakteriofāgi un tika pētīts to lītiskais un biofilmas eradikācijas efekts kombinācijā ar antibiotikām *in vitro*. Bakteriofāgu preparātam BFC1.10 tika novērots aditīvs efekts ar ceftazidīmu/avibaktāmu, kas padarīja ierosinātāju jutīgu pret izmantoto antibiotiku. Savukārt fāgam PNM un PT07 bija labāks biofilmas eradikācijas efekts gadījumā, ja to izmantoja vispirms un pēc tam terapiju mainīja uz ceftazidīmu-avibaktāmu. Bakteriofāgu rezistence pret PNM un PT07 fāgu *P. aeruginosa* kultūrā attīstījās jau 12 h pēc eksperimenta sākšanas biofilmas modelī. Rezistences attīstība bija atšķirīga, izmantojot dažādus baktērijas celmus.

Pētījuma dati liecina, ka bakteriofāgiem piemīt augsts potenciāls multirezistentu un ar biofilmu asociētu infekciju ārstēšanā kā laboratorijas apstākļos, tā arī cilvēka vides apstākļos. Bakteriofāgu terapija var tikt papildināta ar antibiotikām, bet ir nepieciešams izvērtēt konkrēto līdzekļu mijiedarbību un lietošanas secību, jo tas būtiski ietekmē terapijas efektivitāti. Kaut gan bakteriofāgu rezistence ir bieži sastopama fāgu terapijā, to var pārvarēt, izmantojot fāgu kokteiļus, veicot adaptācijas procedūru vai kombinējot fāgu terapiju ar antibiotikām arī tad, ja baktērija ir mēreni jutīga pret antibiotiku. Precīzākam fāgu terapijas izvērtējumam nepieciešami tālāki pētījumi, īpaši klīniskie.

Atslēgvārdi: fāgu terapija, multirezistence, biofilma, fāgu rezistence, fāgu adaptācija, peritoneālā dialīze, urīnceļu infekcija, osteomielīts, LVAD infekcija.

Abstract

Antimicrobial Activity of Bacteriophages in Multidrug-Resistant and Biofilm Associated Infections

In recent years multi-drug resistant bacterial infections are on the rise. Various virulence factors play an important role in the pathogenesis of bacterial infections. One of them, which leads to recurrent and prolonged infection, is the ability of bacteria to form biofilms. Multiresistant and biofilm-associated infections are observed in patients with risk factors such as artificially implanted devices, chronic disease, immunosuppression, severe tissue structural damage due to trauma. The use of antibiotics in the treatment of these infections does not always ensure a successful outcome, so alternative treatments such as bacteriophage therapy are being evaluated and used. Bacteriophages or phages are bacterial viruses that are able to enter a specific bacterium, multiply in it and, at the end of their life cycle, lyse it. Phages are unaffected by bacterial resistance to antibiotics and have the potential to break down bacterial biofilms. Bacteria have the ability to acquire resistance to phages, therefore phage therapy is often combined with antibiotics. The interaction of these agents with planktonic and biofilm-forming cells is highly variable due to differences in the rates of interaction between phages and the bacterium, as well as the mechanisms of action of the antibiotics.

The aim of this study is to evaluate the antimicrobial effect of bacteriophages and their interaction with antibiotics in vitro of selected multidrug-resistant and biofilm-forming bacteria and in the treatment of life-threatening infections.

The dissertation is organised as a collection of four consecutive peer-reviewed articles. The structure of the study consists of three parts.In the first part investigation of the outcomes of *S. aureus* colonisation and biofilm formation in peritoneal dialysis patients over a two-year period was performed. Phenotypic differences in biofilm formation between different isolates of S. aureus, from the same individual were assessed. Bacteriophage lytic effect in isolated cultures was detected, and phage adaptation procedure to overcome bacteriophage resistance was performed.

In the second part, the biofilm-forming capacity of uropathogenic *E. coli* isolates was investigated, the antibiotic and phage biofilm eradication capacity was determined. Bacteriophage adaptation was performed to overcome resistance and assess the lytic effect of adapted phages in planktonic and biofilm-forming cells.

In the third part, the clinical efficacy of bacteriophages in patients with complicated multidrug-resistant *P. aeruginosa* osteomyelitis and Left Ventricular Assist Device (LVAD) associated infection was evaluated. Patients received local and systemic phage therapy

supplemented with antibiotics and underwent wound revision. Clinical outcome and tolerability of therapy were analysed. This was preceded by bacteriophage selection, phage preparation and evaluation for clinical use. The effect of bacteriophages in biofilm models was also evaluated in the laboratory, the interaction of bacteriophages with the antibiotics used was determined and the development of phage resistance was assessed.

The results show that biofilm-forming strains are common in the patient population studied and that their biofilm-forming capacity can vary widely. The biofilm-forming phenotype of the same bacterium may differ even within the same individual. The antibacterial effect of bacteriophages in the isolated bacteria was of broad lytic efficiency. In phage resistant *S. aureus* and *E. coli* isolates adaptation procedure led to overcoming phage resistance. After bacteriophage adaptation in *E. coli* culture, a strong biofilm eradication effect of the adapted bacteriophage was also observed.

Treatment of patients with bacteriophages resulted in clinical recovery in both clinical cases. Complete eradication of *P. aeruginosa* was achieved in the patient with LVAD infection, whereas the patient with osteomyelitis had a relapse of infection after nine months in another bone segment, which was successfully treated with antibiotics.

Different bacteriophages were used to treat the patients and their lytic and biofilm eradication effects were studied in combination with antibiotics. The bacteriophage BFC1.10 showed an additive effect with ceftazidime-avibactam, which rendered the causative organism sensitive to the antibiotic used. In contrast, phages PNM and PT07 had a better biofilm eradication effect when used first and then switched to ceftazidime-avibactam. Bacteriophage resistance to phages PNM and PT07 in *P. aeruginosa* culture developed as early as 12 h after the start of the experiment in the biofilm model. The development of resistance was different using different strains of the bacterium.

The study shows that bacteriophages have a high potential to treat multidrug-resistant and biofilm-associated infections in both laboratory and human settings. Bacteriophage therapy can be complemented with antibiotics, but the interaction and sequence of administration of specific agents needs to be assessed as this has a significant impact on the efficacy of therapy. Although bacteriophage resistance is common in phage therapy, it can be overcome by using phage cocktails, an adaptation procedure or by combining phage therapy with antibiotics, even if the bacterium is moderately sensitive to the antibiotic. Further studies, especially clinical studies, are needed to evaluate phage therapy more precisely.

Keywords: phage therapy, multidrug resistance, biofilm, phage resistance, phage adaptation, peritoneal dialysis, urinary tract infection, osteomyelitis, LVAD infection.

Satura rādītājs

Anotācija 2

Abstract 4

Darbā izmantotie saīsinājumi 8

Ievads 12
- Darba mērķis 14
- Darba uzdevumi 14
- Darba hipotēze 14
- Darba novitāte 15
- Personīgais ieguldījums 15
- Ētiskie aspekti 15

1. Materiāli un metodes 16
   - 1.1. Pētījuma laiks, vieta un uzbūve 16
   - 1.2. Izmantotie materiāli 18
     - 1.2.1. Izmantotās baktēriju kultūras 18
     - 1.2.2. Izmantotie bakteriofāgi 18
   - 1.3. Izmantotās metodes 21
     - 1.3.1. *S. aureus* mikrobioloģiskā izmeklēšana 21
     - 1.3.2. Antibakteriālās jutības noteikšana 21
     - 1.3.3. Bakteriofāgu koncentrācijas jeb titra noteikšana 22
     - 1.3.4. Fāgu izsēšanas efektivitātes noteikšana, salīdzinot ar saimnieka vai references kultūru 24
     - 1.3.5. Bakteriofāgu koncentrācijas noteikšana pacienta asinīs 24
     - 1.3.6. Divslāņu agara punktu metode bakteriofāgu lītiskā efekta noteikšanai 24
     - 1.3.7. Bakteriofāgu pavairošana, izmantojot saimnieka vai references kultūru 25
     - 1.3.8. Bakteriofāgu adaptācija 26
     - 1.3.9. Baktēriju biofilmas veidošanas spējas noteikšana, izmantojot kristālvioletā metodi 27
     - 1.3.10. Biofilmas produkcijas optiskā blīvuma interpretācija 27
     - 1.3.11. Baktēriju augšanas inhibīcijas, minimālās inhibējošās koncentrācijas (MIC), minimālās biofilmas eradikācijas koncentrācijas (MBEC) un biofilmas profilaktiskās koncentrācijas noteikšana (BPC) biofilmu modeļos 28
     - 1.3.12. Baktēriju jutības izmaiņu un rezistences noteikšana pret bakteriofāgiem biofilmu modeļos 30
     - 1.3.13. Datu statistiskā analīze 31

2. Rezultāti 32
   - 2.1. Bakteriofāgu efekts *S. aureus* kultūrās peritoneālās dialīzes pacientiem 32
     - 2.1.1. Iekļauto pacientu raksturojums 32
     - 2.1.2. Klīniskie iznākumi *S. aureus* nēsātājiem un nenēsātājiem 32
     - 2.1.3. Izdalīto *S. aureus* antibakteriālā jutība un biofilmas veidošanas spēja 33
     - 2.1.4. *S. aureus* bakteriofāgu jutība un fāgu adaptācijas rezultāti 35
   - 2.2. Bakteriofāgu efekts uropatogēnās *E. coli* planktoniskās un biofilmu producējošās šūnās 38
     - 2.2.1. Iekļauto pacientu raksturojums 38
     - 2.2.2. *E. coli* biofilmas veidošanas spēja 38
     - 2.2.3. *E. coli* antibakteriālā un bakteriofāgu jutība 39

2.2.4. Ciprofloksacīna un amoksicilīna/klavulanāta efekts planktoniskās un biofilmu producējošās šūnās 41
2.2.5. Bakteriofāgu efekts planktoniskās un biofilmu producējošās šūnās 44
2.3. Bakteriofāgu eksperimentālais lietojums multirezistenta *Pseudomonas aeruginosa* augšstilba osteomielīta ārstēšanā 47
2.3.1. Pacienta gadījuma raksturojums 48
2.3.2. Fāgu terapijas izmantošana, pacienta tālākā ārstēšana, izmeklēšana un terapijas iznākums, ilgtermiņa rezultāts 49
2.3.3. *P. aeruginosa*, kura izolēta no pacienta ar osteomielītu, antibakteriāla un fāgu jutība 53
2.3.4. *P. aeruginosa*, kura izolēta no pacienta ar osteomielītu, biofilmas veidošanas spēja 55
2.3.5. Bakteriofāgu un ceftazidīma/avibaktāma efekts planktoniskās šūnās un biofilmas novēršanā *P. aeruginosa* PA (4) izolātā pacientam ar osteomielītu 55
2.4. Bakteriofāgu eksperimentālais lietojums multirezistenta *Pseudomonas aeurginosa* LVAD kabeļa infekcijas ārstēšanā 58
2.4.1. Pacienta gadījuma raksturojums, pacienta izmeklēšana 58
2.4.2. Fāgu terapijas izmantošana 61
2.4.3. Lietotās terapijas iznākums, ilgtermiņa rezultāts 62
2.4.4. *P. aeruginosa*, kura izolēta no pacienta ar LVAD kabeļa infekciju, antibakteriāla un fāgu jutība 65
2.4.5. *P. aeruginosa* PAP01 un CN573 biofilmas veidošanas spēja 66
2.4.6. Bakteriofāgu efekts planktoniskās un biofilmu veidojošās šūnās, bakteriofāgu rezistences attīstība CN573 kultūrā 67
2.4.7. Bakteriofāgu efekts planktoniskās un biofilmu veidojošās šūnās, bakteriofāgu rezistences attīstība PAP01 kultūrā, izmantojot biofilmas eradikācijas modeli 69
2.4.8. Bakteriofāgu efekts planktoniskās un biofilmu veidojošās šūnās, bakteriofāgu rezistences attīstība PAP01 kultūrā, izmantojot biofilmas profilakses modeli 71
2.4.9. Bakteriofāgu un antibiotiku mijiedarbība planktonisku šūnu līzē un biofilmas eradikācijā, izmantojot sākotnēji fāgus un tad antibiotikas 73
2.4.10. Bakteriofāgu jutības izmaiņas PAP01 kloniem, kuri izdalīti no MIC, MBEC un BPC mikroplašu modeļiem 74

3. Diskusija 76

Secinājumi 91

Publikāciju, ziņojumu un patentu saraksts par promocijas darba tēmu 92

Literatūras saraksts 94

Pateicības 101

Pielikumi 102
1. pielikums 103
2. pielikums 117
3. pielikums 119
4. pielikums 120
5. pielikums 133

6. pielikums 142
7. pielikums 143
8. pielikums 158
9. pielikums 161
10. pielikums 162

Darbā izmantotie saīsinājumi

Saīsinājums	Skaidrojums latviešu valodā	Skaidrojums angļu valodā
ADNP	autosomāli dominanta nieru policistoze	*Autosomal dominant polycystic kidney disease*
AMC	amoksicilīns/klavulanāts	*Amoxicillin/clavulanate*
AMK	amikacīns	*Amikacin*
AMP	ampicilīns	*Ampicillin*
BPC	biofilmas profilakses koncentrācija	*Biofilm prevention concentration*
CAZ	ceftazidīms	*Ceftazidime*
CAZ/AVI	ceftazidīms/avibaktāms	*Ceftazidime/avibactam*
CD	cukura diabēts	*Diabetes mellitus*
CIP	ciprofloksacīns	*Ciprofloxacin*
CL	pilna līze	*Confluent lysis*
CLI	klindamicīns	*Clindamycin*
CMV	citomegalovīruss	*Cytomegalovirus*
CST	kolistīns	*Colistin*
CTX	cefotaksīms	*Cefotaxime*
DN	diabētiska nefropātija	*Diabetic nephropathy*
EDTA	etilēndiamīntetraetiķskābe	*Ethylenediaminetetraacetic acid*
EOP	fāgu izsēšanas efektivitāte	*Efficiency of Plating*
ERY	eritromicīns	*Erythromycin*
ESBL	paplašināta spektra beta-laktamāze	*Extended-spectrum beta-lactamase*
EUCAST	Eiropas Antimikrobiālās jutības noteikšanas komiteja	*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*
FEP	cefepīms	*Cefepime*
FOF	fosfomicīns	*Fosfomycin*
FOX	cefoksitīns	*Cefoxitin*
GEN	gentamicīns	*Gentamicin*
GN	glomerulonefrīts	*Glomerulonephritis*
HIN	hronisks intersticiāls nefrīts	*Chronic interstitial nephritis*
HN	hipertensīva nefropātija	*Hypertensive nephropathy*
HNS	hroniska nieru slimība	*Chronic kidney disease*
HOPS	hroniska obstruktīva plaušu slimība	*Chronic obstructive pulmonary disease*
HSM	hroniska sirds mazspēja	*Congestive heart failure*

I	jutīgs paaugstinātā devā	*Susceptible, increased exposure*
IMP	imipenēms	*Imipenem*
IP	atsevišķi plaki	*Individual plaques*
KVV	baktēriju koloniju veidojošās vienības	*Colony-forming unit*
LB	Luria-Bertani barotne	*Luria-Bertani medium*
LVAD	kreisā kambara mehāniskās palīgcirkulācijas ierīce	*Left Ventricular Assist Device*
MBEC	minimālā biofilmas eradikācijas koncentrācija	*Minimum biofilm eradication concentration*
MDR	multirezistents	*Multidrug-resistant*
MEM	meropenēms	*Meropenem*
MIC	minimālā inhibējošā koncentrācija	*Minimum inhibitory concentration*
MHA	Millera-Hintona agars	*Mueller Hinton agar*
MRSA	meticilīna rezistentais *S. aureus*	*Methicillin-resistant S. aureus*
MSSA	meticilīna jutīgais *S. aureus*	*Methicillin-susceptible S. aureus*
N/A	nav attiecināms	*Not applicable*
N/D	netika noteikts	*Not determined*
NIT	nitrofurantoīns	*Nitrofurantoin*
NOR	norfloksacīns	*Norfloxacin*
OD	optiskais blīvums	*Optical density*
ODc	optiskā blīvuma robežvērtība	*Optical density cut-off value*
ODs	baktērijas izolāta optiskais blīvums	*Optical density of the bacterial isolate*
PD	peritoneālā dialīze	*Peritoneal dialysis*
PFU	fāgu plaku veidojošās vienības	*Plaque-forming unit*
PL	vāja līze	*Partial lysis*
PSKUS	Paula Stradiņa Klīniskā universitātes slimnīca	*Pauls Stradiņš Clinical University Hospital*
QAMH	Karalienes Astrīdas Militārās medicīnas slimnīca	*Queen Astrid Military Hospital*
R	rezistents	*Resistant*
RAKUS	Rīgas Austrumu klīniskā universitātes slimnīca	*Riga East Clinical University hospital*
RIF	rifampicīns	*Rifampicin*
RR	relatīvais risks	*Relative risk*
RSU	Rīgas Stradiņa universitāte	*Rīga Stradiņš University*
S	jutīgs	*Susceptible*

SCL	daļēja līze	*Semi-confluent lysis*
SD	standartnovirze	*Standard deviation*
SXT	sulfametoksazols/trimetoprims	*Sulfamethoxazole/trimethoprim*
TET	tetraciklīns	*Tetracycline*
TIC	tikarcilīns	*Ticarcillin*
TIM	tikarcilīns/klavulanāts	*Ticarcillin/clavulanate*
TOB	tobramicīns	*Tobramycin*
TSA	triptikāzes sojas agars	*Trypticase soy agar*
TSB	triptikāzes sojas buljons	*Trypticase soy broth*
TZP	piperacilīns/tazobaktāms	*Piperacillin/tazobactam*
UCI	urīnceļu infekcija	*Urinary tract infection*
VRE	vankomicīna rezistentais *Enterococcus faecium*	*Vancomycin-resistant Enterococcus faecium*

Ievads

Mūsdienās pieaug multirezistentu mikroorganismu infekciju izplatība, savukārt efektīvu antimikrobiālo līdzekļu kļūst arvien mazāk (1). Eiropas Slimību profilakses un kontroles centrs 2022. gadā ziņoja, ka antibakteriālā rezistence ierosina vidēji 35 tūkstošus nāves gadījumu Eiropas Savienībā un Eiropas Ekonomikas zonā, 1,27 miljonus nāves gadījumu pasaulē, tāpēc Eiropas Komisija 2022. gada jūlijā ierindoja antimikrobiālo rezistencei kā vienu no trim būtiskākajām veselības problēmām (2). Eiropas Savienībā ir izveidots rīcības plāns mikrobiālās rezistences mazināšanai, kurš ticis atkārtoti pārskatīts un pēdējo reizi pieņemts 2023. gada 1. jūnijā, tas paredz jaunu antimikrobiālo līdzekļu un alternatīvu metožu izstrādi multirezistentu mikroorganismu izplatības ierobežošanai (3). Viena no šādām metodēm ir bakteriofāgu terapija, kuras lietošana pēdējos gados tiek pētīta arvien vairāk, tomēr pētījumu skaits ir nepietiekams.

Bakteriofāgus pirmoreiz ir aprakstījis Viljams Tvorts 1915. gadā un Felikss d'Erells 1917. gadā. Neilgi pēc tam tos sāka izmantot infekciju ārstēšanā, bet līdz ar antibiotiku atklāšanu un plašu lietošanu tie tika aizmirsti, jo terapija ir salīdzinoši grūtāka un efektīvai lietošanai sarežģītāka nekā antibiotikām. Bakteriofāgi jeb fāgi ir baktēriju vīrusi, kas tiešā tulkojumā no grieķu valodas nozīmē "baktēriju ēdāji". Fāgiem piemīt unikāla spēja inficēt baktērijas un, veidojot baktērijā jeb saimniekšūnā jaunas vīrusu daļiņas, baktēriju lizēt. Šīs īpašības dēļ bakteriofāgi ir potenciāls līdzeklis cīņā pret patogēnajām baktērijām, īpaši pret tādām, kurām ir izveidojusies rezistence pret antibakteriālām vielām (4). Fāgiem galvenokārt ir raksturīgs saimniekorganisma sugas un celma specifiskums (5, 6), tādēļ ir būtiski identificēt bakteriālo ierosinātāju un piemeklēt tam atbilstošo bakteriofāgu veiksmīgai terapijai. Līdz šim par šāda veida pētījumiem Baltijas valstu reģionā nav publiski pieejamu datu. Saskatot perspektīvu šādā personalizētā terapijas pieejā pret multirezistentiem baktēriju celmiem un to ierosinātām infekcijām, atsevišķās valstīs tiek veidoti reģionāli fāgu centri, piemēram, Beļģijā, Polijā un Vācijā. Šobrīd vērojama fāgu terapijas atkārtota interese un ieviešana klīniskajā praksē.

Vieni no biežākajiem klīniski nozīmīgajiem mikroorganismiem ir *S. aurues*, *E. coli* un *P. aeruginosa.* Tie spēj ierosināt sadzīvē iegūtas un nozokomiālas infekcijas, urīnceļu infekcijas, endokardītu, peritonītu, brūču un citas infekcijas. *S. aureus* ir biežākais peritoneālās dialīzes (PD) katetra izejas atveres infekcijas ierosinātājs, kā arī ierosina PD asociētu peritonītu 6–14 % gadījumu (7–9). Tā ierosinātajam peritonītam ir lielāks recidīvu, katetra nomaiņas un nāves risks (10–12), kur būtisku lomu spēlē dažādie baktērijas virulences faktori, kā viens no tiem ir baktērijas spēja veidot biofilmas (13, 14). Atsevišķās klīniskās situācijās, piemēram,

urīnceļu infekcija (UCI), baktēriju veidotās biofilmas ir iesaistītas slimības attīstībā līdz pat 60 % gadījumu (15). Biežākais UCI ierosinātājs ir *E. coli* (16, 17), kuram ir plaša antibakteriālās rezistences un biofilmas veidošanas spēja. Antibiotiku jutīgu baktēriju veidotajās biofilmās to koncentrācija bieži ir subinhibējoša, tas rada nepietiekamu antibakteriālo efektu un var veicināt baktērijas veidot vēl izteiktāku biofilmu (18, 19). Savukārt hronisku brūču infekciju gadījumā baktēriju veidotas biofilmas nozīme ir vērojama līdz pat 78,2 % gadījumu (20). *P. aeruginosa* ir izaicinošs komplicētu brūču ierosinātājs ar augstu slimības recidīva iespēju. Tas ir skaidrojams ar baktērijas straujo un plašo antibakteriālās rezistences attīstību, multipliem virulences faktoriem un izteiktu biofilmas veidošanās spēju, kurai ir izšķiroša loma hroniskas bakteriālas kolonizācijas attīstībā (21, 22). Šādu infekciju ārstēšana ir kompleksa un ietver kā antibakteriālu terapiju, tā arī ķirurģisku ārstēšanu ar nekrektomiju (23).

Bakteriofāgiem piemīt spēja degradēt biofilmas struktūru, jo tie producē vielas, kuras spēj to noārdīt, piemēram, polisaharīdu depolimerāzes un lizīnus, pēc kuru iedarbības fāgi spēj sasniegt biofilmas dziļākos slāņus (24–26). Šīs īpašības padara fāgus par potenciāliem antibakteriāliem aģentiem, kurus var izmantot multirezistentu un biofilmu asociētu infekciju ierobežošanā. Pieejamie dati par bakteriofāgu efektu ar biofilmām asociētu infekciju ārstēšanā ir ar atšķirīgiem rezultātiem, kas saistāms ar multipliem mainīgajiem faktoriem, piemēram, dažādiem bakteriāliem ierosinātājiem un dažādiem bakteriofāgiem, kuri tikuši izmantoti ar antibiotikām vai bez tām.

Šobrīd nav pieejamu plašu klīnisko pētījumu datu par fāgu efektu klīniskās situācijās, tomēr pašreizējie dati pietiekami pārliecinoši parāda, ka fāgu terapija ir droša. Pietrūkst zinātniski pamatotu un sistēmisku datu par fāgu ievades veidiem, devām, farmakokinētiku un farmakodinamiku, fāgu rezistences attīstību un mijiedarbību ar antibiotikām (27, 28). Visbiežāk fāgu terapija tiek izmantota kombinācijā ar antibiotikām, lai panāktu vēlamo efektu. Tomēr ne vienmēr fāgu un antibiotiku mijiedarbība var būt viegli paredzama, tā var būt sinerģiska, aditīva, bet reizēm pat antagonistiska, ko galvenokārt nosaka fāga dzīves cikls baktērijā, antibiotikas darbības mehānisms un šo abu līdzekļu izmantošanas ilgums un secība (4, 29). Lai precīzi definētu šīs mijiedarbības, nepieciešami plaši un sistēmiski pētījumi, jo fāgu terapijā tiek izmantoti ļoti dažādi un savstarpēji atšķirīgi vīrusi.

Ne mazāk svarīgs ir bakteriofāgu rezistences attīstības process un tā nozīme bakteriofāgu terapijā. Zināms, ka pret fāgiem rezistentu baktēriju klonu veidošanās attīstība notiek pat ārstēšanas laikā, tāpēc fāgu terapijā parasti tiek izmantoti vairāki fāgus saturoši kokteiļi, kā arī terapija tiek papildināta ar antibiotikām (30, 31). Būtiska ir baktērijas ģenētiskā mainība fāgu terapijas laikā, vairāki pētījumi ir parādījuši, ka kombinācijā ar fāgu rezistenci

mainās baktērijas virulences faktoru ekspresija un var notikt esošo rezistences mehānismu izzušana pret antibiotikām, kas veicina infekcijas izārstēšanu (32, 33).

Šie apsvērumi padara bakteriofāgu terapiju par perspektīvu iespēju multirezistentu un ar biofilmu asociētu infekciju ārstēšanā, tomēr, iztrūkstot galvenokārt klīnisko pētījumu datiem, fāgu izmantošana saglabājas kā eksperimentāla terapija. Nepieciešami pētījumi vairākos bakteriofāgu lietošanas aspektos, īpaši klīniskā lietojumā. Ņemot vērā fāgu daudzveidību un to iespējamās dažādās kombinācijas ar antibiotikām, svarīgi izvērtēt fāgu iedarbību biofilmās ar antibiotikām un bez tām *in vitro*. Nepieciešams vērtēt ne tikai efektivitāti, bet arī bakteriālo mainību, piemēram, baktēriju rezistences attīstību pret fāgiem un baktēriju antibakteriālās rezistences mainību fāgu terapijas ietekmē.

Darba mērķis

Izvērtēt bakteriofāgu antibakteriālo efektu un mijiedarbību ar antibiotikām atsevišķu multirezistentu un biofilmu veidojošu infekciju *in vitro* modeļos un dzīvībai apdraudošo klīnisko situāciju ārstēšanā.

Darba uzdevumi

1. Izvērtēt *S. aureus* kolonizācijas biežumu peritoneālās dialīzes pacientiem, to biofilmas veidošanas spēju un bakteriofāgu darbības efektivitāti, analizēt kolonizācijas ietekmi uz PD iznākumiem.
2. Noteikt un izvērtēt bakteriofāgu un to kombināciju ar antibiotikām antibakteriālo un biofilmu eradikācijas efektu uropatogēno *E. coli* kultūrās.
3. Vērtēt bakteriofāgu rezistenci un tās attīstības biežumu izolētajās baktērijās, kā arī veikt bakteriofāgu adaptāciju rezistences pārvarēšanai.
4. Izvērtēt fāgu kokteiļa BFC 1.10 darbības efektu kombinācijā ar ceftazidīmu/avibaktāmu multirezistenta *P. aeruginosa* osteomielīta terapijā un laboratorijas apstākļos.
5. Izvērtēt bakteriofāgu PNM un PT07 un to kombināciju ar antibiotikām līdzīgo efektu multirezistentas *P. aeruginosa* LVAD infekcijas ārstēšanā un laboratorijas modeļos.

Darba hipotēze

Bakteriofāgiem un to kombinācijai ar antibiotikām ir multirezistentu baktēriju biofilmu eradikācijas spēja.

Darba novitāte

Pētnieciskajā darbā ir veikta padziļināta bakteriofāgu terapeitiskā efekta izvērtēšana biofilmu asociētu, kā arī multirezistentu infekciju ārstēšanā. Pētījumā ir izvērtēti dažādi faktori, kā fāgu rezistence, baktēriju spēja veidot biofilmas, fāgu mijiedarbība ar antibiotikām. Šie faktori nosaka fāgu lītiskā efekta atšķirības planktoniskajās šūnās un baktēriju biofilmās.

Vērtēta bakteriofāgu un to kombinācijas ar antibiotikām lītiskā darbība antibiotiku jutīgās un multirezistentās baktēriju kultūrās, kā arī izvērtēts biofilmu eradikācijas efekts, izmantojot dinamisku biofilmas modeli. Noteikta bakteriofāgu mijiedarbība ar antibiotikām, kā arī vērtēta to optimālā lietošanas secība.

Izvērtēta bakteriofāgu rezistences veidošanās, tās attīstības biežums biofilmu inhibīcijas modeļos. Izmantota bakteriofāgu adaptācija, lai pārvarētu bakteriofāgu rezistenci.

Šis ir viens no dažiem darbiem, kur fāgi lietoti pacientiem sarežģītās klīniskās situācijās, kā arī ir pirmais pētījums pasaulē (cik autoram zināms), kur to lietojums apsvērts peritoneālās dialīzes pacientiem. Līdz šim Latvijā nav publiski pieejamu datu par bakteriofāgu terapijas lietošanu un tās efekta vērtējumu biofilmu asociētās multirezistentās infekcijās.

Personīgais ieguldījums

Darba autors ir veicis zinātniskā un klīniskā darba plānošanu, organizēšanu, piedalījies visos pētījuma posmos. Ievācis bioloģisko materiālu (baktēriju kultūras), apkopojis pacienta datus, izstrādājis ārstēšanas plānu. Raksturojis baktērijas, nosakot antibakteriālo jutību, bakteriofāgu jutību, veicis bakteriofāgu adaptāciju un bakteriofāgu efekta izvērtēšanu biofilmu modeļos. Autors ir ieviesis un modificējis darbā izmantotās metodes, kuras nepieciešamas fāgu un biofilmu pētniecībā. Apkopojis, apstrādājis un analizējis, t. sk. izmantojot statistiskas metodes, iegūtos datus. Sagatavojis zinātniskās publikācijas un sarakstījis šo darbu.

Ētiskie aspekti

Pētījums tika veikts atbilstoši Helsinku deklarācijas ētiskajiem aspektiem. Pētījuma protokoli tika saskaņot un atzīti Rīgas Stradiņa universitātes Pētījumu ētikas komitejā, atzinuma Nr. 32/28.01.2016 un Nr. 8/08.09.2016. Pacientu ārstēšana, izmantojot bakteriofāgus, tika veikta atbilstoši Helsinku deklarācijas 37. paragrāfam, pirms pacientu iesaistes tika saņemta rakstiska informētā piekrišana.

1. Materiāli un metodes

1.1. Pētījuma laiks, vieta un uzbūve

Promocijas pētījums tika izstrādāts RSU Bioloģijas un mikrobioloģijas katedrā, kurā tika veikts darbs ar izolētajām baktēriju kultūrām un bakteriofāgiem. Pētījuma materiāls tika iegūts no pacientiem sadarbībā ar Paula Stradiņa Klīnisko universitātes slimnīcu (PSKUS). Rīgas Austrumu klīniskajā universitātes slimnīcā (RAKUS) un PSKUS tika veikta pētījuma eksperimentālā daļa, ārstējot pacientus ar bakteriofāgiem. Pētījuma aktivitātes norisinājās no 2016. gada septembra līdz 2022. gada decembrim. Pacientu klīnisko un demogrāfisko datu analīze tika veikta visiem pacientiem, no kuriem iegūtas un izmantotas baktēriju kultūras vai veikts baktēriju nēsāšanas skrīnings. Pētījuma uzbūve un katrā no tām izmantotās metodes atspoguļotas 1.1. attēlā. Promocijas pētījums ir veidots kā četru secīgu publikāciju kopa.

Pētījumu veidoja trīs sadaļas:

1. Biofilmas veidošanas noteikšana un bakteriofāgu efekta vērtējums *S. aureus* izolātos PD pacientiem. *S. aureus* nēsāšanas noteikšana PSKUS peritoneālās dialīzes pacientiem. Tika ņemtas pacientu iztriepes no deguna, cirkšņa un PD izejas atveres rajona. Veikta iegūtā materiāla kultivēšana, *S. aureus* antibakteriālās jutības noteikšana, biofilmas spējas noteikšana. Salīdzinātas viena pacienta vairāku *S. aureus* izolātu biofilmas veidošanās spējas. Noteikta bakteriofāgu iedarbība pret *S. aureus* izolātiem, veikta bakteriofāgu adaptācija, lai vērtētu līdzekļa efekta izmaiņas un pārvarētu fāgu rezistenci. Tika veikta arī prospektīva iekļautās pacientu kohortas novērošana divu gadu laika periodā pēc skrīninga veikšanas. To veica, lai vērtētu *S. aureus* nēsātāju un nenēsātāju klīniskos iznākumus, kā peritonītu biežums, nāve, PD katetra evakuācija un nieres transplantācija.
2. Bakteriofāgu efektivitātes izvērtēšana biofilmu veidojošos uropatogēnos *E. coli* izolātos. Iegūti *E. coli* izolāti no PSKUS ārstētiem pacientiem ar UCI. Pētījumā analizēta iegūto baktēriju antibakteriālā un fāgu jutība, biofilmas veidošanas spēja, antibiotiku un bakteriofāgu efekts baktēriju veidotajās biofilmās. Bakteriofāgu adaptācija tika veikta, lai pārvarētu fāgu rezistenci un vērtētu tās ietekmi uz bakteriofāgu līdzekļa efektu baktēriju biofilmā.
3. Eksperimentālās fāgu terapijas veikšana un izvērtēšana pacientiem ar multirezistentām *P. aeruginosa* infekcijām. Iekļauti divi pacienti, kuriem bija multirezistenta *P. aeruginosa* infekcija, vienam pacientam augšstilba osteomielīts, otram LVAD kabeļa infekcija. Tika veikta bakteriofāgu sagatavošana pacientu ārstēšanai, baktēriju jutības noteikšana pret antibakteriālām vielām un

izmantotajiem fāgiem. Noteikta *P. aeruginosa* izolātu biofilmas veidošanas spēja, bakteriofāgu efekts biofilmas eradikācijā, bakteriofāgu un antibiotiku mijiedarbība biofilmas eradikācija. Tika analizētas biofilmas veidošanās novēršanas iespējas. Pacientu ārstēšanas laikā tika noteikta bakteriofāgu izdale no pacienta brūces un to koncentrācija asinīs. Atsevišķi analizēta arī bakteriofāgu rezistences attīstība eksperimentālos biofilmu modeļos.

Biofilmas veidošanas noteikšana un bakteriofāgu efekta vērtējums *S. aureus* izolātos PD pacientiem	**Bakteriofāgu efekts biofilmu veidojošos uropatogēnos *E. coli* izolātos**	**Eksperimentālā fāgu terapija pacientiem ar multirezistentām *P. aeruginosa* infekcijām**
• *S. aureus* skrīnings visiem PD pacientiem PSKUS Nefroloģijas centrā • *S. aureus* izolēšana un identifikācija, izmantojot *VITEK-2* sistēmu • Antibakteriālās jutības noteikšana, izmantojot disku difūzijas metodi • Baktēriju biofilmas veidošanas spējas noteikšana ar kristālvioletā krāsojuma mikroplašu metodi • Bakteriofāgu jutības noteikšana ar divslāņu agara punktu metodi • Bakteriofāgu līdziskā efekta pastiprināšana vāji jutīgās vai rezistentās *S. aureus* kultūrās, izmantojot adaptācijas metodi • Klīnisko iznākumu (peritonīts, nāve, PD katetra evakuācija, nieres transplantācija) vērtēšana *S. aureus* nēsātāju un nenēsātāju grupās divu gadu periodā	• *E. coli* izolātu iegūšana no PSKUS ārstētiem pacientiem ar UCI • Antibakteriālās jutības noteikšana, izmantojot disku difūzijas metodi, paplašināta spektra beta-laktamāzes (ESBL, angliski *extended-spectrum beta-lactamase*) fenotipiskā apstiprināšana, izmantojot kombinēto disku metodi • Bakteriofāgu jutības noteikšana ar divslāņu agara punkta metodi • Bakteriofāgu līdziskā efekta pastiprināšana, veicot adaptāciju • Baktēriju biofilmas veidošanas spējas noteikšana ar kristālvioletā krāsojuma mikroplašu metodi • Minimālās inhibējošās koncentrācijas (MIC, angliski *minimum inhibitory concentration*) un minimālās biofilmas eradikācijas koncentrācijas (MBEC, angliski *minimum biofilm eradication concentration*) noteikšana fāgiem un antibiotikām, izmantojot Kalgarī biofilmas eradikācijas metodi	• Baktēriju izolēšana pacientiem ar multirezistentām *P. aeruginosa* infekcijām • Antibakteriālās jutības noteikšana, izmantojot disku difūzijas, E-testa un mikroplašu MIC testa metodes • Biofilmas veidošanas spējas noteikšana ar kristālvioletā krāsojuma mikroplašu metodi • Bakteriofāgu jutības noteikšana ar divslāņu agara punkta metodi, fāgu izsēšanas efektivitātes (EOP, angliski *efficiency of plating*) noteikšana, veicot bakteriofāgu titrēšanu • Bakteriofāgu sagatavošana un testēšana pirms pacientu ārstēšanas • Bakteriofāgu izdales noteikšana no pacienta brūces un asinīs pacientam, kurš saņēma intravenozu fāgu terapiju • MIC, MBEC, biofilmas profilakses koncentrācijas (BPC, angliski *biofilm prevention concentration*) noteikšana fāgiem +/- ar antibiotikām, izmantojot modificēto Kalgarī biofilmas eradikācijas metodi • Bakteriofāgu un antibiotiku mijiedarbības vērtēšana, izmantojot modificēto Kalgarī biofilmas eradikācijas metodi • Bakteriofāgu rezistences noteikšana MBEC un BPC modeļos • Pacientu klīnisko, radioloģisko datu analīze, izvērtēšana, pacientu novērošana

1.1. attēls. **Pētījuma uzbūve ar trim sadaļām, galvenās izmantotās metodes katrā sadaļā**

1.2. Izmantotie materiāli

1.2.1. Izmantotās baktēriju kultūras

Pētījumā tika izmantotas no pacientiem iegūtas *S. aureus*, *E. coli* un *P. aeruginosa* kultūras. *E. coli* un *P. aeruginosa* kultūras tika iegūtas no PSKUS vai RAKUS laboratorijām, kuras identificētas, izmantojot *VITEK-2* vai *MALDI-TOF MS* sistēmas. Savukārt *S. aureus* kultūru izolēšana tika veikta RSU Bioloģijas un mikrobioloģijas katedrā. Lai vērtētu un salīdzinātu pacientu baktēriju biofilmas veidošanas spēju, kā arī veiktu bakteriofāgu pavairošanu, tika izmantotas šādas references kultūras: *S. aureus* ATCC 4336 un ATCC 15923, *E. coli* ATCC 29522, *P. aeruginosa* ATCC 14209, ATCC 27853 un CN573.

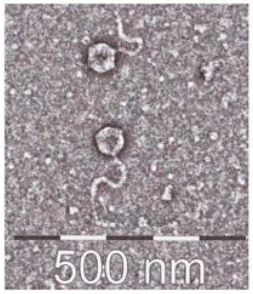
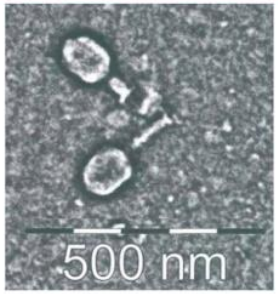
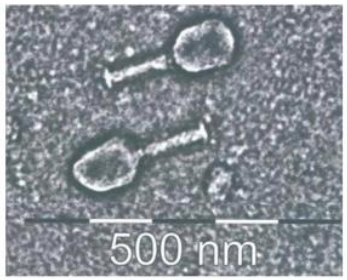
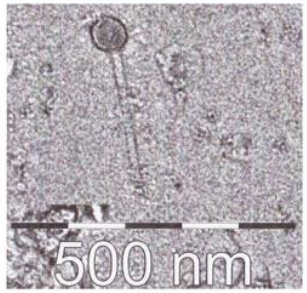
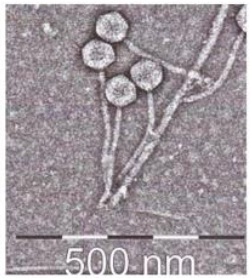
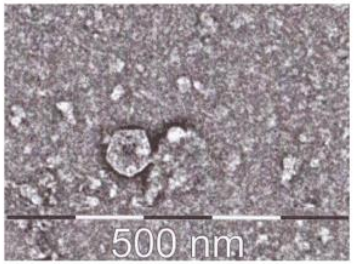
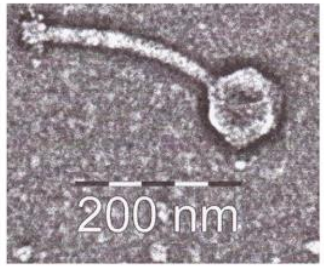
1.2.2. Izmantotie bakteriofāgi

S. aureus un *E. coli* eksperimentos tika izmantoti komerciāli lītisko bakteriofāgu preparāti, kuriem ir zināms sastāvs un darbības spektrs. Seši bakteriofāgu preparāti no *Eliava BioPreparations*, Tbilisi, Gruzijā:

1. Stafilokoku bakteriofāga preparāts, kura sastāvā ir *Myoviridae* dzimtas Sb-1 fāgs ar lītisko aktivitāti pret *S. aureus* (34, 35).
2. *Pyo* bakteriofāgu preparāts, kura sastāvā ir *Myoviridae* dzimtas fāgi Sb-1 un ISP ar lītisko aktivitāti pret *S. aureus*, un citi fāgi. Preparāta lītiskā aktivitāte ir vērsta pret *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Proteus* spp., *P. aeruginosa* un *E. coli* (36, 37).
3. *Ses* bakteriofāgu preparāts ar lītiskiem fāgiem, kuru aktivitāte ir vērsta pret *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. un enteropatogēno *E. coli* (38).
4. *Fersisi* bakteriofāgu preparāts, kura sastāvā ir *Myoviridae* dzimtas lītiskie fāgi B1 un JA1 ar aktivitāti pret *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. (39, 40).
5. *Enko* bakteriofāgu preparāts ar lītiskiem fāgiem, kuru aktivitāte ir vērsta pret *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Staphylococcus* spp. un enteropatogēno *E. coli* (38).
6. *Intesti* bakteriofāgu preparāts, kura sastāvā ir *Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae* dzimtas fāgi D1-D18, F1-F4 un Proteus lītiskie fāgi. Preparāta aktivitāte ir vērsta pret *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *E. coli*, *Proteus* spp., *Staphylococcus* spp., *P. aeruginosa* un *Enterococcus* spp. (37, 38).

Kā arī bakteriofāgu preparāts *Pyobacteriophag* no *Microgen*, Permas, Krievijā. Tā sastāvā ir *Myoviridae* dzimtas fāgs fRuSau02, *Podoviridae* dzimtas fāgs SCH1 un citi fāgi. Preparāta aktivitāte ir vērsta pret *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Proteus* spp., *Klebsiella* spp., *P. aeruginosa* un *E. coli*. Preparāts iepriekš ticis pētīts RSU

Bioloģijas un mikrobioloģijas katedrā sadarbībā ar Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centru, no tā izdalīti astoņi fāgi, kuriem doti unikāli nosaukumi. Izdalīto fāgu caurstarojošās elektronmikroskpijas attēli un to veidi skatāmi 1.2. attēlā.

			
V1 *E.coli* – 2 x 10^6 pfu/ml, *Siphoviridae* dzimta	**V2 *E.coli* - 5 x 10^7 pfu/ml, *Myoviridae* dzimta**	**V12 *E.coli* - 2 x 10^7 pfu/ml, *Myoviridae* dzimta**	**V3 *P.mirabilis.* 1 x 10^3 pfu/ml, *Siphoviridae* dzimta**
			
V6 *P.mirabilis.* 6 x 10^3 pfu/ml, *Siphoviridae* dzimta	**V4 *P.aeruginosa* 4 x 10^5 pfu/ml, *Podoviridae* dzimta**	**V11 *P.aeruginosa* 2 x 10^5 pfu/ml, *Myoviridae* dzimta**	**V9 *S.aureus* 1 x 10^6 pfu/ml, *Myoviridae* dzimta**

1.2. attēls. **Pētījumā izmantotā *Pyobacteriophag* preparātā konstatētie astoņi bakteriofāgi***

* Bakteriofāgus izdalīja RSU Bioloģijas un mikrobioloģijas katedras darbinieki K. Rācenis, L. Eglīte un J. Kroiča sadarbībā ar Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centra darbiniekiem Andri Dišleru un Veltu Osi-Klinklāvu. Attēlā redzami astoņi izdalītie bakteriofāgi, zem katra fāga attēla norādīts fāga kods, baktērija, uz kuras veikta fāga izdale, fāga sākotnējais titrs preparātā un tā dzimta.

Pacientu ārstēšanai un tālākiem pētījumiem ar *P. aeruginosa* fāgi tika iegūti no Karalienes Astrīdas Militārās slimnīcas Briselē, Beļģijā. Šie fāgi tiek ražoti atbilstoši drošības un kvalitātes standartiem bakteriofāgu terapijai, respektīvi, katram fāgam iepriekš ir veikta pilna genoma sekvencēšana, fāga līstiskā dzīves cikla noteikšana, toksīnu gēnu neesamības noteikšana, pēc ražošanas tiek pārbaudīta preparāta sterilitāte, endotoksīna līmenis un pH (41, 42). Šie fāgi iepriekš ir tikuši izmantoti pacientu ārstēšanā (43–45), pirms to lietošanas tiek veikta neatkarīga preparāta kvalitātes izvērtēšana Beļģijas veselības institūtā *Sciensano*.

Pacientam ar osteomielītu tika izmantots līstisko bakteriofāgu preparāts BFC 1.10, kura sastāvā ir *Myoviridae* dzimtas bakteriofāgs 14/1 un *Podoviridae* dzimtas bakteriofāgs PNM, abi ar aktivitāti pret *P. aeruginosa*. BFC 1.10 satur arī *Myoviridae* dzimtas bakteriofāgu ISP ar aktivitāti pret *S. aureus*. Pacientam ar LVAD kabeļa infekciju tika izmantots *Podoviridae* dzimtas bakteriofāgs PNM un *Myoviridae* bakteriofāgs PT07.

1.3. Izmantotās metodes

1.3.1. *S. aureus* mikrobioloģiskā izmeklēšana

Pacienta iztriepes tika ņemtas, izmantojot universālo transporta barotni *AMIES*. Paraugi tika nogādāti laboratorijā istabas temperatūrā 2 h laikā. Paraugus inkubēja triptikāzes sojas buljonā (TSB) 37 °C 16–18 h ilgi. Pēc inkubācijas paraugi tika pārsēti uz mannitola sāls agara, *Baird Parker* agara ar olas dzeltenumu un telurītu un inkubēti 37 °C 16–18 h ilgi. Pēc tam tika veikta koloniju mikroskopija pēc Grama metodes, veikti koagulāzes, katalāzes un lateksa aglutinācijas (*Oxoid*, Lielbritānija) testi. Baktēriju identifikācija tika veikta, izmantojot *VITEK- 2* (*bioMerieux,* Francija) sistēmu.

1.3.2. Antibakteriālās jutības noteikšana

Antibakteriālā jutība tika noteikta visām izmantotajām baktēriju kultūrām, to veica ar disku difūzijas metodi atbilstoši aktuālajam Eiropas Antimikrobiālās jutības noteikšanas komitejas (EUCAST, angliski *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) standartam. Pēc nakts ilgas tīrkultūras inkubācijas tika veidota baktēriju suspensija sterilā 0,9 % NaCl šķidumā, iegūstot šķiduma blīvumu 0,5 *McFarland* vienības, kas atbilst $0{,}5 \times 10^8$ KVV/ml. Ar sterilu vates kociņu baktērijas tika vienmērīgi izklātas uz Millera-Hintona agara. Aptuveni 3–5 minūtes vēlāk ar sterilu pinceti platē novietoti ar atbilstošajām antibiotikām piesūcināti diski. Tālāk plates tika inkubētas 16–18 h 35 °C. Pēc inkubācijas tika mērītas inhibīcijas zonas ap katru disku un rezultāts salīdzināts ar EUCAST standartu un izteikts kā rezistents, jutīgs vai jutīgs paaugstinātā koncentrācijā. Līdzīgi tika veikts

P. aeruginosa E-tests fosfomicīnam: uz baktēriju saturoša Millera-Hintona agara uzlikta ar dažādu fosfomicīna koncentrāciju piesūcināta strēmelīte. Plate inkubēta 16–18 h 35 °C, pēc tam nolasīts rezultāts un noteikta mazākā antibiotikas koncentrācija, kura spēj inhibēt baktērijas augšanu (1.3. attēls).

1.3. attēls. **Fosfomicīna MIC noteikšana, izmantojot E-testu *P. aeruginosa* kultūrā***

* Attēlā redzams *P. aeruginosa* fosfomicīna MIC līmenis 1,0 mg/L.
Attēla autori D. Rezevska, K. Rācenis.

P. aeruginosa MIC noteikšanai tika izmantota komerciāli pieejama *MICRONAUT-S Pseudomonas* MIC AST mikroplate (Merlin-Diagnostika, Vācija), kuras pamatā ir buljona atšķaidījuma metode. Baktēriju inokulums tika sagatavots tieši tāpat kā disku difūzijas metodē: pirms tā iepildīšanas platē tas atšķaidīts Millera-Hintona buljonā (*Oxoid*, Lielbritānija) 1:100, lai iegūtu baktēriju gala koncentrāciju $0{,}5 \times 10^6$ KVV/ml. Pēc tam 30 µl tika pārnesti katrā mikroplates bedrītē. Mikroplate inkubēta 18–24 h ilgi, pēc tam vizuāli vērtētas katras bedrītes krāsas izmaiņas un noteikta minimālā inhibējošā antibiotikas koncentrācija.

1.3.3. Bakteriofāgu koncentrācijas jeb titra noteikšana

Vīrusa veidoto baktēriju šūnu līzes zonas jeb plaku (negatīvās baktēriju kolonijas) metode tika izmantota bakteriofāgu koncentrācijas jeb titra noteikšanai. Tika izveidoti vairāki desmitkārši bakteriofāgu preparātu atšķaidījumi sterilā 0,9 % NaCl šķīdumā no 10^{-1} līdz 10^{-8} vai mazāk atkarībā no paredzamā fāgu titra. Iepriekš gatavotas atbilstošās baktēriju kultūru suspensijas, paņemtas 2–3 baktēriju kolonijas no iepriekš izsētas tīrkultūras uz atbilstošā agara, kolonijas inkubētas buljona barotnē (*E. coli* Luria-Bertani barotne (LB), *S. aureus* un

P. aeruginosa TSB) 35–37 °C 16–18 h ilgi. Tika paņemti 100 µl baktēriju suspensijas, kas sajaukti ar 50 µl iepriekš sagatavoto bakteriofāgu atšķaidījumu, tālāk pievienoti 4–5 ml iepriekš sašķidrināta 0,7 triptikāzes sojas agara (TSA) un viss viegli samaisīts un vienmērīgi izliets uz TSA Petrī platēm. Aptuveni 15 min. pēc plates virsējā slāņa nožūšanas tās liktas inkubēties ar vākiem uz leju 35 °C 16–18 h ilgi. Nākamajā dienā vērtēta katra plate un skaitīti plaki dažādās bakteriofāgu atšķaidījuma pakāpēs. Iegūtais rezultāts no platēm, kurās bija ne vairāk kā 100 plaki, tika izmantots bakteriofāgu titra noteikšanai (skatīt 1.4. attēlu), izmantojot 1.1. formulu, rezultāts izteikts PFU/ml. Lai nodrošinātu precīzākus rezultātus, katrs atšķaidījums tika noteikts vismaz divas reizes. Gala rezultāta aprēķināšanai izmantota vidējā viena atšķaidījuma vērtība.

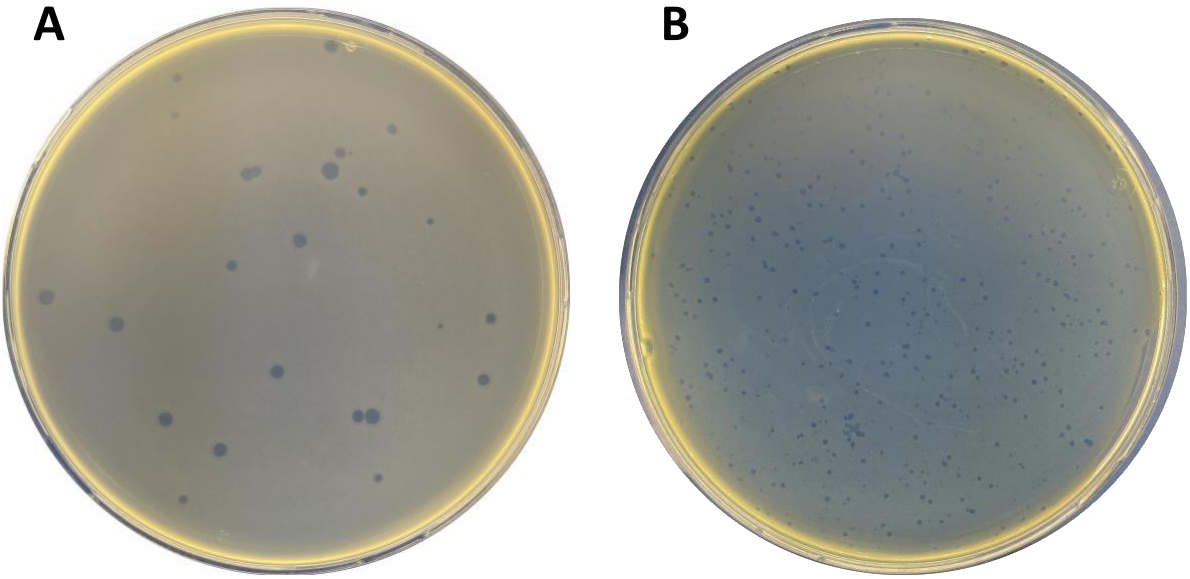
$$F_C = N / DP \times V \qquad (1.1.)$$

F_c – fāga koncentrācija PFU/ml

N – vīrusa plaku skaits Petrī platē

DP – atšķaidījuma jeb dilūcijas pakāpe, kura izmantota konkrētajā Petrī platē

V – izmantotais bakteriofāga atšķaidījuma tilpums



1.4. attēls. **Bakteriofāgu plaki baktēriju zālienā, attēlā redzami kā tumši punkti. A attēlā PT07 fāga plaki uz *P. aeruginosa* CN573 kultūras. B attēlā PNM fāga plaki uz PAP01 (no pacienta izolēta *P. aeruginosa*)***

* A attēlā plaku skaits platē 24, tāpēc to var izmantot fāgu titra noteikšanai. B platē plaku skaits ir lielāks par 100, tāpēc to titra noteikšanai neizmanto. Attēla autors K. Rācenis.

1.3.4. Fāgu izsēšanas efektivitātes noteikšana, salīdzinot ar saimnieka vai references kultūru

Bakteriofāgu efekts ir atšķirīgs vienā baktēriju sugā, reizēm ģintī vai dzimtā atkarībā no bakteriofāga specifiskuma. Lai vērtētu fāgu efektu pacientu kultūrās, nosaka fāga koncentrāciju saimnieka kultūrā (baktēriju kultūra, kura izmantota, lai fāgu iegūtu un pēc tam to pavairotu) vai references kultūrā (baktēriju kultūra, kurā vērojams labs fāga efekts un kura pieejama un tiek izmantota konkrētā laboratorijā), kā arī fāga koncentrāciju pacienta kultūrā. Tiek pieņemts, ka saimnieka vai references kultūrā fāga efektivitāte ir lielāka. Iegūtos rezultātus savstarpēji salīdzina, izmantojot 1.2. formulu. Lielāka efektivitāte ir vērojama gadījumā, ja EOP skaitlis konkrētajam baktērijas izolātam tuvāks 1.

$$EOP = F_{CT} / F_{CR} \quad (1.2.)$$

EOP – fāgu izsēšanas efektivitāte testējamā pacienta izolātā

F_{CT} – fāga koncentrācija pacienta izolātā

F_{CR} – fāga koncentrācija saimnieka baktērijā vai references celmā

1.3.5. Bakteriofāgu koncentrācijas noteikšana pacienta asinīs

Pētījuma eksperimentālajā sadaļā bakteriofāgu titru noteica pacienta asins paraugā. Koncentrācijas noteikšanas pamatā bija plaku metode, kura aprakstīt 1.3.4. metodē. Šajā gadījumā sākotnējais paraugs bija 4–5 ml pacienta asiņu, kuras paņemtas, izmantojot etilēndiamīntetraetiķskābes (EDTA) asins stobriņu. Paraugs tika ņemts 2 h pēc intravenozas bakteriofāgu ievades uzsākšanas. Fāgu koncentrācijas noteikšanai 100 µl baktēriju suspensijas tika sajaukti ar 50 µl asins parauga. Tālāk metode turpinājās, tāpat kā iepriekš aprakstītā plaku metode. Katrs eksperiments tika veikts vismaz divos atkārtojumos.

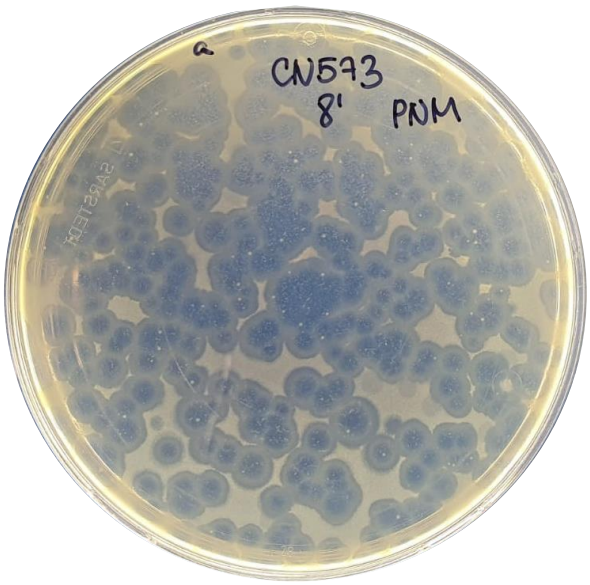
1.3.6. Divslāņu agara punktu metode bakteriofāgu līdiskā efekta noteikšanai

Bakteriofāgu līdiska efekta noteikšanai tika izmantota divslāņu agara punktu metode. Vispirms baktēriju tīrkultūras inkubētas buljona barotnē (*E. coli* LB, *S. aureus* un *P. aeruginosa* TSB) 35–37 °C 16–18 h ilgi. Tālāk 100 µl iegūtās baktēriju suspensijas sajaukti ar 4–5 ml iepriekš sašķidrinātu 0,7 % TSA un viegli samaisīti 15 ml stobriņā, kas pēc tam izlieta kā virskārta uz TSA Petrī plates. Pēc aptuveni 20 min. nogaidīšanas, līdz divslāņu agara virspusējā kārta sacietējusi, uz plates ar mikropipeti tika uznests 10 µl bakteriofāgu preparāta pilienu. Uz katras plates uzlikti līdz 7 dažādiem bakteriofāgu preparātiem. Savstarpējai rezultātu salīdzināšanai fāgu koncentrācijas vienādotas, tos atšķaidot atbilstošā buljonā vai fizioloģiskā

šķīdumā, *E. coli* testēšanai bakteriofāgu preparāta koncentrācija vienādota uz 10^6 PFU/ml, savukārt *S. aureus* un *P. aeruginosa* testēšanai izmantota bakteriofāgu koncentrācija 10^7 PFU/ml. Plates tika atstātas istabas temperatūrā aptuveni 30 min., lai pilieni varētu nožūt un iesūkties virspusējā agara kārtā. Pēc tam plates tika apgrieztas ar vākiem uz leju un inkubētas 35 °C 16–18 h ilgi. Fāgu rezultāti tika vērtēti un nolasīti vizuāli. *E. coli* un *S. aureus* līzes zonas vērtētas kā pilna līze (CL vai +++), daļēja līze (SCL vai ++), vāja līze vai atsevišķi plaki (PL/IP vai +), līzes zonas neesamība (R jeb −), skatīt 2.2. attēlu kā piemēru. *P. aeruginosa* līzes zonas vērtētas kā pilna līze (CL vai ++++), daļēja līze (SCL vai +++), vāja līze (PL vai ++), atsevišķi plaki (PL vai +), līzes zonas neesamība (R jeb −). Katras baktērijas jutība pret bakteriofāgiem tika noteikta vismaz divos atkārtojumos, lai pārliecinātos par rezultātu ticamību.

1.3.7. Bakteriofāgu pavairošana, izmantojot saimnieka vai references kultūru

Lielākai bakteriofāgu preparāta koncentrācijas iegūšanai tālākiem eksperimentiem atsevišķi fāgu preparāti ar nepietiekamu koncentrāciju tika pavairoti. Pavairošanai tika izmantoti *S. aureus* ATCC 4336, *E. coli* ATCC 29522 un *P. aeruginosa* ATCC 27853 un CN 573 celmi. Pavairošanas process notiek, izmantojot plates no fāgu titrēšanas, kurās redzams liels plaku skaits, ko vizuāli apzīmē kā sietiņam līdzīgu struktūru baktēriju zālienā (1.5. attēls).



1.5. attēls. **PNM bakteriofāgu plaki *P. aeruginosa* CN573 baktēriju zālienā, izteikti liels to skaits veidojot sietiņam līdzīgo struktūru**

Attēla autori D. Rezevska, K. Rācenis.

Petrī platē ielieti aptuveni 12 ml LB vai TSB barotnes, plates novietotas uz rotējošā maisītāja 50 rpm 1–2 h ilgi. Buljons un divkāršā agara augšējais slānis tika noņemts, izmantojot sterilu metāla špātelīti, un ievietots 15 ml plastmasas stobriņā. Baktēriju šūnu lizēšanai un

bakteriofāgu izdalei no tām paraugam pievienots hloroforms ($CHCl_3$), lai tā koncentrācija stobriņā būtu 2–3 %, paraugs samaisīts, izmanojot *Vortex* (*Biosan*, Latvija), un tika ievietots 1– 2 h inkubācijai 4 °C. Baktēriju struktūru atlieku noņemšanai paraugs centrifugēts 6000× *g* 15 min. ilgi 4 °C temperatūrā. Tālāk iegūtais preparāts tika filtrēts caur 0,2 µm izmēra filtru (*Filtropur S, Sarstedt*, Vācija), izmantojot sterilu 15 ml šļirci. Atkārtoti tika noteikts jauniegūtā fāga preparāta titrs, izmantojot plaku metodi. Ja fāga koncentrācija nebija pietiekama, tad iegūto preparātu atkārtoti filtrēja un sakoncentrēja, centrifugējot 4000× *g* 20 min. 4 °C temperatūrā *Amicon® Ultra-15* (*Merck Millipore*, Īrija) filtrā. Pēc centrifugēšanas preparātu no filtra aspirēja ar automatizēto mikropipeti un noteica fāgu koncentrāciju preparātā. Tālākiem eksperimentiem iegūtie preparāti tika atšķaidīti sterilā buljonā vai 0,9 % NaCl šķīdumā atkarībā no nepieciešamās fāgu koncentrācijas.

1.3.8. Bakteriofāgu adaptācija

Fāgu rezistences pārvarēšanai un/vai lītiskā efekta pastiprināšanai tika veikta bakteriofāgu adaptācija jeb bakteriofāgu apmācīšana, kuras rezultātā var pastiprināt bakteriofāgu lītisko spektru. Tika izmantota modificēta Apelmana metode (46). Adaptācijas procedūra sastāvēja no vairākiem cikliem, kuros darbības atkārtojās. Katram ciklam tika veidoti vairāki desmitkārši bakteriofāgu preparātu atšķaidījumi, no katra sagatavotā atšķaidījuma 0,5 ml tika pievienoti 4,5 ml LB buljona 15 ml stobriņā. Katrā stobriņā, izņemot pirmo atšķaidījumu 10^{-1}, tika pievienoti 50 µl svaigi saaudzētas baktērijas kultūras suspensijas, pret kuru veikta adaptācijas procedūra. Stobriņš bez baktērijām 10^{-1} tika izmantots kā negatīvā kontrole, bet stobriņš tikai ar baktērijām bez fāgiem izmantots kā pozitīvā kontrole. Visi sagatavotie stobriņi tika inkubēti 48 h 37 °C. Pēc inkubācijas perioda mērīts katra stobriņa optiskais blīvums 600 nm viļņu garumā. Stobriņš ar augstāko atšķaidījuma pakāpi, kura optiskais blīvums bija līdzvērtīgs negatīvās kontroles stobriņam, tika izmantots tālākai adaptācijas procedūrai. Stobriņā pievienots hloroforms, sasniedzot tā koncentrāciju paraugā 2– 3 %, paraugs inkubēts 2 h 4 °C. Pēc tam tika veikta stobriņa centrifugēšana 6000× *g* 15 min. ilgi 4 °C temperatūrā, lai nosēdinātu baktēriju atlieku struktūras. Ar automatizēto pipeti tika paņemta parauga šķidrā daļa un filtrēta ar šļirci caur 0,2 µm izmēra filtru. Iegūtais preparāts tika atkārtoti atšķaidīts un inkubēts, kā aprakstīts iepriekš, šādā veidā veicot parauga adaptēšanas nākamos ciklus. Pirms adaptētā fāga lītiskā efekta pārbaudes tas tika adaptēts vismaz trijos ciklos.

1.3.9. Baktēriju biofilmas veidošanas spējas noteikšana, izmantojot kristālvioletā metodi

Baktēriju spēja veidot biofilmu tika noteikta, izmantojot 96 bedrīšu mikroplati. Sākotnēji tika izdalīta baktēriju tīrkultūra pēc Golda metodes uz triptikāzes sojas agara, tad 3–5 morfoloģiski līdzīgas baktēriju kolonijas kultivēja šķidrā barotnē (*E. coli* LB buljonā, *P. aeruginosa* TSB, *S. aurues* TSB + 1 % glikozes) 37 °C *E. coli* un *S. aureus*, 35 °C *P. aeruginosa*, 16–18 stundas, sasniedzot baktēriju koncentrāciju 1–3 × 10^9 KVV/ml. Pēc kultivēšanas tika veidota baktēriju suspensija šķidrā buljona barotnē ar atšķaidījumu 1:100, iegūstot gala koncentrāciju 1–3 × 10^7 KVV/ml. Izmantojot multikanālu pipeti, kultūras tika pārnestas 96 bedrīšu platē, katrā bedrītē iepildot 200 µl iepriekš pagatavotās suspensijas. Vienai baktērijai tika izmantotas vismaz 8 bedrītes. Katrā mikroplatē tika iekļauta negatīvā kontrole – sterila atbilstošā kultivēšanas buljona barotne (vismaz 8 bedrītes). Biofilmu produkcijai mikroplates tika inkubētas 37 °C (*E. coli* un *S. aureus*) un 35 °C (*P. aeruginosa*) 2–48 stundas atbilstoši izvēlētajam mērķim. Pēc inkubācijas perioda mikroplatēs saaugušās planktoniskās šūnas tika nolietas, tad mikroplašu bedrītes skalotas ar multikanālu pipeti divas reizes ar 250 µl fizioloģiskā šķīduma. Pēc skalošanas veikta biofilmas krāsošana, katru bedrīti uzpildot ar 200 µl 0,1 % kristālvioletā šķīduma 15–20 minūtes ilgi. Tad tika atkārtota mikroplašu skalošana, uzpildot katru bedrīti ar 250 µl destilēta ūdens trīs reizes. Kā biofilmu atkrāsotājs tika izmantots 96 % etanola šķīdums, kurš tika uzpildīts (200 µl) un samaisīts ar multikanālu pipeti. Rezultāta izvērtēšanai tika mērīts krāsoto biofilmu optiskais blīvums, izmantojot *TECAN INFINITE F50* optiskā blīvuma mērītāju baktērijai atbilstošā viļņu garumā (*S. aureus* 570 nm, *P. aeruginosa* 600 nm, *E. coli* 620 nm. Par baktēriju augšanas robežvērtību tika izmantota OD vērtība, kura bija lielāka par 0,1. Visi eksperimenti tika veikti vismaz divos neatkarīgos atkārtojumos.

1.3.10. Biofilmas produkcijas optiskā blīvuma interpretācija

Biofilmas producēšana tika vērtēta kvantitatīvi, kā arī dažādās pakāpēs, salīdzinot ar negatīvo kontroli, tās definējis *Stepanovic* et al. (47). Baktēriju biofilmas veidošanās spējas rezultāts tika izvērtēts kā biofilmu neproducējošs, vāji, vidēji, izteikti producējošs baktēriju izolāts, ņemot vērā vidējo aprēķināto baktērijas izolāta optiskā blīvuma vērtību (ODs). ODc – optiskā blīvuma robežvērtība, kuru aprēķina kā vidējo visu mērījumu negatīvās kontroles vērtību vienā mikroplatē + 3 standarta deviācijas (SD) no negatīvās kontroles. Par nozīmīgu biofilmas producējošu celmu tiek uzskatīts tāds celms, kurš biofilmu producē vidēji vai izteikti (1.1. tabula).

1.1. tabula

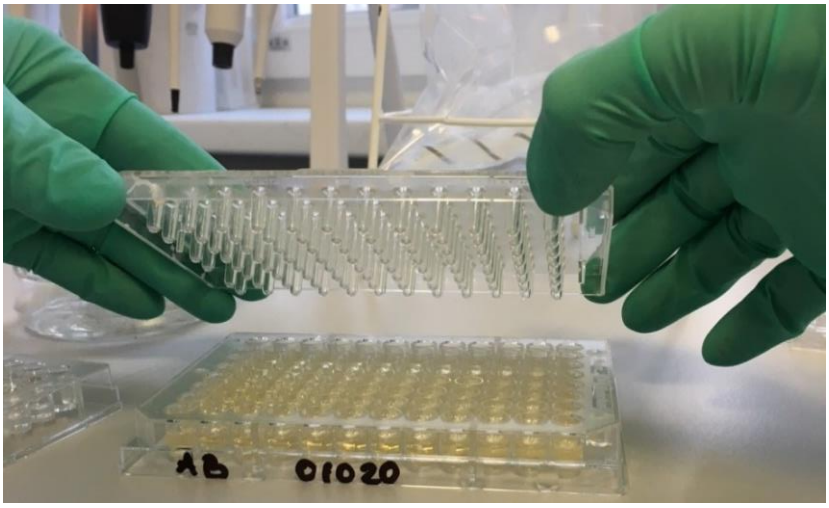
Biofilmas produkcijas pakāpes iedalījums

Vidējā kultūras OD vērtība	Biofilmas produkcijas pakāpe
ODs ≤ ODc	Nevēro
ODc < ODs ≤ 2 × ODc	Vāja
2 × ODc < ODs ≤ 4 × ODc	Vidēja jeb mērena
4 × ODc < ODs	Izteikta

[a] ODc, optiskā blīvuma robežvērtība; ODs, baktērijas izolāta optiskais blīvums.

1.3.11. Baktēriju augšanas inhibīcijas, minimālās inhibējošās koncentrācijas (MIC), minimālās biofilmas eradikācijas koncentrācijas (MBEC) un biofilmas profilaktiskās koncentrācijas noteikšana (BPC) biofilmu modeļos

Bakteriofāgu un antibiotiku iedarbības izvērtēšanai baktēriju biofilmās tika izmantota modificēta Kalgarī metode (48–50). Baktēriju kultūras inkubēja 16–18 h TSA platēs 35 °C *P. aeruginosa* un 37 °C *E. coli*. Pēc tam morfoloģiski identiskas kolonijas iejauca šķidrā buljonā (*P. aeruginosa* TSB un *E. coli* LB), lai sasniegtu 1,0 *McFarland* standartu, kas atbilst baktēriju koncentrācijai 3×10^8 KVV/ml, tālāk baktēriju saturošo buljonu atšķaidīja 1:30, lai sasniegtu inokulāta koncentrāciju $1{,}0 \times 10^7$ KVV/ml. Sterilā 96 bedrīšu plakandibena mikroplatē (*Nunc™ MicroWell™ 96-Well, Nunclon Delta-Treated, Flat-Bottom Microplate, Thermo Fisher Scientific*, Roskilde, Dānija) tika iepildīts sagatavotais baktēriju inokulāts, 150 µl katrā bedrītē. Pēc tam 96 bedrīšu mikroplate tika slēgta ar 96 bedrīšu vāciņu ar tapām (*Nunc™ Immuno TSP Lids*) un inkubēta 24 h rotējošā galda inkubatorā (*InforsTM HT Ecotron*, Bāzele, Šveice) 35 °C temperatūrā, 150 apgr./min. Mikroplates vāciņa tapas kalpo kā biofilmas veidošanās virsma (1.6. attēls).



1.6. attēls. **96 bedrīšu mikroplate un tās vāks ar 96 tapām, uz kuru virsmas veidojās baktēriju biofilmas**

Attēla autori L. Mukāne, K. Rācenis.

Pēc tam, kad biofilma bija izveidojusies, mikroplates vāciņš ar tapām tika pārlikts jaunā 96 bedrīšu mikroplatē, kur katrā iedobē bija 200 µl buljona (*P. aeruginosa* TSB un *E. coli* LB) ar vēlamo antibiotiku, fāgu vai to kombināciju. Pēc 12 h inkubācijas 35 °C temperatūrā *P. aeruginosa* un 24 h inkubācijas 37 °C temperatūrā *E. coli*, 150 apgr./min., tika mērīts mikroplates bedrīšu optiskais blīvums 600 vai 650 nm viļņa garumā. Iegūtā vērtība antibiotikām atspoguļoja MIC, bet fāgiem un antibiotiku–fāgu kombinācijai baktēriju augšanas inhibīciju, kuru rezultātos salīdzināšanas nolūkā arī apzīmē kā MIC.

Lai palielinātu fāgu iedarbību *P. aeruginosa*, vāks ar tapām tika pārvietots uz jaunu 96 bedrīšu mikroplati ar tādiem pašiem fāgiem un/vai antibiotikām un to koncentrācijām tālākai 12 h inkubācijai. Pēc kopumā 24 h inkubācijas ar fāgiem un/vai antibiotikām tika noteikta MIC un baktēriju augšanas inhibīcija.

Pēc tam vāku ar tapām ievietoja svaigā 96 bedrīšu mikroplatē, kur katrā bedrītē bija 200 µl sterila TSB (*P. auruginosa*) vai LB (*E. coli*). Lai noņemtu izveidojušos biofilmu no tapām, mikroplati ar vāku ievietoja sonifikatorā uz 25–30 min. 44 Hz frekvencē, izmantojot ultraskaņas vannu (modelis 08855-02, *Cole-Parmer*, *Vernon Hills*, IL, ASV). To izdzīvojošo baktēriju audzēšanai no destruētās biofilmas visiem slāņiem, kuras bija izturējušas antibiotiku un/vai fāgu iedarbību, mikroplate tika pārklāta ar sterilu vāciņu bez tapām un inkubēta 22 h stacionāri 35 °C temperatūrā. Pēc tam tika noteikta minimālā biofilmas eradikācijas koncentrācija (MBEC), mērot mikroplates optisko blīvumu 600–650 nm viļņa garumā.

Biofilmas profilakses koncentrāciju (BPC) noteica, vienlaikus inokulējot baktērijas, fāgus un antibiotikas attiecīgajās koncentrācijās. Baktēriju augšanas inhibīciju un MIC noteica pēc 12 h vai 22 h inkubācijas. Mikroplate, kura inkubēta 12 h, tika nomainīta pret jaunu mikroplati ar fāgiem un/vai antibiotikām un inkubēta vēl 12 h, un pēc 24 h inkubācijas atkal tika noteikta baktēriju augšanas inhibīcija un MIC. Mikroplati ar 96 bedrīšu vāku pārnesa uz svaigu 96 bedrīšu mikroplati, kura saturēja sterilu TSB. To ievietoja sonifikatorā iepriekš aprakstītajos apstākļos, pēc tam mikroplati inkubēja 22 h 35 °C temperatūrā stacionāri un mērīja optisko blīvumu 600–650 nm viļņu garumā BPC noteikšanai.

Starp visiem eksperimenta posmiem pēc inkubācijas 96 bedrīšu mikroplates vāciņu ar tapām skaloja 2 min. ilgi 0,9 % NaCl saturošā mikroplatē, kur katrā bedrītē bija 200 µl fizioloģiskā šķīduma, un pēc tam pārnesa uz nākamo 96 bedrīšu mikroplati. Visas eksperimentos izmantotās 96 bedrīšu mikroplates tika aizlīmētas ar *Parafilm*® (*Bemis Company, Inc, Neenah, WI,* ASV). Visus testus veica vismaz 10 atkārtojumos. Negatīvajai kontrolei tika izmantots sterils buljons, kura OD < 0,10. Pozitīvajai kontrolei tika izmantots buljons tikai ar baktērijām.

1.3.12. Baktēriju jutības izmaiņu un rezistences noteikšana pret bakteriofāgiem biofilmu modeļos

Lai pārbaudītu fāgu jutības izmaiņas, baktēriju kultūras no biofilmu modeļiem 96 bedrīšu mikroplatēs tika kultivētas Millera-Hintona agarā (MHA) ar 5 % aitas asinīm. Baktēriju kultivēšana no bedrītēm tika veikta pēc tam, kad bija beigusies 96 bedrīšu mikroplašu inkubācija un bija nolasīts mikroplates bedrīšu OD. No dažādām bakteriofāgu efekta izvērtēšanas mikroplašu bedrītēm (biofilmas eradikācijas modelī, biofilmas profilakses modelī) nejaušas izlases veidā tika ņemtas divdesmit divas baktēriju kultūras, kurās tika izmantots pacienta *P. aeruginosa* PAP01 izolāts. Kultūras tika ņemtas no bedrītēm, izmantojot sterilu 1 µl cilpiņu. Pēc tam tika veikta MHA inokulācija, izmantojot svītru metodi, un plates tika inkubētas 24 h 35 °C temperatūrā. Pēc tam trīs līdz četras kolonijas no MHA plates inokulēja TSB un inkubēja 16–18 h ilgi. Izaudzētajām baktērijām tika noteikta bakteriofāgu jutība, izmantojot divslāņu agara punktu metodi (skatīt 1.3.6. apakšnodaļu).

Robežvērtību fāgu rezistences noteikšanai aprēķināja, izmantojot pozitīvo kontroli (tikai baktērijas) atbilstoši 1.3. formulai:

$$OD_R = OD_{PC} - (3 \times SD_{PC}) \quad (1.3.)$$

OD_R – aprēķinātā robežvērtība, kura definē bakteriofāgu rezistences esamību
OD_{PC} – pozitīvās kontroles mērījumu vidējā optiskā blīvuma vērtība
SD_{PC} – pozitīvās kontroles mērījumu aprēķinātā standartdeviācija

Baktērijas klons ($OD_{bedrīte}$) tika uzskatīts par rezistentu pret bakteriofāgu, ja tās izmērītais optiskais blīvums bija lielāks vai vienāds ar aprēķināto rezistences robežvērtību (OD_R). Fāgu rezistences attīstība tika noteikta 12, 24 un 46 h pēc mikroplates inkubācijas, atbilstoši biofilmas eradikācijas vai biofilmas profilakses modelim. Lai atspoguļotu attiecību starp izmērīto vidējo optisko blīvumu izolāta klonam mikroplates bedrītē ($OD_{bedrīte}$) salīdzinājumā ar aprēķināto rezistences optiskā blīvuma robežvērtību (OD_R), tika izmantota 1.4. formula:

$$OD_{attiecība} = OD_{bedrīte} / OD_R \quad (1.4.)$$

$OD_{bedrīte}$ – izaudzētās baktērijas izolāta klona optiskā blīvuma vērtība
OD_R – aprēķinātā robežvērtība, kura definē bakteriofāgu rezistences esamību

Ja vērtība bija mazāka par 1, baktērijas netika uzskatītas par rezistentām, bet, ja vērtība bija lielāka vai vienāda ar 1, baktērijas tika uzskatītas par rezistentām pret fāgu.

1.3.13. Datu statistiskā analīze

Datu statistisko analīzi veica, izmantojot *Microsoft Excel 2016, IBM SPSS Statistics* 27. versijas, kā arī *Graph Pad Prsim* 9. versijas datorprogrammas.

Visiem kvantitatīvajiem mērījumiem tika aprēķināts un atspoguļots izlases vidējais aritmētiskais lielums un aprēķināta standartnovirze (SD) ar datu izkliedes diapazonu 95 %. Nepārtraukto datu normālsadalījumu vērtēja, izmantojot Šapiro-Vilka (*Shapiro-Wilk*) un Kolmogorova-Smirnova (*Kolmogorov-Smirnov*) testus. Parametrisko datu analīzei divu izlašu salīdzināšanai izmantoja t-testu, trīs vai vairāk izlašu salīdzināšanai *one way ANOVA* testu. Neparametrisko datu analīzei divu izlašu salīdzināšanai izmantoja Manna-Vitnija (*Mann-Whitney U*) testu, trīs vai vairāku izlašu salīdzināšanai Kruskola-Volisa (*Kruskal-Wallis*) testu. Noraidot nulles hipotēzi un konstatējot būtiskas atšķirības starp grupām, tika veikta vairāku pāru salīdzināšana, izmantojot *post-hoc* analīzi ar Tukeja (*Tukey*) testu. Rezultāti tika uzskatīti par statistiski ticamiem, ja p vērtība bija mazāka par 0,05.

Klīnisko iznākumu riska aprēķināšanai peritoneālās dialīzes pacientiem tika aprēķināts relatīvais risks (RR) ar 95 % ticamības intervālu.

2. Rezultāti

2.1. Bakteriofāgu efekts *S. aureus* kultūrās peritoneālās dialīzes pacientiem

Pētījuma daļa ir aprakstīta un publicēta Kārļa Rāceņa, Jutas Kroičas, Daces Rezevskas, Laura Avotiņa, Edgara Šķudīša, Annas Popovas, Ilzes Puides, Viktorijas Kuzemas un Aivara Pētersona publikācijā *S. aureus Colonization, Biofilm Production, and Phage Susceptibility in Peritoneal Dialysis Patients*. Antibiotics (Basel). 2020 Sep 7;9(9):582. doi: 10.3390/antibiotics9090582. Skatīt 1. pielikumā.

2.1.1. Iekļauto pacientu raksturojums

Septiņdesmit vienam peritoneālās dialīzes pacientam tika veikti skrīninga izmeklējumi *S. aureus* nēsāšanas noteikšanai. Pētījumā tika iekļauti septiņdesmit pacienti, jo vienam pacientam ar ievietotu PD katetru dialīze nebija uzsākta. No visiem pacientiem 51 % (n = 36) bija vīrieši, bet 49 % (n = 34) sievietes, vidējais vecums 59,96 gadi (SD 15,9).

Terminālas nieru slimības iemesli pētījuma grupā bija šādi: glomerulonefrīts (40 %, n = 28), diabētiska nefropātija (14,3 %, n = 10), hronisks intersticiāls nefrīts (20 %, n = 14), autosomāli dominanta nieru policistoze (ADNP) (10 %, n = 7), hipertensīva nefropātija (12,9 %, n = 9) un nezināms (2,9 %, n = 2). Detalizētus datus par visiem iekļautajiem pacientiem skatīt 2. pielikumā.

S. aureus nēsātāji bija 30 % pacientu (n = 21). No tiem 71,4 % nēsātāju bija vīrieši (n = 15) un 28,6 % sievietes (n = 6). Starp *S. aureus* nēsātājiem un nenēsātājiem statistiski ticamas atšķirības klīniskajos parametros netika novērotas, vērtējot blakusslimības, kā hroniska sirds mazspēja (HSM), vīrushepatīts, podagra, hroniska obstruktīva plaušu slimība (HOPS) (p > 0,05), atzīmējams, ka cukura diabēts nēsātāju grupā bija 28,6 % (n = 6), salīdzinot tikai 10,2 % nenēsātāju grupā (n = 5), (p = 0,05). Pirms pētījuma un pētījuma laikā neviens no pacientiem nelietoja lokālo antibakteriālo terapiju, kā mupirocīnu un hlorheksidīnu *S. aureus* dekolonizācijai. Vidējais pacientu novērošanas ilgums pētījumā nenēsātāju grupā bija 16,61 mēnesis, bet nēsātāju grupā – 13,95 mēneši.

2.1.2. Klīniskie iznākumi *S. aureus* nēsātājiem un nenēsātājiem

Pētījuma laikā tika konstatēti 32 peritonīti (78,1 %, n = 25 nenēsātāju grupā; 21,9 %, n = 7 nēsātāju grupā). Nēsātāju grupā peritonītu ierosināja šādi mikroorganismi: jaukta kultūra, meticilīna jutīgais *S. aureus* (MSSA, angliski *methicillin-susceptible S. aureus*) / *Pseudomonas spp.* (14,3 %, n = 1), *Streptococcus spp.* (42,9 %, n = 3) un neidentificētas baktērijas (42,9 %,

n = 3). Nenēsātāju grupā ierosinātāji bija *Streptococcus spp*. (36 %, n = 9), neidentificētas baktērijas (28 %, n = 7), MSSA (8 %, n = 2), kā arī pa vienam (4 %, n = 1) no *Aerococcus spp.* kopā ar *Pseudomonas spp.*, *Bacillus spp.*, *Candida spp.*, *Enterococcus spp.*, *Aeromonas spp.*, meticilīna jutīgais koagulāzi negatīvais *Staphylococcus* un meticilīna rezistentais koagulāzes negatīvais *Staphylococcus*.

Peritonītu kopējā sastopamība bija 0,35 epizodes vienā pacientgadā. Nenēsātāju grupā 0,37 epizodes vienā pacientgadā, bet nēsātāju grupā 0,29 epizodes vienā pacientgadā.

Nāve kā iznākums tika konstatēta 31,1 % (n = 8) nēsātāju un 16,3 % (n = 8) nenēsātāju. Tika konstatēta tendence, ka nāves risks nēsātāju grupā bija 2,33 reizes lielāks nekā nenēsātāju grupā, klīniskie rezultāti un to RR ir atspoguļoti 2.1. tabulā.

2.1. tabula

Divu gadu klīniskie iznākumi *S. aureus* nēsātājiem un nenēsātājiem

Klīniskie iznākumi	*S. aureus* nēsātāji	*S. aureus* nenēsātāji	Kopā	RR	CI 95 %
Pacientu skaits	30,0 % (n = 21)	70,0 % (n = 49)	100 % (n = 70)	–	–
Nāve	31,1 % (n = 8)	16,3 % (n = 8)	22,9 % (n = 16)	2,33	1,01–5,38
Transplantācija	28,6 % (n = 6)	18,4 % (n = 9)	21,4 % (n = 15)	1,56	0,63–3,81
PD katetra izņemšana	0 % (n = 0)	20,4 % (n = 10)	14,3 % (n = 10)	–	–
Peritonīts	19,1 % (n = 4)	34,7 % (n = 17)	30,0 % (n = 21)	0,55	0,21–1,44

2.1.3. Izdalīto *S. aureus* antibakteriālā jutība un biofilmas veidošanas spēja

Kopumā no 213 pacientu paraugiem tika izdalīti 34 *S. aureus* celmi, no kuriem visi bija jutīgi pret biežāk lietotajām antibiotikām (cefoksitīnu, ciprofloksacīnu, sulfametoksazolu/trimetoprimu, klindamicīnu, gentamicīnu, tetraciklīnu, rifampicīnu), divi celmi bija rezistenti pret eritromicīnu. Neviens no izolētajiem celmiem nebija rezistents pret meticilīnu. Visbiežāk *S. aureus* kolonizācija tika konstatēta deguna dobumā (53%, n = 18) (skatīt 2.2. tabulu). Visu pētījumā iekļauto *S. aureus* antibakteriālās jutības dati un biofilmu produkcijas vidējie OD lielumi ir atspoguļoti 3. pielikumā.

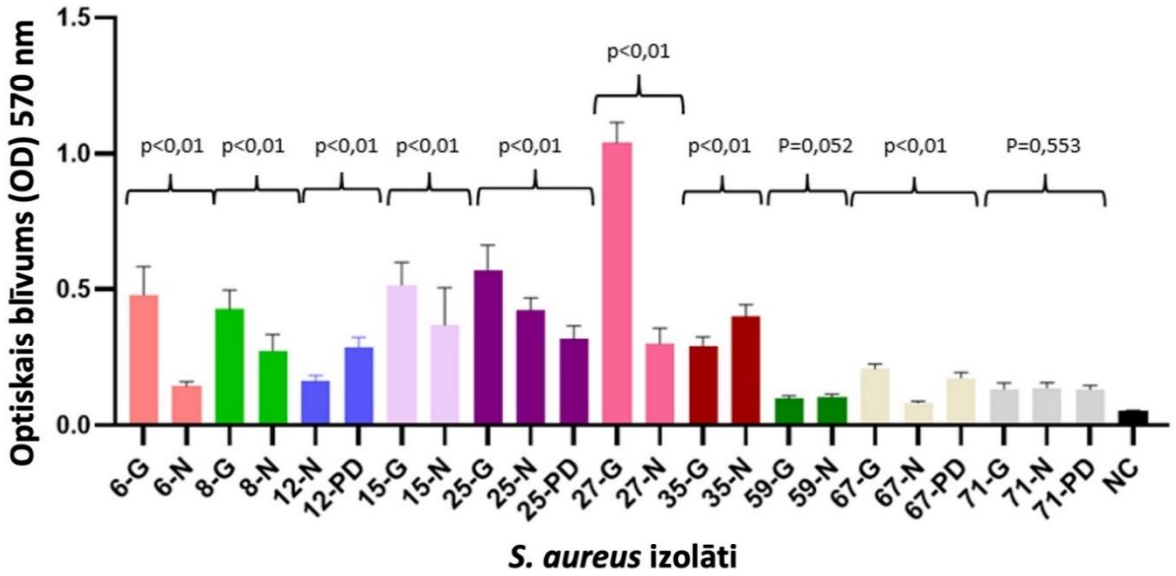
Visas izolētās *S. aureus* kultūras spēja veidot biofilmu. Visbiežāk *S. aureus* izolāti veidoja izteiktu biofilmu (21, 61,8 %), mērenas un vājas biofilmas veidošanas spēja tika novērota desmit (29,4 %) un trim (8,8 %) kultūrām. Piecpadsmit no divdesmit viena pacienta, kurš bija *S. aureus* nēsātājs, vismaz vienā no uzsējuma ņemšanas vietām vēroja kultūru, kura bija spēcīga biofilmas veidotāja (skatīt 2.2. tabulu). Salīdzinot biofilmas veidošanas spēju

S. aureus izolātiem, kuri izdalīti no viena pacienta dažādām uzsējuma ņemšanas vietām, vēroja, ka astoņiem no desmit pacientiem izdalīta *S. aureus* izolātu biofilmas veidošanās spēja būtiski atšķīrās ($p < 0,01$) (skatīt 2.1. attēlu).

2.2. tabula

***S. aureus* nēsāšanas vieta un to biofilmu veidošanās spēja**

Nr.	**Vecums**	**Dzimums**	**Terminālās nieru mazspējas cēlonis**	***S. aureus* nēsāšanas vieta, kods un biofilmas produkcijas pakāpe**		
				Deguns	**Cirksnis**	**PDK**
1	55	vīrietis	DN	1N izteikta	–	–
2	74	sieviete	GN	3N izteikta	–	–
3	76	vīrietis	HN	6N mērena	6G izteikta	–
4	83	vīrietis	HIN	8N izteikta	8G izteikta	–
5	68	sieviete	DN	12N mērena	–	12PD izteikta
6	36	vīrietis	HIN	14N mērena	–	–
7	64	vīrietis	HIN	15N izteikta	15G izteikta	–
8	42	sieviete	HIN	17N izteikta	–	–
9	60	vīrietis	ADNP	19N mērena	–	–
10	34	vīrietis	GN	25N izteikta	25G izteikta	25PD izteikta
11	77	sieviete	ADNP	–	–	26PD izteikta
12	68	vīrietis	GN	27N izteikta	27G izteikta	–
13	69	vīrietis	GN	35N izteikta	35G izteikta	–
14	68	vīrietis	DN	36N mērena	–	–
15	69	vīrietis	GN	–	47G izteikta	–
16	58	vīrietis	HN	–	48N izteikta	–
17	65	vīrietis	DN	58N izteikta	–	–
18	81	vīrietis	HIN	59N vāja	59G vāja	–
19	26	sieviete	GN	67N vāja	67G mērena	67PD mērena
20	47	vīrietis	GN	70N izteikta	–	–
21	49	vīrietis	DN	71N mērena	71G mērena	71PD mērena
Kopējais *S. aureus* izolātu skaits, n (%)				18 (53 %)	11 (32 %)	5 (15 %)
Biofilmas produkcijas pakāpe, n		Vāja		2	1	–
		Mērena		6	2	2
		Izteikta		10	8	3



2.1. attēls. **23 *S. aureus* izolātu biofilmas veidošanās spēja 96 bedrīšu mikroplatēs***

* Stabiņi atspoguļo katra izolāta vidējo OD vērtību (mērīta 570 nm), NC atspoguļo negatīvās kontroles jeb tikai buljona OD vidējo vērtību.

2.1.4. *S. aureus* bakteriofāgu jutība un fāgu adaptācijas rezultāti

No visiem septiņiem bakteriofāgu kokteiļiem stafilokoku bakteriofāgam (*Eliava*) sākotnējais titrs bija 10^4 PFU/ml, bet *Pyo*, *Enko*, *Intesti* bakteriofāgiem (*Eliava*) un *Pjobakteriopfag* (*Microgen*), izmantojot *S. aureus* ATCC 4336, titrs bija 10^5 PFU/ml. Tikai *Ses* un *Fersisi* bakteriofāgiem (*Eliava*) oriģinālais titrs, izmantojot *S. aureus* ATCC 4336, bija 10^6 PFU/ml.

Pēc bakteriofāgu kokteiļu pavairošanas, izmantojot *S. aureus* ATCC 4336, visiem fāgu preparātiem, izņemot vienu, tika sasniegta koncentrācija 10^9 PFU/ml, proti, *Pyo*, *Ses*, *Fersisi*, *Intesti* un *Pyobacteriophag* kokteiļiem. Savukārt stafilokoku bakteriofāgam (*Eliava*) titrs pieauga līdz 10^7 PFU/ml. Pirms fāgu līdzskās aktivitātes noteikšanas pret *S. aureus* izolātiem visi fāgu titri tika vienādoti, tos atšķaidot līdz 10^7 PFU/ml.

Bakteriofāgu līdzskais efekts ir atspoguļotos 2.3. tabulā. Izmantojot 34 *S. aureus* izolātus, tika novērots pozitīvs līdzskais efekts visiem bakteriofāgiem, izņemot stafilokoku (*Eliava*) bakteriofāgu. Pret to bija rezistenti deviņi (26 %) no 34 *S. aureus* izolātiem, kā arī vāju līdzsko efektu ar atsevišķiem plakiem vēroja diviem izolātiem. Tāpēc bakteriofāgu adaptācija tika veikta, izmantojot stafilokoku (*Eliava*) bakteriofāgu un rezistentos vai ar vāju līdzsko efektu esošos *S. aureus* izolātus (skatīt 2.4. tabulu).

2.3. tabula

Bakteriofāgu līdiskais efekts *S. aureus* izolātos

***S. aureus* izolātu kodi**	**Bakteriofāgu preparāti**							
	Stafilokoku fāgs (*Eliava*)		***Pyo***	***Ses***	***Fersisi***	***Enko***	***Intesti***	***Pyobac-teriophag***
	$1{,}2 \times 10^7$							
	Pirms adaptā-cijas	**Pēc adaptā-cijas**	**$3{,}4 \times 10^7$**	**$4{,}0 \times 10^7$**	**$2{,}4 \times 10^7$**	**$1{,}4 \times 10^7$**	**$2{,}0 \times 10^7$**	**$2{,}0 \times 10^7$**
1N	SCL	–	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL
3N	SCL	–	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL
6N	R [a]	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL
6G	R [a]	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL
8N	SCL	–	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL
8G	SCL	–	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL
12N	IP [a]	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL	IP
12PD	R [a]	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL
14N	SCL	–	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL
15N	R [a]	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL
15G	R [a]	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL
17N	R [a]	SCL	IP	SCL	SCL	SCL	SCL	IP
19N	R [a]	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL	IP
25N	SCL	–	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL
25PD	SCL	–	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL
25G	SCL	–	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL
26PD	SCL	–	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL
27N	SCL	–	SCL	IP	SCL	IP	SCL	SCL
27G	SCL	–	CL	SCL	SCL	CL	SCL	SCL
35N	IP [a]	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL
35G	SCL	–	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL
36N	SCL	–	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL
47G	CL	–	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL
48G	CL	–	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL
58N	SCL	–	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL
59G	CL	–	SCL	IP	SCL	SCL	SCL	SCL
59N	CL	–	CL	SCL	IP	SCL	SCL	SCL
67G	R [a]	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL
67N	R [a]	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL
67PD	SCL	–	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL
70N	SCL	–	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL
71PD	SCL	–	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL
71G	SCL	–	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL
71N	SCL	–	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL

[a] *S. aureus* izolāti, kuriem tika veikta adaptācija, izmantojot stafilokoku bakteriofāgu (*Eliava*); CL (+++), pilna līze; SCL (++), daļēja līze; IP vai PL (+), individuāli plaki vai vāja līze; R (−), rezistence vai līzes neesamība.

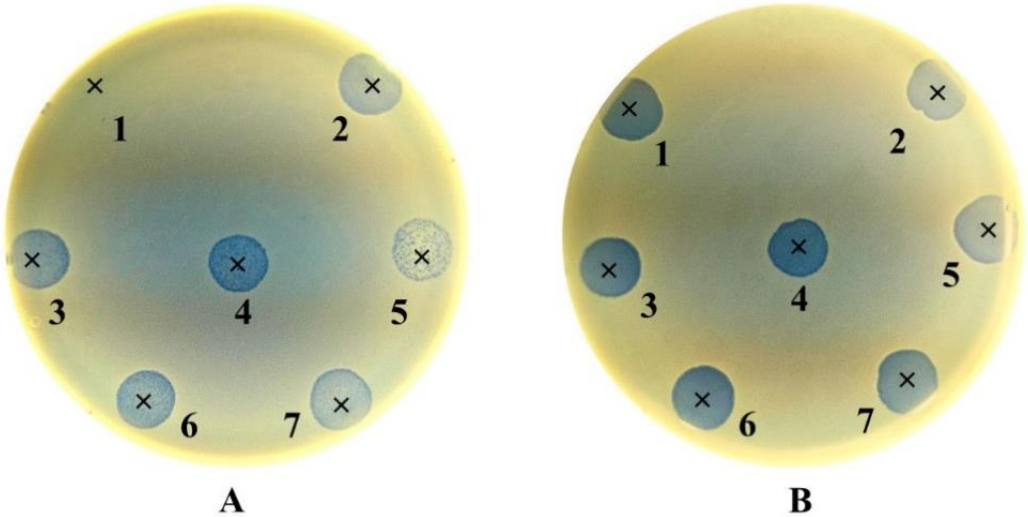
2.4. tabula

Bakteriofāgu lītiskais spektrs *S. aureus* izolātos

Fāgu lītiskā aktivitāte	**Stafilokoku (*Eliava*) fāgs**		***Pyo*, n (%)**	***Ses*, n (%)**	***Fersisi*, n (%)**	***Enko*, n (%)**	***Intesti*, n (%)**	***Pyobac-teriophag*, n (%)**
	Pirms adaptācijas, n (%)	**Pēc adaptācijas, n (%)**						
CL (+++)	4 (12)	0 (0)	2 (6)	0 (0)	0 (0)	1 (3)	0 (0)	0 (0)
SCL (++)	19 (56)	11 (100)	31 (91)	32 (94)	33 (97)	32 (94)	34 (100)	31 (91)
IP vai PL (+)	2 (6)	0 (0)	1 (3)	2 (6)	1 (3)	1 (3)	0 (0)	3 (9)
R (−)	9 (26)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Fāgu adaptācijai izmantoja stafilokoku bakteriofāgu (*Eliava*) pret 11 *S. aureus* izolātiem, kuri uzrādīja rezistenci vai vāju lītisko efektu (9 ar rezistenci un 2 ar atsevišķiem plakiem). Visos gadījumos adaptācijas procedūras rezultātā tika pārvarēta baktēriju rezistence vai tika pastiprināts fāgu lītiskais efekts. Visiem 11 baktēriju izolātiem (100 %) pēc adaptācijas tika novērota daļēja līze (++) (skatīt 2.4. tabulu).

Adaptācijas vizuālā apstiprinājuma rezultāti, izmantojot *S. aureus* ATCC 15 923 kultūru ar septiņiem bakteriofāgu kokteiļiem, ir atspoguļoti 2.2. attēlā. Iegūtie rezultāti liecina, ka adaptācijas procedūras rezultātā tika pārvarēta bakteriofāgu rezistence vai lītiskais efekts pastiprinājās, norādot uz fāga virulences pieaugumu.



2.2. attēls. **Septiņu bakteriofāgu preparātu lītiskais efekts pirms un pēc adaptācijas procedūras *S. aureus* ATCC 15923 references celmā***

* (1) Stafilokoku bakteriofāgs (*Eliava*); (2) *Pyo* (*Eliava*); (3) *Ses* (*Eliava*); (4) *Fersisi* (*Eliava*); (5) *Enko* (*Eliava*); (6) *Intesti* (*Eliava*); (7) *Pyobacteriophag* (*Microgen*). **(A)** Lītiskais efekts pirms adaptācijas. (1) R (−), rezistence vai līzes neesamība; (2–4) SCL (++), daļēja līze; (5) IP (+), atsevišķi plaki; (6, 7) SCL (++), daļēja līze. **(B)** Lītiskais efekts pēc adaptācijas. (1) CL (+++), pilna līze; (2) SCL (++), daļēja līze; (3, 4) CL (+++), pilna līze; (5) SCL (++), daļēja līze; (6, 7) CL (+++), pilna līze. Attēla autori D. Rezevska, K. Rācenis.

2.2. Bakteriofāgu efekts uropatogēnās *E. coli* planktoniskās un biofilmu producējošās šūnās

Pētījuma daļa ir aprakstīta un publicēta Laimas Mukānes, Kārļa Rāceņa, Daces Rezevskas, Aivara Pētersona un Jutas Kroičas publikācijā *Anti-Biofilm Effect of Bacteriophages and Antibiotics against Uropathogenic Escherichia coli.* Antibiotics (Basel). 2022 Nov 26;11(12):1706. doi: 10.3390/antibiotics11121706. Skatīt 4. pielikumā.

2.2.1. Iekļauto pacientu raksturojums

Pētījumā tika iekļauti seši *E. coli* izolāti, kuri tika iegūti no pacientiem ar dažāda veida UCI. Piecas pacientes bija sievietes, bet viens pacients bija vīrietis. Pacientus raksturojošie dati ir atspoguļoti 2.5. tabulā.

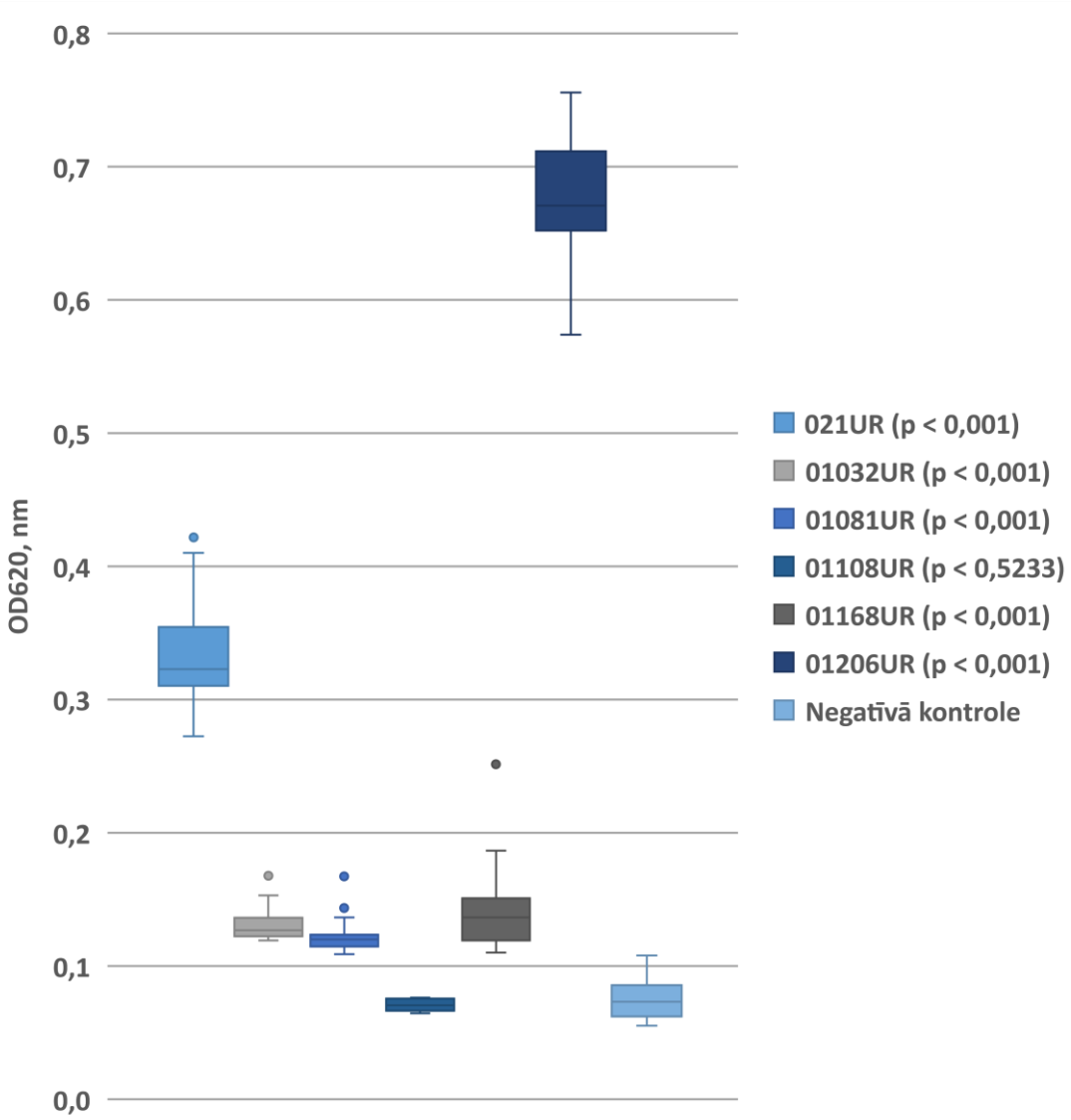
2.5. tabula

Izdalīto *E. coli* kultūru pacientu raksturojums

Nr.	Izolāta kods	Vecums	Dzimums	UCI veids	Blakusslimības
1	021ur	21	Sieviete	Pielonefrīts	Nav
2	01032ur	66	Vīrietis	Pielonefrīts	Cukura diabēts; HNS IIIB; nierakmeņu slimība; primāra arteriāla hipertensija; koronāro artēriju slimība; HSM
3	0108ur	30	Sieviete	Asimptomātiska bakteriūrija	Nieres transplantācija 2013; HNS V; FSGS; hemodialīze; renāla anēmija; sekundāra hipertensija
4	01108ur	74	Sieviete	Cistīts	Koronāro artēriju slimība; primāra arteriāla hipertensija; osteoartrīts; hipotireoze; HSM
5	01168ur	49	Sieviete	Cistīts	Nieres transplantācija 2016; akūts CMV hepatīts; sekundāra hipertensija; multiplā skleroze
6	01206ur	57	Sieviete	Recidivējošs cistīts	Nieres transplantācija 2008; HNS IIIB; recidivējoša UCI; sekundāra hipertensija

2.2.2. *E. coli* biofilmas veidošanas spēja

Pieci *E. coli* izolāti bija būtiski biofilmas producētāji, tos salīdzinot pret negatīvo kontroli ($p < 0,001$) (skatīt 2.3. attēlu). Divi izolāti 021ur (mērens biofilmas veidotājs) un 01206ur (izteikts biofilmas veidotājs) uzrādīja visspēcīgāko biofilmas veidošanas spēju, tāpēc tie tika izmantoti tālākai MIC un MBEC testēšanai ar bakteriofāgiem. Pārējie izolāti (01032ur, 01081ur, 01168ur) bija vāji biofilmas veidotāji, savukārt 01108ur izolāts biofilmu neveidoja.



2.3. attēls. ***E. coli* biofilmu veidošanas spēja 96 bedrīšu mikroplatēs**

2.2.3. *E. coli* antibakteriālā un bakteriofāgu jutība

Izolētajām *E. coli* kultūrām tika vērota atšķirīga jutība pret antibakteriālām vielām (skatīt 2.6. tabulu). No sešiem baktēriju celmiem 01081UR un 01108UR bija jutīgi pret visiem pārbaudītajiem antibakteriālajiem līdzekļiem, 01032UR bija ar visplašāko antibakteriālo rezistenci, tas bija rezistents pret sešiem antibakteriālajiem līdzekļiem un bija ESBL producējošs, 021UR un 01206UR bija rezistenti pret trim antibakteriālajiem līdzekļiem, 01168UR bija rezistents pret diviem antibakteriālajiem līdzekļiem.

Bakteriofāgu kokteiļa *Ses* sākotnējais titrs bija 4×10^5 PFU/ml, *Intesti* 7×10^5 PFU/ml un *Pyobacteriophag* 3×10^6 PFU/ml, titru nosakot *E. coli* ATCC 29522 references celmā. Pēc fāgu kokteiļa pavairošanas uz tā paša references celma titrs *Ses*, *Intesti* un *Pyobacteriophag* pieauga, attiecīgi līdz 4×10^6, 1×10^8 un 4×10^6 PFU/ml. Dati par baktēriju celmu jutību pret fāgiem ir apkopoti 2.6. tabulā.

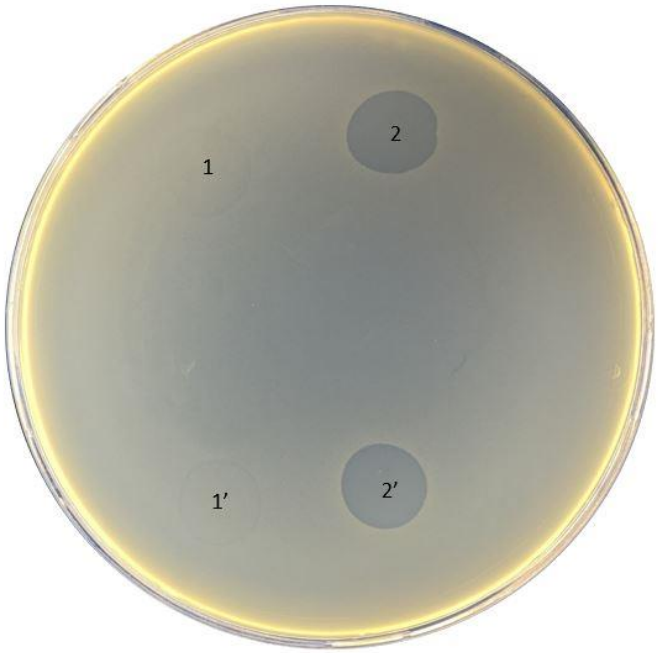
E. coli izolāts 021UR bija visjutīgākais pret visiem fāgu kokteiļiem, uzrādot daļēju līzi, izmantojot *Ses* un *Pyobacteriophag*, un pilnu līzi, izmantojot *Intesti* fāgu kokteili. Vismazākā fāgu preparātu jutība tika novērota 01108UR un 01206UR izolātiem. 01108UR bija rezistents pret *Intesti* un *Pyobacteriophag* un vāji jutīgs pret *Ses* fāgu kokteiļiem. Izolāts 01206UR bija rezistents pret *Ses* un *Intesti* fāgu kokteiļiem un vāji jutīgs pret *Pyobacteriophag*. Lai uzlabotu *Pyobacteriophag* preparāta līitisko efektivitāti 01206UR izolātā, tika veikta fāgu adaptācija, jo šis celms tika izvēlēts tālākai fāgu un biofilmu mijiedarbības testēšanai. Pēc *Pyobacteriophag* adaptācijas tā titrs palielinājās līdz 7×10^7 PFU/ml. Lai veiktu fāgu jutības izvērtēšanu, tā titrs tika pielīdzināts pārējiem testējamiem fāgu preparātiem, respektīvi, 10^6 PFU/ml. Pēc adaptācijas tika novērtēta *Pyobacteriophag* efekta uzlabošanās 01206UR, līitiskais efekts no vāja (+) pieauga līdz pilnai līzei (+ + +) (skatīt 2.6. tabulu un 2.4. attēlu).

2.6. tabula

***E. coli* antibakteriālā un fāgu jutība**

Antibiotikas, fāgs	**021UR**	**01032UR**	**01081UR**	**01108UR**	**01168UR**	**01206UR**
AMP	R	R	S	S	R	R
AMC	R	R	S	S	S	S
TZP	S	I	S	S	S	S
CTX	S	R	S	S	S	S
CAZ	S	R	S	S	S	S
IMP	S	S	S	S	S	S
MEM	S	S	S	S	S	S
CIP	S	R	S	S	S	R
NOR	S	N/A	N/A	N/A	S	R
GEN	S	R	S	S	S	S
SXT	R	S	S	S	R	S
NIT	S	S	S	S	S	S
ESBL	–	Producē	–	–	–	–
Ses	++	+	++	+	++	–
Intesti	+++	+	++	–	+	–
Pyobacteriophag	++	+	+	–	+	+
*Pyobacteriophag**	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	+++

S – jutīgs; R – rezistents, I – jutīgs paaugstinātā devā; +++ CL; ++ SCL; + IP vai PL; ampicilīns (AMP); amoksicilīns/klavulanāts (AMC); piperacilīns/tazobaktāms(TZP); cofotaksīms (CTX); ceftazidīms (CAZ); imipenēms (IMP); meropenēms (MEM); ciprofloksacīns (CIP); norfloksacīns (NOR); gentamicīns (GEN); sulfametoksazols/trimetoprims (SXT); nitrofurantoīns (NIT); paplašināta spektra beta-laktamāze (ESBL); * *Pyobacteriophag* preparāts pēc adaptācijas; nav attiecināms (N/A).

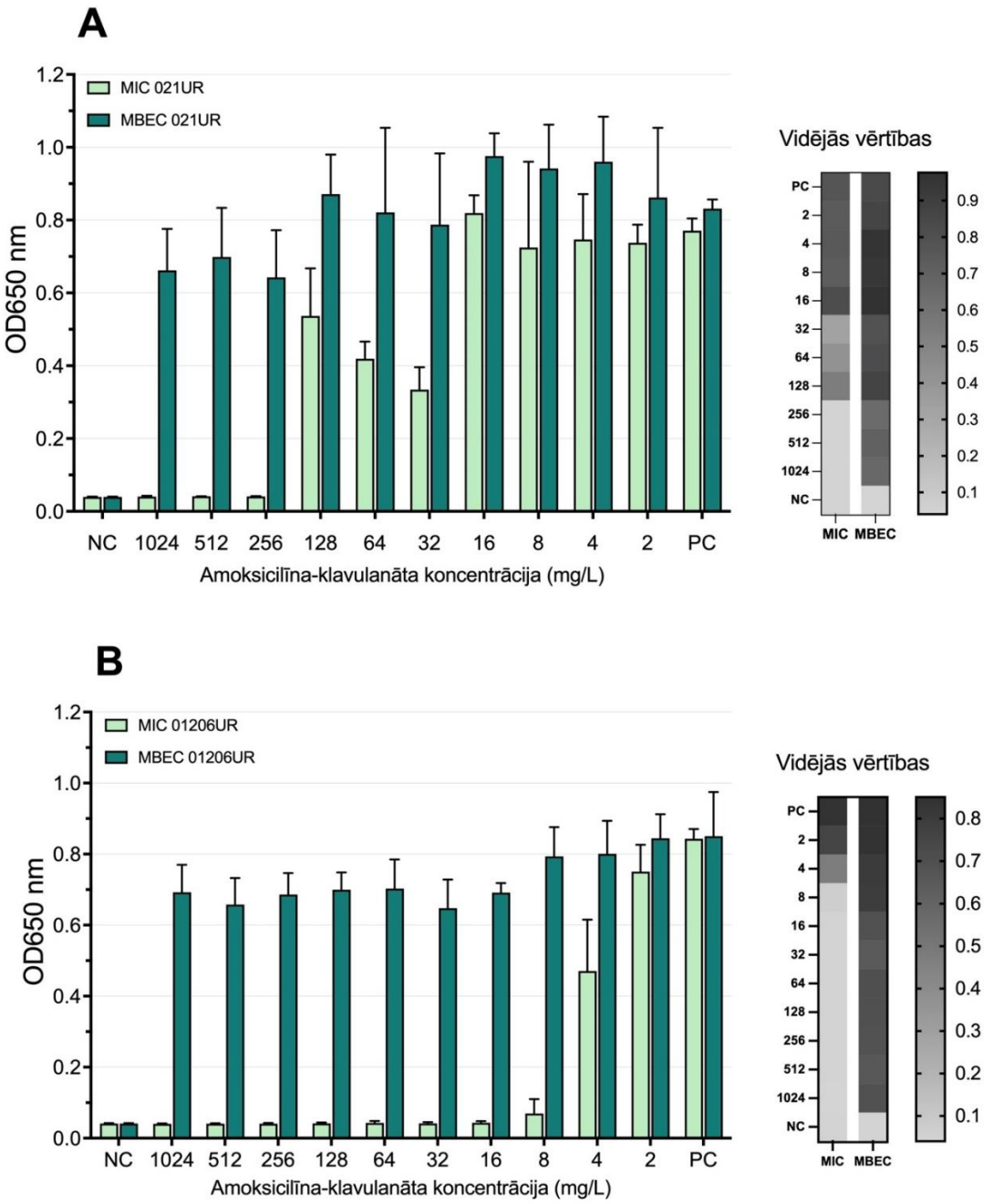


2.4. attēls. **01206UR izolāta jutība pret *Pyobacteriophag* fāga preparāta pirms (1 un 1') un pēc (2 un 2') adaptācijas**

Attēla autori D. Rezevska, K. Rācenis.

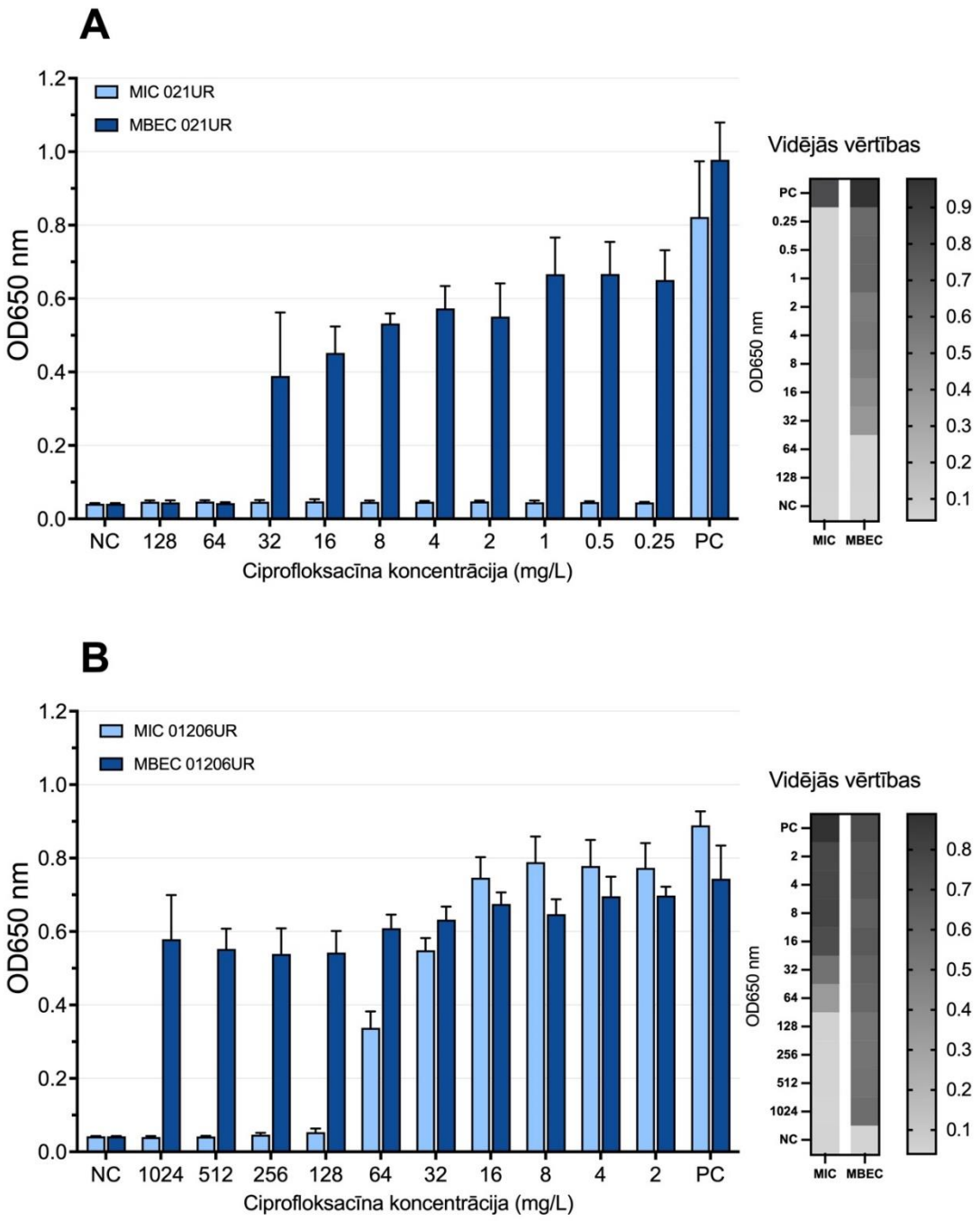
2.2.4. Ciprofloksacīna un amoksicilīna/klavulanāta efekts planktoniskās un biofilmu producējošās šūnās

Atbilstoši EUCAST standartam amoksicilīna/klavulanāta un ciprofloksacīna MIC vērtības ir attiecīgi 8 mg/L un 0,25 mg/L. *E. coli* 021UR bija rezistents pret amoksicilīnu/klavulanātu (skatīt 2.6. tabulu), un MIC vērtība tika sasniegta tikai koncentrācijā 256 mg/L, bet MBEC netika sasniegta pat augstākajā izmantotajā koncentrācijā (1024 mg/L). Ciprofloksacīna MIC vērtība tika sasniegta pie 0,25 mg/L, bet tika vērota rezistence pret to baktērijas biofilmā, jo MBEC vērtība bija 64 mg/L. Lai gan izolāts 01206UR bija jutīgs pret amoksicilīna/klavulanāta un MIC, vērtība bija 8 mg/ml, šī antibiotika nespēja efektīvi iedarboties uz baktērijas biofilmu, jo MBEC netika sasniegts pat augstākajā izmantotajā koncentrācijā 1024 mg/L. Izolāts 01206UR bija rezistents pret ciprofloksacīnu (skatīt 2.6. tabulu), līdz ar to nebija pārsteidzoši, ka MIC vērtība bija 128 mg/L, bet MBEC vērtība netika sasniegta pat pie 1024 mg/L. Tas liecina, ka arī ciprofloksacīns nespēja iznīcināt baktērijas noformētajā baktērijas biofilmā. Vidējās abu izolātu MIC un MBEC optiskā blīvuma vērtības amoksicilīnam/klavulanātam un ciprofloksacīnam ir attēlotas 2.5. un 2.6. attēlā. Neatkarīgi no iepriekš noteiktās (disku difūzijas tests, rezultāti atspoguļoti 2.6. tabulā) antibakteriālās jutības abām antibiotikām netika novērota spēja iznīcināt biofilmā esošās *E. coli* šūnas, savukārt iegūtās MIC vērtības sakrita ar antibakteriālās jutības datiem, kuri tika iegūti disku difūzijas metodē.



2.5. attēls. **Amoksicilīna/klavulanāta MIC un MBEC 021UR (A) un 01206UR (B) kultūrām***

* Stabiņi atspoguļo baktēriju vidējo OD vērtību, izmantojot dažādas amoksicilīna/klavulanāta koncentrācijas (mērīta 650 nm), NC atspoguļo negatīvās kontroles jeb tikai buljona, PC atspoguļo pozitīvās kontroles jeb tikai baktērijas OD vidējo vērtību.



2.6. attēls. **Ciprofloksacīna MIC un MBEC 021UR (A) un 01206UR (B) kultūrām***

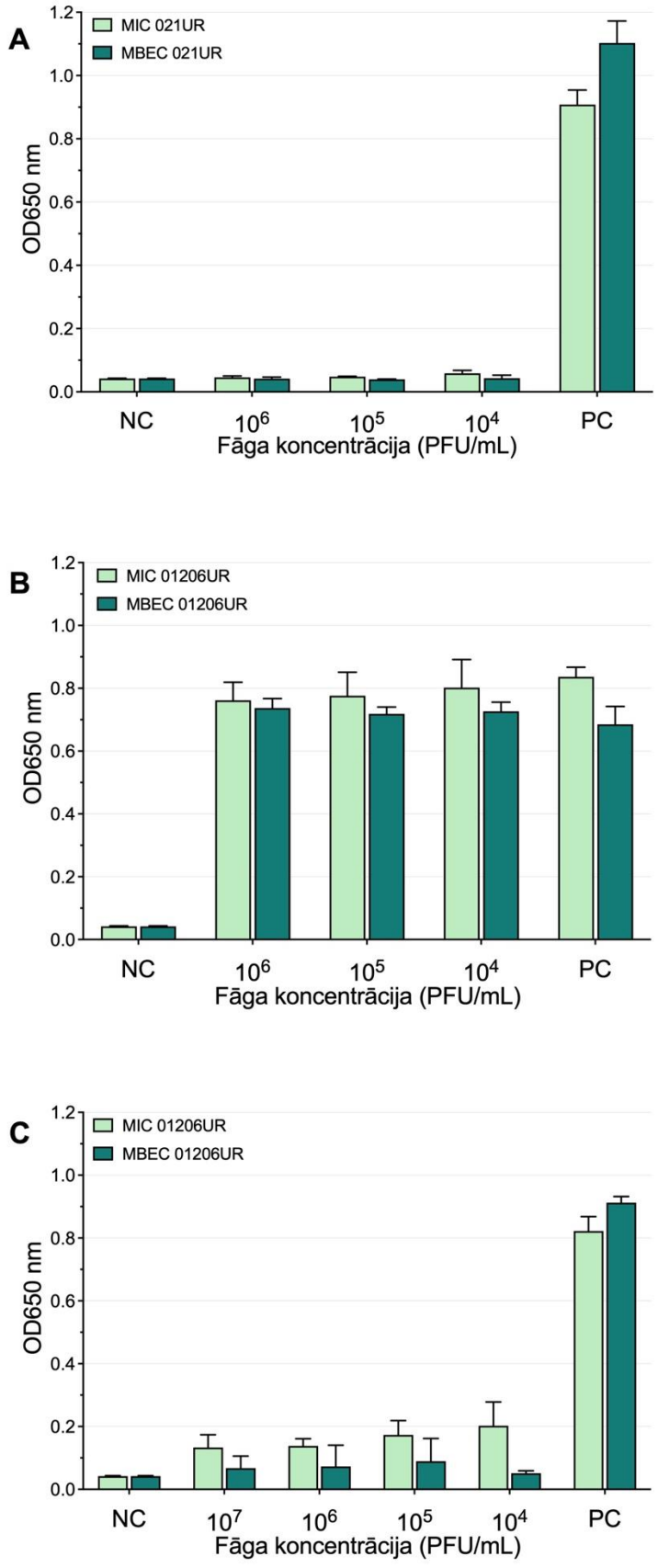
* Stabiņi atspoguļo baktēriju vidējo OD vērtību, izmantojot dažādas ciprofloksacīna koncentrācijas (mērīta 650 nm), NC atspoguļo negatīvās kontroles jeb tikai buljona, PC atspoguļo pozitīvās kontroles jeb tikai baktērijas OD vidējo vērtību.

2.2.5. Bakteriofāgu efekts planktoniskās un biofilmu producējošās šūnās

Fāgu MIC un MBEC testu vidējās vērtības ir norādītas 2.7., 2.8. un 2.9. attēlā. Baktērija bija jutīga pret fāgu, ja OD vērtības bija < 0,1, rezultātu mērot 650 nm viļņu garumā, vai ja rezultāts bija tuvu negatīvai kontrolei.

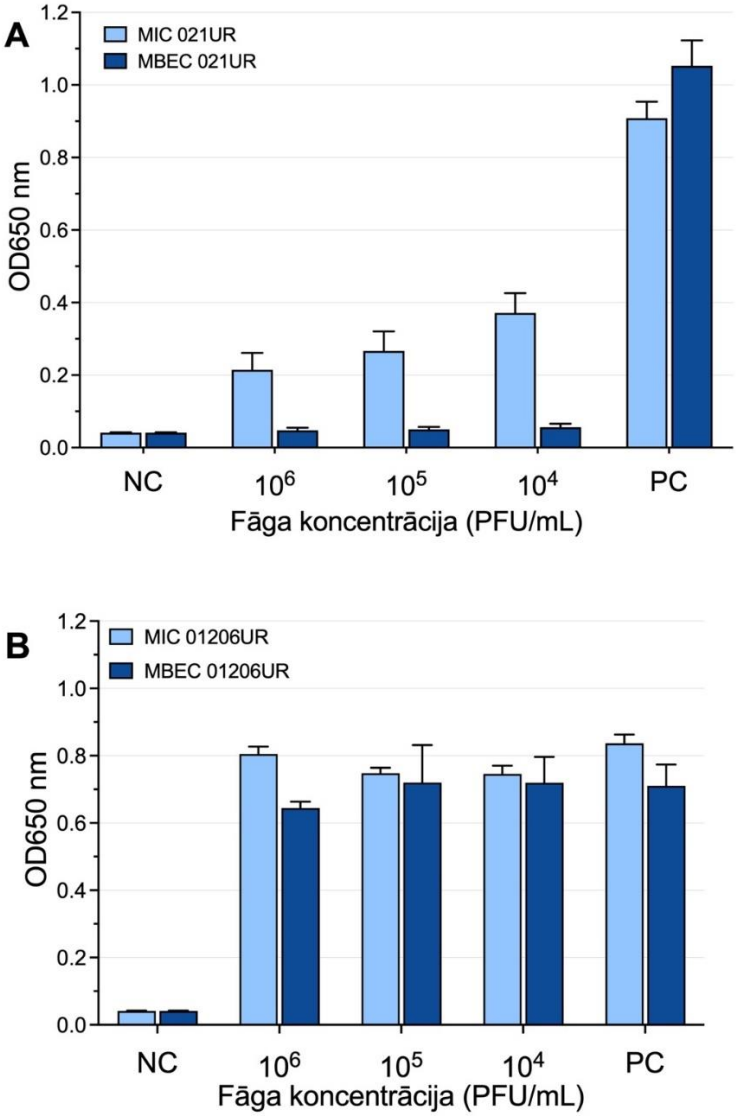
Izmantojot fāgus, *E. coli* izolāta 021UR augšana salīdzinājumā ar pozitīvo kontroli samazinājās visos gadījumos gan planktoniskās šūnās (MIC), gan biofilmā esošās baktērijās (MBEC). Visos gadījumos tika novērots statistiski ticams bakteriofāgu līdzīgais ($p < 0,01$) efekts neatkarīgi no lietotās bakteriofāgu koncentrācijas. Līdzīgais efekts nebija pietiekams, lai secinātu, ka biofilmā esošo šūnu augšana ir pilnībā nomākta ar *Ses* un *Intesti* fāgiem. Pilnīgu *E. coli* šūnu iznīcināšanu vēroja, izmantojot *Pyobacteriophag* preparātu visās tā koncentrācijās.

Otram *E. coli* izolātam 01206UR tika vērota rezistence pret visiem trim fāgu kokteiļiem (*Pyobacteriophag*, *Ses* un *Intesti*), kas bija sagaidāms, jo fāgu jutības testā (skatīt 2.6. tabulu) jau tika vērota rezistence pret *Ses* un *Intesti* fāgu preparātiem. Savukārt *Pyobacteriophag* preparātam, kuram novēroja vāju līdzīsko efektu un tika veikta tā adaptācija efekta uzlabošanai, konstatēja, ka pēc adaptācijas baktēriju augšana visās fāga koncentrācijās ievērojami samazinājās gan planktoniskās (MIC), gan biofilmu veidojošajās šūnās (MBEC), $p < 0,01$. Tomēr OD vērtības attiecībā uz MIC bija nedaudz virs 0,1, kas ir sagaidāms, jo MIC vērtība tiek standartā izmantota vielām, nevis dzīvām būtnēm, šajā gadījumā vīrusiem. Rezultāti parādīja, ka, veicot adaptāciju, var uzlabot bakteriofāgu efektu un pārvarēt to rezistenci kā planktoniskās, tā biofilmās esošās šūnās (skatīt 2.7. attēlu).



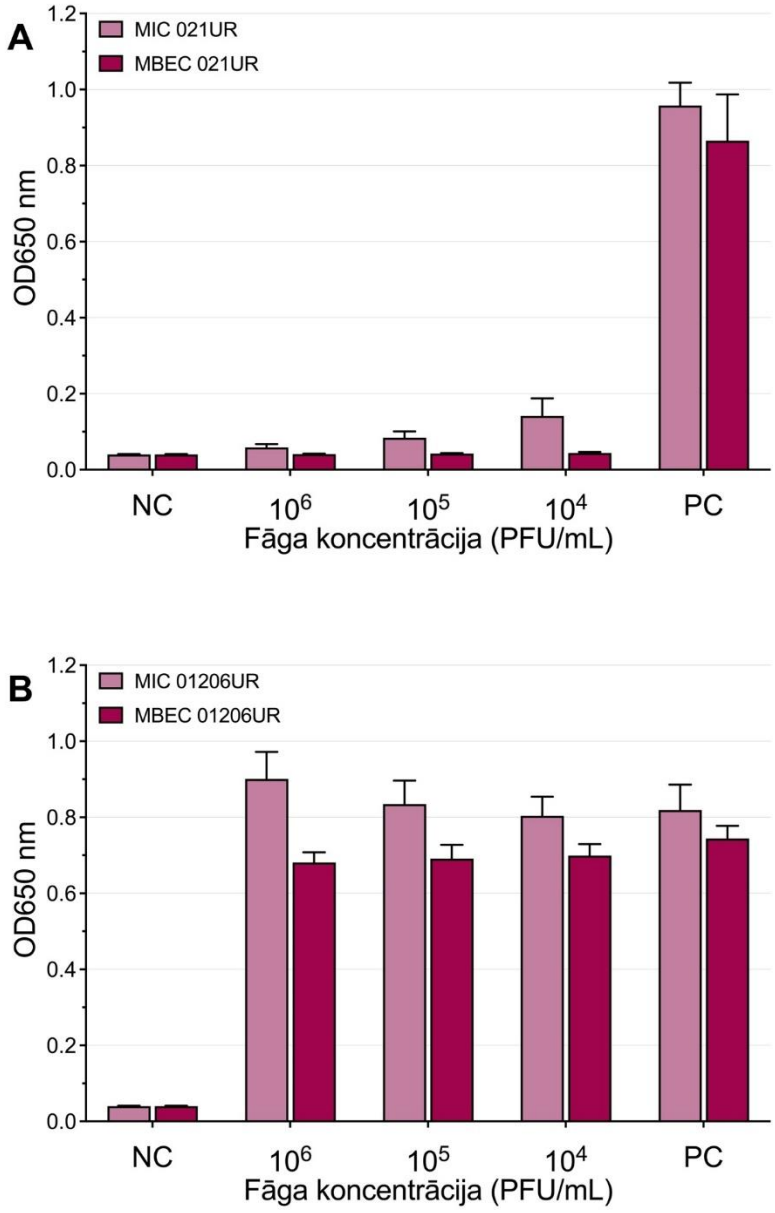
2.7. attēls. ***Pyobacteriophag*** **fāga MIC un MBEC 021UR (A), 01206UR pirms adaptācijas (B) un 01206UR pēc adaptācijas (C)***

* Stabiņi atspoguļo baktēriju vidējo OD vērtību, izmantojot dažādas fāga koncentrācijas (mērīta 650 nm), NC atspoguļo negatīvās kontroles jeb tikai buljona, PC atspoguļo pozitīvas kontroles jeb tikai baktērijas OD vidējo vērtību.



2.8. attēls. ***Ses* fāga MIC un MBEC 021UR (A), 01206UR (B)***

* Stabiņi atspoguļo baktēriju vidējo OD vērtību, izmantojot dažādas fāgu koncentrācijas (mērīta 650 nm), NC atspoguļo negatīvās kontroles jeb tikai buljona, PC atspoguļo pozitīvas kontroles jeb tikai baktērijas OD vidējo vērtību.



2.9. attēls. ***Intesti* fāga MIC un MBEC 021UR (A), 01206UR (B)***

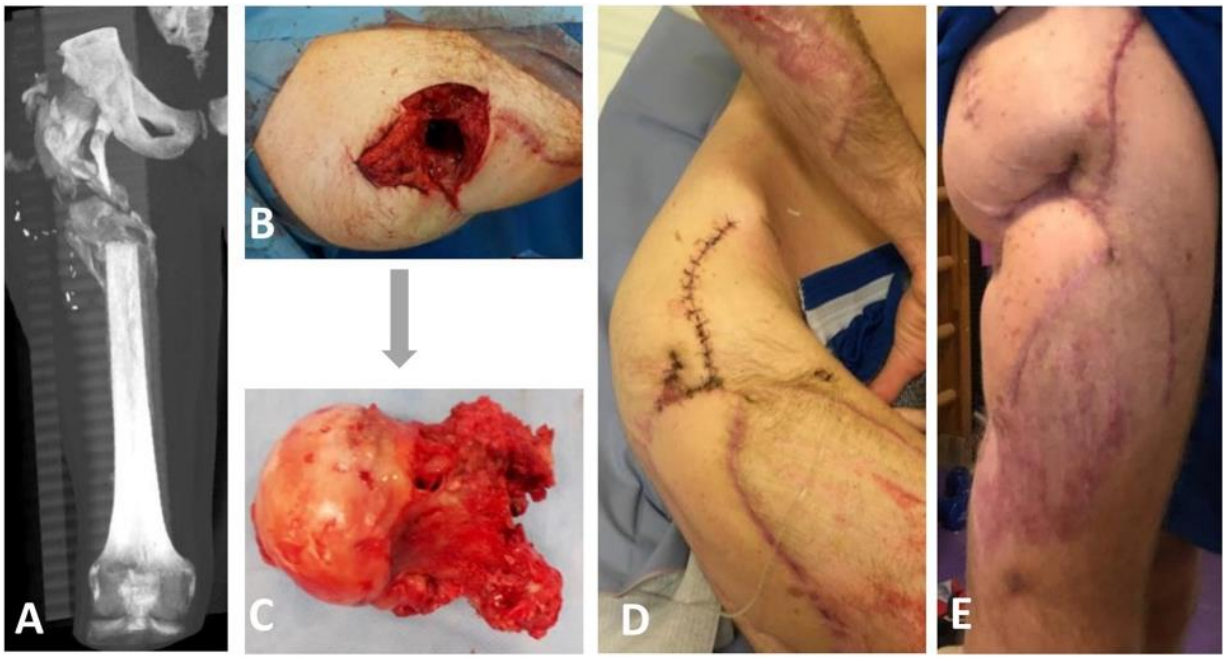
* Stabiņi atspoguļo baktēriju vidējo OD vērtību, izmantojot dažādas fāgu koncentrācijas (mērīta 650 nm), NC atspoguļo negatīvās kontroles jeb tikai buljona, PC atspoguļo pozitīvas kontroles jeb tikai baktērijas OD vidējo vērtību.

2.3. Bakteriofāgu eksperimentālais lietojums multirezistenta *Pseudomonas aeruginosa* augšstilba osteomielīta ārstēšanā

Pētījuma daļa ir aprakstīta un publicēta Kārļa Rāceņa, Daces Rezevskas, Montas Madelānes, Ervīna Lavrinoviča, *Sarah Djebara*, Aivara Pētersona un Jutas Kroičas publikācijā *Use of Phage Cocktail BFC 1.10 in Combination With Ceftazidime-Avibactam in the Treatment of Multidrug-Resistant Pseudomonas aeruginosa Femur Osteomyelitis-A Case Report*. Front Med (Lausanne). 2022 Apr 25;9:851310. doi: 10.3389/fmed.2022.851310. Skatīt 5. pielikumā.

2.3.1. Pacienta gadījuma raksturojums

2018. gada jūlijā 21 gadu vecs vīrietis tika stacionēts slimnīcā pēc ceļu satiksmes negadījuma ar vaļēju, šķembainu acetabulāru un labā augšstilba proksimālā segmenta lūzumu, labā apakšdelma plēstu brūci un hemorāģisku šoku. Pacientam 14. jūlijā veikta nekrotisko audu evakuācija veselo audu robežās (debridments), fasciotomija, labā augšstilba kaula stabilizācija ar gamma naglu, kā arī audu rekonstrukcija. Pacientam pēc operācijas attīstījās sekundāra multirezistenta (MDR, angliski *multidrug-resistant*) *P. aeruginosa*, karbapenēmu rezistenta *Acinetobacter baumannii* un vankomicīna rezistenta *Enterococcus faecium* (VRE) ierosināta brūču infekcija un multiorgānu disfunkcijas sindroms. Pacientam tika veiktas piecas operācijas ar debridmentu un terapija, izmantojot brūču vakuuma sistēmu. Pacients saņēma plaša spektra intravenozu antibakteriālu terapiju ar meropenēmu, kolistīnu, piperacilīnu/tazobaktāmu, linezolīdu un flukonazolu, kā arī pacientam tika veikta nieru aizstājterapija. Neatkarīgi no lietotās ārstēšanas pacientam attīstījās ar osteosintēzi saistīta infekcija un osteomielīts, izdalījumos no brūcēm atkārtoti auga multirezistentas baktērijas VRE, MDR *P. aeruginosa* un MDR *A. baumannii.* Lai nodrošinātu tālāku ārstēšanu, 13. augustā tika izņemta gamma nagla, veikta augšstilba kaula proksimālā segmenta rezekcija, kam sekoja audu rekonstrukcija un apakšstilba ārēja fiksācija. Balstoties uz ierosinātāju antibakteriālo jutību, terapija tika mainīta uz intravenozu fosfomicīnu, meropenēmu un kolistīnu. Dinamikā bija vērojams klīnisks uzlabojums, un 13. septembrī, izmantojot audu lēveri, tika slēgta labā augšstilba brūce. Pacienta stāvoklis pakāpeniski uzlabojās, netika novērotas sistēmiska vai lokāla iekaisuma pazīmes. Atkārtotos brūču uzsējumos baktēriju augšanu nekonstatēja. Slimnieks tika izrakstīts 15. oktobrī un turpināja ambulatori saņemt intravenozu meropenēma un kolistīna terapiju, kas tika pārtraukta pēc divām nedēļām, jo attīstījās akūta nieru mazspēja, domājams, kolistīna izraisīts tubulārs bojājums. Novembrī pacientam parādījās strutaini izdalījumi no labā augšstilba. Datortomogrāfija ar kontrastvielas ievadi brūces atverē norādīja uz fistulas izveidošanos, kura savieno labā augšstilba galviņu un ādas virsmu augšstilba laterālajā augšējā trešdaļā (2.10. A attēls). Pacientam tika veikta fistulotomija, no iegūtā brūces materiāla atkārtoti izauga MDR *P. aeruginosa* un VRE. Ņemot vērā aizdomas par atkārtotu augšstilba kaula osteomielītu, tika plānota divu etapu operācija, lai saglabātu gūžas locītavas endoprotezēšanas iespēju nākotnē. Lai panāktu pēc iespējas labāku klīnisko iznākumu, tika nolemts izmantot bakteriofāgu terapiju kopā ar ķirurģisku un antibiotisku ārstēšanu. Sadarbībā ar Karalienes Astrīdas Militārās medicīnas slimnīcu Briselē, Beļģijā, tika plānota līdzskā bakteriofāgu kokteiļa BFC 1.10 izmantošana, kura sastāvā ir fāgi, ar līdzsko aktivitāti pret *P. aeruginosa* un *S. aureus*.



2.10. attēls. **Pacienta klīniskā un radioloģiskā atrade pirms un pēc bakteriofāgu terapijas, kā arī tās lietošanas laikā***

* (A) Datortomogrāfijas attēls pēc lokālas kontrastvielas ievades, kurā vērojama fistula starp augšstilba kaula galviņu un ādas virsmu augšstilba augšējā laterālajā trešdaļā. (B) un (C) attēls no operācijas 5. decembrī, kad tika veikta augšstilba galviņas ekscīzija, vērojama fistulas atvere (C) augšstilba kaula galviņā. (D) Brūce pēc operācijas 13. decembrī, kurā redzams katetrs, caur kuru tika veikta bakteriofāgu lokāla ievade brūcē. (E) Dzīstoša brūce divus mēnešus pēc bakteriofāgu terapijas. Attēla autori E. Lavrinovičs, K. Rācenis.

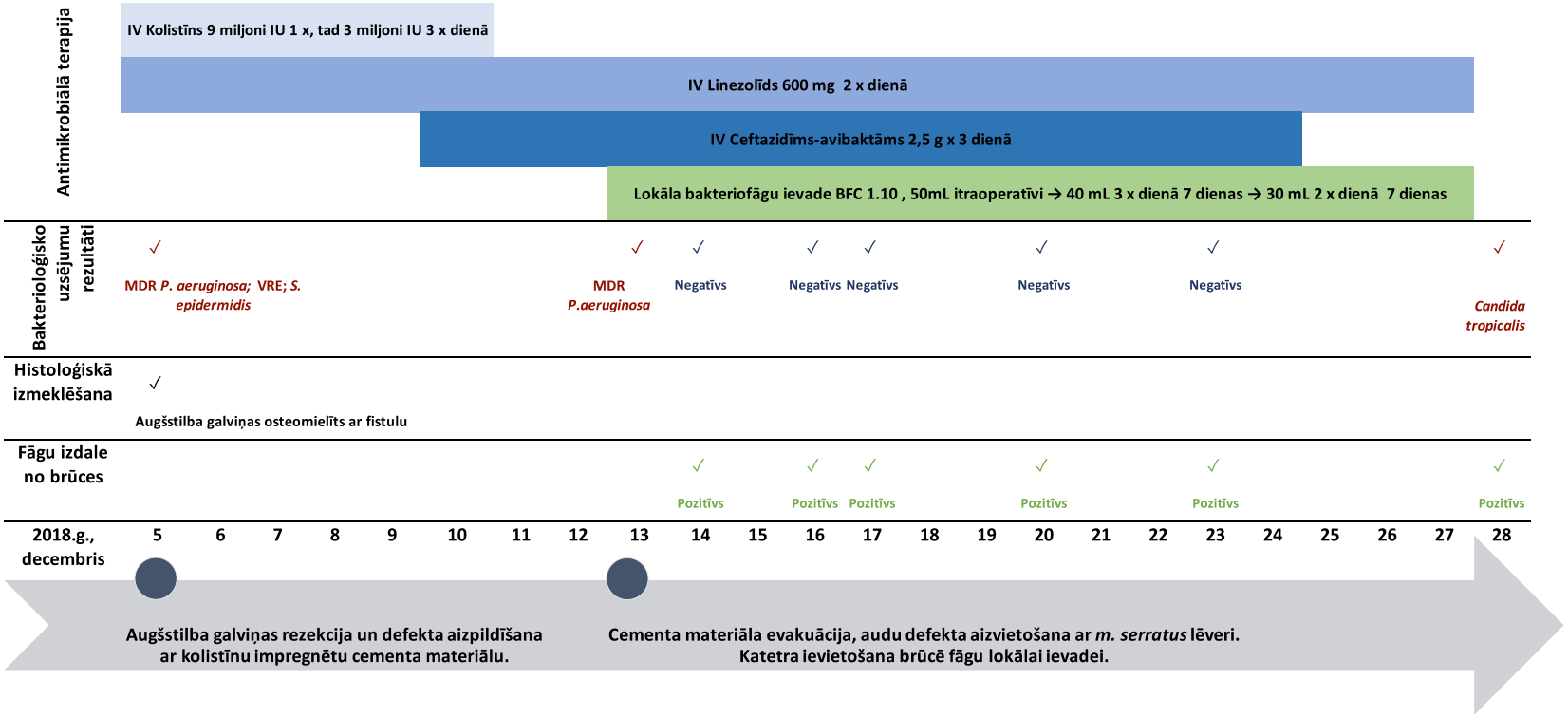
2.3.2. Fāgu terapijas izmantošana, pacienta tālākā ārstēšana, izmeklēšana un terapijas iznākums, ilgtermiņa rezultāts

Bakteriofāgu eksperimentālā izmantošana tika veikta atbilstoši Helsinku deklarācijas 37. paragrāfam (51). Šis paragrāfs nosaka: "Ārstējot atsevišķu pacientu gadījumā, kad nav pierādītu metožu vai tās bijušas neefektīvas, pēc ekspertu sniegtas konsultācijas ārsts ar pacienta vai viņa likumīgā pārstāvja informētu piekrišanu var izmantot nepārbaudītu metodi, ja uzskata, ka tā dod cerību glābt dzīvību, atjaunot veselību vai atvieglot ciešanas. Pēc tam jāveic šīs metodes izpēte, lai izvērtētu tās drošumu un efektivitāti. Jebkurā gadījumā jaunā informācija ir jādokumentē un vajadzības gadījumā jādara publiski pieejama." Pirms terapijas uzsākšanas tika saņemta rakstiska piekrišana no pacienta par fāgu terapijas lietošanu.

5. decembrī pacientam tika veikta augšstilba galviņas rezekcija un defekta aizpildīšana ar kolistīnu impregnētu cementa materiālu. Atkārtoti tika ņemti uzsējumi, kuros no proksimālās augšstilba kaula daļas izauga MDR *P. aeruginosa*, VRE un *Staphylococcus epidermidis*. Histoloģiska un vizuāla intraoperatīvā atrade apstiprināja augšstilba galviņas osteomielītu ar fistulu (2.10. B, C attēls). Pēc operācijas pacients septiņas dienas saņēma intravenozi kolistīnu un 23 dienas linezolīdu. 7. decembrī Rīgas Stradiņa universitātē tika saņemts BFC 1.10 fāgu kokteilis 2000 ml ar koncentrāciju 10^7 PFU/ml katram kokteilī esošajam fāgam. Sterilos apstākļos tika sagatavoti sterili konteineri ar 30, 40 vai 50 ml fāgu šķīdumu. Trīs dienas pirms operācijas pacientam tika uzsākta terapija ar intravenozu ceftazidīma/avibaktāma ievadi, ko pacients turpināja saņemt kopā 15 dienas.

13. decembrī tika veikta operācija, kurā tika izņemts iepriekš ievietotais kolistīnu saturošais kaulu cements, paņemti uzsējumi no dažādām brūces vietām, kuri bija pozitīvi, arī uzsējums no acetabulārās virsmas bija pozitīvs, uzsējumos auga MDR *P. aeruginosa*. Tālāk tika veikta nekrotisko audu evakuācija normālo audu ietvarā, brūces skalošana ar 50 ml 4,2 % nātrija bikarbonāta šķīdumu, tika nogaidītas 5 min. un operācijas vieta skalota ar 50 ml BFC 1.10 bakteriofāgu suspensiju. Pēc tam audu bojājumi tika aizvietoti ar *m. serratus* lēveri, kā arī ievietots katetrs brūcē lokālai bakteriofāgu ievadei turpmākajās dienās (2.10. D attēls). Pirmās septiņas pēcoperācijas dienas pacientam trīs reizes dienā tika lokāli ievadīti 40 ml BFC 1.10 bakteriofāgu suspensijas ar ātrumu 1 ml/min. Pirms katras fāgu ievades reizes brūce tika skalota, izmantojot katetru, ar 50 ml 4,2 % nātrija bikarbonāta šķīduma. Otrajā pēcoperācijas nedēļā fāgi tika ievadīti divas reizes dienā ar kopējo vienas reizes tilpumu 30 ml, šādu terapiju turpināja septiņas dienas. Kopējais fāgu terapijas ilgums bija 15 dienas. Vienlaikus ar lokālo fāgu ievadi tika turpināta jau uzsāktā terapija ar intravenozu linezolīdu un ceftazidīma/avibaktāma ievadi. Fāgu ārstēšanas laikā un pēc tās 1., 3., 4., 7., 10. un 15. pēcoperācijas dienā ņemtie uzsējumi no brūces bija negatīvi. Paralēli tika noteikta arī fāgu izdale no brūces rīta buferšķīduma paraugā pirms fāgu ievadīšanas 1., 3., 4., 7., 10. un 15. dienā, visos paraugos konstatēja fāgu klātbūtni. Ārstēšanas beigās brūce sadzija bez lokālām vai sistēmiskām iekaisuma pazīmēm. Pabeidzot terapiju, fāgu ievades katetrs tika izņemts un nosūtīts mikrobioloģiskai izmeklēšanai, no tā gala izauga *Candida tropicalis*, kuras ārstēšana netika veikta. Saņemtā antibakteriālā un fāgu terapija, baktēriju uzsējumu un fāgu uzsējumu apkopojums ir atspoguļots 2.11. attēlā. Fāgu terapijas laikā netika novērotas nelabvēlīgas blakusparādības, piemēram, drudzis, lokāli izsitumi, nieze, slikta dūša, vai citi simptomi, kā arī nieru, aknu bojājuma rādītāji saglabājās normas robežās. Decembra beigās pacients tika izrakstīts no stacionāra līdz gūžas locītavas endoprotezēšanas operācijai, pacientam tika saglabāta apakšstilba ārējā fiksācija.

Divus mēnešus pēc fāgu terapijas brūce bija sadzijusi un netika vērotas lokālas vai sistēmiskas iekaisuma pazīmes (2.10. E attēls), arī labās gūžas locītavas magnētiskās rezonanses izmeklējuma patoloģiskā atrade, kas varētu liecinātu par iekaisuma ainu, netika konstatēta. Trīs mēnešus pēc fāgu terapijas labās gūžas un augšstilba kaula datortomogrāfijā netika konstatēta osteomielīta aina, kā arī šķidruma kolekciju klātesamība. Tālākā sešu mēnešu periodā tika veiktas divas labā augšstilba proksimālās daļas punkcijas, lai vērtētu baktēriju klātesamību, paņemtie uzsējumi bija negatīvi. Pacientam jūnijā tika noņemts ārējās fiksācijas aparāts un tika plānota labās gūžas locītavas endoprotezēšana.



2.11. attēls. **Saņemtās terapijas, bakteriālo uzsējumu un fāgu izdales rezultāti stacionēšanas epizodē, kad tika izmantota fāgu terapija**

2019. gada 3. septembrī pacientam tika veikta gūžas endoprotezēšana ar sudrabu pārklātu implantu. Operācijas laikā tika ņemti uzsējumi no vairākām brūces vietām. Tika konstatēta MDR *P. aeruginosa* un VRE (jutīga pret fosfomicīnu) augšana no augšstilba kaula distālās daļas, bet uzsējumi no acetubulārā rajona un muskuļiem proksimālajā augšstilba daļā bija bakteriālo kultūru negatīvi. Pacients saņēma vienu intravenozu vankomicīna devu perioperatīvajai profilaksei un intravenozu kolistīna terapiju, kuru turpināja lietot līdz mikrobioloģisko izmeklējumu atbildes saņemšanai. Saņemot pozitīvu bakterioloģisko atbildi, pacientam tika turpināta terapija ar kolistīnu un pievienota fosfomicīna terapija. Pēc sešpadsmit dienām pacientam tika veikta DAIR procedūra (debridments, antibiotiku terapija un implantāta saglabāšana), jo tika konstatēta hematoma brūces rajonā un bija aizdomas par iespējamu protēzes infekciju. Operācijas laikā tika ņemtas vairākas iztriepes, no kurām MDR *P. aeruginosa* augšana tika konstatēta augšstilba audu distālajā segmentā. Tika turpināta antibakteriālā terapija un 4. oktobrī veiktas punkcijas un to uzsējumi no audiem apkārt gūžas endoprotēzei, šajos materiālos baktēriju augšanu nekonstatēja. Trīs dienas vēlāk pacients tika izrakstīts un turpināja kolistīna un fosfomicīna antibakteriālu terapiju ambulatori. Šajā ārstēšanas epizodē pacients saņēma kolistīnu sešas nedēļas un fosfomicīnu piecus mēnešus. Novērošanas periodā pēc gada pacientam netika konstatētas lokālas vai sistēmiskas infekcijas pazīmes, slimnieks atzīmēja ierobežoto kustību labajā kājā, tomēr viņš varēja turpināt spēlēt basketbolu. Piecpadsmit mēnešus pēc endoprotezēšanas labās gūžas un augšstilba radioloģiskajos izmeklējumos iekaisuma pazīmes nevēroja, skatīt attēlus 6. pielikumā.

2.3.3. *P. aeruginosa*, kura izolēta no pacienta ar osteomielītu, antibakteriāla un fāgu jutība

No visiem iegūtajiem paraugiem pētījumā tika izmantoti septiņi *P. aeruginsoa* izolāti. Bakteriofāgu jutības, MIC un BPC testēšanai tika izmantots izolāts PA (4), kuru izdalīja 23.11.2018. no brūces. Vērtējot PA (4) jutību pret BFC 1.10 bakteriofāgu preparātu, vēroja daļēju līzes zonu divslāņu agarā.

Lai veiktu tālākos eksperimentus, tika veikta bakteriofāga kokteiļa pavairošana, pēc pavairošanas bakteriofāgu koncentrācija pieauga no $1{,}6 \times 10^7$ PFU/ml uz $2{,}5 \times 10^9$ PFU/ml. Iegūtais pavairotais bakteriofāgu preparāts tika izmantots tālākai testēšanai MIC un BPC noteikšanai.

P. aeruginosa izolātu antibakteriālā jutība laika gaitā mainījās. Antibakteriālās jutības rezultāti septiņiem *P. aeruginosa* izolātiem ir atspoguļoti 2.7. tabulā.

2.7. tabula

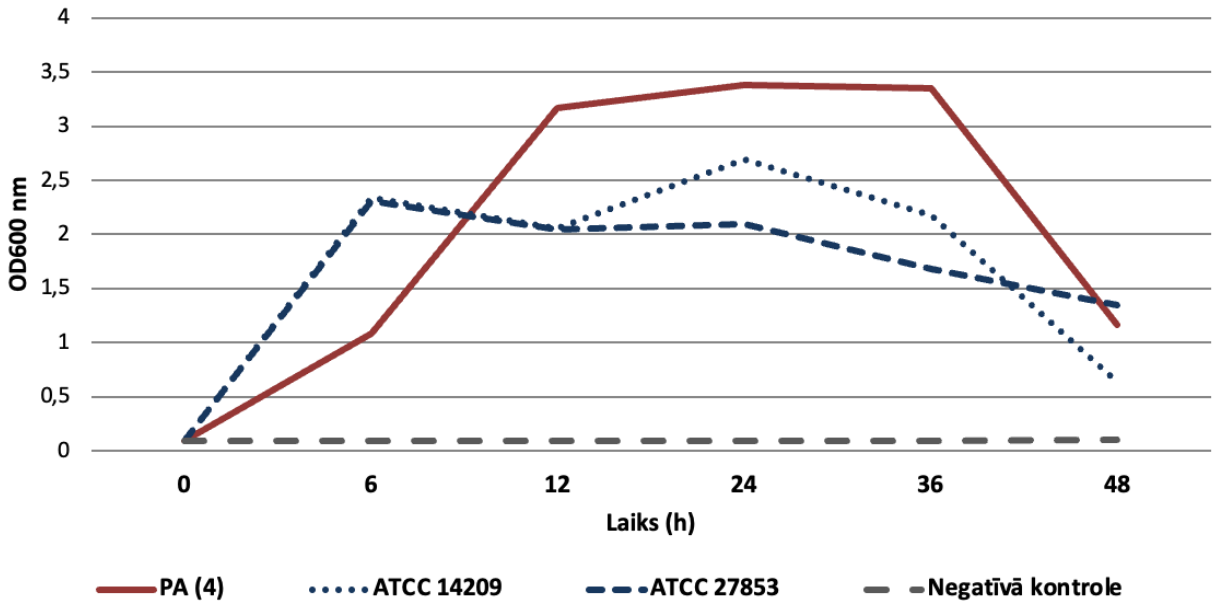
Antibakteriālās jutības rezultāti *P. aeruginosa* izolātiem pacientam ar osteomielītu

Izolāta kods	PA (1)	PA (2)	PA (3)	PA (4)	PA (5)	PA (6)	PA (7)
Pacienta materiāla raksturojums (baktērijas zolēšanas laiks)	**Brūces iztriepe, operācijas materiāls (18.07.18.)**	**Audu paraugs no operācijas materiāla (01.08.18.)**	**Brūces iztriepe, operācijas materiāls (13.08.18.)**	**Izdalījumi no fistulas (23.11.18.)**	**Brūces iztriepe no augšstilba proksimālās daļas, operācijas materiāls (05.12.18.)**	**Brūces iztriepe no acteabulārā rajona, operācijas materiāls (13.12.18.)**	**Brūces iztriepe no augšstilba distālās daļas, operācijas materiāls (03.09.19.)**
AMK	R	R	R	R	R MIC = 48	R	R
FEP	R	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
CAZ	R	R	R	R	R	R	R
CAZ/AVI	N/A	N/A	N/A	S MIC = 4	S MIC = 4	S MIC = 6	N/A
CIP	R	R	R	R	R	R	R
CST	S	S MIC = 0,75	S	S	S	S MIC = 1,5	S
FOF	N/A	MIC = 16	N/A	MIC = 32	N/A	N/A	N/A
GEN	R	N/A	N/A	R	R	R	R
IPM	R	R	R	R	R MIC > 32	R	R
MEM	R	R	R	N/A	R	R	R
TIC	R	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
TIM	R	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
TOB	N/A	R	R	R	R	R	N/A
TZP	R	R	R	R	R	R	R

S – jutīgs; R – rezistents; amikacīns (AMK); cefepīms (FEP); ceftazidīms (CAZ); ceftazidīms/avibaktāms (CAZ/AVI); ciprofloksacīns (CIP); kolistīns (CST); fosfomicīns (FOF); gentamicīns (GEN); imipenēms (IMP); meropenēms (MEM); tikarcilīns (TIC); tikarcilīns/klavulanāts (TIM); tobramicīns (TOB); piperacilīns/tazobaktāms(TZP); nav attiecināms (N/A).

2.3.4. *P. aeruginosa*, kura izolēta no pacienta ar osteomielītu, biofilmas veidošanas spēja

P. aeruginosa izolāts PA (4) bija izteikts biofilmas veidotājs, tas spēja izteikti veidot biofilmu jau 6 h pēc inkubācijas. Izteiktākā biofilmas veidošanās tika vērota 12–36 h. Līdzīgi rezultāti tika novēroti izmantotajos references celmos, bet 12–36 h PA (4) bija izteiktāks biofilmas veidotājs. Statistiski ticama atšķirība ($p < 0,001$) starp PA (4) un abiem references celmiem tika novērota visos biofilmas noteikšanas laikos, izņemot 0 stundu.



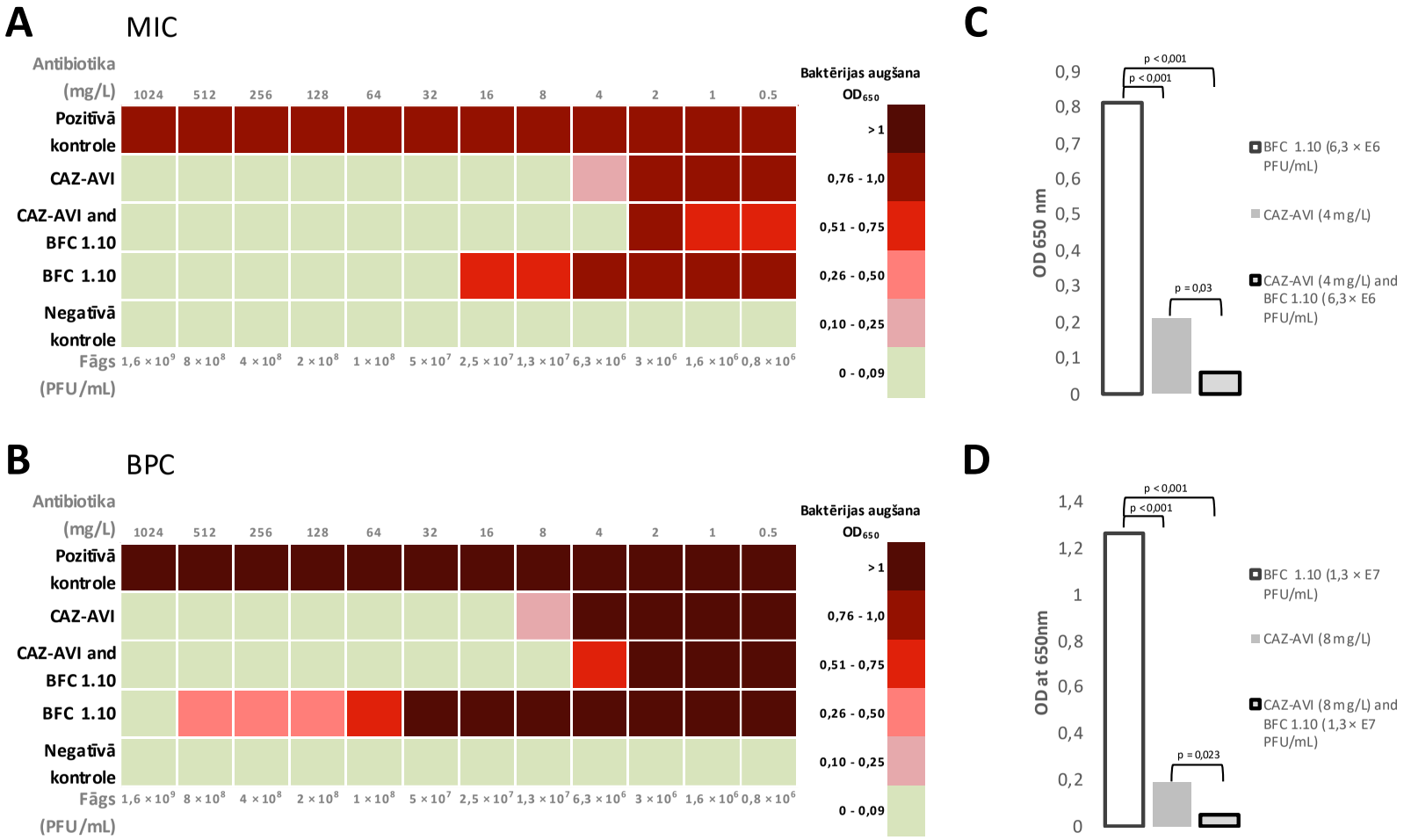
2.12. attēls. ***P. aeruginosa*** **(PA (4)) un divu** ***P. aeruginosa*** **references celmu (ATCC 14209; 27853) biofilmas veidošanas spēja 48 h periodā***

* Sterils triptikāzes sojas agars tika izmantots kā negatīvā kontrole.

2.3.5. Bakteriofāgu un ceftazidīma/avibaktāma efekts planktoniskās šūnās un biofilmas novēršanā *P. aeruginosa* PA (4) izolātā pacientam ar osteomielītu

Ceftazidīma/avibaktāma MIC un BPC vērtības bija attiecīgi 8 un 16 mg/L. Tādējādi saskaņā ar EUCAST standartu iegūtās vērtības uzrādīja planktonisko šūnu jutību pret ceftazidīmu/avibaktāmu. Biofilmas veidošanos novēršanā nepieciešamā antibiotikas koncentrācija bija lielāka par iespējamo lietojamo koncentrāciju *in vivo*, līdz ar to biofilmas novēršanā PA (4) uzrādīja rezistenci pret ceftazidīmu/avibaktāmu. Izmantojot fāgu preparātu BFC 1.10 baktēriju, planktonisko šūnu augšanu nekonstatēja fāgu koncentrācijā 5×10^7 PFU/ml. Fāgu preparāts pilnībā spēja novērst biofilmas veidošanos, tikai izmantojot augstāko testēto koncentrāciju – $1,6 \times 10^9$ PFU/ml. Ceftazidīma/avibaktāma un BFC 1.10 kombinācijas gadījumā tika vērota aditīva mijiedarbība *P. aeruginosa* planktonisko šūnu iznīcināšanā (MIC) un biofilmas veidošanās profilaksē (BPC). Lietojot ceftazidīmu/avibaktāmu kombinācijā ar BFC 1.10, ceftazidīma/avibaktāma MIC un BPC vērtības samazinājās attiecīgi

no 8 līdz 4 mg/L (p = 0,03) un no 16 līdz 8 mg/L (p = 0,023), salīdzinot ar vērtībām, kas iegūtas, lietojot ceftazidīmu/avibaktāmu vienu pašu. Biofilmas profilaksei nepieciešamā antibiotiku koncentrācija samazinājās līdz MIC robežvērtībai (≤ 8 mg/L) saskaņā ar EUCAST standartu, padarot baktērijas celmu jutīgu pret ceftazidīmu/avibaktāmu, rezultāti ir attēloti 2.13. attēlā.



2.13. attēls. **BFC 1.10 un ceftazidīma/avibaktāma MIC (A) un BPC (B) vērtība *P. aeruginosa* celmā pacientam ar osteomielītu***

* C attēlā redzama baktērijas augšanas atšķirība planktoniskās šūnās, izmantojot ceftazidīmu/avibaktāmu, BFC 1.10 un to kombinācijas antibiotikas koncentrācijā 4 mg/L, fāga koncentrācijā $6,3 \times 10^6$ PFU/ml; D attēlā redzama baktērijas augšanas atšķirība, biofilmas novēršanai izmantojot ceftazidīmu/avibaktāmu, BFC 1.10 un to kombinācijas antibiotikas koncentrācijā 8 mg/L, fāga koncentrācijā $1,3 \times 10^7$ PFU/ml. Sterils triptikāzes sojas agars tika izmantots kā negatīvā kontrole.

2.4. Bakteriofāgu eksperimentālais lietojums multirezistenta *Pseudomonas aeruginosa* LVAD kabeļa infekcijas ārstēšanā

Pētījuma daļa ir aprakstīta un publicēta Kārļa Rāceņa, Jāņa Lāča, Daces Rezevskas, Laimas Mukānes, Aijas Vildes, Inta Putniņa, *Sarah* Djebara, *Maya Merabishvili, Jean-Paul Pirnay*, Marikas Kalniņas, Aivara Pētersona, Pētera Stradiņa, Sanda Mauriņa un Jutas Kroičas publikācijā *Successful Bacteriophage-Antibiotic Combination Therapy against Multidrug-Resistant Pseudomonas aeruginosa Left Ventricular Assist Device Driveline Infection.* Viruses. 2023 May 20;15(5):1210. doi: 10.3390/v15051210. Skatīt 7. pielikumā.

2.4.1. Pacienta gadījuma raksturojums, pacienta izmeklēšana

2020. gada oktobrī PSKUS tika stacionēts 54 gadus vecs vīrietis ar strutainiem izdalījumiem no LVAD *HeartMate 3* (HM3) kabeļa izejas atveres, kā arī ar lokālu iekaisumu izejas atveres rajonā (2.14. A attēls), febrilu temperatūru un paaugstinātiem iekaisuma rādītājiem (C reaktīvais proteīns (CRP) 44 mg/L).

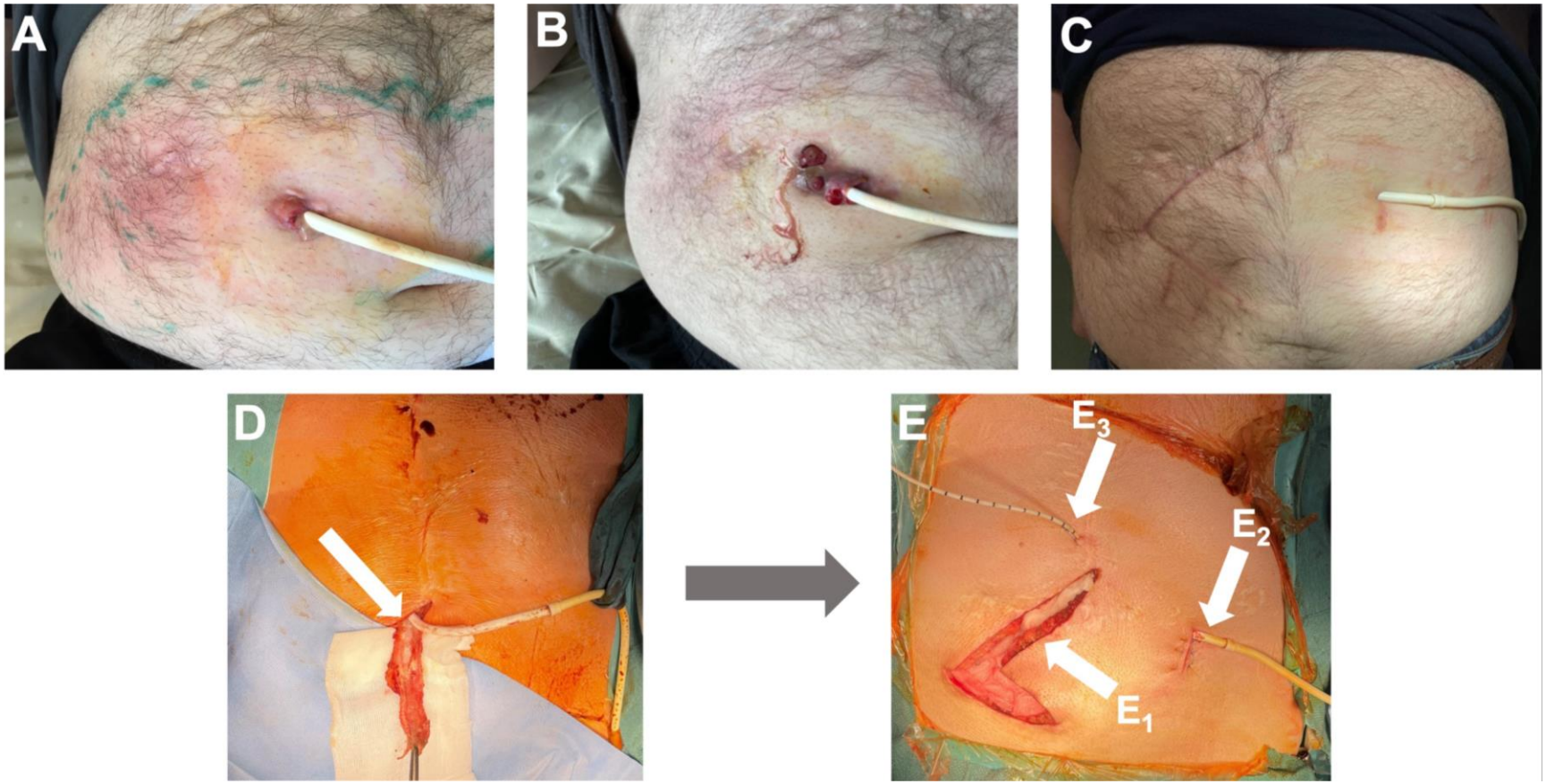
No slimību vēstures zināms, ka pacientam 2016. gada novembrī tika implantēta LVAD HM3 ierīce, jo pacientam bija smagas pakāpes sirds mazspēja (*INTERMACS* 1. profils), kuras cēlonis bija dilatācijas kardiomiopātija. Ierīces ievietošana tika veikta, lai nodrošinātu pietiekamu sirds funkciju līdz tās iespējamai transplantācijai, 2017. gadā pacients tika uzņemts sirds transplantācijas gaidīšanas sarakstā.

Izdalījumi no LVAD HM3 kabeļa izejas atveres pacientam pirmo reizi parādījās 46 mēnešus pēc ierīces implantācijas. Pacientam tika uzsākta terapija ar piperacilīnu/tazobaktāmu, kuru pacients saņēma divas nedēļas. Tika paņemti uzsējumi no brūces, kuros izauga *P. aeruginosa* (2.8. tabula). Pakāpeniski iekaisuma process mazinājās un pacientam tika mainīta antibakteriāla terapija uz ilgstošu perorālu ciprofloksacīna terapiju ambulatori, pacients tika izrakstīts 2020. gada oktobra beigās.

Deviņpadsmit nedēļas vēlāk, 2021. gada martā, pacients atkal tika stacionēts, jo atkārtoti parādījās strutaini izdalījumi no kabeļa izejas atveres, kā arī bija izveidojusies fistula (2.14. B attēls). Atkārtotos brūces uzsējumos auga MDR *P. aeruginosa,* kuras ārstēšana bija iespējama tikai ar intravenoziem antibakteriāliem līdzekļiem. Pacientam tika uzsākta terapija ar kolistīnu, pirmā deva 9 miljoni un pēc tam 3 miljoni IU trīs reizes dienā, šī terapija tika turpināta līdz operācijai. Tika pieņemts lēmums veikt LVAD kabeļa repozīciju jaunā zemādas tunelī. Tika veikta fluora-18-fluorodeoksiglikozes pozitronu emisijas tomogrāfija ar datortomogrāfiju (^{18}F-FDG PET/CT), kurā tika konstatēta hipermetabola aktivitāte pa LVAD

kabeļa gaitu līdz vēdera muskuļu līmenim, kā arī konstatēts viegli infiltrēts *m. rectus abdominis*, iegūtā atrade liecināja par bakteriālu infekciju (2.16. A attēls).

Lai nodrošinātu pēc iespējas labāku ārstēšanas iznākumu, tika pieņemts lēmums izmantot bakteriofāgus lokālā un intravenozā veidā. Šāds lēmums tika pieņemts, pamatojoties uz iepriekšējo neveiksmīgo antibakteriālo ārstēšanu, kā arī bija ierobežotas antibakteriālas terapijas alternatīvas iespējas. Balstoties uz izdalītās MDR *P. aeruginosa* kultūras antibakteriālo jutību, efektīva terapija bija iespējama, izmantojot tikai ceftazidīmu/avibaktāmu un amikacīnu (skatīt 2.8. tabulu). Sadarbībā ar Karalienes Astrīdas Militārās medicīnas slimnīcu (*QAMH*) Briselē, Beļģijā, tika saņemti divi lītiskie *P. aeruginosa* fāgi – PNM un PT07. Fāgu lietošanas veids tika apspriests ar lokālo ārstniecības komandu un *QAMH* speciālistiem. Ārstēšana tika veikta saskaņā ar Helsinku deklarācijas 37. paragrāfu (51), un pirms procedūras no pacienta tika saņemta informētā piekrišana par fāgu terapijas lietošanu.



2.14. attēls. **Brūces vizuālās izmaiņas pirms un pēc ārstēšanas, kā arī tās laikā***

*(A) Brūce 2020. g. oktobrī pirms antibakteriālas terapijas uzsākšanas. (B) Brūce 2021. g. martā pirms antibakteriālās terapijas uzsākšanas. (C) Brūce 2021. g. oktobrī 4 mēnešus pēc fāgu terapijas un ķirurģiskas kabeļa repozīcijas, redzams, ka netiek vērotas lokālas iekaisuma pazīmes. (D) Velūra noņemšana no LVAD kabeļa operācijas laikā; velūrs norādīts ar bultiņu. (E) Attēls no operācijas, E_1 bultiņa norāda uz veco (iepriekšējo) kabeļa tuneļa vietu, E_2 bultiņa norāda uz jauno kabeļa tuneļa izejas atveres vietu, E_3 bultiņa norāda uz vietu, kurā ievietots 8-FR katetrs, pa kuru tika lokāli ievadīti bakteriofāgi jaunajā kabeļa tunelī. Attēla autors J. Lācis.

2.4.2. Fāgu terapijas izmantošana

16. jūnijā tika notika operācija, kuras laikā veica nekrotisko audu ekscīziju pa kabeļa gaitu, ieskaitot daļēju *m. rectus abdominis* rezekciju. Operācijas laikā tika ņemtas vairākas iztriepes no brūces, lai varētu vērtēt infekcijas izplatību un identificētu bakteriālo ierosinātāju. LVAD kabelis ir klāts ar velūru, lai veicinātu tā saaugšanu ar zemādas audiem, bet tas rada infekcijas perēkļa risku, kuru ir grūti sanēt, tāpēc operācijas laikā velūrs tika noņemts no kabeļa. Velūru nosūtīja tālākai mikrobioloģiskai analīzei (2.14. D attēls). Turpmākā operācijas gaitā tika veikta brūces skalošana un lokāla apstrāde ar *Prontosan* ® šķīdumu (*B. Braun*, Vācija), kurš satur virsmaktīvu vielu betaīnu un 0,1 % poliaminopropilbiguanīdu (poliheksidīnu). Tad vēdera priekšējā sienā tika sagatavots jauns zemādas tunelis, lai tajā ievietotu LVAD kabeli. Lai samazinātu iespēju, ka jaunais modulārais kabeļa savienotājs varētu tikt kontaminēts no apkārtesošā šķidruma vai audu materiāla, un pārvietošanas laikā nodrošinātu sterilitāti, tika izmantots sterils ultraskaņas zondes apvalks, lai izklātu zemādas tuneļa sienas. Jaunais zemādas tunelis un iepriekšējais ar *P. aeruginosa* inficētais tunelis tika skalots ar 250 ml 0,9 % NaCl un tad ar 250 ml 4,2 % NaHCO3, lai apkārtējā vide būtu sārmaina. Piecas minūtes vēlāk katru no tuneļiem skaloja ar 50 ml fāgu suspensijas, kuras sastāvā bija PNM un PT07 fāgi, katrs koncentrācijā 10^7 PFU/ml. Caur jauno zemādas tuneli tika ievietots jauns modulārais kabelis, kas jau bija savienots ar LVAD kontrolierīci. Notika īslaicīga iekārtas atslēgšana, lai atvienotu veco un pievienotu jauno kabeli LVAD iekārtai. Pārliecinoties, ka pacients ir hemodinamiski stabils un LVAD darbojas, kabelis tika ievietots jaunajā zemādas kanālā. Fāgu lokālai ievadīšanai jaunajā tunelī tika ievietots arī 8-FR katetrs. Brūce tika atstāta vaļēja sekundārai dzīšanai (2.14. E attēls).

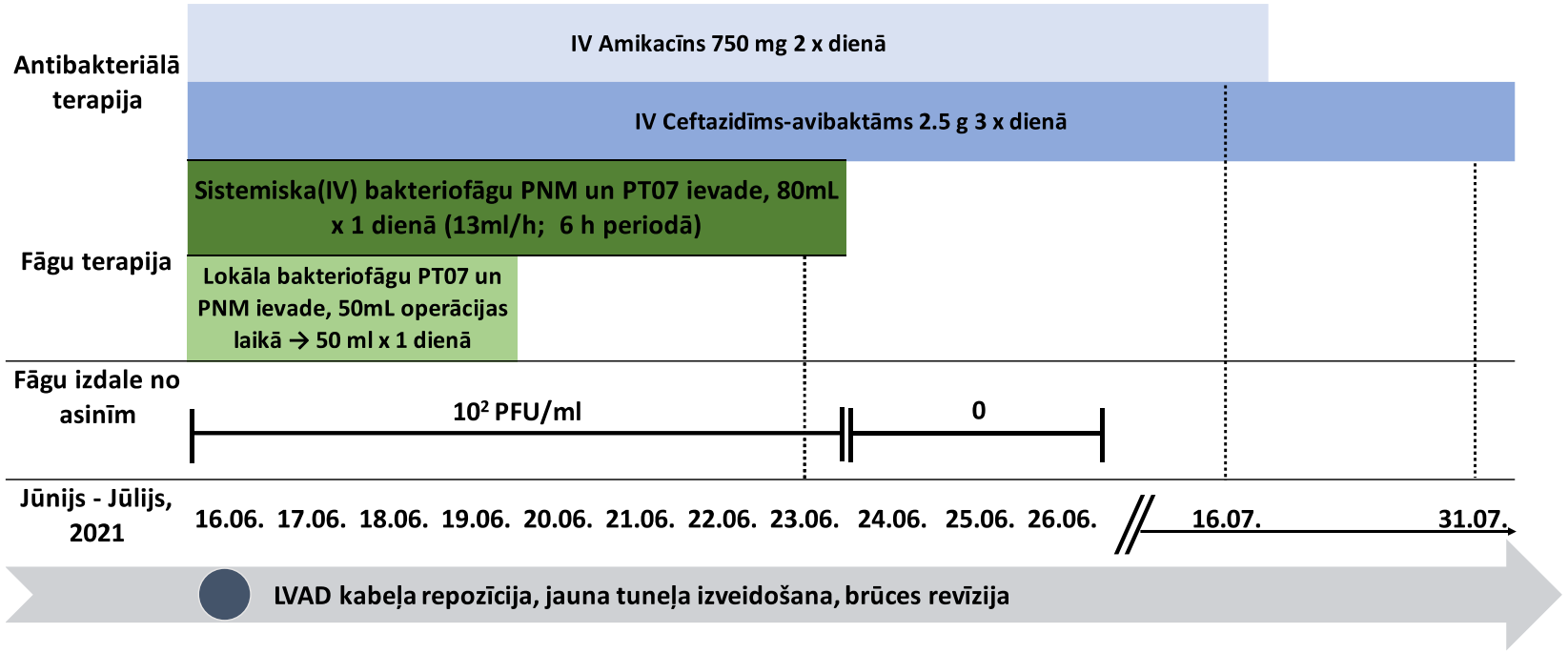
Divas stundas pirms operācijas, izmantojot infūzijas sūkni ar ātrumu 13 ml/h, sešas stundas caur centrālo venozo katetru tika ievadīti 80 ml PNM un PT07 fāgi, katra fāga koncentrācija bija 10^7 PFU/ml. Šāda intravenoza fāgu terapija tika turpināta kopumā astoņas dienas. Nākamajā dienā pēc operācijas tika veikta lokāla 50 ml PNM un PT07 fāgu ievade, izmantojot 8-FR iepriekš ievietoto katetru. Lokāla fāgu terapija tika turpināta trīs dienas. Pirms lokālas fāgu lietošanas brūci skaloja caur katetru ar 250 ml 0,9 % NaCl un tad ar 250 ml 4,2 % NaHCO3. Divas stundas pirms operācijas tika uzsākta arī intravenoza antibiotiku terapija ar ceftazidīmu/avibaktāmu 2,5 g trīs reizes dienā un amikacīnu 750 mg divas reizes dienā. Amikacīnu turpināja lietot četras nedēļas, bet ceftazidīmu/avibaktāmu sešas nedēļas (skatīt 2.15. attēlu). Visos ņemtajos intraoperatīvajos brūču uzsējumos izauga *P. aeruginosa* (2.8. tabula). Pacientam tika veikta regulāra (katru dienu) brūces pārsiešana un iztriepju bakterioloģiskā izmeklēšana, kurā baktēriju augšanu nekonstatēja. Sešas dienas pēc operācijas

brūce bija bez iekaisuma pazīmēm un tā tika slēgta. Fāgu terapijas laikā nevēlamas blakusparādības, kā slikta dūša, febrilitāte, izsitumi un citas, netika novērotas, kā arī aknu un nieru bojājumu marķieri saglabājās normas robežā. Fāgu titrs slimnieka asinīs bija stabils septiņas ārstēšanas dienas pēc kārtas, respektīvi, 10^2 PFU/ml. Fāgu klātesamību asinīs vairs nevarēja noteikt, sākot ar pirmo dienu pēc fāgu ievades pārtraukšanas (2.15. attēls).

2.4.3. Lietotās terapijas iznākums, ilgtermiņa rezultāts

Sešas nedēļas pēc LVAD kabeļa repozīcijas operācijas pacientam tika veikts atkārtots ^{18}F-FDG PET/CT, kurā vēroja vieglu atlieku metabolu aktivitāti proksimālā kabeļa daļā, kas salīdzinājumā ar iepriekšējo izmeklējumu bija izteikti samazinājusies (2.16. B attēls). Šādas radioloģiskās izmaiņas skaidrojamas ar agrīnu izmeklējuma veikšanu un reaktīvām audu izmaiņām. Brūce vizuāli bija bez iekaisuma pazīmēm, iekaisuma rādītāji bija normas robežā. Pacients tika izrakstīts no stacionāra 45. pēcoperācijas dienā.

Trīsdesmit četras nedēļas pēc kabeļa repozīcijas operācijas tika veikts atkārtots PET/CT, kurā iekaisuma ainu nekonstatēja (2.16. C attēls). Pacients turpina regulāru novērošanos pie ārsta, 21 mēnesi pēc operācijas infekcija nav atkārtojusies (2.14. C attēls).



2.15. attēls. **Saņemtās terapijas un fāgu koncentrācijas rezultāti stacionēšanas epizodē, kad tika izmantota fāgu terapija**

2.16. attēls. **Brūces vizuālās izmaiņas pirms un pēc ārstēšanas, kā arī tās laikā***

* (A) 2021. gada aprīlis, stāvoklis pēc LVAD implantēšanas. Hipermetabolas izmaiņas ādā, zemādā un muskuļos pa LVAD kabeļa gaitu vēdera priekšējā sienā no tās ieejas vārtiem līdz *m. resctus abdominis*, radioloģiskā aina atbilst (visticamāk, hroniskam) iekaisumam. Cita veida patoloģiskas hipermetabolas izmaiņas ne ķermenī, ne citās implantētās ierīcēs vai kabeļos nekonstatē. (B) 2021. gada jūlijs, salīdzinot ar iepriekšējo PET/CT izmeklējumu, hipermetabolas izmaiņas pa LVAD kabeli vērojamas daudz mazākā mērā, tās saglabājas pie *m. rectus abdominis* un zemādā, visticamāk, norāda uz reaktīvām pārmaiņām, kuras saistītas ar nesenu kabeļa repozīciju. (C) 2022. gada februāris, vieglas hipermetabolas izmaiņas pa LVAD kabeļa gaitu, ar niecīgu metabolu aktivitāti un apjomu, iespējams, bez klīniskas nozīmes. Visā ķermeņa izmeklējumā nav saskatāmi citi fokusi, kuri varētu norādīt uz iekaisumu.
Hipermetabolās izmaiņas attēlos ir norādītas ar bultiņām.

2.4.4. *P. aeruginosa*, kura izolēta no pacienta ar LVAD kabeļa infekciju, antibakteriāla un fāgu jutība

Pētījumā tika iekļauti pieci *P. aeruginosa* izolāti. To antibakteriālā jutība laika gaitā bija mainīga, saglabājot plašu antibakteriālo rezistenci. Pirms tika izmantota bakteriofāgu terapija, to jutība tika noteikta izolātam PA03, kurš tika iegūts no izdalījumiem no LVAD izejas atveres. Tālākiem *in vitro* testiem tika izmantots PAP01 izolāts, kurš tika iegūts, kultivējot materiālu no LVAD kabeļa velūra, kas tika noņemts operācijas laikā. Iegūtie rezultāti parāda, ka fāgu jutība, izmantojot divkāršo agara punktu metodi, bija ar mērenu līzi PT07 un ar daļēju līzi PNM fāgam. Savukārt, vērtējot EOP PT07 fāgam, izmantojot abus izolātus, tas bija 0,1, bet PNM fāgam, izmantojot PA03 – 0,001, PAP01 – 0,0005. Rezultāti liecina, ka PNM fāga lītiskais efekts bija izteiktāks un tas bija virulentāks pret pacienta *P. aeruginosa* izolātiem, savukārt PNM bija mazāk virulents un tā lītiskais efekts, vērtējot EOP rezultātus, dinamikā pret jaunāko no izolātiem (PAP01) samazinājās. Rezultāti ir atspoguļoti 2.8. tabulā.

2.8. tabula

Antibakteriālās un fāgu jutības rezultāti *P. aeruginosa* izolātiem pacientam ar LVAD kabeļa infekciju

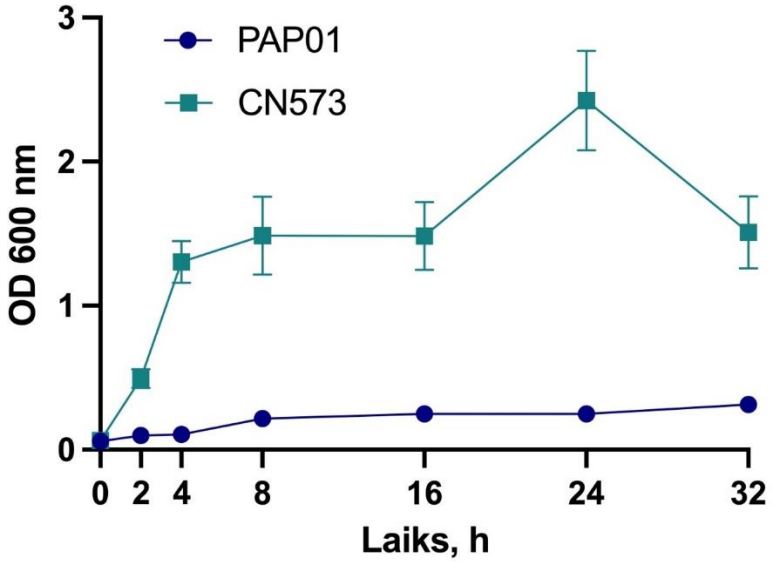
Izolāta veids	CN573	PA01	PA02	PA03	PAP01	PAP02
	Fāga saimniek-kultūra	Izdalījumi no LVAD kabeļa izejas atveres	Izdalījumi no LVAD kabeļa izejas atveres	Izdalījumi no LVAD kabeļa izejas atveres	Velūrs no LVAD kabeļa	Velūrs no LVAD kabeļa
Izolēšanas laiks	–	04/10/20	05/03/21	19/04/21	16/06/21	16/06/21
AMK	S (MIC ≤ 4)	S	S	S	S (MIC ≤ 4)	S (MIC ≤ 4)
FEP	I (MIC = 4)	N/A	N/A	N/A	I (MIC = 2)	I (MIC = 4)
CAZ	I (MIC = 2)	I	R	I	I (MIC = 2)	I (MIC = 2)
CAZ/AVI	S (MIC ≤ 1)	N/A	N/A	N/A	S (MIC ≤ 1)	S (MIC ≤ 1)
CIP	I (MIC = 0,25)	I	R	R	I (MIC = 0,25)	I (MIC = 0,25)
CST	S (MIC = 2)	N/A	S	S	S (MIC ≤ 1)	S (MIC = 2)
FOF	R (MIC > 128)	R (MIC > 128)	R (MIC > 128)	N/A	R (MIC > 128)	R (MIC > 128)
IPM	I (MIC ≤ 1)	I	R	R	I (MIC ≤ 1)	I (MIC ≤ 1)
MEM	S (MIC = 1)	S	R	I	S (MIC ≤ 0,125)	S (MIC = 1)

2.8. tabulas turpinājums

Izolāta veids	CN573	PA01	PA02	PA03	PAP01	PAP02
	Fāga saimniek-kultūra	Izdalījumi no LVAD kabeļa izejas atveres	Izdalījumi no LVAD kabeļa izejas atveres	Izdalījumi no LVAD kabeļa izejas atveres	Velūrs no LVAD kabeļa	Velūrs no LVAD kabeļa
TOB	S (MIC = 0,5)	N/A	R	R	S (MIC = 0,5)	S (MIC = 0,5)
TZP	I (MIC = 8)	I	R	I	I (MIC = 4)	I (MIC = 8)
PNM fāgs	++++	N/A	N/A	++ EOP = 0,001	++ EOP = 0,0005	N/A
PT07 fāgs	++++	N/A	N/A	+++ EOP = 0,1	+++ EOP = 0,1	N/A

2.4.5. *P. aeruginosa* PAP01 un CN573 biofilmas veidošanas spēja

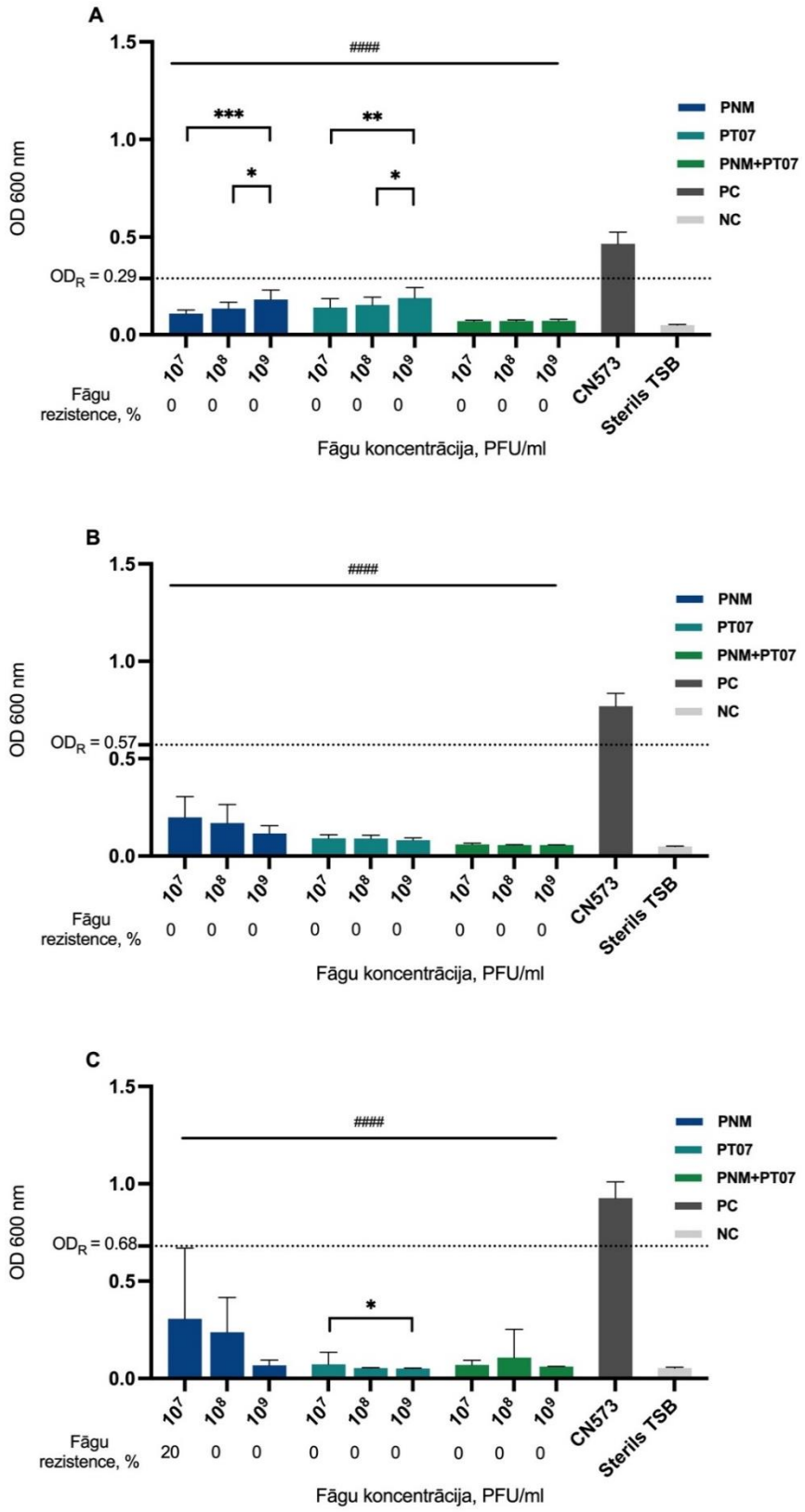
No pacienta izolētā PAP01 kultūra bija vāja biofilmas veidotāja visā 32 stundu inkubācijas periodā. Savukārt CN573 references celms bija spēcīgs biofilmas veidotājs, tas spēja veidot izteiktu biofilmu jau divas inkubācijas stundā. Salīdzinot abu celmu biofilmas veidošanas spējas visos laika periodos, kad tika veikti mērījumi, tās bija statistiski atšķirīgas, $p < 0,0001$ (2.17. attēls).



2.17. attēls. **PAP01 un *P. aeruginosa* references celma CN573 biofilmas veidošanas spēja 32 h periodā**

2.4.6. Bakteriofāgu efekts planktoniskās un biofilmu veidojošās šūnās, bakteriofāgu rezistences attīstība CN573 kultūrā

Biofilmas eradikācijas modelī fāgiem pret CN573 kultūru tika novērots statistiski ticams lītiskais efekts planktoniskās šūnas pēc 12 un 24 h, kā arī biofilmas eradikācijā jeb biofilmu veidojošās baktērijas šūnās (2.18. attēls). Rezultāti arī atspoguļo, ka fāgu lītiskais efekts planktoniskās šūnās pēc 12 h inkubācijas bija mazāk izteikts, izmantojot lielākas fāgu koncentrācijas PNM un PT07 fāgiem. Savukārt pēc 24 h planktonisko šūnu inkubācijas un biofilmas eradikācijā šādu sakarību nevēroja. Izmantojot abu fāgu kombinācijas, vērojama lītiskā efekta pastiprināšanas tendence, īpaši planktonisko šūnu līze. Lītiskā efekta un biofilmas eradikācijas efekta atšķirības, izmantojot abu fāgu kombinācijas, netika novērotas starp dažādām to koncentrācijām. Fāgu rezistences attīstība tika vērota tikai biofilmas eradikācijas laikā pret fāgu PNM tā koncentrācijā 10^7 PFU/ml (2.18. attēls).



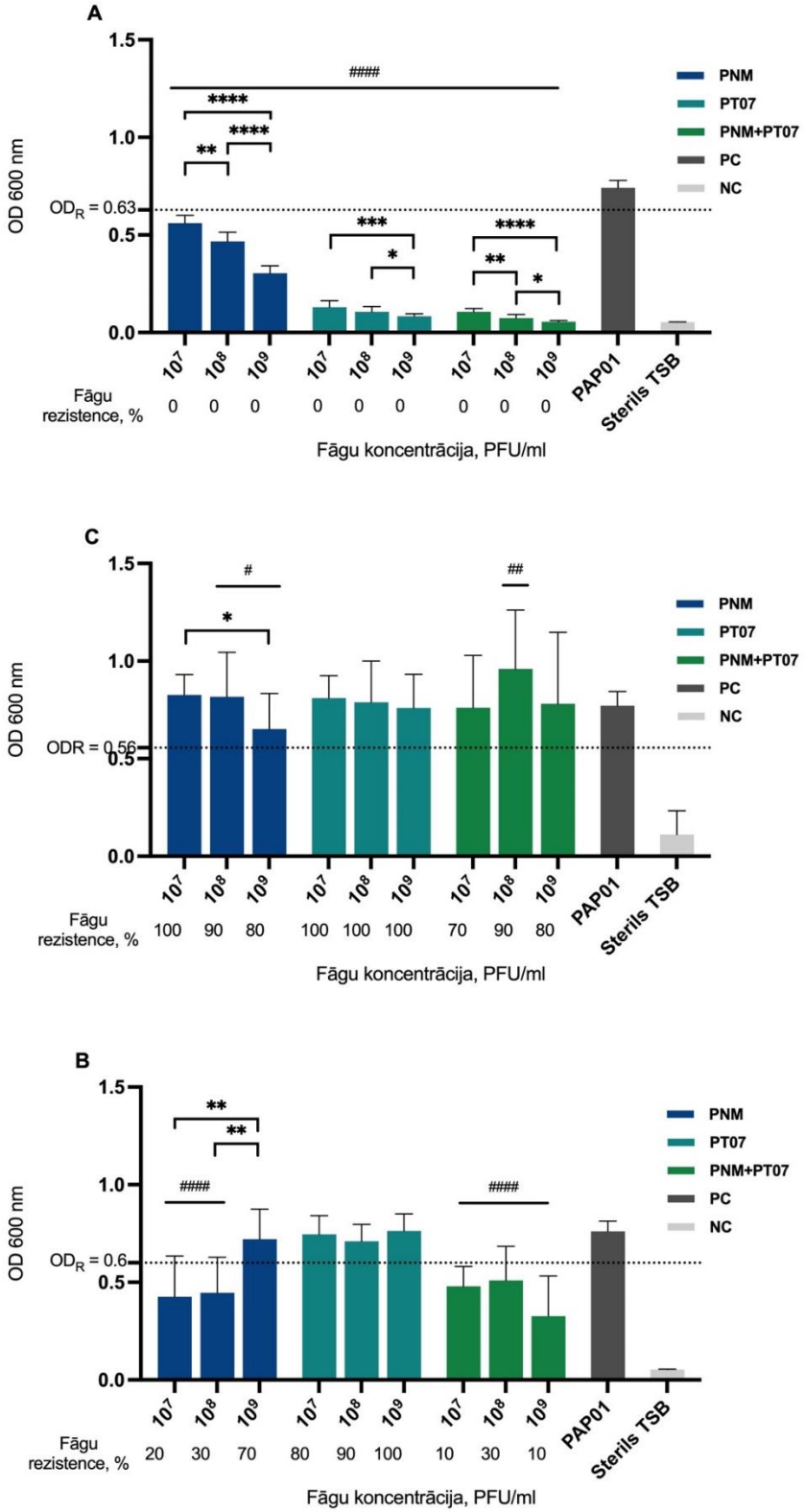
2.18. attēls. **PNM, PT07 un to kombinācijas MIC un MBEC CN573 celmā***

* Stabiņi atspoguļo baktēriju vidējo OD vērtību + SD, izmantojot dažādas fāgu koncentrācijas (mērīta 600 nm). Fāgu procentuālā rezistence ir atspoguļota zem katra grafika. (A) MIC12; (B) MIC24; (C) MBEC; PC – pozitīvā kontrole, CN573 kultūra atsevišķi; NC – negatīvā kontrole, sterils TSB; OD_R – aprēķinātā bakteriofāgu rezistences robežvērtība. Stabiņi, kuriem ir tēmtura zīme (#), norāda uz statistiski ticamu atšķirību pret pozitīvo kontroli, stabiņi, kuriem ir zvaigznīte (*), norāda uz statistiski ticamu atšķirību starp viena fāga vai fāgu kombinācijas dažādām koncentrācijām; */# p vērtība < 0,05, **/## p vērtība < 0,01, ***/### p vērtība < 0,001 un ****/#### p vērtība < 0,0001.

2.4.7. Bakteriofāgu efekts planktoniskās un biofilmu veidojošās šūnās, bakteriofāgu rezistences attīstība PAP01 kultūrā, izmantojot biofilmas eradikācijas modeli

Izmantojot PAP01 izolātu, tika vērots, ka tikai fāgs PNM koncentrācijā 10^9 PFU/ml spēja samazināt biofilmas veidošanos nelielā apmērā (2.19. attēls). Pārējos gadījumos, lietojot PNM, PT07 un to kombinācijas dažādās koncentrācijās, biofilmas eradikāciju nevēroja. Planktonisko šūnu augšana pēc 12 h samazinājās, izmantojot visus fāgus visās to koncentrācijās. Savukārt pēc 24 h nozīmīgs lītiskais efekts bija vērojams tikai PNM fāgam koncentrācijā no 10^7 līdz 10^8 PFU/ml un fāgu kombinācijai visās testētajās koncentrācijās (2.19. B attēls). Visos gadījumos pēc 12 h fāgu lītiskais efekts planktoniskās šūnās bija labāks, izmantojot lielākas fāgu koncentrācijas, izņemot PT07 fāga koncentrācijās 10^7 un 10^8 PFU/ml. Šādu sakarību nevēroja, nosakot fāgu lītisko efektu 24 h pēc inkubācijas planktoniskās šūnās, atsevišķos gadījumos pat tika novērota pretēja sakarība, proti, fāgu efekts bija labāks, izmantojot mazākas koncentrācijas – 10^7 pret 10^9 PFU/ml un 10^8 pret 10^9 PFU/ml.

Fāgu rezistence tika novērota visos gadījumos pēc 24 h inkubācijas, tā bija mazāk izteikta, izmantojot PNM un PT07 kombinācijas. Izmantojot PT07 fāgu visās tā koncentrācijās un PNM fāgu 10^7 PFU/ml, fāgu rezistence bija 100 % (2.19. C attēls).



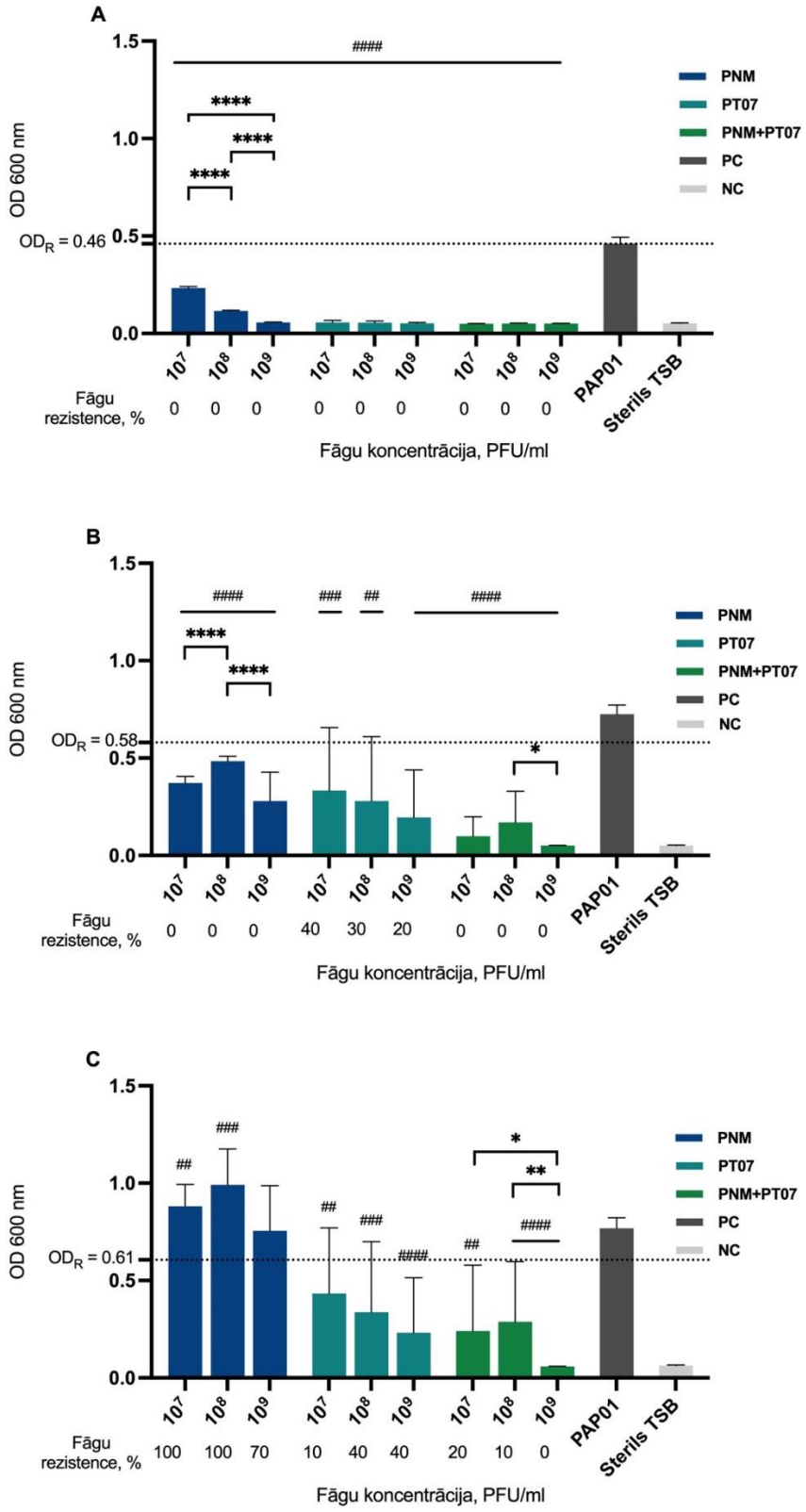
2.19. attēls. **PNM, PT07 un to kombinācijas MIC un MBEC PAP01 izolātā – biofilmas eradikācijas modelis***

* Stabiņi atspoguļo baktēriju vidējo OD vērtību + SD, izmantojot dažādas fāgu koncentrācijas (mērīta 600 nm). Fāgu procentuālā rezistence ir atspoguļota zem katra grafika. (A) MIC12; (B) MIC24; (C) MBEC; PC – pozitīvā kontrole, PAP01 kultūra atsevišķi; NC – negatīvā kontrole, sterils TSB; OD_R – aprēķinātā bakteriofāgu rezistences robežvērtība. Stabiņi, kuriem ir tēmtura zīme (#), norāda uz statistiski ticamu atšķirību pret pozitīvo kontroli, stabiņi, kuriem ir zvaigznīte (*), norāda uz statistiski ticamu atšķirību starp viena fāga vai fāgu kombinācijas dažādām koncentrācijām; */# p vērtība < 0,05, **/## p vērtība < 0,01, ***/### p vērtība < 0,001 un ****/#### p vērtība < 0,0001.

2.4.8. Bakteriofāgu efekts planktoniskās un biofilmu veidojošās šūnās, bakteriofāgu rezistences attīstība PAP01 kultūrā, izmantojot biofilmas profilakses modeli

Bakteriofāgu PNM, PT07 un to kombinācijas spēja profilaktiski inhibēt biofilmas veidošanos tika noteikta, izmantojot tās pašas fāgu koncentrācijas, kuras lietoja biofilmas eradikācijas modelī. Rezultāti atspoguļo, ka PNM fāgam un tā kombinācijai ar PT07 fāgu tika novērota biofilmas veidošanās inhibīcija visās izmantotajās fāga koncentrācijās. Savukārt PNM fāgam netika novērota spēja ierobežot biofilmas veidošanos, gluži pretēji, atsevišķās tā koncentrācijās 10^7 un 10^8 PFU/ml vēroja biofilmas biomasas pieaugumu. Līdzīgs efekts planktoniskās šūnās tika vērots visiem fāgiem gan 12 h, gan 24 h pēc inkubācijas.

Bakteriofāgu rezistence attīstījās, izmantojot visus fāgus baktēriju biofilmās, to nevēroja PNM un PT07 fāgu kombinācijai 10^9 PFU/ml koncentrācijā, savukārt PNM fāga koncentrācijās 10^7 un 10^8 PFU/ml tā sasniedza 100 %. Planktoniskās šūnās rezistence attīstījās tikai pēc 24 h inkubācijas un tikai PT07 fāgam (2.20. attēls).



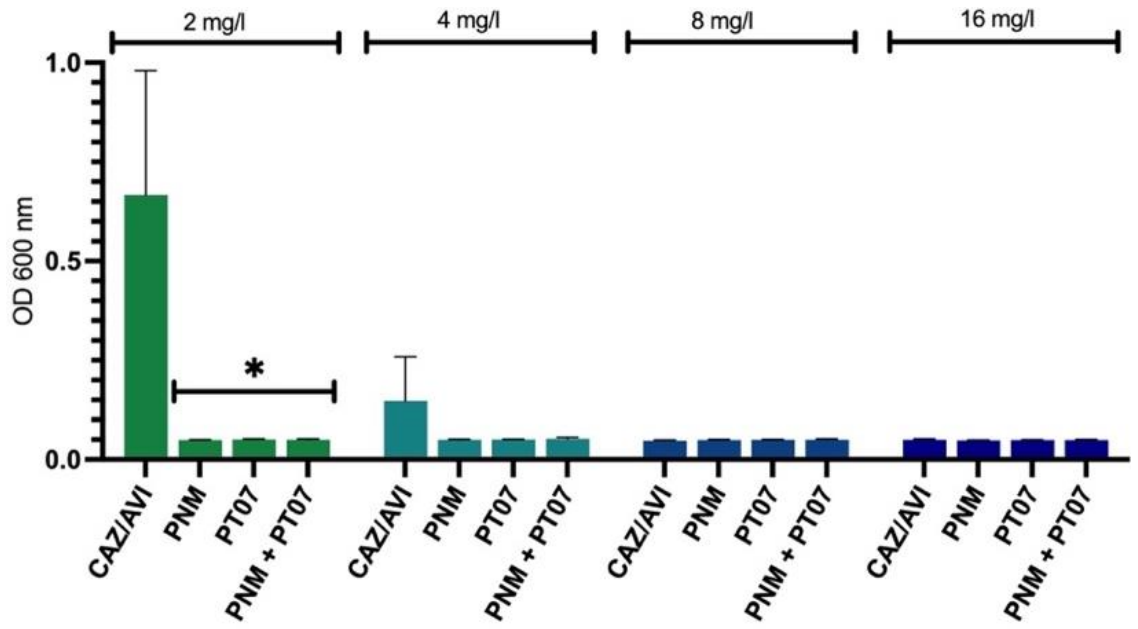
2.20. attēls. **PNM, PT07 un to kombinācijas MIC un BPC PAP01 izolātā – biofilmas profilaktiskais modelis***

* Stabiņi atspoguļo baktēriju vidējo OD vērtību + SD, izmantojot dažādas fāgu koncentrācijas (mērīta 600 nm). Fāgu procentuālā rezistence ir atspoguļota zem katra grafika. (A) MIC12; (B) MIC24; (C) BPC; PC – pozitīvā kontrole, PAP01 kultūra atsevišķi; NC – negatīvā kontrole, sterils TSB; OD_R – aprēķinātā bakteriofāgu rezistences robežvērtība. Stabiņi, kuriem ir tēmtura zīme (#), norāda uz statistiski ticamu atšķirību pret pozitīvo kontroli, stabiņi, kuriem ir zvaigznīte (*), norāda uz statistiski ticamu atšķirību starp viena fāga vai fāgu kombinācijas dažādām koncentrācijām; */# p vērtība < 0,05, **/## p vērtība < 0,01, ***/### p vērtība < 0,001 un ****/#### p vērtība < 0,0001.

2.4.9. Bakteriofāgu un antibiotiku mijiedarbība planktonisku šūnu līzē un biofilmas eradikācijā, izmantojot sākotnēji fāgus un tad antibiotikas

Izmantojot biofilmas eradikācijas modeli, kurā sākotnēji CN573 kultūra tiek pakļauta fāgu PNM, PT07 vai to kombinācijas iedarbībai 10^7 PFU/ml 12 h un tad terapeitiskais līdzeklis mainīts uz ceftazidīmu/avibaktāmu vēl 12 h inkubācijai, tika novērots, ka fāgu un antibiotiku kombinācijai bija statistiski ticama atšķirība ($p < 0,05$) biofilmas modelī, salīdzinot ar antibiotiku vienu pašu 24 h garumā.

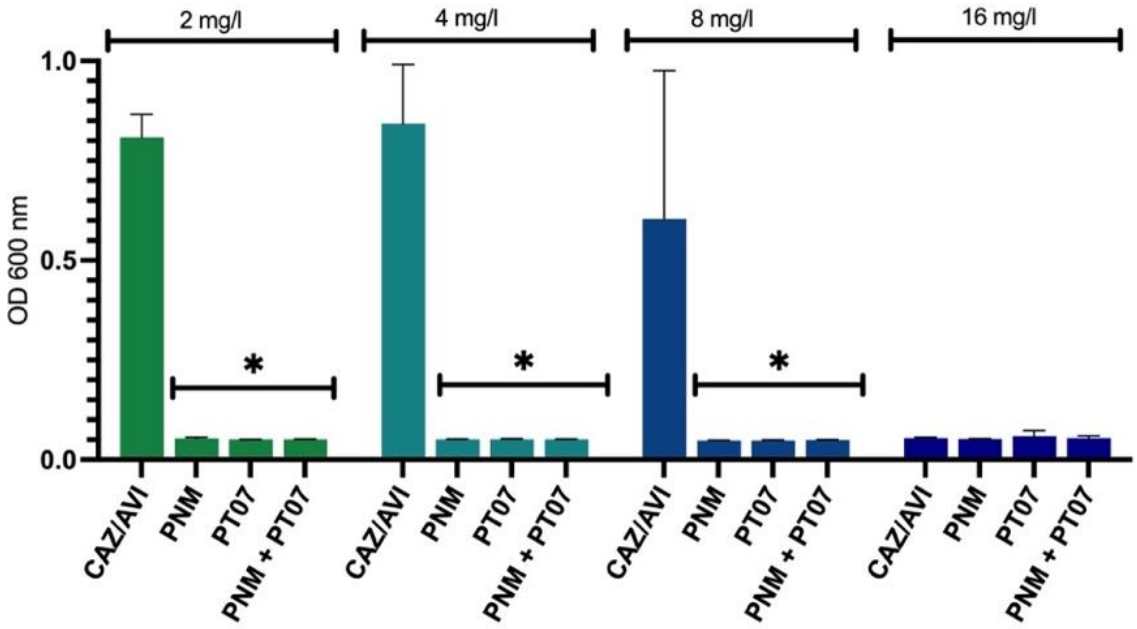
Planktoniskās šūnās ceftazidīms/avibaktāms viens pats nespēja iznīcināt CN573, izmantojot tā koncentrāciju 2 mg/L. Izmantojot lielākas ceftazidīma/avibaktāma koncentrācijas, CN573 planktoniskās šūnas tika iznīcinātas. Lietojot fāgus pirmās 12 h un tad terapiju mainot uz 12 h ceftazidīma/avibaktāma iedarbību, vēroja, ka baktēriju iznīcināšana notika jau 2 mg/L koncentrācijā. Šis rezultāts norāda uz fāgu un ceftazidīma/avibaktāma aditīvo mijiedarbību (2.21. attēls).



2.21. attēls. **CN573 planktonisko šūnu augšana, izmantojot 12 h fāgu iedarbību, pēc tam 12 h ceftazidīma/avibaktāma iedarbību – biofilmas eradikācijas modelī***

* CAZ/AVI atspoguļo pozitīvo kontroli, kurā ceftazidīms/avibaktāms tika izmantots viens pats (12 h inkubācija pirmajā platē, pēc tam 12 h inkubācijas otrajā platē). Stabiņi atspoguļo CN573 vidējo OD vērtību + SD, izmantojot dažādas fāgu koncentrācijas (mērīta 600 nm). Ar zvaigznīti (*) ir atzīmētas statistiski ticamas atšķirības starp fāgiem un pozitīvo kontroli ($p < 0,05$).

Vērtējot fāgu un ceftazidīma/avibaktāma mijiedarbības ietekmi uz CN573 noformētas biofilmas eradikāciju, vēroja sinerģistisku efektu visās izmantotajās antibiotikas koncentrācijās, kur antibiotika viena pati nespēja iznīcināt baktēriju šūnas biofilmā. Rezultāti liecina, ka sinerģija, lai iznīcinātu biofilmu, pastāv, izmantojot vispirms fāgus 12 h inkubācijai un tad mainot terapeitisko līdzekli uz antibiotiku atlikušo 12 h iedarbībai (2.22. attēls).



2.22. attēls. **CN573 biofilmas augšana, izmantojot 12 h fāgu iedarbību, pēc tam 12 h ceftazidīma/avibaktāma iedarbību – biofilmas eradikācijas modelī***

* CAZ/AVI atspoguļo pozitīvo kontroli, kurā ceftazidīms/avibaktāms tika izmantots viens pats (12 h inkubācija pirmajā platē, pēc tam 12 h inkubācijas otrajā platē). Stabiņi atspoguļo CN573 vidējo OD vērtību + SD, izmantojot dažādas fāgu koncentrācijas (mērīta 600 nm). Ar zvaigznīti (*) ir atzīmētas statistiski ticamas atšķirības starp fāgiem un pozitīvo kontroli ($p < 0,05$).

2.4.10. Bakteriofāgu jutības izmaiņas PAP01 kloniem, kuri izdalīti no MIC, MBEC un BPC mikroplašu modeļiem

Tika noteikta mainīga fāgu jutība PAP01 kloniem, kurus izolēja no 22 dažādām mikroplates bedrītēm, kuras izmantoja biofilmas eradikācijas un biofilmas profilakses modeļos. Vienā gadījumā baktērijas no plates neizauga. Četrpadsmit gadījumos no 21 vēroja fāgu jutības samazināšanos pret izmantoto fāgu, savukārt 7 no 21 gadījuma fāgu jutība izolētajiem kloniem nebija mainījusies, salīdzinot ar sākotnēji izmantoto PAP01 izolāta fāgu jutību. Biofilmas eradikācijas modelī fāgu jutības izmaiņas vēroja retāk nekā biofilmas profilakses modelī. Rezultāti atspoguļoti 2.9. tabulā.

2.9. tabula

Bakteriofāgu jutības izmaiņas PAP01 kloniem, kuri izdalīti no MIC, MBEC un BPC mikroplašu modeļiem

	N	Rezistences noteikšanas laiks, h	Fāgs un tā koncentrācija mikroplates bedrītē	$OD_{attiecība}$	PNM jutība	PT07 jutība	Fāgu jutības izmaiņas
Biofilmas eradikācijas modelis	1	12	PT07, 10^7	0,32	N/D	+++	Bez mainības
	2	12	PT07, 10^8	0,25	N/D	++	Jutība samazinājās
	3	12	PNM, 10^7	0,94	+	N/D	Jutība samazinājās
	4	24	PT07, 10^7	1,53	N/D	+++	Bez mainības
	5	24	PNM, 10^9	1,54	++	N/D	Bez mainības
	6	24	PT07 + PNM, 10^8	1,12	–	++	Jutība samazinājās
	7	24	PT07 + PNM, 10^9	0,10	–	+++	Jutība samazinājās
	8	46	PT07, 10^7	1,54	N/D	+++	Bez mainības
	9	46	PNM, 10^8	1,85	++	N/D	Bez mainības
	10	46	PT07 + PNM, 10^8	2,32	–	–	Jutība samazinājās
Biofilmas profilakses modelis	11	24	PT07, 10^7	1,31	N/D	++	Jutība samazinājās
	12	24	PT07, 10^8	1,41	N/D	++	Jutība samazinājās
	13	24	PT07, 10^8	0,09	Baktērijas neizauga		
	14	24	PNM, 10^8	0,84	–	N/D	Jutība samazinājās
	15	24	PT07 + PNM, 10^7	0,45	–	++	Jutība samazinājās
	16	24	PT07 + PNM, 10^8	0,71	–	–	Jutība samazinājās
	17	46	PT07, 10^7	1,29	N/D	+++	Bez mainības
	18	46	PT07, 10^7	0,77	N/D	++	Jutība samazinājās
	19	46	PT07, 10^8	1,24	N/D	++	Jutība samazinājās
	20	46	PNM, 10^9	0,72	–	N/D	Jutība samazinājās
	21	46	PT07 + PNM, 10^7	0,33	+	+++	Jutība samazinājās
	22	46	PT07 + PNM, 10^8	0,33	++	+++	Bez mainības

N/D, netika noteikts; rezistences noteikšanas laiks ir 96 bedrīšu mikroplates inkubēšanas laiks, no kuras tika ņemtas baktēriju kultūras to augšanas noteikšanai; $OD_{attiecība}$, $OD_{bedrīte}$ attiecība pret OD_R; $OD_{bedrīte}$, mikroplates bedrītes OD vērtība mērīta 600 nm, no kuras izdalīts PAP01 klons; OD_R, aprēķinātā vidējā OD rezistences robežvērtība, mērīta 600 nm;+++, daļēja līze; ++, vāja līze; +, individuāli plaki; –, līzi nevēro.

3. Diskusija

Promocijas darbs veltīts tēmai par bakteriofāgu iespējamo lietojumu multirezistentu ar biofilmu asociētu infekciju apkarošanā dažādās klīniskās situācijās, kur šīs problēmas ir īpaši aktuālas, kā implantējamo ierīču infekcijas (PD katetri, LVAD), smagu kaulu un mīksto audu bojājuma gadījumā, tā arī pacientiem ar riska faktoriem (imūnsupresija, strukturālas un/vai fizioloģiskas audu izmaiņas).

Pēdējos gados pieaug multirezistentu mikroorganismu infekciju izplatība, savukārt efektīvu antimikrobiālo līdzekļu kļūst mazāk. Viena no alternatīvām ir bakteriofāgu izmantošana infekciju gadījumā, kas tiek pētīta arvien vairāk. Infekcijas, kuru gadījumā baktērijas ir rezistentas pret šobrīd plaši lietotiem antibakteriāliem līdzekļiem, aizvien biežāk sastopamas klīniskā praksē.

Bakteriofāgi jeb fāgi ir baktēriju vīrusi, kuriem piemīt unikāla spēja inficēt baktērijas un tās iznīcināt. Katrai baktērijai ir savs fāgs. Lītiskie fāgi ir izplatīti apkārtējā vidē, un tie nespēj inficēt ne cilvēka, ne dzīvnieka šūnas. Šo specifisko īpašību dēļ bakteriofāgi ir potenciāls līdzeklis cīņā ar bakteriālām infekcijām, īpaši tādām, kuras nav iespējams ārstēt ar antibiotikām. Bakteriofāgu terapija kā alternatīva infekciju ārstēšanā ir iekļauta Eiropas Savienības antimikrobiālās rezistences ierobežošanas plānā.

Veiktie pētījumi par bakteriofāgu efektu multirezistentās infekcijās norāda uz to potenciālu, tomēr nav skaidras atbildes par fāgu mijiedarbību šo baktēriju veidotajās biofilmās. Tāpat trūkst klīnisko datu, lai droši un efektīvi varētu izmantot bakteriofāgus pacientu ārstēšanā.

Bakteriofāgu efekts *S. aureus* kultūrās peritoneālās dialīzes pacientiem

Pētījumā tika noskaidrota *S. aureus* kolonizācijas klīniskā nozīme pacientiem ar PD, vērtēta izolātu antimikrobiālā jutība, biofilmu veidošanas spēja un fāgu *in vitro* jutība. Rezultāti atspoguļoja dažādu komerciāli pieejamu bakteriofāgu plašo lītisko aktivitāti, norādot uz izteiktu fāgu antimikrobiālo iedarbību pret izolētajām *S. aureus* kultūrām.

Mūsdienās ir būtiska jaunu antimikrobiālo līdzekļu atklāšana un ieviešana, tos varētu izmantot *S. aureus* infekciju ārstēšanā kā PD, tā citu populāciju pacientiem. *S. aureus* ir viens no izplatītākajiem ar PD saistīta peritonīta un PD izejas atveres infekciju ierosinātājiem (7–11). Tā spēcīgā virulences profila un biofilmu veidošanās spējas dēļ PD pacientiem ir augsts peritonīta recidīvu, PD katetra izņemšanas un nāves risks (12–14). Pētījuma rezultāti norādīja, ka nāves relatīvais risks *S. aureus* nēsātāju grupā bija 2,33 reizes lielāks, kas liecina par sliktāku vispārējo prognozi *S. aureus* nēsātājiem, tāpat kā citos pētījumos (9, 12). Interesanti, ka netika konstatēts biežāks peritonītu vai *S. aureus* izraisīta peritonīta skaits nēsātāju grupā, ko varētu

skaidrot ar salīdzinoši mazo pētījuma grupu. Kopējais peritonīta biežums visiem PD pacientiem bija 0,35 uz pacientu gadā, kas ir līdzīgs citu Ziemeļeiropā veikto pētījumu datiem, kuros tika pētītas lielākas kohortas (52).

PD pacientiem *S. aureus* kolonizācija ir viens no endogēnās infekcijas avotiem, tāpēc Starptautiskās Peritoneālās dialīzes asociācijas vadlīnijās ir ieteikta ilgtermiņa lokāla antibakteriālo līdzekļu mupirocīna lietošana, taču vairākās valstīs tas netiek veikts, lai izvairītos no iespējamas *S. aureus* rezistences attīstības (11, 53). Iegūtie rezultāti par *S. aureus* izolēšanu no deguna dobuma, cirkšņa rajona un PD katetra izejas atveres parādīja, ka PD pacientu vidū kolonizācija ir 30 % (n = 21), kas ir līdzīgi, bet nedaudz vairāk nekā līdzīgos pētījumos (54). Kolonizācija tika konstatēta dažādās izolācijas vietās, galvenokārt deguna dobumā (n = 18), bet arī cirkšņa rajonā (n = 11) un ap PD katetra izejas atveri (n = 5). Neviens no izolētajiem *S. aureus* nebija MRSA.

Pozitīvs vai lītisks bakteriofāga efekts tika konstatēts pret visiem *S. aureus* (n = 71) izolātiem, izmantojot *Eliava* (*Pyo, Ses, Fersisi, Enko, Intesti*) un *Microgen* (*Pyobacteriophag*) komerciāli pieejamos bakteriofāgu kokteiļus, savukārt, izmantojot *Eliava* stafilokoku bakteriofāga preparātu, rezistences biežums vai lītiska efekta neesamība bija 26 % (n = 9). Visbiežāk novērotā pozitīvā fāgu lītiskā efekta veids bija daļēja līze, kas izolātu vidū bija no 56 % līdz 100 %, izmantojot dažādus bakteriofāgu preparātus. Iegūtie rezultāti par plašo fāgu lītisko efektu (100 %) visiem, izņemot *Eliava* stafilokoku bakteriofāga preparātam, varētu būt saistīti arī ar iespējami mazu ģenētisko *S. aureus* izolātu daudzveidību pētītajā populācijā (55). Baktēriju rezistences vai vāja lītiskā efekta gadījumā, izmantojot *Eliava* stafilokoku bakteriofāga preparātu, tika veikta adaptācijas procedūra jeb saimniekbaktēriju spektra paplašināšana. Adaptācijas rezultātā tika novērota izteikta bakteriofāgu lītiskā efekta pastiprināšanās, kas rezultējās ar 100 % lītisko aktivitāti izmantotajos *S. aureus* izolātos. Deviņiem izolātiem, kuri bija rezistenti pret izmantoto fāgu, adaptācija rezultējās ar rezistences pārvarēšanu un pozitīvu lītisko efektu; diviem izolātiem sākotnēji vājais fāgu lītiskais efekts pastiprinājās no atsevišķiem plakiem (+) līdz vājai līzei (++). Fāgu adaptācijas princips galvenokārt ir saistīts ar spontānām mutācijām un iespējamu gēnu rekombināciju starp ģenētiski atšķirīgiem bakteriofāgiem vīrusa kokteiļa ietvaros. Šādu izmaiņu rezultātā mainās strukturālie gēnu produkti, piemēram, fāgu astes proteīni, kas nepieciešami fāga piesaistei pie saimniekšūnas vai adsorbcijai, kas ir pirmais fāga infekcijas solis baktērijā. Adaptācijas process var arī samazināt līzes laiku un palielināt jauno vīrusa kopiju skaitu (56, 57). Nesenie atklājumi par *Eliava* stafilokoku bakteriofāgu preparātu, kas sastāv no *Twort* līdzīgā fāga Sb-1, parādīja, ka pēc adaptācijas procesa fāgu preparātā tika atrasti dažādi tā mutantie varianti, kas rezultējās ar fāga preparāta lītiskā spektra palielināšanos no 87 % līdz 96 %, efektu vērtējot ģenētiski

daudzveidīgos *S. aureus* celmos no ģeogrāfiski dažādiem reģioniem. Interesanti, ka ģenētiskās atšķirības starp oriģinālo jeb sākotnējo Sb-1 fāgu un tā kloniem tika konstatētas fāga genoma hipervariablajā kompleksa atkārtojumu struktūrā, bet adsorbcijas ātrums starp oriģinālo fāgu un tā mutantajiem variantiem bija līdzīgs, no kā var secināt, ka Sb-1 fāga saimniekbaktēriju spektra paplašināšanās mehānisms joprojām nav skaidrs (34). Citā Šveicē veiktā pētījumā tika iegūti līdzīgi rezultāti – pēc *Eliava Pyo* bakteriofāga adaptācijas, izmantojot *E. coli* izolātus no pacientiem ar urīnceļu infekciju, līdzīgais spektrs palielinājās no 65,9 % līdz 92,7 % (58).

Iegūtie rezultāti atspoguļo klīniski nozīmīgu (izteiktu un mērenu) biofilmas veidošanās spēju 91,2 % (n = 31) *S. aureus* izolātiem, kas ir tāpat kā citā pētījumā Brazīlijā, kur, pētot *S. aureus* izolātus PD peritonīta pacientiem, tie biofilmu veidoja 88,7 % (n = 55). Jāatzīmē, ka šajā pētījumā tika izmantota cita biofilmas noteikšanas metode (59), kas norāda, ka kristālvioletā krāsojuma metode 96 bedrīšu mikroplatē var tikt izmantota kā izmaksu efektīva un salīdzinoša metode klīniski nozīmīgu *S. aureus* izolātu biofilmas noteikšanai. Fāgu līdzīgā aktivitāte neatšķīrās dažādās *S. aureus* biofilmu veidošanās pakāpju grupās, kas liecina, ka *S. aureus* biofilmas veidošanās spēja neietekmē fāgu līdzīgo efektu *in vitro* planktoniskās baktēriju šūnās.

S. aureus izolācijas vietai ir būtiska nozīme, lai gan lielākā daļa baktēriju tika izolētas no deguna dobuma, diviem pacientiem *S. aureus* izolēja tikai cirkšņos un vienam tikai PD katetra izejas atveres rajonā. Pacientiem, kuriem *S. aureus* tika izolēts vairākās vietās, to biofilmu veidošanās fenotips bija statistiski atšķirīgs, atspoguļots 2.1. attēlā. *Piechota* et al. publicētā pētījumā, kur tika analizēti 130 dažādi *S. aureus* izolāti, konstatēts, ka to biofilmu producēšanas spēja bija atšķirīga atkarībā no izolācijas vietas, spēcīgi biofilmu producētāji galvenokārt tika konstatēti no traheostomas caurulēm, krēpām, rīkles un deguna (60). Spēcīga biofilmas veidošanās spēja tika konstatēta 56–73 % *S. aureus* izolātu dažādās izolācijas vietās. *S. aureus* biofilmu veidošanā liela nozīme ir papildu gēnu regulatora (agr) *quorum-sensing* sistēmai un starpšūnu adhēzijas (ica) grupas gēniem, kuru aktivitāti ietekmē dažādi vides faktori, tāpēc genotipiskās atšķirības vienas pašas nenosaka biofilmas produkcijas spēju un būtiskāka ir baktēriju biofilmas fenotipiskā analīze identiskos vides apstākļos (60–63). Iegūtie rezultāti par biofilmu veidošanas fenotipu (biofilmas lielumu) un jutību pret fāgiem apstiprina *S. aureus* fenotipisko atšķirību pat viena pacienta ietvaros, $p < 0,01$ (2.1. attēls). Lai gan baktērijas bija fenotipiski atšķirīgas, tas neietekmēja bakteriofāga līdzīgo efektu, kas tika konstatēts vairumam izolātu.

Bakteriofāgu efekts uropatogēnās *E. coli* planktoniskās un biofilmu producējošās šūnās

Pētījuma dati liecina, ka *E. coli,* kas izolētas no pacientiem ar UCI, bieži var veidot biofilmas. Rezultāti parāda, lai gan amoksicilīns/klavulanāts un ciprofloksacīns var veiksmīgi iznīcināt baktēriju planktoniskās šūnās, tie nespēj iznīcināt baktēriju veidotās biofilmas. Rezultāti atspoguļo, ka atšķirībā no antibiotikām, ja bakteriofāgi spēj iznīcināt baktēriju planktoniskās šūnās, tad tie var iznīcināt arī konkrētās baktērijas biofilmu. Situācijās, kad bakteriofāgi sākotnēji uzrādīja vāju iedarbību pret *E. coli* izolātu, fāgus varēja pielāgot, veicot adaptācijas procedūru, tādējādi panākot līdzīgu iedarbību gan planktoniskās, gan biofilmu veidojošās baktēriju šūnās.

E. coli biofilmas veidošana tiek vērota bieži (64–67), lai gan pētījuma rezultāti liecina, ka baktēriju spēja veidot biofilmu ir ļoti atšķirīga starp uropatogēnajiem *E. coli* izolātiem. Cilvēka organismā baktērijas var piesaistīties audiem un mākslīgām virsmām, piemēram, katetriem un implantiem, veidojot biofilmu (68). Ir pašsaprotami, ka biofilmās esošās baktērijas kā izturīgākas baktēriju formas bieži tiks atrastas pacientu materiālos pacientiem ar riska faktoriem, piemēram, hroniskām blakusslimībām, novājinātu imunitāti un mākslīgām ierīcēm, kā urīnpūšļa ilgkatetriem (69, 70). Līdzīgi rezultāti tika novēroti pētījumā, kur visspēcīgākais biofilmu veidojošais izolāts 01206UR tika iegūts no pacienta ar transplantētu nieri, hronisku nieru slimību, sekundāru hipertensiju un recidivējošām UCI. Tomēr interesanti, ka otrs spēcīgākais biofilmu veidojošais celms 021UR tika izolēts no pacienta ar pielonefrītu, kuram nebija citu blakusslimību. Pētījumā netika pētīti ģenētiskie faktori, kuri nosaka baktēriju biofilmu veidošanos (71, 72), kas būtu svarīgi turpmākos pētījumos, lai pilnībā izprastu baktēriju biofilmas veidošanos apstākļus un ietekmējošos faktorus. Baktēriju celmi ar plašu antibakteriālo rezistenci ne vienmēr ir spēcīgākie biofilmu veidotāji (73, 74). Piemēram, pētījumā aprakstītais ESBL producējošais *E. coli* 01032UR izolāts bija rezistents pret amoksicilīnu, amoksicilīnu/klavulanātu, cefotaksīmu un ceftazidīmu, tomēr, salīdzinot ar citiem izolātiem, tas bija vājš biofilmas veidotājs. Spēcīgākie biofilmu veidotāji bija 021UR un 01206UR, šie izolāti bija rezistenti pret trim antibiotikām. Baktēriju spēja veidot biofilmu jāuzskata par būtisku faktoru infekcijas ārstēšanā. Antibiotiku lietošana parasti ir balstīta to iedarbības analīzē planktoniskās baktēriju šūnās, nepievēršot pietiekamu uzmanību biofilmu veidošanās riskam. Dažas antibiotikas, piemēram, fluorhinoloni, rifampicīns un ampicilīns, labi iekļūst biofilmas struktūrās, lai gan ne vienmēr spēj tās pilnībā iznīcināt, jo šīs antibiotikas lēni difundē cauri biofilmai, kas dod laiku un stimulu baktērijām tikt ilgstoši pakļautām antibiotiku subinhibējošām koncentrācijām. Secīgi, baktēriju šūnas var pielāgoties antibiotiku klātbūtnei, izmantojot metaboliskos vai transkripcijas pielāgošanās veidus (75). Ir pierādījumi, ka

subinhibējošas antibiotiku koncentrācijas var pat veicināt baktēriju biofilmu veidošanos (18, 76). Tāpēc pirms terapijas uzsākšanas no pacienta materiāla izolētajām baktērijām klīniski sarežģītās situācijās būtu jāpārbauda ne tikai jutība pret antibakteriāliem līdzekļiem, bet jānosaka arī bakērijas biofilmas veidošanas spēja.

Amoksicilīns/klavulanāts un ciprofloksacīns ir plaši izplatītas antibiotikas, ko lieto UCI ārstēšanai. Balstoties uz antibakteriālās jutības rezultātiem, baktēriju izolāts 021UR bija rezistents pret amoksicilīnu/klavulanātu, ko apstiprināja arī MIC noteiktā vērtība biofilmas modelī, tāpēc nav pārsteidzoši, ka amoksicilīns/klavulanāts nespēja iznīcināt šī izolāta biofilmu. Atšķirīgi rezultāti tika iegūti izolātam 01206UR, proti, lai gan baktērija bija jutīga pret amoksicilīnu/klavulanātu un MIC vērtība biofilmas modelī sasniegta salīdzinoši zemā koncentrācijā (8 mg/L), biofilmas eradikācijas gadījumā pat maksimālajā koncentrācijā (1024 mg/L) antibiotika nespēja iznīcināt biofilmā esošās baktērijas. Ciprofloksacīnam tika iegūti līdzīgi rezultāti: izolāts 01206UR, kam tika vērota rezistence pret ciprofloksacīnu ar augstu MIC vērtību 128 mg/L biofilmas modelī, nespēja iznīcināt baktērijas biofilmā pat maksimālajā izmantotajā koncentrācijā 1024 mg/L. Ciprofloksacīnam vēroja labākus rezultātus izolātā 021UR: planktoniskās šūnas baktērijas tika iznīcinātas, izmantojot mazas antibiotiku koncentrācijas, MIC vērtība bija 0,25 mg/L, tomēr spēja iznīcināt biofilmu tika vērota, izmantojot daudz lielāku koncentrāciju 64 mg/L, kuru nav iespējams sasniegt cilvēka organismā (77). Lai gan antibiotikas var veiksmīgi iznīcināt planktoniskās baktēriju šūnas, tās bieži nespēj iznīcināt biofilmas, tāpēc biofilmā esošās baktērijas spēj būt noturīgas pret ārstēšanu un var izraisīt infekcijas recidīvu (75).

Reizēm, lai sasniegtu MIC un MBEC vērtības biofilmu modeļos, ir nepieciešams izmantot lielas antibiotiku koncentrācijas (19). Lai sasniegtu atbilstošās antibiotiku koncentrācijas cilvēka organismā, nepieciešams izmantot lielas devas, kas pārsniedz antibiotiku maksimālo pieļaujamo devu un var būt kaitīgas vai pat letālas pacientam. Šādas antibiotikas nenodrošina efektivitāti biofilmu asociētu infekciju ārstēšanā, lai gan tiek vērots to efekts *in vitro*. Pētījuma rezultāti liecina, ka fāgu efekts ir līdzvērtīgs vai pat labāks baktēriju biofilmās (MBEC vērtības) nekā planktoniskās šūnās (MIC vērtības). Visskaidrāk to var novērot, analizējot *Ses* fāga iedarbību pret 021UR izolātu (skatīt 2.8. attēlu), kur vērojams, ka baktēriju inhibīcija, izmantojot vienādas fāga koncentrācijas, ir labāka baktēriju biofilmās esošās šūnās, nevis planktoniskās baktēriju šūnās. To varētu skaidrot ar to, ka fāgi sāk aktīvu replikāciju brīdī, kad baktērijas izkļūst no biofilmas un kļūst metaboliski aktīvas (78). Visi trīs testētie fāgu preparāti spēja inhibēt 021UR izolāta baktēriju biofilmas, savukārt abas vērtētās antibiotikas amoksicilīns/klavulanāts un ciprofloksacīns to nespēja, MBEC vērtība tika sasniegta tikai

64 mg/L koncentrācijā. Rezultāti norāda, ka šajā gadījumā fāgiem ir labāks *in vitro* antibiofilmas efekts salīdzinājumā ar testētajām antibiotikām.

Lai gan abi izolāti 021UR un 01206UR veido spēcīgas biofilmas un ir rezistenti pret vairākām antibiotikām (skatīt 2.6. tabulu), tie joprojām ir jutīgi pret fāgiem. Tas liek secināt literatūrā aprakstītas parādības, ka antibakteriālas rezistences attīstība nav vienlīdz saistīta ar bakteriofāgu rezistenci un fāgu, antibiotiku krusteniskā rezistence nenotiek (79). Kā ierobežojums precīzu fāgu analīzei jāmin, ka pētījumā netika izmantoti atsevišķi fāgi, bet gan komerciāli fāgu kokteiļi. Izmantojot komerciālos fāgu kokteiļus, ir grūti tos pavairot, jo nebija pieejami oriģinālie saimniekorganismu celmi, uz kuriem šie fāgi tika audzēti un pavairoti to ražotnēs.

Atšķirībā no antibiotikām fāgi ir dzīvi vīrusi, un to aktivitāti var ietekmēt dažādi faktori, piemēram, barības vielu daudzums, temperatūra un pH. Tāpēc pētījumu laikā ir ļoti svarīgi nodrošināt atbilstošus augšanas apstākļus un izmantot piemērotas laboratoriskās metodes. Kalgarī biofilmas modelis nodrošina ātrus un atkārtojamus rezultātus, nosakot minimālo biofilmas eradikācijas koncentrāciju (48). Šajā modelī ir iespējams nodrošināt dinamiskus apstākļus un pievienot svaigas barības vielas jau noformētajām biofilmām, un pēc to iznīcināšanas ir iespējams noteikt izdzīvojošo baktēriju šūnu esamību biofilmā, kas piešķir lielāku ticamību pētījumā iegūtajiem rezultātiem.

Katram bakteriofāgam ir savs darbības spektrs. Tāpēc iedarbība pret dažiem baktēriju celmiem var būt vāja vai pat baktērijas var būt pret tiem pilnīgi rezistentas. Viena no iespējām paplašināt fāgu aktivitātes spektru ir izmantot vairāku fāgu kokteiļus, kā tas tika darīts arī šajā pētījumā. Otrs veids, kā uzlabot fāgu aktivitāti, ir veikt fāgu adaptāciju, kas ievērojami var uzlabot to efektivitāti (72, 80), tāpat kā iepriekšējā pētījuma daļā ar *S. aureus* izolātiem. Sākotnēji *Pyobacteriophag* no *Microgen* nespēja inhibēt 01206UR augšanu, bet pēc adaptācijas tika novērots būtisks efekta uzlabojums no vājas līzes (+) līdz pilnīgai baktēriju līzei (+++), līdzīgu rezultātu vēroja biofilmas modelī gan planktoniskās, gan biofilmu veidojošās baktēriju šūnās (skatīt 2.7. attēlu). Komplicētos gadījumos, kad antibiotikām nav vēlamā efekta un fāgu efektivitāte ir zema, adaptācija var būt risinājums, lai iegūtu efektīvu līdzekli infekcijas ārstēšanai.

Bakteriofāgu eksperimentālais lietojums multirezistenta *Pseudomonas aeruginosa* augšstilba osteomielīta ārstēšanā

Smagu mīksto audu un kaulu struktūru bojājumu gadījumā bakteriāla infekcija ir viena no biežākajām komplikācijām, posttraumatisks osteomielīts var attīstīties līdz pat 19 % (81). Antimikrobiālā rezistence rada būtisku risku posttraumatisku infekciju ārstēšanā. Tādi faktori

kā vaļēja kaula lūzuma smaguma pakāpe, piemēram, III pakāpes lūzums pēc Gustilo-Andersona klasifikācijas, un plaši mīksto audu bojājumi ir saistīti ar augstu risku pēcoperācijas infekcijas attīstībai, tās biežums šādu traumu gadījumā variē no 4 līdz 52 % (82, 83). Būtiski, ka arvien biežāk tiek novērots gramnegatīvo baktēriju un polimikrobiālās floras ierosinātāju biežums, īpaši III pakāpes vaļēju lūzumu gadījumā, kas ir saistīts ar sliktāku prognozi un sarežģītāku slimības gaitu (84). *P. aeruginosa* ierosinātās infekcijas, t. sk. kaulu un mīksto audu, ir grūtāk ārstējamas, un tām tiek novērots biežāks slimības recidīvs (85, 86). Tas skaidrojams ar multipliem baktērijas virulences faktoriem, piemēram, izteiktu spēju veidot blīvas biofilmas, spēju pielāgoties dažādiem vides apstākļiem, eksotoksīnu un proteāžu produkciju, līdz ar to *Pseudomonas* ierosinātām infekcijām ir vajadzīgs ilgāks ārstēšanas kurss un nepieciešams kombinēt divus vai vairāk dažādu grupu antibakteriālos līdzekļus (21, 22, 87, 88). Osteomielīta gadījumā *P. aeruginosa* ierosināta infekcija ir saistīta ar lielāku amputācijas risku, kā arī *P. aeruginosa* ātri kļūst multirezistenta, kas apgrūtina veiksmīgu osteomielīta izārstēšanu (89, 90).

Līdzīgi arī klīniskajā gadījumā, kur pacientam tika izmantota bakteriofāgu terapija, infekciju ierosināja polimikrobiāla flora, ko veidoja MDR *P. aeruginosa*, karbapenēmiem rezistentais *A. baumannii* un VRE. Neskatoties uz vairākām nekrotisko audu ekscīzijām un brūces revīzijas operācijām, kā arī plaši lietoto antimikrobiālo terapiju, infekcija recidivēja un attīstījās augšstilba kaula osteomielīts, kuru galvenokārt ierosināja tieši MDR *P. aeruginosa*. Pētījuma rezultāti liecina, ka izolētā MDR *P. aeruginosa* bija ne tikai rezistenta pret dažādām antibakteriālām vielām, bet arī spēcīga biofilmu veidotāja (2.12. attēls), kas veicināja recidivējošas infekcijas attīstību un rezultējās ar nesekmīgu standarta antibakteriālo un ķirurģisko terapiju. Noformētas baktēriju biofilmas samazina saimniekorganisma imūnās atbildes efektivitāti, kā arī apgrūtina antibakteriālo līdzekļu difūziju, lai sasniegtu baktērijas tajā, kā arī biofilmā pastāv baktērijas ar atšķirīgu metabolo aktivitāti. Tas rezultējās ar hronisku recidivējošu infekciju, kuras cēlonis ir ilgstošā baktēriju kolonizācija un rezistence pret antibiotikām (91, 92). Nekrotiskie audi un kauli osteomielīta gadījumā kalpo kā virsma, uz kuras baktērijas veiksmīgi spēj veidot biofilmas (93). Šie faktori izskaidro sarežģīto slimības gaitu ārstētajam pacientam.

Multirezistentu infekciju ārstēšanā var rasties dzīvībai bīstamas komplikācijas, kas saistītas ar antimikrobiālo līdzekļu toksiskajām blakusparādībām, kā, piemēram, polimiksīnu radītā nefrotoksicitāte (94). Nevēlama zāļu iedarbība var sarežģīt turpmāko ārstēšanas procesu. Lietojot kolistīnu, pacientam tika novērota nefrotoksicitāte, tāpēc ārstēšana tika rūpīgi uzraudzīta un bija ierobežota, lai izvairītos no neatgriezeniska nieru bojājuma. Izolētais MDR *P. aeruginosa* celms bija jutīgs pret ceftazidīmu/avibaktāmu, tomēr tā izmantošana

monoterapijā var būt neefektīva, jo rezistences attīstības risks pret ceftazidīmu/avibaktāmu ir augsts un notiek salīdzinoši īsā laikā (95). Šie apsvērumi lika izmantot bakteriofāgu terapiju.

Bakteriofāgu spēja pašreplicēties un ražot polisaharīdu depolimerāzes, kuras ir spējīgas noārdīt baktēriju izveidotās biofilmas struktūras, padara tos par pievilcīgu līdzekli arī *P. aeruginosa* biofilmu asociētu infekciju ārstēšanā (43, 96). Vairāki *in vitro* pētījumi ir pierādījuši antibakteriālu līdzekļu un antipseidomonālo bakteriofāgu sinerģisku iedarbību, tomēr šāda mijiedarbība nav absolūta un ir saistīta ar antibakteriālā līdzekļa darbības mehānismu (29, 97). Fāgu un antibakteriālo līdzekļu mijiedarbībai būtiska loma ir arī vides faktoriem, piemēram, temperatūrai, skābekļa daudzumam, pH un citiem, kas būtiski ietekmē baktērijas biofilmas veidošanas spēju (98, 99). Šādi apsvērumi rada arī apgrūtinājumu, lai salīdzinātu klīniskos un laboratoriskos rezultātus biofilmu asociētu infekciju ārstēšanā. Vairāki klīniskie gadījumi ir parādījuši veiksmīgu bakteriofāgu terapijas lietojumu kaulu un mīksto audu infekciju ārstēšanā (43, 100, 101), kā arī aprakstīti daži gadījumi, kur biofilmas asociētas *P. aeruginosa* locītavas endoprotēzes infekcijas un aortas vārstules endoprotēzes infekcijas ārstēšanā izmantota bakteriofāgu un antibiotiku, tostarp ceftazidīma/avibaktāma, kombinācija ar sinerģisku iedarbību, kas rezultējās ar infekcijas izārstēšanu (100, 102). Ņemot vērā šos apsvērumus, tika izvēlēta antipseidomonālā stratēģija ar dubulto antimikrobiālo terapiju, izmantojot lokāli bakteriofāgus un intravenozi ceftazidīmu/avibaktāmu, kā arī veicot ķirurģisku nekrotisko audu izgriešanu. Šobrīd pieejamie dati par fāgu terapiju liecina, ka tā ir droša (103, 104), ja bakteriofāgu preparāts tiek sagatavots pēc kvalitātes un drošības kritērijiem atbilstoši fāgu preparātiem (42, 46), tomēr šie dati ir ierobežoti un nepieciešami tālāki klīniskie pētījumi. Līdz ar to infekciju ārstēšanai būtu jāizmanto fāgu preparāti, kas ir labi aprakstīti un droši pacientu ārstēšanā, piemēram, bakteriofāgu kokteilis BFC 1.10, kurš tika izmantots konkrētajam pacientam ar osteomielītu (41). Tika novērota BFC 1.10 un ceftazidīma/avibaktāma aditīvā iedarbība planktonisko šūnu augšanā un biofilmas izveides profilaksē. Būtiski, ka biofilmas novēršanai nepieciešamā antibiotikas koncentrācija, kombinējot fāgus ar antibiotiku, samazināja ceftazidīma/avibaktāma MIC robežvērtību, panākot baktērijas jutību pret antibiotiku (2.13. attēls) atbilstoši EUCAST standartam biofilmas profilakses modelī.

Sešus mēnešus pēc ārstēšanas pabeigšanas pacienta brūces bija sadzijušas, iekaisuma rādītāji bija normas robežās, kā arī veiktie radioloģiskie izmeklējumi un audu punkcija neliecināja par infekcijas recidīvu. Neraugoties uz augšstilba proksimālās puses infekcijas izārstēšanu, augšstilba distālajā daļā saglabājās MDR *P. aeruginosa* un VRE infekcija. Līdz ar to izmantotā bakteriofāgu un antibiotiku ārstēšana nerezultējās ar pilnīgu bakteriālu eradikāciju,

bet panāca osteomielīta izārstēšanu acetabulārajā rajonā, kas ļāva veikt gūžas endoprotezēšanu. Ne mazāk svarīgi, ka ārstēšanas laikā netika novērotas terapijas blakusparādības.

Augšstilba distālā segmenta infekcija pēc labās gūžas locītavas endoprotēzes implantācijas tika veiksmīgi ārstēta ar DAIR (angliski, *debridement, antibiotics and implant retention*) un supresīvo antibakteriālo terapiju, izmantojot kolistīnu un fosfomicīnu. Lai izvairītos no persistējošas infekcijas citā kaula segmentā, varētu veikt precīzākus izmeklējumus, piemēram, leikocītu scintigrāfiju vai pozitronu emisijas tomogrāfiju ar datortomogrāfiju (PET/CT). Vēl viens risinājums varētu būt bakteriofāgu sistēmiska lietošana vai to ievade augšstilba kanālā, bet šajā gadījumā to nebija iespējams veikt, jo kanālu veidoja sklerotiski audi un tajā nebija iespējams ievietot irigācijas sistēmu. Locītavu endoprotēzes asociētu infekciju gadījumā varētu izmantot hidrogela pārklājumu ar bakteriofāgiem. Šāda veida pieeja ir aprakstīta atsevišķos veiksmīgi ārstētos klīniskos gadījumos, tomēr dati par to ir ļoti ierobežoti (105).

Bakteriofāgu eksperimentālais lietojums multirezistenta *Pseudomonas aeruginosa* LVAD kabeļa infekcijas ārstēšanā

LVAD implantācija pēdējos gados ir kļuvusi arvien izplatītāka, galvenokārt kā tilts sirds transplantācijai (106). Papildus labā kambara mazspējai, asiņošanai, trombembolijai un LVAD pumpja darbības traucējumiem viena no biežākajām komplikācijām ir bakteriāla infekcija (107, 108). Tiek lēsts, ka tikai 58,9 % pacientu ar LVAD pirmajā gadā pēc ierīces implantācijas neattīstās ar to saistīta pirmā nopietnā bakteriālā infekcija; trīs gadus pēc ierīces implantācijas tikai 38,2 % pacientu nav bijusi ar ierīci asociēta bakteriāla infekcija (109). LVAD kabeļa infekcija ir viena no biežākajām ar LVAD saistītām infekcijām, tās izplatība ir 18,8–100 % (110). Tāpat kā citu implantēto ierīču infekciju gadījumā, arī ar LVAD asociētas infekcijas gadījumā ārstēšana ir apgrūtināta un bieži ir nepieciešama ķirurģiska iejaukšanās (111). Sākotnējā LVAD kabeļa infekcijas ārstēšana ietver sistēmisku antibiotiku lietošanu, tomēr parasti šāda veida pieeja rezultējas ar neveiksmīgu iznākumu un ir nepieciešama LVAD kabeļa ķirurģiska repozīcija. Polijā veiktā pētījumā kabeļa infekcijas izārstēšana, lietojot tikai antibiotikas, tika sasniegta 27 %, savukārt atlikušajos 73 % bija nepieciešama kabeļa ķirurģiska repozīcija, būtiski, ka šo pacientu vidū mirstība bija 11,5 % (111).

Galvenie ierosinātāji šāda veida infekcijām ir grampozitīvi koki, tomēr līdzīgi osteomielīta infekcijas gadījumam gramnegatīvās baktērijas ir sastopamas arvien biežāk un rada lielāku risku, jo to antibakteriālā rezistence ir plašāka (23, 112). ASSIST-ICD pētījumā, kurā piedalījās 19 centri, *P. aeruginosa* infekcijas tika konstatētas 13,7 % (113, 114). Publiski ir pieejami 10 ziņojumi par fāgu terapijas izmantošanu LVAD saistītu infekciju ārstēšanā. Šajās

publikācijās infekciju galvenie izraisītāji bija šādi: piecos gadījumos *S. aureus*, vienā gadījumā *S. aureus* un *P. mirabilis* un četros gadījumos *P. aeruginosa*, no kuriem trīs bija MDR celmi. Četros gadījumos ārstēšana ietvēra operāciju, antibiotiku un fāgu lietošanu (115–118); piecos gadījumos – antibiotiku un fāgu lietošanu (116, 119–121); vienā gadījumā – operāciju un fāgu lietošanu (122). Rezultāti liecina, ka fāgu terapija parasti tiek kombinēta ar antibiotikām un fāgi reti tiek izmantoti kā atsevišķs antimikrobiāls līdzeklis. No 10 pacientiem tikai četri tika izārstēti un panākta baktēriju eradikācija. Daži ārstēšanas neveiksmes iemesli bija lītiskās aktivitātes trūkums pret ierosinātāju, kā aprakstīja *Püschel* et al. (122), un neitralizējošu antivielu veidošanās, kā *Aslam* et al. aprakstītajā gadījumā, kurā tika ārstēts 60 gadu vecs vīrietis (116). Ārstēšanas metodes ietvēra intravenozu fāgu lietošanu un/vai to lokālu lietošanu; ārstēšanas ilgums svārstījās no vienas dienas līdz aptuveni 14 nedēļām. Fāgu koncentrācija intravenozai ievadīšanai bija no 10^7 līdz 10^{11} PFU/ml, bet lokālai aplikācijai – no 10^6 līdz 10^9 PFU/ml. Literatūras dati liecina, ka fāgu terapijas lietošana šajos gadījumos ir bijusi ļoti dažāda un nav vienprātības un skaidru pierādījumu par vispiemērotāko terapijas veidu, lai panāktu efektīvu rezultātu. Šajos klīniskajos gadījumos tika aprakstītas arī terapijas blakusparādības. *Mulzer* et al. publicētajā gadījumā pacientam bija slikta dūša (115). *Aslam* et al. publicētajā gadījumā, ārstējot 82 gadus vecu vīrieti ar fāgiem intravenozi (116), izmantojot lielu fāgu koncentrāciju 10^{11} PFU/ml, pacientam attīstījās drudzis, iesnas, elpas trūkums, simptomi izzuda, kad fāgu koncentrācija tika samazināta līdz 10^{10} PFU/ml. Citā gadījumā, ko aprakstīja *Tkhilaishvili* et al. (117), tika novērota aknu bojājuma enzīmu palielināšanās, bet pēc fāgu devas samazināšanas tie normalizējās (skatīt tabulu 8. pielikumā).

Šie publicētie gadījumi parāda, ka ir būtiskas nepilnības, lai varētu izmantot fāgu terapiju efektīvi, piemēram, fāgu lietošanas devas un veidi, ārstēšanas ilgums, antibiotiku kombinācija un fāgu rezistences veidošanās. Šobrīd trūkst klīnisko pētījumu datu par fāgu izmantošanu dažādu infekciju ārstēšanā, tajā skaitā ar LVAD saistītu infekciju ārstēšanā, tāpēc pašreizējā izpratne ir balstīta uz atsevišķiem klīniskiem gadījumiem, kuri parāda dažādus rezultātus.

Pētījumā iegūtie rezultāti liecina, ka ar LVAD saistīto infekciju sekmīgai ārstēšanai vispiemērotākā var būt lokāla un intravenoza fāgu lietošana kopā ar antibiotikām un ķirurģisku ārstēšanu. Līdz šim publicēti divi ar MDR *P. aeruginosa* LVAD saistītu infekciju ārstēšanas gadījumi, izmantojot fāgus. Vienā gadījumā, izmantojot to pašu ārstēšanas pieeju, kombinējot terapiju ar fāgiem, tika panākta pacienta izārstēšana un baktēriju eradikācija (117). Otrā gadījumā tika izmantoti tikai fāgi un antibiotikas, ārstēšana bija neveiksmīga, ārstēšanas laikā infekcija atjaunojās un attīstījās rezistence pret fāgiem (121). Vērtējot ārstēšanas drošuma aspektus, no iegūtajiem datiem var secināt, ka intravenozi lietotie fāgi koncentrācijā 10^7 PFU/ml

neradīja blakusparādības, līdzīgi *Aslam* et al. publicētajā gadījumā (116). Tāpēc turpmākai fāgu lietošanai optimāla varētu būt 10^7 PFU/ml liela antipseidomonālo fāgu deva (skatīt tabulu 8. pielikumā).

Veiktajos *in vitro* biofilmu modeļos tika konstatēti atšķirīgi rezultāti. Abi fāgi, izmantojot saimnieka (mātes) baktērijas celmu CN573, spēja iznīcināt planktoniskās šūnas un baktēriju šūnas noformēto biofilmu. Savukārt, izmantojot pacienta izolātu PAP01, biofilmās esošo baktēriju šūnu iznīcināšana bija nesekmīga. Viens no apsvērumiem, kas varētu izskaidrot iegūtos rezultātus, ir atšķirīgā baktēriju jutība pret izmantotajiem fāgiem: CN573 bija jutīgāka pret fāgiem, salīdzinot ar PAP01, būtiski, ka EOP, izmantojot PNM PAP01 kultūrā, bija tikai 0,0005, kas norāda uz ļoti vāju bakteriofāgu lītisko efektu. Ja fāgi ir iepriekš pielāgoti saimniekbaktērijām, kā tas bija PNM un PT07 gadījumā pret CN573, tie ir efektīvāki. Tāpēc labākos fāgu terapijas rezultātus varētu sasniegt, izmantojot personalizētus fāgu preparātus, kas satur fāgus, kuri ir atlasīti vai pat iepriekš adaptēti, lai labāk iedarbotos uz pacienta inficējošo baktēriju (123). Tomēr šāda pieeja ir laikietilpīga un dārgāka, tāpēc fāgu terapija ir grūtāk lietojama klīniskajā praksē. Svarīgi atzīmēt, ka arī pēdējās iespējas ārstēšana ar antibiotikām ir ļoti dārga un ne vienmēr pieejama. Vēl viens būtisks faktors ir biofilmas struktūra; saskaņā ar iegūtajiem rezultātiem *P. aeruginosa* celms CN573 veidoja izteiktāku biofilmu nekā celms PAP01, pieņemot, ka fāgiem būtu vieglāk iznīdēt PAP01 biofilmu. Tomēr tas netika novērots, un to varētu izskaidrot ar biofilmas blīvuma atšķirībām. *Hu* et al. parādīja, ka fāgu iekļūšana un lītiskā efektivitāte biofilmā ir atkarīga ne tikai no tās lieluma, bet arī biofilmas polisaharīdu blīvuma (124). Tas ir viens no pētījuma trūkumiem, jo netika noteikts biofilmas blīvums, kas būtu jāveic, izmantojot citas metodes, piemēram, konfokālā lāzera skenēšanas mikroskopiju. Tas spētu dot atbildi, vai vājais fāgu biofilmas iznīcināšanas efekts PAP01 kultūrā bija saistīts ar biofilmas blīvumu, nevis tās lielumu.

Baktēriju rezistences attīstība pret fāgiem var notikt relatīvi ātri gan *in vitro*, gan *in vivo* vidē (125). Biofilmā, pēc tam kad fāgu iedarbības rezultātā tā ir daļēji destruēta, bakteriofāgi nokļūst pie baktēriju šūnām dziļākos slāņos, kur baktērijas var būt fenotipiski atšķirīgas, proti, var konstatēt fāgiem rezistentu baktēriju klātbūtni (26). Veiktā pētījuma rezultāti parāda, ka rezistence pret fāgiem visvairāk tika novērota biofilmas eradikācijas modelī, tās sastopamība bija no 70 % līdz 100 % PNM un PT07, kā arī to kombinācijām. Tas varētu izskaidrot fāgu nespēju iznīcināt noformēto PAP01 biofilmu, kur fāgi sasnieguši baktērijas tās dziļākajos slāņos. Fāgu rezistences klātesamība tika konstatēta arī biofilmas profilakses modelī, bet tā bija retāka; PNM gadījumā tā bija 80–100 %, PT07 gadījumā – 10–40 %, bet, izmantojot šo fāgu kombināciju, tā bija tikai 10–20 % (2.20. attēls). Stratēģijas, kas ietver kombinētu ārstēšanu ar fāgiem un antibiotikām, var nodrošināt labāku iznākumu, jo baktēriju rezistences attīstība pret

fāgiem var radīt baktēriju antibakteriālās jutības izmaiņas, kas var padarīt bakteriālo ierosinātāju jutīgu pret izmantotajām antibiotikām un samazināt baktērijas virulenci (126). Līdzīgus rezultātus ir publicējis *Burmeister* et al., kur vērojams, ka fāgu rezistentiem celmiem var attīstīties jutība pret iepriekš neefektīvām antibiotikām (127). Tomēr fāgu un antibiotiku mijiedarbība ir sarežģīta, un ne vienmēr tai piemīt sinerģisks efekts; gluži pretēji, var novērot pat antagonistisku efektu. Fāgu un antibiotiku kombināciju iedarbība ir atkarīga arī no to ievadīšanas secības, fāga koncentrācijas, kā arī no antibiotikas un fāga darbības mehānisma (29, 128). Iegūtie rezultāti parāda, ka ceftazidīms/avibaktāms viens pats nespēj iznīcināt planktoniskās šūnas. Lai to panāktu, nepieciešama antibiotikas koncentrācijas palielināšana, savukārt, kombinējot terapiju, sākotnēji dodot 12 h fāgu PNM, PT07 vai abu kombināciju un tad 12 h antibiotiku, tiek vērots spēcīgs planktonisko šūnu augšanas inhibīcijas efekts (2.21. attēls). Lai inhibētu baktēriju šūnu augšanu biofilmā, bija nepieciešama trīs reizes lielāka ceftazidīma/avibaktāma koncentrācija, kas sasniedz slieksni, lai baktēriju definētu kā rezistentu pret šo antibiotiku. Izmantojot stratēģiju, kad pēc 12 h fāgu iedarbības tiek izmantotas antibiotikas vēl 12 h, biofilmas eradikācija tika novērota visos eksperimentos neatkarīgi no antibiotikas koncentrācijas (2.22. attēls). Šie dati liecina, ka nav nepieciešama maksimālā antibiotikas koncentrācija, lai panāktu vēlamo biofilmas eradikācijas efektu, ja fāgus pareizi kombinē ar antibiotikām, t. i., precīzi nosaka to izmantošanas ilgumu un secību.

Šī brīža standarta pieeja LVAD asociētu infekciju ārstēšanā ietver audu nekrektomijas un brūces ķirurģisku sanēšanu, kas tiek kombinēta ar antibiotiku terapiju. Ķirurģiska iejaukšanās ir būtiska, lai mehāniski noņemtu un likvidētu biofilmu no LVAD kabeļa (110). Līdzīgi arī pētījumā tika veikta LVAD kabeļa mehāniska tīrīšana un ievietošana jaunā vietā, kas, visticamāk, bija galvenais biofilmas eradikācijas aspekts, savukārt antibiotiku un fāgu lietošana nepieļāva jaunas biofilmas veidošanos un bakterēmijas vai septicēmijas attīstību no atlikušajām baktēriju šūnām.

Vēl viens iemesls, kāpēc nepieciešama kombinēta terapija ar fāgiem, ir *P. aeruginosa* straujā rezistences attīstība pret antibiotikām, kuras pamatā ir multipli iedzimtās un iegūtās rezistences mehānismi (129). Pacienta *P. aeruginosa* izolātiem infekcijas laikā bija vērojama mainīga antibakteriālā jutība (2.8. tabula), tāpēc mēs nevaram būt droši, ka rezistence pret amikacīnu un ceftazidīmu/avibaktāmu neradīsies ārstēšanas laikā. Tas pamato nepieciešamību MDR bakteriālo infekciju gadījumā izmantot citus efektīvus ārstēšanas līdzekļus, piemēram, fāgus, kuru rezistences attīstība nav saistīta ar antibiotiku rezistences attīstības gēniem.

Precīza slimības apmēra diagnostika LVAD asociētām infekcijām ir sarežģīta, grūti ir precizēt infekcijas dziļumu un plašumu. ^{18}F-FDG PET/CT ir samērā jauna un precīza metode infekcijas fokusa diagnostikā (130). *Dell'Aquila* et al. konstatēja, ka LVAD saistītu infekciju

diagnostika ar ^{18}F-FDG PET/CT sasniedz 100 % jutību un 80 % specifiskumu (131). Veiktā pētījuma rezultāti apstiprina ^{18}F-FDG PET/CT lietderību, kas bija būtisks faktors, lai izvēlētos atbilstošu ārstēšanas stratēģiju. Interesanti, ka nelielas hipermetabolas izmaiņas tika novērotas pat 34 nedēļas pēc ārstēšanas. To varētu izskaidrot ar granulācijas audiem, iekaisumu vai reziduālu infekciju, tomēr 21 mēnesi pēc ārstēšanas netika konstatētas lokālas vai sistēmiskas infekcijas pazīmes, kas apšauba reziduālas infekcijas iespējamību (132).

Drošas bakteriofāgu terapijas lietošanas aspekti un perspektīva nākotnē

Būtisks apsvērums vīrusu, tajā skaitā baktēriju vīrusu, izmantošanā ir drošības kritērijiem, pareiziem principiem preparāta izveidē un sagatavē klīniskai lietošanai. Fāgu terapijā ir svarīgi, lai fāgs būtu lītisks, jo lizogēnie fāgi var integrēties baktēriju genomā un radīt baktērijā jaunas īpašības (52, 133), piemēram, Šiga toksīna gēni, kas izraisa ar *E. coli* saistīto hemorāģisko kolītu un hemolītiski urēmisko sindromu, ko pārnēsā lambdoidālie lizogēnie bakteriofāgi (54). Lizogēnie fāgi šīs ģenētiskās struktūras savstarpēji var nodot ar horizontālu gēnu pārnesi, tāpēc pirms terapeitiskas izmantošanas jāveic fāgu morfoloģiskā raksturošana un visa genoma sekvencēšana (55). Nepieciešamās kvalitātes un drošības prasības ir aprakstītas vadlīnijās un rakstos par fāgu kokteiļu preparātiem (56, 57), šāda veida fāgu preparāti tika izmantoti arī abu pacientu ārstēšanā.

Joprojām būtisks šķērslis ir pašreizējais fāgu terapijas tiesiskais regulējums to iespējamai klīniskai izmantošanai un vieglākai klīnisko pētījumu organizēšanai. Fāgi tiek klasificēti tajā pašā farmaceitiskajā grupā kā klasiskie pretmikrobu līdzekļi, neņemot vērā to bioloģisko izcelsmi, kas sarežģī fāgu lietošanu un to efektivitātes noteikšanu (58). Viens no šīs jomas ekspertu ierosinātajiem risinājumiem ir izmantot *Quality by Design* koncepciju kā regulatoras sistēmas pamatu (56). Bakteriofāgu terapija būtu jāuzskata par personalizētu medicīnu, jo īpaši tad, ja iespējamai infekcijas ārstēšanai tiek radīts unikāli pielāgots bakteriofāgs. Šobrīd fāgu terapija ir ierobežota, jo pastāv to nepieejamība. Ja arī tie ir pieejami, raksturojums nav pilnvērtīgs drošai lietošanai. Pieprasot fāgus no institūcijām, kur tie ir iepriekš sagatavoti un raksturoti klīniskai lietošanai, nepieciešams laiks un finansiālie resursi baktēriju un fāgu kultūru testēšanai, transportēšanai, kā arī šie procesi bieži ir laikietilpīgi. Arī veiktā pētījuma dati liecina, ka fāgu terapija ir efektīvāka, veicot to adaptāciju, kas prasa laiku. Tas liek secināt, ka fāgu terapijas perspektīvā nepieciešama lokāla fāgu bankas izveide Latvijā vai Baltijas valstīs, kurai ir sadarbība ar citām Eiropas un pasaules fāgu pētniecības institūcijām, lai varētu dalīties un izmantot drošākos un efektīvākos fāgus.

Darba kritiskais vērtējums

Veiktajam pētījumam bija vairāki limitējoši faktori, kā viens no tiem iespējamā izolēto baktēriju mazā daudzveidība, kuru var palielināt, iesaistot pacientus no dažādiem reģioniem, valstīm. Līdz ar daudzveidības trūkumu var būt neprecīzi izvērtēts bakteriofāgu efekts.

Baktēriju veidotās biofilmas noteikšanas modelis un apstākļi būtiski ietekmē iegūto rezultātu, ir grūti paredzēt un pierādīt identiska rezultāta esamību cilvēka organismā, tāpēc iegūtie rezultāti tikai atspoguļo baktērijas biofilmas veidošanas spēju.

Bakteriofāgu līdzīsko efektu cilvēka organismā ietekmē multipli faktori, piemēram, pH, fāgu neitralizējošo antivielu veidošanās, nespecifiskie imunitātes faktori, tāpēc *in vitro* fāgu efektivitātes rezultāts tikai daļēji norāda uz to iespējamo efektu *in vivo*. Bakteriofāgu mijiedarbība ar baktērijām infekcijas gadījumā ir dinamisks process, kura laikā notiek abu iesaistīto mainība, var attīstīties fāgu rezistence un notikt dabiska fāgu adaptācija rezistences pārvarēšanai. Tāpēc noteiktie rezistences rezultāti un adaptācija rezistences pārvarēšanai teorētiski pierāda abu procesu pastāvēšanu un iespējamo ietekmi uz iznākumu. Bakteriofāgu mijiedarbība ar antibiotiskām vielām ir daudzveidīga, darba gaitā netika noteiktas visas iespējamās izmantoto antibiotiku un fāgu lietošanas kombinācijas un režīmi, kas var radīt selektīvu iegūto rezultātu atlasi.

Darba gaitā tika ārstēti tikai divi pacienti ar dzīvībai bīstamām multirezistentām infekcijām, kas neļauj izdarīt plašus secinājumus par fāgu terapijas efektivitāti un drošību klīniskā aspektā. Rezultāti drīzāk papildina esošos datus par fāgu terapiju. Precīzākam izvērtējumam būtu nepieciešams iesaistīt lielāku pacientu skaitu un veikt klīniskos pētījumus.

Darba noslēdzošā rindkopa

Multirezistento baktēriju izplatība ir plaša, antibiotiskās vielas arvien biežāk kļūst neefektīvas, tādēļ tiek rekomendētas alternatīvas antibakteriālās metodes, kā viena no tām ir bakteriofāgu terapija. Pētījumā iegūtie rezultāti apliecina, ka fāgu terapija ir perspektīva un gadījumos, kad antibakteriālā terapija nav iespējama multirezistences vai antibiotiku toksiskās iedarbības dēļ, var izmantot bakteriofāgus. Bakteriofāgu terapiju apgrūtina vairāki faktori, kuri ietekmē rezultātus kā *in vitro,* tā *in vivo.* Atbilstošai fāgu izvēlei nepieciešama ātra un precīza baktērijas identifikācija un laboratoriski pareiza līdzīskās efektivitātes izvērtēšana. Nepieciešams izmantot atbilstošu bakteriofāgu koncentrāciju, kuru iespējams ievadīt pacientam. Jāņem vērā fāgu mijiedarbība ar citiem medikamentiem, piemēram, jānodrošina atbilstošs vides pH ievades laikā, kā arī jāvērtē bakteriofāgu rezistences attīstības biežums un ātrums. Labāka antibakteriālā efekta panākšanai vēlama bakteriofāgu adaptācija, kas apgrūtina un pagarina bakteriofāgu preparāta sagatavošanu. Alternatīva ir fāgu kokteiļu izmantošana vai to kombinācija ar

antibiotikām. Izmantojot antibiotikas, nepieciešams vērtēt to mijiedarbību ar fāgiem, jo efekts var būt atšķirīgs, izmantojot dažādus fāgus un antibiotikas. Klīnisko pētījumu veikšana bakteriofāgu terapijā ir sarežģīta, jo ir grūti prognozēt un sagatavot vienu preparātu, kura sastāvs nebūtu jāpielāgo pirms terapijas uzsākšanas. Izmantojot nemainīgu fāgu preparātu, tā antibakteriālais efekts var būt nepietiekams un rezultēties ar neveiksmīgu ārstēšanu. Fāgu terapija ir personalizēta terapija, kas prasa rūpīgu pacientu, bakteriālās infekcijas izvērtējumu, kā arī fāgu sagatavošanu, precīzu terapijas algoritma aprakstu, iespējamo blakusefektu izvērtēšanu. Bakteriofāgu terapijas lietošanā ir jāapsver dažādi cilvēka un bakteriofāga lietošanas apstākļi, kas prasa multidisciplināru pieeju un speciālistu iesaisti ar pieredzi fāgu terapijā.

Secinājumi

1. Darbā izvirzītā hipotēze apstiprinās daļēji, jo bakteriofāgiem un to kombinācijai ar antibiotikām piemīt biofilmas eradikācijas spēja daļā izolēto baktēriju. Baktēriju biofilmās, kur eradikāciju nevēroja, ir nepieciešamas papildu darbības, kā fāgu adaptācija, vai specifiska bakteriofāgu un antibiotiku režīma ievērošana, lai panāktu vēlamo rezultātu.
2. *S. aureus* kolonizācija ir saistīta ar lielāku PD pacientu mirstību.
    a. PD pacienti ir kolonizēti ar fenotipiski atšķirīgiem *S. aureus* izolātiem, vērtējot to biofilmas veidošanas spēju un fāgu jutību.
3. Bakteriofāgiem piemīt baktēriju biofilmas eradikācijas un planktonisko šūnu augšanas inhibīcijas spēja gan pret antibiotikām jutīgās, gan rezistentās uropatogēnās *E. coli* kultūrās.
4. *P. aeruginosa* rezistence attīstās relatīvi ātri *in vitro* modeļos un ietekmē biofilmas eradikācijas rezultātu, bet nav skaidra tās ietekme *in vivo.*
    a. Izmantojot adaptācijas metodi, var pārvarēt *S. aureus* un *E. coli* rezistenci pret fāgiem.
5. Fāgu lokāla terapija un sistēmiska terapija kombinācijā ar antibiotikām ir droša un nerada nepārvaramas blakusparādības, kas papildina jau esošos publicētos datus un ļauj to izmantot nākotnē.
    a. Fāgu preparātam BFC 1.10 ir aditīva mijiedarbība ar ceftazidīmu/avibaktāmu. Šos līdzekļus kombinējot ar ķirurģisku terapiju, var panākt MDR *P. aeruginosa* osteomielīta klīnisku izārstēšanu, bet ne pilnīgu bakteriālu eradikāciju.
    b. Fāgiem PNM un PT07 kombinācijā ar ceftazidīmu/avibaktāmu ir būtiska lietošanas secība: izmantojot vispirms fāgus un pēc tam antibiotiku, ir vērojama lielāka antibakteriālā efektivitāte. Šos līdzekļus kombinējot ar ķirurģisku terapiju, var izārstēt MDR *P. aeruginosa* LVAD kabeļa infekciju un panākt pilnīgu bakteriālu eradikāciju.

Publikāciju, ziņojumu un patentu saraksts par promocijas darba tēmu

Publikācijas starptautiski recenzējamos zinātniskajos izdevumos:

1. **Racenis, K.,** Kroica, J., Rezevska, D., Avotins, L., Skuditis, E., Popova, A., . . . Petersons, A. 2020. S. aureus Colonization, Biofilm Production, and Phage Susceptibility in Peritoneal Dialysis Patients. *Antibiotics*, 9(9), 582. doi:10.3390/antibiotics9090582
2. Mukane, L., **Racenis, K.,** Rezevska, D., Petersons, A., & Kroica, J. 2022. Anti-Biofilm Effect of Bacteriophages and Antibiotics against Uropathogenic. *Antibiotics (Basel)*, 11(12). doi:10.3390/antibiotics11121706
3. **Racenis, K.,** Rezevska, D., Madelane, M., Lavrinovics, E., Djebara, S., Petersons, A., & Kroica, J. 2022. Use of Phage Cocktail BFC 1.10 in Combination With Ceftazidime-Avibactam in the Treatment of Multidrug-Resistant. *Front Med (Lausanne)*, 9, 851310. doi:10.3389/fmed.2022.851310
4. **Racenis, K.,** Lacis, J., Rezevska, D., Mukane, L., Vilde, A., Putnins, I., . . . Kroica, J. 2023. Successful Bacteriophage-Antibiotic Combination Therapy against Multidrug-Resistant. *Viruses*, 15(5). doi:10.3390/v15051210

Publikācijas Latvijā recenzējamos zinātniskajos izdevumos:

1. **Rācenis, K.,** Kroiča, J., Eglīte, L., Mihailova, I., Reinis, A., Skadiņš, I., . . . Petersons, A. 2017. Bakteriofāgu līdzās efekta vērtējums biofilmu producējošās uropatogēnās E. coli kultūrās. *RSU Zinātniskie raksti*, 166–173.

Ziņojumi un tēzes starptautiskās konferencēs:

1. **Racenis, K.** 2023. Phage therapy: a personalized approach in the treatment of multi-drug resistant infections. *PMNET Forum 2023.* Riga, Latvia. (Mutisks referāts).
2. **Rācenis, K.,** Kroiča, J., Rezevska, D., Mukāne, L., Pētersons, A. 2023. The clinical application of bacteriophages in complicated biofilm-associated infections. *RSU Research week 2023: Knowledge for Use in Practice*. Riga, Latvia. (Mutisks referāts).
3. **Racenis, K.,** Petersons, A., Kroica, J. 2022. Combination treatment of antibiotics and phages in biofilm-related infections. *44TH ICMM World congress 2021.* Brussels, Belgium. (Mutisks referāts).
4. **Rācenis, K.,** Pētersons, A., Munkena, Z., Rezevska, D., Broks, R., Gailīte, L., & Kroiča, J. 2021. Risk factor detection for biofilm formation in E. coli. 275. *RSU Research week 2021: Knowledge for Use in Practice*. Riga, Latvia. (Mutisks referāts).
5. **Racenis, K.,** Kroica, J., Petersons, A. 2019. Detection of biofilm formation among uropathogenic ESBL-producing Escherichia coli. *29th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Disease.* Amsterdam, Netherlands. (Stenda referāts).
6. **Racenis, K.** 2019. Bacteriophage use in bacterial biofilm treatment. Reintroduction of *Bakteriophages in today's medicine space. Phage Meeting Berlin 2019*. Berlin, Germany. (Mutisks referāts).
7. **Racenis, K.,** Kroica, J., Mukane L., Petersons A., 2019. E. coli biofilm eradication using meropenem and INTESTI bacteriophage cocktail. *77th International Scientific Conference of the University of Latvia*. Riga, Latvia. (Mutisks referāts).
8. **Racenis, K.,** Kroica, J., Mukane, L., Petersons, A. 2019. Bacteriophage Treatment in Biofilm Associated Infections. *RSU International conference on medical and health care sciences.* Riga, Latvia. (Mutisks referāts).

9. **Rācenis, K.,** Pētersons, A., Kroiča, J. 2018. Bacterial biofilm as a major factor for treatment of urinary tract infection. *XIV Baltic Nephrology Conference.* Tallinn, Estonia. (Stenda referāts).
10. **Racenis, K.,** Olive, A. S., Avotins, L., Petersons, A., Balode, A. O., Kroica, J. 2018. Biofilm formation screening among uropathogenic E.coli. *28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.* Madrid, Spain. (Stenda referāts).
11. **Rācenis, K.,** Matīsa, D., Pētersons, A., Kroiča, J. 2017. First steps in phage treatment among bacterial biofilms. *1st German Phage Symposium*. Stutgart, Germany. (Stenda referāts).
12. **Racenis, K.,** Eglite, L., Reinis, A., Skadins, I., Kroica, J. 2016. Prevention of bioceramics against bacterial contamination using bacteriophages. *4th World Congress on Targeting Infectious Diseases "Phage Therapy 2016"*. Paris, France. (Stenda referāts).
13. **Rācenis, K.,** Eglīte, L., Avotiņš, L., Saulkalne, L., Vītola, L., Kuzema, V., Pētersons, A., Kroiča, J. Bacteriophages as potential treatment for infections in S.aureus colonised nephrological patients: an in vitro study. *XIII Baltic Nephrology Conference*. Jurmala, Latvia. (Mutisks referāts).

Ziņojumi un tēzes vietēja mēroga konferencēs Latvijā:

1. **Rācenis, K.,** Kroiča, J., Avotiņš, L., Vītola, L., Saulkane, L., Puide, I., Mihailova, I., Pētersons, A. 2018. S. aureus dekontaminācija nefroloģiskiem pacientiem, izmantojot dažādus bakteriofāgus. *Rīgas Stradiņa universitātes zinātniskā konference, 2018.* Rīga, Latvija. (Mutisks referāts).
2. **Rācenis, K.,** Eglīte, L., Balode, A. O., Pētersons, A., Silda, A., Kroiča, J. 2017. Bakteriofāgu līdiskā efekta izvērtējums no pacientiem izdalītās E. coli kultūrās. *RSU zinātniskā konference, 2017*. Rīga, Latvija. (Mutisks referāts).
3. **Rācenis, K.** Bakteriofāgu līdiskā efekta vērtējums biofilmu producējošās uropatogēnās E. coli kultūrās. 2017. RSU TIF rezidentu 20. zinātniski praktiskā konference un konkurss "Mūsdienu aktualitātes medicīnā". Rīga, Latvija. (Mutisks referāts).
4. **Rācenis, K.,** Eglīte, L., Dišlers, A., Klinklava, V. O., Kroiča, J. 2016. Bakteriofāgu līdisko spēju raksturojums in vitro. *Rīgas Stradiņa universitātes 15. zinātniskā konference*. Rīga, Latvija. (Stenda referāts).

Literatūras saraksts

1. World Health Organization. 2021. *Global antimicrobial resistance and use surveillance system (glass) report 2021*. Available from: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/341666/9789240027336-eng.pdf [Viewed: 15.07.2023].
2. European Centre for Disease Prevention and Control. 2022. *Assessing the health burden of infections with antibiotic-resistant bacteria in the eu/eea, 2016–2020*. Available from: https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Health-burden-infections-antibiotic-resistant-bacteria.pdf [Viewed: 15.07.2023].
3. European Parliament. 2023. *European parliament resolution of 1 june 2023 on eu action to combat antimicrobial resistance (2023/2703(rsp))*. Available from: https://www.europarl.europa.eu/doceo/document/TA-9-2023-0220_EN.html [Viewed: 15.07.2023].
4. Łusiak-Szelachowska, M. et al. 2022. Bacteriophages and antibiotic interactions in clinical practice: What we have learned so far. *J Biomed Sci*. 29(1), 23.
5. Abedon, S. T. et al. 2011. Phage treatment of human infections. *Bacteriophage*. 1(2), 66–85.
6. Holmfeldt, K. et al. 2007. Large variabilities in host strain susceptibility and phage host range govern interactions between lytic marine phages and their flavobacterium hosts. *Appl Environ Microbiol*. 73(21), 6730–6739.
7. Whitty, R. et al. 2017. Residual kidney function and peritoneal dialysis-associated peritonitis treatment outcomes. *Clin J Am Soc Nephrol*. 12(12), 2016–2022.
8. Kitterer, D. et al. 2015. Microbiological surveillance of peritoneal dialysis associated peritonitis: Antimicrobial susceptibility profiles of a referral center in germany over 32 years. *PLoS One*. 10(9), e0135969.
9. Govindarajulu, S. et al. 2010. Staphylococcus aureus peritonitis in australian peritoneal dialysis patients: Predictors, treatment, and outcomes in 503 cases. *Perit Dial Int*. 30(3), 311–319.
10. Xu, G., Tu, W. and Xu, C. 2010. Mupirocin for preventing exit-site infection and peritonitis in patients undergoing peritoneal dialysis. *Nephrol Dial Transplant*. 25(2), 587–592.
11. Simões-Silva, L. et al. 2018. Oral colonization of. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2018, 5789094.
12. Li, P. K. and Chow, K. M. 2011. Infectious complications in dialysis – epidemiology and outcomes. *Nat Rev Nephrol*. 8(2), 77–88.
13. Kane, T. L., Carothers, K. E. and Lee, S. W. 2018. Virulence factor targeting of the bacterial pathogen staphylococcus aureus for vaccine and therapeutics. *Curr Drug Targets*. 19(2), 111–127.
14. Ricciardi, B. F. et al. 2018. Staphylococcus aureus evasion of host immunity in the setting of prosthetic joint infection: Biofilm and beyond. *Curr Rev Musculoskelet Med*. 11(3), 389–400.
15. Tajbakhsh, E. et al. 2016. Biofilm formation, antimicrobial susceptibility, serogroups and virulence genes of uropathogenic e. Coli isolated from clinical samples in iran. *Antimicrob Resist Infect Control*. 5, 11.
16. Lee, D. S., Lee, S. J. and Choe, H. S. 2018. Community-acquired urinary tract infection by. *Biomed Res Int*. 2018, 7656752.
17. Asadi Karam, M. R., Habibi, M. and Bouzari, S. 2019. Urinary tract infection: Pathogenicity, antibiotic resistance and development of effective vaccines against uropathogenic escherichia coli. *Mol Immunol*. 108, 56–67.
18. Kaplan, J. B. 2011. Antibiotic-induced biofilm formation. *The International journal of artificial organs*. 34(9).
19. Penesyan, A. et al. 2020. Secondary effects of antibiotics on microbial biofilms. *Frontiers in microbiology*. 11.

20. Malone, M. et al. 2017. The prevalence of biofilms in chronic wounds: A systematic review and meta-analysis of published data. *Journal of Wound Care*. 26(1), 20–25.

21. Depypere, M. et al. 2020. Pathogenesis and management of fracture-related infection. *Clin Microbiol Infect*. 26(5), 572–578.

22. Guerra, M. T. E. et al. 2017. Infection rate in adult patients with open fractures treated at the emergency hospital and at the ulbra university hospital in canoas, rio grande do sul, brazil. *Rev Bras Ortop*. 52(5), 544–548.

23. Lumish, H. S. et al. 2022. Driveline infection in left ventricular assist device patients: Effect of standardized protocols, pathogen type, and treatment strategy. *ASAIO J*. 68(12), 1450–1458.

24. Harada, L. K. et al. 2018. Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art. *Microbiol Res*. 212–213, 38–58.

25. Olsen, N. M. C. et al. 2018. Synergistic removal of static and dynamic. *Viruses*. 10(8).

26. Chegini, Z. et al. 2020. Bacteriophage therapy against pseudomonas aeruginosa biofilms: A review. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 19(1), 45.

27. Luong, T., Salabarria, A. C. and Roach, D. R. 2020. Phage therapy in the resistance era: Where do we stand and where are we going? *Clin Ther*. 42(9), 1659–1680.

28. Suh, G. A. et al. 2022. Considerations for the use of phage therapy in clinical practice. *Antimicrob Agents Chemother*. 66(3), e0207121.

29. Gu Liu, C. et al. 2020. Phage-antibiotic synergy is driven by a unique combination of antibacterial mechanism of action and stoichiometry. *mBio*. 11(4).

30. Oechslin, F. 2018. Resistance development to bacteriophages occurring during bacteriophage therapy. *Viruses*. 10(7).

31. Egido, J. E. et al. 2022. Mechanisms and clinical importance of bacteriophage resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 46(1).

32. Mangalea, M. R. and Duerkop, B. A. 2020. Fitness trade-offs resulting from bacteriophage resistance potentiate synergistic antibacterial strategies. *Infect Immun*. 88(7).

33. Mcgee, L. W. et al. 2023. Phage-resistant mutations impact bacteria susceptibility to future phage infections and antibiotic response. *Ecol Evol*. 13(1), e9712.

34. Sergueev, K. V. et al. 2019. Correlation of host range expansion of therapeutic bacteriophage sb-1 with allele state at a hypervariable repeat locus. *Appl Environ Microbiol*. 85(22).

35. Kvachadze, L. et al. 2011. Evaluation of lytic activity of staphylococcal bacteriophage sb-1 against freshly isolated clinical pathogens. *Microb Biotechnol*. 4(5), 643–650.

36. Azam, A. H. and Tanji, Y. 2019. Peculiarities of staphylococcus aureus phages and their possible application in phage therapy. *Appl Microbiol Biotechnol*. 103(11), 4279–4289.

37. Kutateladze, M. and Adamia, R. 2008. Phage therapy experience at the Eliava institute. *Med Mal Infect*. 38(8), 426–430.

38. Gundogdu, A., Bolkvadze, D. and Kilic, H. 2016. Effectiveness of commercial bacteriophage cocktails on diverse extended-spectrum beta-lactamase producing. *Front Microbiol*. 7, 1761.

39. Ajuebor, J. et al. 2018. Comparison of. *Antibiotics (Basel)*. 7(2).

40. Mccallin, S. et al. 2018. Metagenome analysis of russian and georgian pyophage cocktails and a placebo-controlled safety trial of single phage versus phage cocktail in healthy staphylococcus aureus carriers. *Environ Microbiol*. 20(9), 3278–3293.

41. Merabishvili, M. et al. 2009. Quality-controlled small-scale production of a well-defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials. *PLoS One*. 4(3), e4944.

42. Pirnay, J. P. et al. 2015. Quality and safety requirements for sustainable phage therapy products. *Pharm Res*. 32(7), 2173–2179.

43. Onsea et al. 2019. Bacteriophage application for difficult-to-treat musculoskeletal infections: Development of a standardized multidisciplinary treatment protocol. *Viruses*. 11(10), 891.

44. Rose, T. et al. 2014. Experimental phage therapy of burn wound infection: Difficult first steps. *International journal of burns and trauma*. 4(2), 66–73.

45. Jennes, S. et al. 2017. Use of bacteriophages in the treatment of colistin-only-sensitive pseudomonas aeruginosa septicaemia in a patient with acute kidney injury-a case report. *Crit Care*. 21(1), 129.

46. Merabishvili, M., Pirnay, J. P. and De Vos, D. 2018. Guidelines to compose an ideal bacteriophage cocktail. *Methods Mol Biol*. 1693, 99–110.

47. Stepanović, S. et al. 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*. 115(8), 891–899.

48. Ceri, H. et al. 1999. The calgary biofilm device: New technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms.

49. Harrison, J. J., Turner, R. J. and Ceri, H. 2005. High-throughput metal susceptibility testing of microbial biofilms. *BMC Microbiology*. 5(1), 53.

50. Fernández-Olmos, A. et al. 2012. In vitro prevention of pseudomonas aeruginosa early biofilm formation with antibiotics used in cystic fibrosis patients. *Int J Antimicrob Agents*. 40(2), 173–176.

51. Association, W. M. 2013. World medical association declaration of helsinki: Ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*. 310(20), 2191–2194.

52. Ljungman, S. et al. 2020. Retraining for prevention of peritonitis in peritoneal dialysis patients: A randomized controlled trial. *Perit Dial Int*. 40(2), 141–152.

53. Szeto, C. C. et al. 2017. Ispd catheter-related infection recommendations: 2017 update. *Perit Dial Int*. 37(2), 141–154.

54. Grothe, C. et al. 2016. Prophylactic treatment of chronic renal disease in patients undergoing peritoneal dialysis and colonized by staphylococcus aureus: A systematic review and meta-analysis. *BMC Nephrol*. 17(1), 115.

55. Grundmann, H. et al. 2010. Geographic distribution of staphylococcus aureus causing invasive infections in europe: A molecular-epidemiological analysis. *PLoS Med*. 7(1), e1000215.

56. Burrowes, B. H., Molineux, I. J. and Fralick, J. A. 2019. Directed in vitro evolution of therapeutic bacteriophages: The appelmans protocol. *Viruses*. 11(3).

57. North, O. I. et al. 2019. Phage tail fibre assembly proteins employ a modular structure to drive the correct folding of diverse fibres. *Nat Microbiol*. 4(10), 1645–1653.

58. Sybesma, W. et al. 2016. Bacteriophages as potential treatment for urinary tract infections. *Front Microbiol*. 7, 465.

59. Barretti, P. et al. 2012. Peritoneal dialysis-related peritonitis due to staphylococcus aureus: A single-center experience over 15 years. *PLoS One*. 7(2), e31780.

60. Piechota, M. et al. 2018. Biofilm formation by methicillin-resistant and methicillin-sensitive. *Biomed Res Int*. 2018, 4657396.

61. Le, K. Y. and Otto, M. 2015. Quorum-sensing regulation in staphylococci-an overview. *Front Microbiol*. 6, 1174.

62. Yarwood, J. M. et al. 2004. Quorum sensing in staphylococcus aureus biofilms. *J Bacteriol*. 186(6), 1838–1850.

63. Zhang, Y. et al. 2018. Association between. *Front Microbiol*. 9, 1876.

64. Sharma, G. et al. 2016. Escherichia coli biofilm: Development and therapeutic strategies. *J Appl Microbiol*. 121(2), 309–319.

65. Surgers, L. et al. 2019. Biofilm formation by esbl-producing strains of escherichia coli and klebsiella pneumoniae. *International journal of medical microbiology: IJMM*. 309(1).

66. Whelan, S. et al. 2020. Uropathogenic escherichia coli biofilm-forming capabilities are not predictable from clinical details or from colonial morphology. *Diseases (Basel, Switzerland)*. 8(2).

67. Zhou, F. et al. 2022. Control measurements of escherichia coli biofilm: A review. *Foods (Basel, Switzerland)*. 11(16).

68. Trautner, B. W. and Darouiche, R. O. 2004. Role of biofilm in catheter-associated urinary tract infection. *Am J Infect Control*. 32(3), 177–183.

69. Shah, C. et al. 2019. Virulence factors of uropathogenic escherichia coli (upec) and correlation with antimicrobial resistance. *BMC Microbiol*. 19(1), 204.

70. Tajbakhsh, E. et al. 2016. Biofilm formation, antimicrobial susceptibility, serogroups and virulence genes of uropathogenic e. Coli isolated from clinical samples in iran. *Antimicrobial resistance and infection control*. 5.

71. Chen, X. P. et al. 2018. Biofilm formation plays a role in the formation of multidrug-resistant. *Front Microbiol*. 9, 367.

72. Ballén, V. et al. 2022. Clinical escherichia coli: From biofilm formation to new antibiofilm strategies. *Microorganisms*. 10(6), 1103.

73. Folliero, V. et al. 2021. Evaluation of antibiotic resistance and biofilm production among clinical strain isolated from medical devices. *International Journal of Microbiology*. 2021.

74. Donadu, M. G. et al. 2022. No correlation between biofilm-forming capacity and antibiotic resistance in environmental staphylococcus spp.: In vitro results. *Pathogens*. 11(4), 471.

75. Lebeaux, D., Ghigo, J.-M., Beloin, C. 2014. Biofilm-related infections: Bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*. 78(3).

76. Penesyan, A. et al. 2020. Secondary effects of antibiotics on microbial biofilms. *Front Microbiol*. 11, 2109.

77. Esposito, S. et al. 1987. Ciprofloxacin concentrations in human fluids and tissues following a single oral dose. *Int J Clin Pharmacol Res*. 7(3), 181–186.

78. Visnapuu, A. et al. 2022. Deconstructing the phage-bacterial biofilm interaction as a basis to establish new antibiofilm strategies. *Viruses*. 14(5).

79. Taati Moghadam, M. et al. 2020. How phages overcome the challenges of drug resistant bacteria in clinical infections. *Infect Drug Resist*. 13, 45–61.

80. Liu, S. et al. 2022. Phages against pathogenic bacterial biofilms and biofilm-based infections: A review. *Pharmaceutics*. 14(2), 427.

81. Kremers, H. M. et al. 2015. Trends in the epidemiology of osteomyelitis: A population-based study, 1969 to 2009. *J Bone Joint Surg Am*. 97(10), 837–845.

82. Fang, C. et al. 2017. Infection after fracture osteosynthesis – part i. *J Orthop Surg (Hong Kong)*. 25(1), 2309499017692712.

83. Gustilo, R. B., Mendoza, R. M. and Williams, D. N. 1984. Problems in the management of type III (severe) open fractures: A new classification of type iii open fractures. *J Trauma*. 24(8), 742–746.

84. Benito, N. et al. 2019. The different microbial etiology of prosthetic joint infections according to route of acquisition and time after prosthesis implantation, including the role of multidrug-resistant organisms. *J Clin Med*. 8(5).

85. Garner, M. R. et al. 2020. Antibiotic prophylaxis in open fractures: Evidence, evolving issues, and recommendations. *J Am Acad Orthop Surg*. 28(8), 309–315.

86. Sudduth, J. D. et al. 2020. Open fractures: Are we still treating the same types of infections? *Surg Infect (Larchmt)*. 21(9), 766–772.

87. Qin, S. et al. 2022. Pseudomonas aeruginosa: Pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal Transduct Target Ther*. 7(1), 199.

88. Ruffin, M. and Brochiero, E. 2019. Repair process impairment by. *Front Cell Infect Microbiol*. 9, 182.

89. Cerioli, M. et al. 2020. Implant-associated bone and joint infections: Experience in a regional reference center in france. *Front Med (Lausanne)*. 7, 513242.

90. Tice, A. D., Hoaglund, P. A. and Shoultz, D. A. 2003. Risk factors and treatment outcomes in osteomyelitis. *J Antimicrob Chemother*. 51(5), 1261–1268.

91. Thi, M. T. T., Wibowo, D. and Rehm, B. H. A. 2020. Biofilms. *Int J Mol Sci*. 21(22).

92. Singh, S. et al. 2017. Understanding the mechanism of bacterial biofilms resistance to antimicrobial agents. *Open Microbiol J*. 11, 53–62.

93. Junka, A. et al. 2017. Bad to the bone: On in vitro and ex vivo microbial biofilm ability to directly destroy colonized bone surfaces without participation of host immunity or osteoclastogenesis. *PLoS One*. 12(1), e0169565.

94. Wagenlehner, F. et al. 2021. Systematic review on estimated rates of nephrotoxicity and neurotoxicity in patients treated with polymyxins. *Clin Microbiol Infect*.

95. Wang, Y. et al. 2020. Resistance to ceftazidime-avibactam and underlying mechanisms. *J Glob Antimicrob Resist*. 22, 18–27.

96. Stone, E. et al. 2019. Understanding and exploiting phage–host interactions. *Viruses*. 11(6), 567.

97. Tagliaferri, T. L., Jansen, M. and Horz, H. P. 2019. Fighting pathogenic bacteria on two fronts: Phages and antibiotics as combined strategy. *Front Cell Infect Microbiol*. 9, 22.

98. Pires, D. P. et al. 2015. Phage therapy: A step forward in the treatment of pseudomonas aeruginosa infections. *J Virol*. 89(15), 7449–7456.

99. Manohar, P. et al. 2022. Synergistic effects of phage-antibiotic combinations against. *ACS Infect Dis*. 8(1), 59–65.

100. Tkhilaishvili, T. et al. 2019. Bacteriophages as adjuvant to antibiotics for the treatment of periprosthetic joint infection caused by multidrug-resistant pseudomonas aeruginosa. *Antimicrob Agents Chemother*. 64(1).

101. Eskenazi, A. et al. 2022. Combination of pre-adapted bacteriophage therapy and antibiotics for treatment of fracture-related infection due to pandrug-resistant klebsiella pneumoniae. *Nature Communications*. 13(1).

102. Chan, B. K. et al. 2018. Phage treatment of an aortic graft infected with. *Evol Med Public Health*. 2018(1), 60–66.

103. Clarke, A. L., De Soir, S. and Jones, J. D. 2020. The safety and efficacy of phage therapy for bone and joint infections: A systematic review. *Antibiotics (Basel)*. 9(11).

104. Liu, D. et al. 2021. The safety and toxicity of phage therapy: A review of animal and clinical studies. *Viruses*. 13(7).

105. Ferry, T. et al. 2020. The potential innovative use of bacteriophages within the dac. *Front Med (Lausanne)*. 7, 342.

106. Frigerio, M. 2021. Left ventricular assist device: Indication, timing, and management. *Heart Fail Clin*. 17(4), 619–634.

107. Kilic, A., Acker, M. A. and Atluri, P. 2015. Dealing with surgical left ventricular assist device complications. *J Thorac Dis*. 7(12), 2158–2164.

108. Varshney, A. S. et al. 2022. Trends and outcomes of left ventricular assist device therapy: Jacc focus seminar. *J Am Coll Cardiol*. 79(11), 1092–1107.

109. Molina, E. J. et al. 2021. The society of thoracic surgeons intermacs 2020 annual report. *Ann Thorac Surg*. 111(3), 778–792.

110. O'horo, J. C. et al. 2018. Left ventricular assist device infections: A systematic review. *ASAIO J*. 64(3), 287–294.

111. Juraszek, A. et al. 2021. Prevalence and management of driveline infections in mechanical circulatory support - a single center analysis. *J Cardiothorac Surg*. 16(1), 216.

112. Kunz Coyne, A. J. et al. 2022. Therapeutic strategies for emerging multidrug-resistant pseudomonas aeruginosa. *Infect Dis Ther*. 11(2), 661–682.

113. Rahal, A. et al. 2020. Left ventricular assist device-associated infections: Incidence and risk factors. *J Thorac Dis*. 12(5), 2654–2662.

114. Tattevin, P. et al. 2019. Risk factors and prognostic impact of left ventricular assist device-associated infections. *Am Heart J*. 214, 69–76.

115. Mulzer, J., Trampuz, A. and Potapov, E. V. 2020. Treatment of chronic left ventricular assist device infection with local application of bacteriophages. *Eur J Cardiothorac Surg*. 57(5), 1003–1004.

116. Aslam, S. et al. 2020. Lessons learned from the first 10 consecutive cases of intravenous bacteriophage therapy to treat multidrug-resistant bacterial infections at a single center in the united states. *Open Forum Infect Dis*. 7(9), ofaa389.

117. Tkhilaishvili, T. et al. 2021. Successful case of adjunctive intravenous bacteriophage therapy to treat left ventricular assist device infection. *J Infect*. 83(3), e1–e3.

118. Rojas, S. V. et al. 2022. Bacteriophage-enriched galenic for intrapericardial ventricular assist device infection. *Antibiotics (Basel)*. 11(5).

119. Rubalskii, E. et al. 2020. Bacteriophage therapy for critical infections related to cardiothoracic surgery. *Antibiotics (Basel)*. 9(5).

120. Aslam, S. et al. 2019. Novel bacteriophage therapy for treatment of left ventricular assist device infection. *J Heart Lung Transplant*. 38(4), 475–476.

121. Tkhilaishvili, T. et al. 2022. Bacteriophage therapy as a treatment option for complex cardiovascular implant infection: The german heart center berlin experience. *J Heart Lung Transplant*. 41(5), 551–555.

122. Püschel, A. et al. 2022. Local treatment of driveline infection with bacteriophages. *Antibiotics (Basel)*. 11(10).

123. Glonti, T. and Pirnay, J. P. 2022. In vitro techniques and measurements of phage characteristics that are important for phage therapy success. *Viruses*. 14(7).

124. Hu, J., Miyanaga, K. and Tanji, Y. 2010. Diffusion properties of bacteriophages through agarose gel membrane. *Biotechnol Prog*. 26(5), 1213–1221.

125. Castledine, M. et al. 2022. Parallel evolution of. *Elife*. 11.

126. Nale, J. Y. and Clokie, M. R. 2021. Preclinical data and safety assessment of phage therapy in humans. *Curr Opin Biotechnol*. 68, 310–317.

127. Burmeister, A. R. et al. 2020. Pleiotropy complicates a trade-off between phage resistance and antibiotic resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 117(21), 11207–11216.

128. Leclerc, Q. J., Lindsay, J. A. and Knight, G. M. 2022. Modelling the synergistic effect of bacteriophage and antibiotics on bacteria: Killers and drivers of resistance evolution. *PLoS Comput Biol*. 18(11), e1010746.

129. Wheatley, R. et al. 2021. Rapid evolution and host immunity drive the rise and fall of carbapenem resistance during an acute pseudomonas aeruginosa infection. *Nat Commun*. 12(1), 2460.

130. Pijl, J. P. et al. 2021. Pet/ct imaging for personalized management of infectious diseases. *J Pers Med*. 11(2).

131. Dell'aquila, A. M. et al. 2016. Contributory role of fluorine 18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography in the diagnosis and clinical management of infections in patients supported with a continuous-flow left ventricular assist device. *Ann Thorac Surg*. 101(1), 87–94; discussion 94.

132. Pijl, J. P. et al. 2021. Limitations and pitfalls of fdg-pet/ct in infection and inflammation. *Semin Nucl Med*. 51(6), 633–645.

133. Merabishvili, M., Pirnay, Jp., De Vos, D. 2018. Guidelines to compose an ideal bacteriophage cocktail | springerlink. *Methods in Molecular Biology*. 1693, 99–110.

Pateicības

Vēlos izteikt vislielāko pateicību maniem darba vadītājiem prof. **Jutai Kroičai** un prof. **Aivaram Pētersonam** par iedrošinājumu, pacietību un veltīto laiku darba izstrādē.

Īpašs paldies kolēģiem **Dacei Rezevskai**, **Laimai Mukānei**, **Lāsmai Eglītei**, ar kuriem šos gadus esam kopā strādājuši bakteriofāgu pētniecībā un apguvuši dažādas metodes bakteriofāgu terapijā. Paldies arī LU Biomedicīnas pētījumu un studiju centra molekulārajiem biologiem **Andrim Dišleram** un **Veltai Osei-Klinklāvai** par apmācību pirmajos soļos bakteriofāgu pētniecībā.

Darba veikšana nebūtu iespējama bez slimnīcas kolēģu iesaistes un palīdzības. Paldies kolēģiem nefroloģijā, īpaši asoc. prof. **Viktorijai Kuzemai** par morālu atbalstu, infektologiem **Montai Madelānei** un **Aijai Vildei**, klīniskajiem mikrobiologiem **Dacei Rudzītei** un **Inesei Jansonei**, par padomiem un palīdzību dažādu mikrobioloģisku testu veikšanā. Paldies par sadarbību mikroķirurgam **Ervīnam Lavrinovičam**, kardioķirurgam **Jānim Lācim** un pārējiem iesaistītajiem kardioķirurģijas kolēģiem un citiem medicīnas darbiniekiem.

Pētījuma veiksmīgai norisei būtiska bija bakteriofāgu ražošana un iespējama izmantošana, par to saku paldies kolēģiem no Karalienes Astrīdas Militārās medicīnas slimnīcas, īpaši ***Jean-Paul Pirnay***, ***Maya Merabishvili*** un ***Sarah Djebara***, kolēģiem no *Eliava* institūta Gruzijā, īpaši tā vadītājai ***Mzia Kutateladze***. Paldies arī Ludviga Hiršfelda Imunoloģijas un eksperimentālās terapijas institūta kolēģiem, īpaši prof. **Andžejam Gorskim**, par motivācijas un entuziasma radīšanu fāgu terapijā.

Esmu pateicīgs arī kolēģiem Rīgas Stradiņa universitātē par atbalstu un stimulāciju pētījumu turpināšanā un darba pabeigšanā, īpaši prof. **Aivaram Lejniekam** un asoc. prof. **Aināram Stepenam**, un kolēģiem Bioloģijas un mikrobioloģijas katedrā.

Paldies arī iesaistītajiem pacientiem, kuri nesavtīgi veltīja laiku zinātnes attīstībai.

Darbs ir veltīts manai ģimenei, īpaši sievai **Laurai Rācenei** un mūsu dēlam, par viņu sapratni, atbalstu un pacietību.

Pielikumi

Pirmā publikācija

antibiotics

MDPI

Article

S. aureus Colonization, Biofilm Production, and Phage Susceptibility in Peritoneal Dialysis Patients

Karlis Racenis [1,2,*], Juta Kroica [1], Dace Rezevska [1], Lauris Avotins [1], Edgars Skuditis [1], Anna Popova [1,2], Ilze Puide [2,3], Viktorija Kuzema [2,3] and Aivars Petersons [2,3]

[1] Department of Biology and Microbiology, Riga Stradins University, LV-1007 Riga, Latvia; juta.kroica@rsu.lv (J.K.); dace.rezevska@rsu.lv (D.R.); lauris.avotins@rsu.lv (L.A.); e.skuditis@gmail.com (E.S.); annasild@yahoo.co.uk (A.P.)

[2] Center of Nephrology, Pauls Stradins Clinical University Hospital, LV-1002 Riga, Latvia; Ilze.Puide@rsu.lv (I.P.); Viktorija.Kuzema@rsu.lv (V.K.); Aivars.Petersons@rsu.lv (A.P.)

[3] Department of Internal Diseases, Riga Stradins University, LV-1007 Riga, Latvia

* Correspondence: karlis.racenis@rsu.lv

Received: 21 July 2020; Accepted: 6 September 2020; Published: 7 September 2020

check for updates

Abstract: Peritonitis caused by *Staphylococcus aureus* is of major importance in peritoneal dialysis (PD) patients due to its great virulence profile and biofilm formation ability. Bacteriophages are a potential tool to treat peritonitis resulting from biofilm-associated infections. We screened *S. aureus* colonization in 71 PD patients from the nasal cavity, groin, and PD exit-site regions and analyzed clinical outcomes in these patients. We performed biofilm-formation testing of different strains and compared the isolates of one patient to detect phenotypic differences in *S. aureus*. Phage cocktails were used to detect *S. aureus* in vitro susceptibility. An adaptation procedure was performed in cases of bacterial resistance. Around 30% of PD patients (n = 21) were found to be *S. aureus* carriers; from these, a total of 34 *S. aureus* strains were isolated, of which 61.8% (n = 21) produced a strong biofilm. Phenotypic differences in strain biofilm production were detected in eight patients out of ten. All strains were sensitive to commonly used antibiotics. Broadly positive phage lytic activity (100%) was observed in six cocktails out of seven, and bacterial resistance towards phages was overcome using adaptation. Overall phages showed a promising in vitro effect in biofilm-forming *S. aureus* strains.

Keywords: *S. aureus*; peritoneal dialysis; phage adaptation; biofilm; phage therapy; phenotypic trait

1. Introduction

Staphylococcus aureus is a common causative agent of bacterial peritonitis in patients undergoing peritoneal dialysis (PD), representing 6–14% of cases [1–3], as well as being the most common causative agent of exit-site infection [4,5]. *S. aureus* peritonitis is associated with higher rates of relapse, repeated infection, and catheter removal in addition to increased mortality [3,6]. This can be explained by the existence of particular strains that have high expression of virulence factors such as Panton–Valentine leukocidin, enterotoxins that can act as superantigens, hemolysins, phenol-soluble modulins, and the quorum-sensing accessory gene regulator (*agr*) system that plays an important role in biofilm formation and virulence factor expression [7,8]. *S. aureus* colonizes human organisms in various sites such as the nasal cavity, inguinal region, and the PD catheter exit site [5]; therefore, treatment of culture-positive nasal carriers with topical mupirocin and the application of antibiotics to the catheter exit-site are recommended to reduce the risk of peritonitis [9]. Nevertheless, bacterial biofilm formation is of great importance as *S. aureus* can produce multilayered biofilms that are mainly made of polysaccharides [10]. These structures evade both the innate and adaptive immune systems of the host, leading to altered polymorphonuclear neutrophil killing and weakened phagocytosis,

ineffectiveness of toll-like-receptor activation [8,11], and activation of the T-helper 1 (Th1) and Th17 immune response instead of the Th2 response that prevents *S. aureus* biofilm-associated infection [12]. The antimicrobial effect within the biofilm is insufficient due to lowered bacterial metabolic activity and reduced penetration that can be observed even with such bactericidal antimicrobials as oxacillin and vancomycin [13,14]. In a Brazilian study, biofilm formation was detected in 89% of *S. aureus* strains that were isolated from patients with PD-associated peritonitis [15]. Different anatomical niches of the xhuman organism can be colonized by phenotypically and genotypically polyclonal *S. aureus* strains; even the nasal cavity can be colonized with different *S. aureus* strains serving as a source for horizontal gene transfer with the ability for diverse antimicrobial susceptibility and virulence factor expression [16,17]. The quorum-sensing accessory gene regulator (*agr*) system plays a role in biofilm formation, and low *agr* activity is associated with increased biofilm production [18]; however, their expression activity is linked to environmental conditions [19]. Detection of strain polyclonality revealed differences in *agr* gene types [17], and the *S. aureus* biofilm-formation capacity varies between isolates and according to *agr* type [20]. Bacterial isolation sites among clinical strains impact biofilm production in *S. aureus* infections [21].

Bacteriophages or phages are natural viruses that infect bacterial cells and replicate in them, causing bacterial cell lysis. Eventually, this property can be used to eradicate bacterial pathogens. Phages are very diverse due to differences in their size, genetic structure, and morphology. Moreover, the host range of individual phage may differ from strain-specific to the extent of infecting bacteria that derive from distinctive genera [22]. Bacterial host specificity of phages is regulated via host cell surface receptors and, hence, bacteria that do not expose a specific receptor for a particular bacteriophage cannot be infected [23]. Phages replicate at the site of infection and produce substances such as endolysins that act on bacterial cell wall peptidoglycan, polysaccharide depolymerases that degrade carbohydrates, and lipopolysaccharides within bacterial biofilm. This leads to the destruction of biofilm and the bacteria embedded within regardless of their various metabolic activities. Phage-produced enzymes also mainly act on single bacterial species [24,25]. Such properties make bacteriophages and their produced particles an attractive tool for *S. aureus* eradication and the treatment of peritonitis caused by both antibiotic-resistant and -sensitive strains [26–28].

In this study, we detected *S. aureus* colonization in PD patients in the nasal cavity, groin, and PD exit-site region. We analyzed the impact of *S. aureus* colonization on peritonitis, death, kidney transplantation and PD catheter removal rates. Commercially available phage cocktails that may be potentially potent in future clinical trials were used to detect *S. aureus* in vitro susceptibility. The adaptation procedure was performed in the case of bacterial resistance towards phages. We performed biofilm-formation testing of different strains and compared the isolates of one patient to detect *S. aureus* phenotypic differences.

2. Materials and Methods

We included all peritoneal dialysis patients in Pauls Stradins Clinical University Hospital Peritoneal Dialysis Department, Latvia, between November 2016 and January 2017. *S. aureus* isolation and in vitro testing of antimicrobial and phage susceptibility, phage adaptation and strain biofilm formation testing were performed. Underlying diseases were noted for each patient and clinical outcomes as peritonitis, death, removal of PD catheter, and transplantation were analyzed over two-year period after *S. aureus* screening.

2.1. S. aureus Isolation and Microbiological Investigation

Swabs were obtained from nasal, inguinal, and PD catheter sites. Material was transported with universal transport media (AMIES) at room temperature within 2 h. Microbiological analysis was performed after overnight swab culturing on trypticase soy broth, mannitol salt agar, and Baird Parker agar with egg yolk tellurite. Gram staining and microscopy, coagulase detection, catalase test, and latex agglutination (Oxoid) were performed. For the final identification of *S. aureus*, a VITEK-2 (bioMerieux)

system was used. Disk-diffusion antimicrobial susceptibility testing was performed according to EUCAST version 7.1, 2017.

2.2. Biofilm Growth Using Microtiter Plate Assay

Bacterial strains were isolated on trypticase soy agar (TSA) by streak method with incubation at 37 °C for 16–18 h. Two to three colonies were taken and resuspended in trypticase soy broth (TSB) supplemented with an additional 1% glucose for incubation at 37 °C for 16–18 h to receive a concentration 1–3 × 10^9 CFU/mL, bacterial concentration was detected using densitometer (DEN-1, Riga, Latvia) occasionally to reaffirm bacterial concentration we would perform bacterial titration. Inoculum bacteria grown in broth were diluted 1:100 in TSB supplemented with 1% glucose to receive a final concentration 1–3 × 10^7 CFU/mL. Then, 150 µL of diluted suspension was transferred with multichannel pipette in sterile 96-well plate (96-well TC plate, Suspension, F, Sarstedt, Germany) for biofilm cultivation. Each plate contained 11 strains and the negative control, with 8 wells per strain to provide reliable analysis of the experiment, which was triplicated. The inoculated plate was cultivated aerobically at 37 °C for 24 h. After incubation, the content of the plate was carefully removed by decanting in disinfectant. Each well was rinsed three times with 250 µL 0.9% saline to remove planktonic bacteria. After washing, the remaining bacteria attached were heat-fixed for 60 min at 60 °C. Staining was performed adding 150 µL of 0.1% crystal violet per well over 15 min; then, color was removed by decanting, and each well was washed three times with 250 µL distilled water. To detach formed cells from the wells and quantify the biofilm production degree, 150 µL of 96% ethanol was added to each well and left for 30 min (see Figure S1). Afterwards, the optical density (OD) of wells was measured with a microplate spectrophotometer (TECAN INFINITE F50, Männedorf, Switzerland) at 570 nm wavelength. Data were recovered from the TECAN interface and transferred to Microsoft Excel 10.

2.3. Biofilm Calculation

The optical density (OD) values for each strain were averaged and expressed as a number. The cut-off value (ODc) was separately calculated as three standard deviations (SDs) over the mean negative control value for each plate. To classify bacterial strains according to their capability for biofilm production, they were grouped according to Stepanovic et al. [29], respectively, biofilm nonproducer ODs ≤ ODc, weak producer ODc < ODs ≤ 2 × ODc, moderate producer 2 × ODc < ODs ≤ 4 × ODc, and strong producer ODs ≥ 4 × ODc.

2.4. Bacteriophage Preparation

Seven commercial bacteriophage stocks, i.e., cocktails were used: 6 produced by Eliava BioPreparations Ltd. (Staphylococcal, Pyo, Ses, Fersisi, Enko, and Intesti; Tbilisi, Georgiaand 1 by Microgen Ltd. (Pyobacteriophag; Perm, Perm Territory, Russia). *S. aureus* ATCC 4336 and ATCC 15923 were used as reference strains.

In terms of commercially produced phage stocks, main constituents, and host range of them have been disclosed before [30–38]. Staphylococcal bacteriophage containing Sb-1 (*Myoviridae*), active against *S. aureus* [30,31]. Pyo bacteriophage containing Sb-1 (*Myoviridae*) and ISP (*Myoviridae*) active against *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Proteus* spp., *P. aeruginosa*, and *E. coli* [32,33]. Ses active against *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., enteropathogenic *E. coli* [34]. Fersisi containing B1 (*Myoviridae*) and JA1 (*Myoviridae*) active against *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. [35,36]. Enko active against *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Staphylococcus* spp., enteropathogenic *E. coli* [34]. Intesti containing D1-D18, F1-F4 and Proteus phage (*Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae*) [37], active against *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *E.coli*, *Proteus* spp., *Staphylococcus* spp., *P.aeruginosa*, *Enterococcus* spp. [32,34]. Pyobacteriophag containing fRuSau02 (*Myoviridae*) and SCH1 *(Podoviridae)* active against *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Proteus* spp., *Klebsiella* spp., *P. aeruginosa*, and *E.coli* [33,36,38].

Plaque assay was used for the determination of the original titer of all 7 commercial phage cocktails that was measured in plaque-forming units per milliliter (PFU/mL). Serial tenfold dilutions of each commercial bacteriophage cocktail were made in 1.5 mL microcentrifuge tubes labeled from 10^{-1} to 10^{-5}. For sequential dilutions, each microcentrifuge tube was filled with 900 µL sterile physiological saline and 100 µL bacteriophage suspension. Two to three pure colonies of *S. aureus* ATCC 4336 bacterial strain freshly grown on TSA plate were transferred to Luria–Bertani (LB) broth medium and incubated overnight at 37 °C. Then, 100 µL of bacterial culture suspension grown overnight and 50 µL of each previously made dilution of every bacteriophage cocktail were mixed together in 4 mL of previously molten 0.7% TSA tube, gently mixed, and poured evenly onto each corresponding TSA plate. After solidification of the top agar, plates were inverted and incubated overnight at 37 °C. Each bacteriophage commercial stock titer (PFU/mL) was calculated by using the following equation: (number of plaques)/(dilution factor × volume of diluted bacteriophage in mL). All procedures were performed in duplicate.

To attain the higher concentration of each bacteriophage, cocktail phage propagation using *S. aureus* ATCC 4336 was performed. After performing the plaque assay, the webbed plates of each bacteriophage cocktail were selected. Then, 12 mL of the LB broth medium was poured on each webbed plate. The flooded plates were left at room temperature on an orbital shaker (50 rpm) for 1–2 h. Subsequently, supernatant and soft overlay agar were collected for each bacteriophage cocktail in a labeled 15 mL plastic centrifuge tube. For each labeled tube, chloroform ($CHCl_3$) with a final volume of 2–3% was added. After brief vortexing, all tubes were stored for 1–2 h at 4 °C. Tubes were centrifuged at 6000× *g* for 15 min at 4 °C to remove bacterial cell debris. To avoid bacterial contamination, the bacteriophage supernatant after centrifugation was filtered using a 0.20 µm filter. The final titer of the freshly acquired bacteriophage lysate was assessed via plaque assay. To equate the dilution factor among each bacteriophage cocktail, dilution with LB broth medium was accordingly performed.

2.5. Bacteriophage Adaptation

The adaptation procedure was applied to overcome bacteriophage resistance and ensure the enhanced bacteriophage lytic efficacy of bacteriophage cocktails. For bacteriophage adaptation, a protocol of a modified Appelman's method was followed [39]. To optimize the method, strain ATCC 15923 was adapted using all 7 bacteriophage cocktails. Briefly, consecutive serial tenfold dilutions were made by adding 0.5 mL bacteriophage cocktail to 4.5 mL LB broth using bacteriophage lysate that was attained after the propagation procedure. For each tube except the first, 50 µL of the overnight bacterial host was added. The first tube, labeled as 10^{-1} containing only bacteriophage cocktail, was used as negative control, whereas the tube containing only bacterial suspension was the positive control. All prepared tubes were incubated for 48 h at 37 °C. Tubes were subsequently examined by measuring OD at 600 nm. The tube with the highest dilution factor but with OD similar to negative control was selected for further steps of the adaptation procedure. Prior to centrifugation, chloroform ($CHCl_3$) with a final concentration of 2–3% was added to the selected bacteriophage and bacterial host mixture and incubated at 4 °C for 2 h. Centrifugation for 15 min at 4 °C was performed at 6000× *g* to pellet bacterial debris. The bacteriophage lysate from the supernatant above the solid residue was filtered through a 0.20 µm filter. The acquired lysate was subject to 3 cycles of the described adaptation procedure before performing a spot test to visually demonstrate the lytic ability of adapted bacteriophage stock.

2.6. Bacteriophage Lytic Activity Detection

To qualitatively demonstrate the lytic activity of the original and adapted bacteriophages, a spot test was applied. To make a bacterial lawn, 100 µL of overnight bacterial culture was mixed with 4.5 mL of previously molten top 0.7% TSA in a tube and gently mixed. Afterwards, it was transferred to the corresponding stiffened TSA plate and left at room temperature for approximately 20 min until complete solidification. A drop containing 10 µL of bacteriophage lysate was pipetted onto previously

labeled area on the bacterial host lawn. Plates were left at room temperature to allow the drops to absorb into the agar. Plates were incubated in inverted position overnight at 37 °C. After incubation, the zones of clearing were visually examined for each plate. A positive lytic effect was recorded as confluent lysis (+++), partial lysis (++), or individual plaques (+), while a negative effect as resistant or no lysis (−) (see Figure 2). To validate the results, the spot test procedure duplicated for each phage preparation.

2.7. Data Analysis

IBM SPSS Statistics version 26 and Microsoft Excel 10 were used for data analysis. Graphical analysis was done using GraphPad Prism software version 8.1.0.

2.8. Ethical Statement

The study protocol was approved by the Ethics Committee of Riga Stradins University (document no. 32/28.01.2016). Written informed consent was obtained from all subjects before the study.

3. Results

Seventy-one patients were screened for *S. aureus* carriage, but seventy patients were included in the study, as one patient with PD catheter had not initiated dialysis; 51% (n = 36) were male and 49% (n = 34) were female, with an average age 59.96 years (SD15.9). For detailed patient data see Table S1.

Causes for end-stage renal disease vary in the study group: glomerulonephritis (GN; 40%, n = 28), diabetic nephropathy (14.3%, n = 10), chronic interstitial nephritis (20%, n = 14), autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD; 10%, n = 7), hypertensive nephropathy (12.9%, n = 9); and unknown (2.9%, n = 2).

S. aureus carriers were 30% (n = 21; see Table 1); 71.4% of carriers were male (n = 15) and 28.6% female (n = 6). Of the carrier group patients, 28.6% had diabetes mellitus (n = 6), compared to only 10.2% in the noncarrier group (n = 5). Prior to and during the study, none of the patients used topical antimicrobial for *S. aureus* decolonization. The mean length of patient participation in the study in the noncarrier group was 16.61 months, and 13.95 months in the carrier group.

In total, 34 *S. aureus* strains were obtained from 213 patient samples, all sensitive to commonly used antibiotics (cefoxitin, ciprofloxacin, trimethoprim/sulfamethoxazole, clindamycin, gentamycin, tetracycline, rifampicin), two strains were resistant to erythromycin. None of the isolated strains were methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) (see Table S2). No statistically significant correlation was noted between *S. aureus* carriage and comorbidities such as diabetes mellitus (p = 0.05), chronic heart failure, viral hepatitis, gout, and chronic obstructive pulmonary disease.

Death as an outcome was detected in 31.1% (n = 8) of carriers and 16.3% (n = 8) in the noncarrier group. Data showed the statistical tendency that risk of death in the carrier group was 2.33 times greater than that in the noncarrier group (see Table 2).

We noted 32 cases of peritonitis during our study (78.1%, n = 25 in noncarrier group; 21.9%, n = 7 in carrier group). Causative agents in the carrier group were mixed culture of methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA)/*Pseudomonas* spp. (14.3%, n = 1), *Streptococcus* spp. (42.9%, n = 3), and culture-negative (42.9%, n = 3). In the noncarrier group, causative agents were *Streptococcus* spp. (36%, n = 9), culture-negative (28%, n = 7), MSSA (8%, n = 2), mixed culture of *Aerococcus* spp./*Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., *Candida* spp., *Enterococcus* spp., *Aeromonas* spp., methicillin-sensitive coagulase-negative *Staphylococcus* and methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococcus*, each 4%, n = 1.

The overall incidence of peritonitis was 0.35 episodes per patient year. In the noncarrier group, there were 0.37 episodes per patient year compared to 0.29 per patient year in carrier group.

Table 1. *S. aureus* carrier characteristics. Note: PD, peritoneal dialysis; ADPKD, autosomal dominant polycystic kidney disease.

N	Age	Sex	Cause of End-Stage Renal Disease	Carriage Site (Biofilm Production Group)			Outcome in Two Years
				Nose	Groin	PD Catheter	
1	55	♂	Diabetic nephropathy	1N strong			1 episode of *S. aureus*/*Pseudomonas* spp. Peritonitis, transplantation
2	74	♀	Glomerulonephritis	3N strong			Death
3	76	♂	Hypertensive nephropathy	6N moderate	6G strong		3 episodes of peritonitis (2 *Streptococcus* spp., 1 culture-negative)
4	83	♂	Chronic interstitial nephritis	8N strong	8G strong		Death
5	68	♀	Diabetic nephropathy	12N moderate		12PD strong	Death
6	36	♂	Chronic interstitial nephritis	14N moderate			Transplantation
7	64	♂	Chronic interstitial nephritis	15N strong	15G strong		Uneventful PD
8	42	♀	Chronic interstitial nephritis	17N strong			Transplantation
9	60	♂	ADPKD	19N moderate			Transplantation
10	34	♂	Glomerulonephritis	25N strong	25G strong	25PD strong	Transplantation
11	77	♀	ADPKD			26PD strong	Death
12	68	♂	Glomerulonephritis	27N strong	27G strong		Uneventful PD
13	69	♂	Glomerulonephritis	35N strong	35G strong		1 episode of culture-negative peritonitis
14	68	♂	Diabetic nephropathy	36N moderate			Transplantation
15	69	♂	Glomerulonephritis		47G strong		Uneventful PD
16	58	♂	Hypertensive nephropathy		48N strong		Death
17	65	♂	Diabetic nephropathy	58N strong			Death
18	81	♂	Chronic interstitial nephritis	59N weak	59G weak		Death
19	26	♀	Glomerulonephritis	67N weak	67G moderate	67PD moderate	2 episodes of peritonitis (1 *Streptococcus* spp., 1 culture-negative)
20	47	♂	Glomerulonephritis	70N strong			Transplantation
21	49	♂	Diabetic nephropathy	71N moderate	71G moderate	71PD moderate	Death
TOTAL *n* (%) *S. aureus* Strain Count				18 (53%)	11 (32%)	5 (15%)	
Biofilm Production *n* (%)			Strong	10 (56%)	8 (73%)	3 (60%)	
			Moderate	6 (33%)	2 (18%)	2 (40%)	
			Weak	2 (11%)	1 (9%)		

Table 2. Two-year outcome of screened patients.

Clinical Outcomes	*S. aureus* Carriers	*S. aureus* Noncarriers	Total	RR	CI 95%
Number of patients	30.0% (n = 21)	70.0% (n = 49)	100% (n = 70)		
Death	31.1% (n = 8)	16.3% (n = 8)	22.9% (n = 16)	2.33	1.01–5.38
Transplantation	28.6% (n = 6)	18.4% (n = 9)	21.4% (n = 15)	1.56	0.63–3.81
Removal of PD catheter	0% (n = 0)	20.4% (n = 10)	14.3% (n = 10)		
Peritonitis	19.1% (n = 4)	34.7% (n = 17)	30.0% (n = 21)	0.55	0.21–1.44

3.1. Biofilm Growth

Biofilm production was observed among all isolated strains. Most commonly, strains produced strong biofilm (21, 61.8%), moderate (10, 29.4%), and weak (3, 8.8%) biofilm, all isolated strain biofilm mean optical densities are summarized in Table S2. Strong biofilm production of *S. aureus* strains was detected in seven out of ten individuals who did carry *S. aureus* in multiple isolation sites (see Table 1). The biofilm production capacity of *S. aureus* strains significantly varied in 8 out of 10 patients when strains were compared among different patient *S. aureus* isolation sites (see Figure 1).

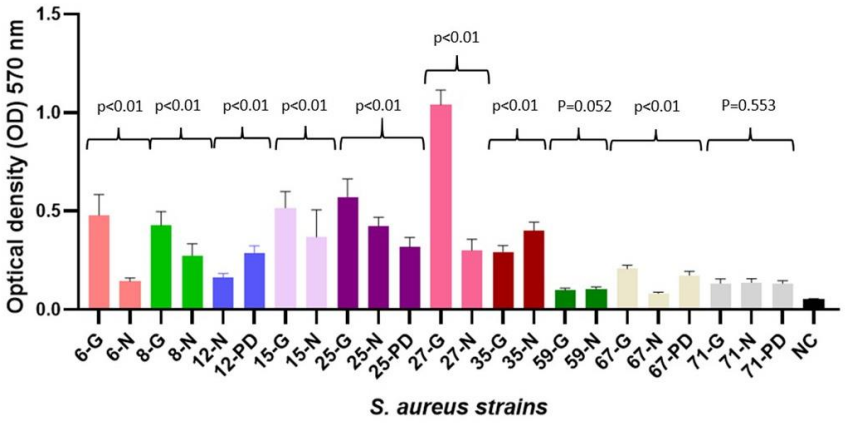


Figure 1. Biofilm production capability on microtiter plate of the 34 clinical isolates of *S. aureus* and negative control (NC). Bars represent mean values of OD (measured at wavelength of 570 nm). Differences between one suspect *S. aureus* strain capability in biofilm formation were analyzed using T test and Mann–Whitney U Test for two strain analyses, and one-way ANOVA and Kruskal–Wallis test for three strain analysis and are expressed as *p*-values.

3.2. Bacteriophage Susceptibility and Adaptation

From all seven commercial bacteriophage cocktails, the Staphylococcal Bacteriophage (Eliava) had an original titer of 10^4 PFU/mL, while Pyo, Enko, Intesti Bacteriophages (Eliava) and Pyobacteriophag (Microgen) had 10^5 PFU/mL. Only the Ses and Fersisi Bacteriophages (Eliava) demonstrated a titer of 10^6 PFU/mL. After bacteriophage cocktail propagation, of seven phage stocks all but one presented a titer of 10^9 PFU/mL, namely Pyo, Ses, Fersisi, Intesti and Pyobacteriophag. Conversely, an estimated titer of Staphylococcal Bacteriophage was 10^7 PFU/mL. All phage titers were equalised to 10^7 PFU/mL before phage lytic activity testing against *S. aureus* strains (see Table 3).

The evaluation results of bacteriophage lysate lytic activity obtained in the spot assay are shown in Table 3. When tested against all 34 *S. aureus* isolates, 6 bacteriophage stocks except Staphylococcal Bacteriophage (Eliava) revealed positive lytic results in all cases. Bacterial resistance to bacteriophage represented in the spot test was determined in 9 (26%) out of 34 *Staphylococcus aureus* isolates to Staphylococcal bacteriophage (Eliava).

Table 3. Lytic activity of seven commercial bacteriophage cocktails against 34 *Staphylococcus aureus* strains acquired from peritoneal dialysis patient samples.

S. aureus Strain Code	Biofilm Production Degree	Bacteriophages							
		Eliava BioPreparations Ltd.						Microgen Ltd.	
		Staphylococcal 1.2×10^7		Pyo 3.4×10^7	Ses 4.0×10^7	Fersisi 2.4×10^7	Enko 1.4×10^7	Intesti 2.0×10^7	Pyobacteriophag 2.0×10^7
		Not Adapted	Adapted						
1N	Strong	PL		PL	PL	PL	PL	PL	PL
3N	Strong	PL		PL	PL	PL	PL	PL	PL
6N	Moderate	R [a]	PL	PL	PL	PL	PL	PL	PL
6G	Strong	R [a]	PL	PL	PL	PL	PL	PL	PL
8N	Strong	PL		PL	PL	PL	PL	PL	PL
8G	Strong	PL		PL	PL	PL	PL	PL	PL
12N	Moderate	IP [a]	PL	PL	PL	PL	PL	PL	IP
12PD	Strong	R [a]	PL	PL	PL	PL	PL	PL	PL
14N	Moderate	PL		PL	PL	PL	PL	PL	PL
15N	Strong	R [a]	PL	PL	PL	PL	PL	PL	PL
15G	Strong	R [a]	PL	PL	PL	PL	PL	PL	PL
17N	Strong	R [a]	PL	IP	PL	PL	PL	PL	IP
19N	Moderate	R [a]	PL	PL	PL	PL	PL	PL	IP
25N	Strong	PL		PL	PL	PL	PL	PL	PL
25PD	Strong	PL		PL	PL	PL	PL	PL	PL
25G	Strong	PL		PL	PL	PL	PL	PL	PL
26PD	Strong	PL		PL	PL	PL	PL	PL	PL
27N	Strong	PL		PL	IP	PL	IP	PL	PL
27G	Strong	PL		CL	PL	PL	CL	PL	PL
35N	Strong	IP [a]	PL	PL	PL	PL	PL	PL	PL
35G	Strong	PL		PL	PL	PL	PL	PL	PL
36N	Moderate	PL		PL	PL	PL	PL	PL	PL
47G	Strong	CL		PL	PL	PL	PL	PL	PL
48G	Strong	CL		PL	PL	PL	PL	PL	PL
58N	Strong	PL		PL	PL	PL	PL	PL	PL
59G	Weak	CL		PL	IP	PL	PL	PL	PL
59N	Weak	CL		CL	PL	IP	PL	PL	PL
67G	Weak	R [a]	PL	PL	PL	PL	PL	PL	PL
67N	Moderate	R [a]	PL	PL	PL	PL	PL	PL	PL
67PD	Moderate	PL		PL	PL	PL	PL	PL	PL
70N	Strong	PL		PL	PL	PL	PL	PL	PL
71PD	Moderate	PL		PL	PL	PL	PL	PL	PL
71G	Moderate	PL		PL	PL	PL	PL	PL	PL
71N	Moderate	PL		PL	PL	PL	PL	PL	PL
	Phage lytic activity	*n* (%)	*n* (%)	*n* (%)	*n* (%)	*n* (%)	*n* (%)	*n* (%)	*n* (%)
	CL (+++)	4 (12)	0 (0)	2 (6)	0 (0)	0 (0)	1 (3)	0 (0)	0 (0)
	PL (++)	19 (56)	11 (100)	31 (91)	32 (94)	33 (97)	32 (94)	34 (100)	31 (91)
	IP (+)	2 [a] (6)	0 (0)	1 (3)	2 (6)	1 (3)	1 (3)	0 (0)	3 (9)
	R (−)	9 [a] (26)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

[a] Staphylococcal Bacteriophage (Eliava) taken to adaptation procedure after showing spot test result as individual plaques (+) or no lysis (−) against 11 *Staphylococcus aureus* strains acquired from peritoneal dialysis patients samples: CL (+++), confluent lysis; PL (++), partial lysis; IP (+), individual plaques; R (−), resistant or no lysis.

The visual confirmation results of the effect of the adaptation procedure for exposure of *S. aureus* ATCC 15923 to seven commercial bacteriophage cocktails is shown in Figure 2, which shows that the adaptation procedure led to both improvement in already positive lytic activity and overcoming bacterial resistance.

Staphylococcal Bacteriophage (Eliava) against 11 chosen bacterial strains (9 with resistance and 2 with individual plaques) were taken for phage adaptation. In all cases, the adaptation procedure resulted in overcoming bacterial resistance; all 11 bacterial strains (100%) showed a positive lytic effect after adaptation (see Table 3).

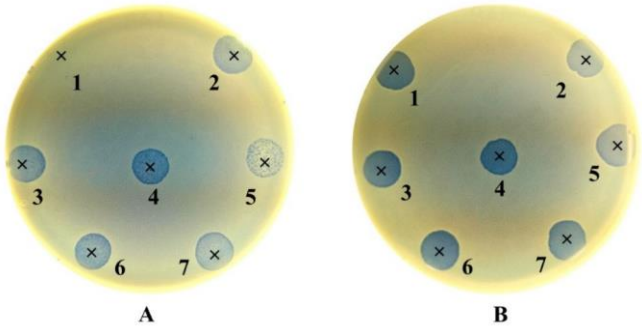


Figure 2. Lytic activity of seven commercial bacteriophage cocktails against *Staphylococcus aureus* reference strain ATCC 15923 before and after bacteriophage adaptation. (1) Staphylococcal Bacteriophage (Eliava); (2) Pyo Bacteriophage (Eliava); (3) Ses Bacteriophage (Eliava); (4) Fersisi Bacteriophage (Eliava); (5) Enko Bacteriophage (Eliava); (6) Intesti Bacteriophage (Eliava); (7) Pyobacteriophag Bacteriophage (Microgen). (**A**) Lytic activity before adaptation procedure. (1) R (**–**), resistant or no lysis; (2**–**4) PL (++), partial lysis; (5) IP (+), individual plaques; (6, 7) PL (++), partial lysis. (**B**) Lytic activity after adaptation procedure. (1) CL (+++), confluent lysis; (2) PL (++), partial lysis; (3, 4) CL (+++), confluent lysis; (5) PL (++), partial lysis; (6, 7) CL (+++), confluent lysis.

4. Discussion

In our study, we detected the clinical relevance of *S. aureus* colonization in PD patients, strain antimicrobial susceptibility, biofilm characteristics, and we performed an in vitro phage susceptibility testing that showed the broad lytic activity of different commercially available bacteriophages indicating a wide phage antimicrobial effect.

The necessity of novel antimicrobial agents that can be used against *S. aureus*-caused infections in PD patients is of great importance, as this microorganism is one of the most prevalent causative agents of PD-associated peritonitis and exit-site infections. Due to its strong virulence profile and biofilm production capability in PD patients, it has high peritonitis relapse, PD catheter removal, and death rates. Our results suggested a 2.33 times greater relative risk of death in the *S. aureus* carrier group that demonstrates worse overall prognosis for *S. aureus* carriers, similarly to other studies. Interestingly, we did not detect higher peritonitis or *S. aureus*-caused peritonitis rate in the carrier group that could be explained by our relatively small study group. Nevertheless, the overall peritonitis rate was 0.35 per patient year, similar to data from other studies having larger cohorts in Northern Europe [40].

For PD patients, *S. aureus* colonization is one of the sources of endogenous infection; therefore, use of long-term antimicrobials is recommended by International Society for Peritoneal Dialysis guidelines, but in several countries, it is not fulfilled to avoid possible *S. aureus* resistance development. Our results of *S. aureus* isolation from the nasal cavity, groin region, and PD catheter exit-site indicated 30% (n = 21) *S. aureus* colonization among PD patients, which is similar but slightly greater than that in a similar study [41]. Colonization was mainly detected in several body niches, mostly in the nasal cavity (n = 18) but also in the groin region (n = 11) and around the PD catheter exit site (n = 5); however, none of the strains were MRSA.

A positive or lytic bacteriophage effect was detected in all 71 *S. aureus* strains using commercially available bacteriophage cocktails from Eliava (Pyo, Ses, Fersisi, Enko, Intesti) and Microgen (Pyobacteriophag), except Eliava Staphylococcal Bacteriophage, where the incidence of resistance or no lytic effect was 26% (n = 9). The most commonly observed degree of positive phage lytic effect was partial lysis, ranging 56**–**100% among isolates and could depend on phage concentration within the cocktail, time of incubation, and phage resistance. Our results of wide phage lytic activity of 100% for all except Eliava Staphylococcal Bacteriophage could be also associated with possible low strain

genetic diversity, as in various parts of the world, we can find genetically and biologically distinct strains of the same bacterial species [42]. In cases of bacterial resistance or a weak lytic effect towards Eliava Staphylococcal Bacteriophage, an adaptation procedure or so-called host range expansion was performed. The outcome after adaptation was indicative of persistent enhancement in bactericidal action, leading to 100% lytic activity. In nine resistant strains, adaptation led to overcoming bacterial resistance; in two strains, improvement of positive lytic activity from individual plaques (+) to partial lysis (++) was achieved. The principle of phage adaptation is mainly due to spontaneous mutations and possible gene recombination between genetically diverse bacteriophages within the phage cocktail. Such changes lead to altered structural gene products, for example, encoding phage tail fiber assembly proteins that are necessary for phage attachment to the host cell or adsorption, which is the first step of phage infection. Adaptation can also reduce lysis time and increase phage burst size [43,44]. Recent findings on the Eliava Staphylococcal Bacteriophage cocktail that consist of Twort-like phage Sb-1 showed that after the adaptation process, newly formed phage clones were found in phage stock, and such a process increased phage lytic activity from 87% to 96% on globally diverse *S. aureus* strains. Interestingly, genetic differences between the mutant and parental Sb-1 phages were found in the phage genome hypervariable complex repeat structure, but the adsorption rate between parental and mutant phage was similar, with the conclusion that the process of host range expansion in the Sb-1 phage is still unclear [30]. Another study from Switzerland showed similar results in that after phage–bacterium adaptation of Eliava Pyo Bacteriophage with *E. coli* isolates from urinary tract infection, the lytic spectrum increased from 65.9% to 92.7% [45].

In phage therapy, it is important that the phage is lytic, as lysogenic phages can integrate into the genome of bacteria and introduce new pathogenic properties [46,47]; for example, Shiga toxin genes responsible for *E. coli*-associated hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome development that are conveyed by lambdoid lysogenic bacteriophages [48]. In lysogenic phages, these properties can be transferred via horizontal gene transfer; therefore, morphologic characterization of phages and whole-genome sequencing should be performed before therapeutic use [49]. Bacterial resistance towards phages can also emerge, so the use of cocktails containing several phages even against different bacterial species is reasonable. Proper quality and safety procedures are already described by phage researchers in guidelines and articles of phage cocktail preparations [39,50]. Still, the current legal framework of phage therapy for their possible clinical use and easier clinical-study organization is a major hurdle. Already now Eliava bacteriophages have been used to treat life-threatening *S. aureus* caused infections with Pyo, Staphylococcal and Fersisi phage cocktails. Results from these reports show positive clinical outcome and great tolerability when used on skin and mucous membranes [51,52]. Pyo, Eliava phage cocktail and its component ISP phage [35] has been used in clinical trials. In these studies, application of bacteriophages did not elicit any side effect [53,54].

Our results revealed clinically relevant (strong and moderate) biofilm production in 91.2% (n = 31) of strains, an observation similar to another study from Brazil where *S. aureus* strains isolated from PD peritonitis patients produced biofilm in 88.7% (n = 55) of cases, even though a different biofilm detection method was used [15], indicating that microtiter plate assay can be used as a cost-effective screening method for biofilm detection in clinically relevant *S. aureus* strains. Phage lytic activity was not affected by different degrees of *S. aureus* biofilm production, showing that their biofilm production capability does not interfere with in vitro testing of phage on planktonic bacteria.

S. aureus isolation sites might be of major importance; although the majority of strains were isolated from the nasal cavity, two patients were only colonized in the groin and one in only the PD catheter exit-site regions. Among patients with multiple isolated *S. aureus* strains, their biofilm production phenotype was statistically different (see Figure 1). Based on the study of 130 *S. aureus* isolates, Piechota M. et al. [21] reported, that their biofilm production differed according to their isolation site, and strong biofilm producers were found mainly from tracheostomy tubes, sputum, throat, and nose. We detected strong biofilm production in 56–73% of *S. aureus* among all three isolation sites. The accessory gene regulator (*agr*) quorum-sensing system and intercellular adhesion

(*ica*) group genes play an important role in *S. aureus* biofilm formation, but they are environmental factor-dependent [18–21]. Our results about biofilm production and phage susceptibility support *S. aureus* phenotypic variability, even within one patient; however, such phenomena did not interfere with the bacteriophage positive lytic effect that was detected in the majority of strains.

5. Conclusions

Colonization of *S. aureus* was associated with greater mortality rate. In vitro, bacteriophage activity showed a broad lytic spectrum against isolates. In the case of bacterial resistance, it was overcome with an adaptation procedure. Interestingly, the phenotypic differences of *S. aureus* isolates for phage susceptibility and biofilm production were detected, meaning that isolate virulence was variable and isolation site-dependent.

The increasing incidence of antibiotic-resistant infections and the lack of novel antimicrobials against multidrug-resistant bacteria makes phages a promising agent in treating biofilm-associated infections.

Supplementary Materials: The following are available online at http://www.mdpi.com/2079-6382/9/9/582/s1, Table S1: Patients characteristics, Table S2: *Staphylococcus aureus* strain biofilm mean optical density and antimicrobial susceptibility, Figure S1: *S. aureus* biofilm growth using microtiter plate assay stained with crystal violet.

Author Contributions: Conceptualization, K.R.; methodology K.R. and J.K.; validation, K.R., D.R. and L.A.; formal analysis, K.R., L.A. and E.S.; investigation, K.R., D.R., L.A. and A.P. (Anna Popova); data curation, K.R., L.A. and E.S.; writing—original-draft preparation, K.R., D.R.; writing—review and editing J.K., A.P. (Anna Popova), I.P., V.K. and A.P. (Aivars Petersons); visualization, K.R., D.R., L.A. and E.S.; supervision, J.K. and A.P. (Aivars Petersons); project administration, K.R., J.K. and A.P. (Aivars Petersons) All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: The authors would like to acknowledge and thank for the support from Mzia Kutateladze, Head of George Eliava Institute of Bacteriophage, Microbiology, and Virology, Tbilisi, Georgia, for her support and assistance to the paper.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Whitty, R.; Bargman, J.M.; Kiss, A.; Dresser, L.; Lui, P. Residual Kidney Function and Peritoneal Dialysis—Associated Peritonitis Treatment Outcomes. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **2017**, *12*, 2016–2022. [CrossRef]
2. Kitterer, D.; Latus, J.; Pöhlmann, C.; Alscher, M.D.; Kimmel, M. Microbiological Surveillance of Peritoneal Dialysis Associated Peritonitis: Antimicrobial Susceptibility Profiles of a Referral Center in GERMANY over 32 Years. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0135969. [CrossRef] [PubMed]
3. Govindarajulu, S.; Hawley, C.M.; McDonald, S.P.; Brown, F.G.; Rosman, J.B.; Wiggins, K.J.; Bannister, K.M.; Johnson, D.W. Staphylococcus Aureus Peritonitis in Australian Peritoneal Dialysis Patients: Predictors, Treatment, and Outcomes in 503 Cases. *Perit. Dial. Int.* **2010**, *30*, 311–319. [CrossRef] [PubMed]
4. Xu, G.; Tu, W.; Xu, C. Mupirocin for Preventing Exit-site Infection and Peritonitis in Patients Undergoing Peritoneal Dialysis. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2010**, *25*, 587–592. [CrossRef] [PubMed]
5. Simões-Silva, L.; Ferreira, S.; Santos-Araujo, C.; Tabaio, M.; Pestana, M.; Soares-Silva, I.; Sampaio-Maia, B. Oral Colonization of Staphylococcus Species in a Peritoneal Dialysis Population: A Possible Reservoir for PD-Related Infections? *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* **2018**, *2018*, 5789094. [CrossRef]
6. Li, P.K.-T.; Chow, K.M. Infectious Complications in Dialysis—Epidemiology and Outcomes. *Nat. Rev. Nephrol.* **2012**, *8*, 77–88. [CrossRef]
7. Kane, T.L.; Carothers, K.E.; Lee, S.W. Virulence Factor Targeting of the Bacterial Pathogen Staphylococcus Aureus for Vaccine and Therapeutics. *Curr. Drug Targets.* **2018**, *19*, 111–127. [CrossRef]
8. Ricciardi, B.F.; Muthukrishnan, G.; Masters, E.; Ninomiya, M.; Lee, C.C.; Schwarz, E.M. Staphylococcus Aureus Evasion of Host Immunity in the Setting of Prosthetic Joint Infection: Biofilm and Beyond. *Curr. Rev. Musculoskelet Med.* **2018**, *11*, 389–400. [CrossRef]

9. Szeto, C.-C.; Li, P.K.-T.; Johnson, D.W.; Bernardini, J.; Dong, J.; Figueiredo, A.E.; Ito, Y.; Kazancioglu, R.; Moraes, T.; Esch, S.V.; et al. ISPD Catheter-Related Infection Recommendations: 2017 Update. *Perit. Dial. Int.* **2017**, *37*, 141–154. [CrossRef]
10. Archer, N.K.; Mazaitis, M.J.; Costerton, J.W.; Leid, J.G.; Powers, M.E.; Shirtliff, M.E. Staphylococcus Aureus Biofilms: Properties, Regulation, and Roles in Human Disease. *Virulence* **2011**, *2*, 445–459. [CrossRef]
11. Thurlow, L.R.; Hanke, M.L.; Fritz, T.; Angle, A.; Aldrich, A.; Williams, S.H.; Engebretsen, I.L.; Bayles, K.W.; Horswill, A.R.; Kielian, T. Staphylococcus Aureus Biofilms Prevent Macrophage Phagocytosis and Attenuate Inflammation In Vivo. *J. Immunol.* **2011**, *186*, 6585–6596. [CrossRef] [PubMed]
12. Jensen, L.K.; Jensen, H.E.; Koch, J.; Bjarnsholt, T.; Eickhardt, S.; Shirtliff, M. Specific Antibodies to Staphylococcus Aureus Biofilm Are Present in Serum from Pigs with Osteomyelitis. *In Vivo* **2015**, *29*, 555–560. [PubMed]
13. Singh, R.; Ray, P.; Das, A.; Sharma, M. Penetration of Antibiotics Through *Staphylococcus Aureus* and *Staphylococcus Epidermidis* Biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* **2010**, *65*, 1955–1958. [CrossRef] [PubMed]
14. Donlan, R.M.; Costerton, J.W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **2002**, *15*, 167–193. [CrossRef] [PubMed]
15. Barretti, P.; Moraes, T.M.C.; Camargo, C.H.; Caramori, J.C.T.; Mondelli, A.L.; Montelli, A.C.; Maria de Lourdes, R.S. Peritoneal Dialysis-Related Peritonitis Due to Staphylococcus Aureus: A Single-Center Experience over 15 Years. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e31780. [CrossRef]
16. Muenks, C.E.; Hogan, P.G.; Wang, J.W.; Eisenstein, K.A.; Burnham, C.-A.D.; Fritz, S.A. Diversity of Staphylococcus Aureus Strains Colonizing Various Niches of the Human Body. *J. Infect.* **2016**, *72*, 698–705. [CrossRef]
17. Cespedes, C.; Saïd-Salim, B.; Miller, M.; Lo, S.-H.; Kreiswirth, B.N.; Gordon, R.J.; Vavagiakis, P.; Klein, R.S.; Lowy, F.D. The Clonality of *Staphylococcus Aureus* Nasal Carriage. *J. Infect. Dis.* **2005**, *191*, 444–452. [CrossRef]
18. Le, K.Y.; Otto, M. Quorum-Sensing Regulation in Staphylococci-An Overview. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 1174. [CrossRef]
19. Yarwood, J.M.; Bartels, D.J.; Volper, E.M.; Greenberg, E.P. Quorum Sensing in Staphylococcus Aureus Biofilms. *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 1838–1850. [CrossRef]
20. Zhang, Y.; Xu, D.; Shi, L.; Cai, R.; Li, C.; Yan, H. Association Between Agr Type, Virulence Factors, Biofilm Formation and Antibiotic Resistance of Staphylococcus Aureus Isolates from Pork Production. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1876. [CrossRef]
21. Piechota, M.; Kot, B.; Frankowska-Maciejewska, A.; Grużewska, A.; Woźniak-Kosek, A. Biofilm Formation by Methicillin-Resistant and Methicillin-Sensitive Staphylococcus Aureus Strains from Hospitalized Patients in Poland. *Biomed Res. Int.* **2018**, *2018*. [CrossRef] [PubMed]
22. Ross, A.; Ward, S.; Hyman, P. More Is Better: Selecting for Broad Host Range Bacteriophages. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1352. [CrossRef] [PubMed]
23. Kasman, L.M.; Porter, L.D. Bacteriophages. StatPearls. 2019. Available online: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493185/ (accessed on 29 May 2020).
24. Harada, L.K.; Silva, E.C.; Campos, W.F.; Del Fiol, F.S.; Vila, M.; Dąbrowska, K.; Krylov, V.N.; Balcão, V.M. Biotechnological Applications of Bacteriophages: State of the Art. *Microbiol. Res.* **2018**, *212–213*, 38–58. [CrossRef] [PubMed]
25. Olsen, N.M.C.; Thiran, E.; Hasler, T.; Vanzieleghem, T.; Belibasakis, G.N.; Mahillon, J.; Loessner, M.J.; Schmelcher, M. Synergistic Removal of Static and Dynamic Staphylococcus Aureus Biofilms by Combined Treatment with a Bacteriophage Endolysin and a Polysaccharide Depolymerase. *Viruses* **2018**, *10*, 438. [CrossRef] [PubMed]
26. Roach, D.R.; Donovan, D.M. Antimicrobial Bacteriophage-Derived Proteins and Therapeutic Applications. *Bacteriophage* **2015**, *5*, e1062590. [CrossRef] [PubMed]
27. Rashel, M.; Uchiyama, J.; Ujihara, T.; Uehara, Y.; Kuramoto, S.; Sugihara, S.; Yagyu, K.-I.; Muraoka, A.; Sugai, M.; Hiramatsu, K.; et al. Efficient Elimination of Multidrug-Resistant Staphylococcus Aureus by Cloned Lysin Derived from Bacteriophage Phi MR11. *J. Infect. Dis.* **2007**, *196*, 1237–1247. [CrossRef]
28. Chhibber, S.; Gupta, P.; Kaur, S. Bacteriophage as Effective Decolonising Agent for Elimination of MRSA from Anterior Nares of BALB/c Mice. *BMC Microbiol.* **2014**, *14*, 212. [CrossRef]

29. Stepanović, S.; Vuković, D.; Hola, V.; Di Bonaventura, G.; Djukić, S.; Cirković, I.; Ruzicka, F. Quantification of Biofilm in Microtiter Plates: Overview of Testing Conditions and Practical Recommendations for Assessment of Biofilm Production by Staphylococci. *APMIS* **2007**, *115*, 891–899. [CrossRef]
30. Sergueev, K.V.; Filippov, A.A.; Farlow, J.; Su, W.; Kvachadze, L.; Balarjishvili, N.; Kutateladze, M.; Nikolich, M.P. Correlation of Host Range Expansion of Therapeutic Bacteriophage Sb-1 with Allele State at a Hypervariable Repeat Locus. *Appl. Environ. Microbiol.* **2019**, *85*, e01209–e01219. [CrossRef]
31. Kvachadze, L.; Balarjishvili, N.; Meskhi, T.; Tevdoradze, E.; Skhirtladze, N.; Pataridze, T.; Adamia, R.; Topuria, T.; Kutter, E.; Rohde, C.; et al. Evaluation of Lytic Activity of Staphylococcal Bacteriophage Sb-1 Against Freshly Isolated Clinical Pathogens. *Microb. Biotechnol.* **2011**, *4*, 643–650. [CrossRef]
32. Kutateladze, M.; Adamia, R. Phage Therapy Experience at the Eliava Institute. *Med. Mal. Infect.* **2008**, *38*, 426–430. [CrossRef] [PubMed]
33. Azam, A.H.; Tanji, Y. Peculiarities of Staphylococcus Aureus Phages and Their Possible Application in Phage Therapy. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *103*, 4279–4289. [CrossRef] [PubMed]
34. Gundogdu, A.; Bolkvadze, D.; Kilic, H. In Vitro Effectiveness of Commercial Bacteriophage Cocktails on Diverse Extended-Spectrum Beta-Lactamase Producing Escherichia Coli Strains. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1761. [CrossRef] [PubMed]
35. Ajuebor, J.; Buttimer, C.; Arroyo-Moreno, S.; Chanishvili, N.; Gabriel, A.M.; O'Mahony, J.; McAuliffe, O.; Neve, H.; Franz, C.; Coffey, A. Comparison of Staphylococcus Phage K with Close Phage Relatives Commonly Employed in Phage Therapeutics. *Antibiotics* **2018**, *7*, 37. [CrossRef]
36. McCallin, S.; Sarker, S.A.; Sultana, S.; Oechslin, F.; Brüssow, H. Metagenome Analysis of Russian and Georgian Pyophage Cocktails and a Placebo-Controlled Safety Trial of Single Phage Versus Phage Cocktail in Healthy Staphylococcus Aureus Carriers. *Environ. Microbiol.* **2018**, *20*, 3278–3293. [CrossRef]
37. Zschach, H.; Joensen, K.G.; Lindhard, B.; Lund, O.; Goderdzishvili, M.; Chkonia, I.; Jgenti, G.; Kvatadze, N.; Alavidze, Z.; Kutter, E.M.; et al. What Can We Learn from a Metagenomic Analysis of a Georgian Bacteriophage Cocktail? *Viruses* **2015**, *7*, 6570–6589. [CrossRef]
38. Leskinen, K.; Tuomala, H.; Wicklund, A.; Horsma-Heikkinen, J.; Kuusela, P.; Skurnik, M.; Kiljunen, S. Characterization of vB_SauM-fRuSau02, a Twort-Like Bacteriophage Isolated from a Therapeutic Phage Cocktail. *Viruses* **2017**, *9*, 258. [CrossRef]
39. Merabishvili, M.; Pirnay, J.-P.; De Vos, D. Guidelines to Compose an Ideal Bacteriophage Cocktail. *Methods Mol. Biol.* **2018**, *1693*, 99–110. [CrossRef]
40. Ljungman, S.; Jensen, J.E.; Paulsen, D.; Petersons, A.; Ots-Rosenberg, M.; Saha, H.; Struijk, D.G.; Wilkie, M.; Heimbürger, O.; Stegmayr, B.; et al. Retraining for Prevention of Peritonitis in Peritoneal Dialysis Patients: A Randomized Controlled Trial. *Perit. Dial. Int.* **2020**, *40*, 141–152. [CrossRef]
41. Grothe, C.; Taminato, M.; Belasco, A.; Sesso, R.; Barbosa, D. Prophylactic Treatment of Chronic Renal Disease in Patients Undergoing Peritoneal Dialysis and Colonized by Staphylococcus Aureus: A Systematic Review and Meta-Analysis. *BMC Nephrol.* **2016**, *17*. [CrossRef]
42. Grundmann, H.; Aanensen, D.M.; van den Wijngaard, C.C.; Spratt, B.G.; Harmsen, D.; Friedrich, A.W. Geographic Distribution of Staphylococcus Aureus Causing Invasive Infections in Europe: A Molecular-Epidemiological Analysis. *PLoS Med.* **2010**, *7*, e10000215. [CrossRef] [PubMed]
43. North, O.I.; Sakai, K.; Yamashita, E.; Nakagawa, A.; Iwazaki, T.; Büttner, C.R.; Takeda, S.; Davidson, A.R. Phage Tail Fibre Assembly Proteins Employ a Modular Structure to Drive the Correct Folding of Diverse Fibres. *Nat. Microbiol.* **2019**, *4*, 1645–1653. [CrossRef] [PubMed]
44. Burrowes, B.H.; Molineux, I.J.; Fralick, J.A. Directed in Vitro Evolution of Therapeutic Bacteriophages: The Appelmans Protocol. *Viruses* **2019**, *11*, 241. [CrossRef] [PubMed]
45. Sybesma, W.; Zbinden, R.; Chanishvili, N.; Kutateladze, M.; Chkhotua, A.; Ujmajuridze, A.; Mehnert, U.; Kessler, T.M. Bacteriophages as Potential Treatment for Urinary Tract Infections. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 465. [CrossRef]
46. Harper, D.R.; Parracho, H.M.R.T.; Walker, J.; Sharp, R.; Hughes, G.; Werthén, M.; Lehman, S.; Morales, S. Bacteriophages and Biofilms. *Antibiotics* **2014**, *3*, 270–284. [CrossRef]
47. Iacovelli, V.; Gaziev, G.; Topazio, L.; Bove, P.; Vespasiani, G.; Finazzi Agrò, E. Nosocomial Urinary Tract Infections: A Review. *Urologia* **2014**, *81*, 222–227. [CrossRef]

48. Tozzoli, R.; Grande, L.; Michelacci, V.; Ranieri, P.; Maugliani, A.; Caprioli, A.; Morabito, S. Shiga Toxin-Converting Phages and the Emergence of New Pathogenic Escherichia Coli: A World in Motion. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2014**, *4*, 80. [CrossRef]
49. Jacobsen, S.M.; Stickler, D.J.; Mobley, H.L.T.; Shirtliff, M.E. Complicated Catheter-Associated Urinary Tract Infections Due to Escherichia Coli and Proteus Mirabilis. *Clin. Microbiol. Rev.* **2008**, *21*, 26–59. [CrossRef]
50. Pirnay, J.-P.; Blasdel, B.G.; Bretaudeau, L.; Buckling, A.; Chanishvili, N.; Clark, J.R.; Corte-Real, S.; Debarbieux, L.; Dublanchet, A.; De Vos, D.; et al. Quality and Safety Requirements for Sustainable Phage Therapy Products. *Pharm. Res.* **2015**, *32*, 2173–2179. [CrossRef]
51. Mulzer, J.; Trampuz, A.; Potapov, E.V. Treatment of Chronic Left Ventricular Assist Device Infection with Local Application of Bacteriophages. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* **2020**, *57*, 1003–1004. [CrossRef]
52. Zhvania, P.; Hoyle, N.S.; Nadareishvili, L.; Nizharadze, D.; Kutateladze, M. Phage Therapy in a 16-Year-Old Boy with Netherton Syndrome. *Front. Med.* **2017**, *4*, 94. [CrossRef] [PubMed]
53. Rose, T.; Verbeken, G.; Vos, D.D.; Merabishvili, M.; Vaneechoutte, M.; Lavigne, R.; Jennes, S.; Zizi, M.; Pirnay, J.-P. Experimental Phage Therapy of Burn Wound Infection: Difficult First Steps. *Int. J. Burns. Trauma.* **2014**, *4*, 66–73. [PubMed]
54. Ujmajuridze, A.; Chanishvili, N.; Goderdzishvili, M.; Leitner, L.; Mehnert, U.; Chkhotua, A.; Kessler, T.M.; Sybesma, W. Adapted Bacteriophages for Treating Urinary Tract Infections. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1832. [CrossRef] [PubMed]

© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Peritoneālās dialīzes pacientu raksturojums

Nr.	Vecums	Dzimums	HNS cēlonis	Divu gadu iznākums	Blakusslimības
1	55	vīrietis	DN	1 peritonīts (MSSA / *Pseudomonas spp.*), transplantācija	CD
2	36	vīrietis	GN	Transplantācija	–
3	74	sieviete	GN	Nāve	CD, HSM
4	33	sieviete	GN	Transplantācija	–
5	75	vīrietis	HIN	1 MSSA peritonīts	–
6	76	vīrietis	HN	3 citas baktērijas peritonīti (2 *Streptococcus spp*., 1 neidentificēts)	HSM
7	61	vīrietis	HIN	1 *Enterococcus spp.* peritonīts	–
8	83	vīrietis	HIN	Nāve	HSM, Podagra
9	78	sieviete	HIN	1 *Streptococcus spp.* peritonīts, nāve	–
10	67	sieviete	HN	Transplantācija	HSM
11	56	vīrietis	HIN	Bez notikumiem	–
12	68	sieviete	DN	Nāve	CD
13	71	sieviete	HN	Bez notikumiem	HSM, HOPS
14	36	vīrietis	HIN	Transplantācija	Vīrushepatīts
15	64	vīrietis	HIN	Bez notikumiem	HSM
16	69	sieviete	DN	1 neidentificēts peritonīts, PD katetra izņemšana	CD
17	42	sieviete	HIN	Transplantācija	–
18	58	sieviete	ADNP	2 peritonīti (1 *Aeromonas spp*., 1 *Streptococcus spp*.)	Vīrushepatīts
19	60	vīrietis	ADNP	Transplantācija	–
20	32	vīrietis	GN	Bez notikumiem	–
21	60	sieviete	ADNP	Bez notikumiem	–
22	59	vīrietis	GN	1 peritonīts(koagulāzes negatīvais *Staphylococcus spp.*)	HSM
23	44	vīrietis	GN	Transplantācija	HSM
24	64	sieviete	Nezināms	2 peritonīti (1 *Streptococcus spp*., 1 neidentificēts), PD katetra izņemšana	HSM
25	34	vīrietis	GN	Transplantācija	–
26	77	sieviete	ADNP	Nāve	–
27	68	vīrietis	GN	Bez notikumiem	HSM, HOPS
28	64	vīrietis	GN	2 peritonīti (1 MSSA, 1 neidentificēts), PD katetra izņemšana	–
29	43	sieviete	GN	PD katetra izņemšana	–
30	39	sieviete	HIN	1 peritonīts (*Streptococcus spp.*)	–
31	52	vīrietis	DN	Bez notikumiem	CD, HSM, HOPS
32	79	sieviete	DN	Bez notikumiem	CD
33	58	sieviete	GN	Nāve	–
34	76	vīrietis	HIN	1 peritonīts (neidentificēts), PD katetra izņemšana	–
35	69	vīrietis	GN	1 peritonīts (neidentificēts)	–
36	68	vīrietis	DN	Transplantācija	CD
37	82	vīrietis	GN	Bez notikumiem	Podagra, vīrushepatīts HOPS
38	41	sieviete	DN	Nāve	CD, vīrushepatīts

Nr.	Vecums	Dzimums	HNS cēlonis	Divu gadu iznākums	Blakusslimības
39	65	vīrietis	GN	3 peritonīti (1 MSSA, 1 *Aerococcus spp. / Pseudomonas spp.*, 1 neidentificēts)	–
40	31	sieviete	GN	Bez notikumiem	–
41	68	sieviete	ADNP	PD katetra izņemšana	–
42*	53	vīrietis	GN	Bez notikumiem	–
43	81	sieviete	GN	1. peritonīts (*Bacillus spp.*)	HSM, podagra
44	71	vīrietis	GN	3 peritonīti (*Streptococcus spp.*)	HSM
45	72	sieviete	HN	Nāve	–
46	32	sieviete	DN	Nāve	CD, podagra
47	69	vīrietis	GN	Bez notikumiem	HSM, HOPS, vīrushepatīts
48	58	vīrietis	HN	Nāve	–
49	60	sieviete	GN	PD katetra izņemšana	–
50	61	sieviete	ADNP	Transplantācija	–
51	58	vīrietis	GN	Transplantācija	–
52	36	sieviete	HIN	1 peritonīts (*Candida spp.*)	HSM
53	87	sieviete	HN	2 peritonīti (*Streptococcus spp.*)	–
54	45	sieviete	GN	Bez notikumiem	HSM, HOPS
55	72	vīrietis	HIN	PD katetra izņemšana	HSM
56	77	sieviete	GN	Bez notikumiem	–
57	69	vīrietis	HN	Nāve	–
58	65	vīrietis	DN	Nāve	CD, HSM, podagra
59	81	vīrietis	HIN	Nāve	–
60	57	vīrietis	ADNP	Transplantācija	–
61	65	vīrietis	GN	Transplantācija	–
62	70	vīrietis	GN	Bez notikumiem	–
63	79	sieviete	HN	1 peritonīts (neidentificēts), nāve	–
64	62	sieviete	HN	1 peritonīts (neidentificēts), PD katetra izņemšana	–
65	77	vīrietis	Nezināms	Nāve	–
66	32	sieviete	GN	PD katetra izņemšana	–
67	26	sieviete	GN	2 peritonīti (1 *Streptococcus spp*., 1 neidentificēts)	Vīrushepatīts
68	70	vīrietis	HIN	Bez notikumiem	–
69	34	sieviete	GN	Transplantācija	–
70	47	vīrietis	GN	Transplantācija	HSM
71	49	vīrietis	DN	Nāve	CD

Izolēto *S. aureus* antibakteriālā jutība un biofilmu veidošanas spējas optiskā blīvuma vidējās vērtības

S. aureus **izolāta kods**	**Vidējās OD vērtība, 570 nm**	**Antibakteriālā jutība**							
		FOX	**CIP**	**TET**	**SXT**	**RIF**	**ERY**	**CLI**	**GEN**
1N	0,23	S	S	S	S	S	S	S	S
3N	0,25	S	S	S	S	S	S	S	S
6N	0,14	S	S	S	S	S	S	S	S
6G	0,48	S	S	S	S	S	S	S	S
8N	0,27	S	S	S	S	S	S	S	S
8G	0,43	S	S	S	S	S	S	S	S
12N	0,16	S	S	S	S	S	S	S	S
12PD	0,29	S	S	S	S	S	S	S	S
14N	0,18	S	S	S	S	S	S	S	S
15N	0,37	S	S	S	S	S	S	S	S
15G	0,52	S	S	S	S	S	S	S	S
17N	0,25	S	S	S	S	S	S	S	S
19N	0,14	S	S	S	S	S	S	S	S
25N	0,42	S	S	S	S	S	S	S	S
25PD	0,32	S	S	S	S	S	S	S	S
25G	0,57	S	S	S	S	S	S	S	S
26PD	0,36	S	S	S	S	S	S	S	S
27N	0,30	S	S	S	S	S	S	S	S
27G	1,04	S	S	S	S	S	S	S	S
35N	0,40	S	S	S	S	S	S	S	S
35G	0,29	S	S	S	S	S	S	S	S
36N	0,19	S	S	S	S	S	S	S	S
47G	0,25	S	S	S	S	S	S	S	S
48G	0,43	S	S	S	S	S	S	S	S
58N	0,36	S	S	S	S	S	S	S	S
59G	0,10	S	S	S	S	S	S	S	S
59N	0,10	S	S	S	S	S	S	S	S
67G	0,21	S	S	S	S	S	R	S	S
67N	0,08	S	S	S	S	S	R	S	S
67PD	0,17	S	S	S	S	S	S	S	S
70N	0,40	S	S	S	S	S	S	S	S
71PD	0,13	S	S	S	S	S	S	S	S
71G	0,13	S	S	S	S	S	S	S	S
71N	0,14	S	S	S	S	S	S	S	S

Otrā publikācija

antibiotics

MDPI

Article

Anti-Biofilm Effect of Bacteriophages and Antibiotics against Uropathogenic *Escherichia coli*

Laima Mukane [1,*], Karlis Racenis [1,2,3,*], Dace Rezevska [1,4], Aivars Petersons [2,3] and Juta Kroica [1]

[1] Department of Biology and Microbiology, Riga Stradins University, LV-1007 Riga, Latvia
[2] Center of Nephrology, Pauls Stradins Clinical University Hospital, LV-1002 Riga, Latvia
[3] Department of Internal Diseases, Riga Stradins University, LV-1007 Riga, Latvia
[4] Joint Laboratory, Pauls Stradins Clinical University Hospital, LV-1002 Riga, Latvia
* Correspondence: laima.mukane@rsu.lv (L.M.); karlis.racenis@rsu.lv (K.R.)

Abstract: *Escherichia coli* is a common cause of biofilm-associated urinary tract infections. Bacteria inside the biofilm are more resistant to antibiotics. Six *E. coli* strains isolated from patients with urinary tract infections were screened for biofilm-forming capability and antimicrobial susceptibility. Two of the most significant biofilm-producing strains were selected for minimal inhibitory concentration and minimal biofilm eradication concentration in vitro testing using amoxicillin–clavulanic acid, ciprofloxacin, and three commercial bacteriophage cocktails (Pyobacteriophag, Ses, and Intesti). In case of a low phage effect, an adaptation procedure was performed. Although the biofilms formed by strain 021UR were resistant to amoxicillin–clavulanic acid and ciprofloxacin, the three phage cocktails were able to reduce biofilm formation. In contrast, phages did not affect the 01206UR strain against planktonic and biofilm-forming cells. After Pyobacteriophag adaptation, the effect improved, and, regardless of the concentration, the adapted phage cocktail could destroy both planktonic cells and the biofilm of strain 01206UR. Bacteriophages capable of killing bacteria in biofilms can be used as an alternative to antibiotics. However, each case should be considered individually due to the lack of clinical trials for phage therapy. Antimicrobial and phage susceptibility should be determined in biofilm models before treatment to achieve the desired anti-biofilm effect.

Keywords: *E. coli*; biofilm; urinary tract infection; phage; phage adaptation; MBEC

check for updates

Citation: Mukane, L.; Racenis, K.; Rezevska, D.; Petersons, A.; Kroica, J. Anti-Biofilm Effect of Bacteriophages and Antibiotics against Uropathogenic *Escherichia coli*. *Antibiotics* **2022**, *11*, 1706. https://doi.org/10.3390/antibiotics11121706

Academic Editor: Adelaide Almeida

Received: 21 October 2022
Accepted: 24 November 2022
Published: 26 November 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Antibiotic resistance is spreading rapidly and is a major problem for the healthcare system. The World Health Organization (WHO) Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) report [1] confirms that antibacterial resistance is increasing, specifically in low- and middle-income countries, causing significant mortality and morbidity. New and wide-spectrum antibiotics are rarely invented, and their costs are usually high [2,3]. Since the first analysis in 2017, only two approved agents represent new chemical classes. Most recently, authorized agents are derivatives of known classes. There are 217 antibacterial agents/programs that are in the preclinical stage. The annual analysis of the preclinical pipeline shows that from one year to the other, one-third of the development programs are discontinued [4].

Treatment with antibiotics can also cause unwanted side effects and even toxic effects for the patient, which can be very different and depend on the specific active substance and the group of drugs represented, including hypersensitivity reactions, gastrointestinal disturbances, and even nephro- or neurotoxicity [5]. Bacteriophages, which, unlike antibiotics, do not cause unwanted antibiotic-associated side effects, can be used as an alternative therapy. For example, in cases where the patient has kidney failure and the only effective antibiotics are nephrotoxic, it is necessary to look for alternatives, so that they do not cause irreversible damage to the patient [6].

Urinary tract infections (UTIs) are common infections that require antibacterial therapy, which can cause changes in the microbiome and promote the development of multidrug-resistant bacterial strains [7]. *E. coli* is one of the most common causes of UTIs [7–10]. It is a Gram-negative rod-shaped bacteria with flagella, which help with movement and provide the adhesion function [11]. Resistance development is facilitated by the ability of bacteria to form biofilms, which make the microorganism more virulent and help to resist the host's immune response by enclosing them in an extracellular biochemical matrix. Biofilms are associated with up to 60% of human infections [12]. They can form in human tissues on altered or damaged surface structures. Biofilms are often related to the ability of bacteria to adhere to surfaces, and, in this case, the morphology of the bacteria plays an important role. *E. coli* has great potential to form a biofilm in the case of a UTI [13]. Studies show that the ability to create a biofilm depends on various factors. One of them is that biofilm formation is genetically encoded and is one of the defense mechanisms that ensure resistance [14,15]. Many studies indicate that the mechanical and physical–chemical properties of the biofilm matrix reduce or delay the penetration of many compounds, including antibacterial agents. As a result, UTIs are becoming increasingly difficult to treat. The WHO has listed resistant *Enterobacterales* as one of the global priorities for the research and development of new antibacterial agents [1].

The use of antibiotics is commonly based on their effect on planktonic bacterial cells, without paying enough attention to the risk of biofilm formation. Some antibiotics, such as fluoroquinolones, rifampin, and ampicillin, penetrate well through the matrix, although they do not completely eradicate the biofilm. However, delayed antibiotic penetration may have critical phenotypic consequences. Due to the slow diffusion of antibiotics through the biofilm, bacteria could be exposed to long-term subinhibitory concentrations of antibiotics. Subsequently, bacterial cells could adapt to the presence of antibiotics through metabolic or transcriptional adaptation [16]. There is evidence that sub-inhibitory concentrations of antibiotics can even promote the formation of bacterial biofilms [17,18].

Phages have been explored as antibiofilm agents, as they are capable of lysing host bacteria in biofilms. Although the efficacy of these phages is limited [19], phages can usually infect and destroy only a subset of strains belonging to a single bacterial species. Therefore, several methods can be used to expand the spectrum of phage efficacy and reduce the risk of resistance. Using a mixture of several lytic phages as a phage cocktail can overcome the limitations of monotherapy and improve treatment results [20]. Recent studies have shown that a phage cocktail is more effective at preventing and destroying bacteria biofilms than individual phages [21]. Another option to improve the effect against resistant strains is to perform an adaptation procedure in which phages are trained to infect the host [22].

In this study, we tested the biofilm-formation capacity of *E. coli* strains isolated from urine samples from patients with a UTI. The antimicrobial and anti-biofilm effect of amoxicillin–clavulanic acid, ciprofloxacin, and three commercial bacteriophage cocktails was detected in the two strongest biofilm-forming strains. In the event of low phage efficiency, a bacteriophage-adaptation procedure was performed, and the improvement of the lytic effect was evaluated.

2. Results

2.1. Bacterial Isolates

Six *E. coli* strains included in the study were isolated from five female and one male patients with different types of UTI and comorbidities, as shown in Table 1.

Table 1. Patient characteristics for isolated bacterial strains. CKD, chronic kidney disease; FSGS, focal segmental glomerulosclerosis; CMV, cytomegalovirus; UTI, urinary tract infection.

N	Strain Code	Age	Sex	Type of UTI	Comorbidities
1	021UR	21	Female	Pyelonephritis	Non
2	01032UR	66	Male	Pyelonephritis	Diabetes mellitus; CKD IIIB; Nephrolithiasis; Essential arterial hypertension; Coronary artery disease; Congestive heart failure
3	0108UR	30	Female	Asymptomatic bacteriuria	Renal transplantation 2013; CKD V; FSGS; Haemodialysis; Renal anaemia; Secondary hypertension
4	01108UR	74	Female	Cystitis	Coronary artery disease; Essential arterial hypertension; Osteoarthritis; Hypothyroidism; Congestive heart failure
5	01168UR	49	Female	Cystitis	Renal transplantation 2016; Acute CMV hepatitis; Secondary hypertension; Multiple sclerosis;
6	01206UR	57	Female	Recurrent cystitis	Renal transplantation 2008; CKD IIIB; Recurrent UTI; Secondary hypertension;

2.2. Biofilm Screening

The *E. coli* strain 01108UR did not produce any biofilm because the optical density was similar to that of the negative control. Five strains showed different biofilm-formation capabilities (see Figure 1). The two strains (021UR and 01206UR) with the highest optical density values were selected for further MIC and MBEC testing.

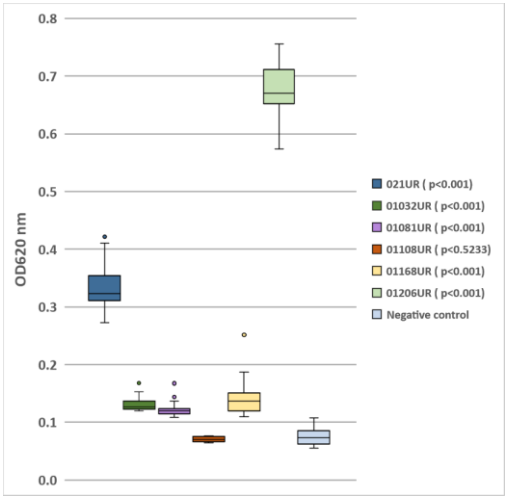


Figure 1. Biofilm formation by *E.coli* isolated from patients' urine samples.

2.3. Antimicrobial and Phage Susceptibility

The original titer of the bacteriophage cocktail Ses was 4 ⇾ 10^5 PFU/ mL, Intesti was 7 ⇾ 10^5 PFU/ mL, and Pyobacteriophag was 3 ⇾ 10^6 PFU/ mL. After propagation of the phage cocktail, the titer increased to 4 ⇾ 10^6, 1 ⇾ 10^8, and 4 ⇾ 10^6 PFU/ mL for Ses, Intesti, and Pyobacteriophag, respectively. The data on the susceptibility of bacterial strains to phages are summarized in Table 2. We observed that the strain 021UR was more sensitive to all phage cocktails, having semi-confluent lysis in the case of Ses and Pyobacteriophag and confluent lysis when the Intesti phage cocktail was applied. The

lowest sensitivity of the phage cocktails was observed for 01108UR and 01206UR. The strain 0108UR showed resistance to Intesti and Pyobacteriophag and partial lysis to Ses. The strain 01206UR showed resistance to the Ses and Intesti phage cocktails and partial lysis to Pyobacteriophag. Phage adaptation was performed to improve the efficiency of the Pyobacteriophag cocktail with 01206UR, as this strain was chosen for further antibiofilm testing. After adaptation, the Pyobacteriophag titer increased to 7×10^7 PFU/mL. The phage titer was equalized to 10^6 PFU/mL to perform the spot assay for phage-susceptibility testing. Improvement of the Pyobacteriophag effect in strain 01206 from individual plaques (+) to confluent lysis (+++) was detected after adaptation (Table 2 and Figure 2).

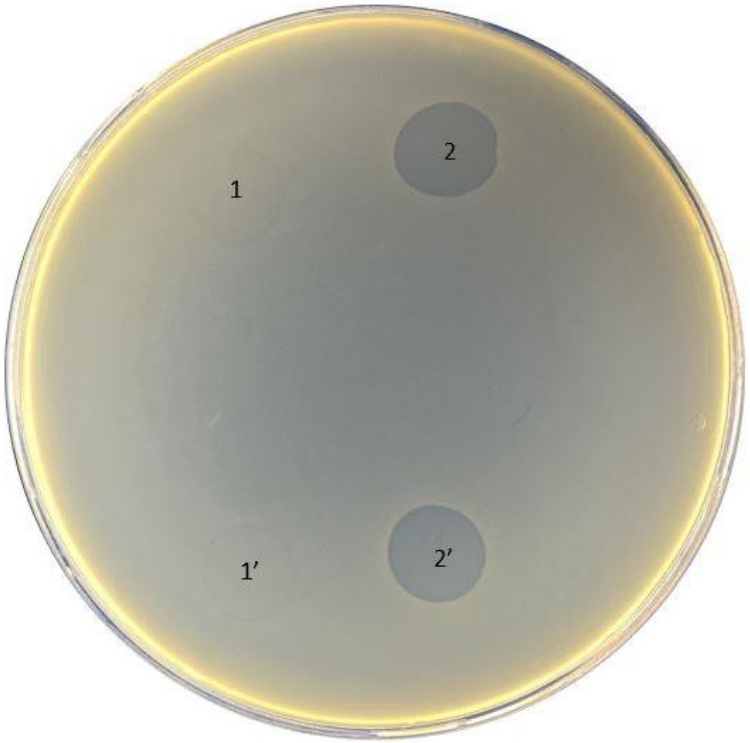


Figure 2. Pyobacteriophag effect before (1 and 1′) and after (2 and 2′) adaptation to strain 01206UR.

Table 2. Results of antimicrobial and phage-susceptibility testing and ability of biofilm formation.

	021UR	**01032UR**	**01081UR**	**01108UR**	**01168UR**	**01206UR**
AMP	R	R	S	S	R	R
AMC	R	R	S	S	S	S
TZP	S	I	S	S	S	S
CTX	S	R	S	S	S	S
CAZ	S	R	S	S	S	S
IMP	S	S	S	S	S	S
MEM	S	S	S	S	S	S
CIP	S	R	S	S	S	R

Table 2. *Cont.*

	021UR	01032UR	01081UR	01108UR	01168UR	01206UR
NOR	S	N/A	N/A	N/A	S	R
GEN	S	R	S	S	S	S
SXT	R	S	S	S	R	S
NIT	S	S	S	S	S	S
ESBL	Negative	Positive	Negative	Negative	Negative	Negative
Ses	++	+	++	+	++	-
Intesti	+++	+	++	-	+	-
Pyobacteriophag	++	+	+	-	+	+
Pyobacteriophag *	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	+++
Biofilm formation	Moderate	Weak	Weak	No biofilm	Weak	Strong

S—sensitive; R—resistant, I—intermediate; ampicillin (AMP); amoxicillin–clavulanic acid (AMC); piperacillin–tazobactam (TZP); cefotaxime (CTX); ceftazidime (CAZ); imipenem (IMP); meropenem (MEM); ciprofloxacin (CIP); norfloxacin (NOR); gentamicin (GEN); sulfamethoxazole–trimethoprim (SXT); nitrofurantoin (NIT); extended-spectrum beta-lactamase (ESBL); * Pyobacteriophag phage cocktail after adaptation; not applicable (N/A).

Bacterial strains showed different antimicrobial susceptibilities (see Table 2). Of the six bacterial strains, 01081UR and 01108UR were susceptible to all antimicrobials tested; 01032UR showed the broadest antimicrobial resistance, being resistant to six antimicrobials; 021UR and 01206UR were resistant to three antimicrobials; and 01168UR was resistant to two antimicrobials.

2.4. Colony-Forming Unit Spot Test

The results of the tests are reflected in Table 3 and visualization of the test is represented in Figure 3. According to the results, even after 24 h, the biofilm continued to form, and, after 48 h, the number of bacteria increased.

Table 3. Results of colony-forming unit spot test.

Bacterial Strain	Inoculum	Planktonic Cells (after 24 h)	Biofilm Formatting Cells (after 24 h)	Biofilm Formatting Cells (after 48 h)
021UR	10^7 CFU/mL	10^9 CFU/mL	10^6 CFU/mL	10^7 CFU/mL
01206UR	10^7 CFU/mL	10^9 CFU/mL	10^6 CFU/mL	10^7 CFU/mL

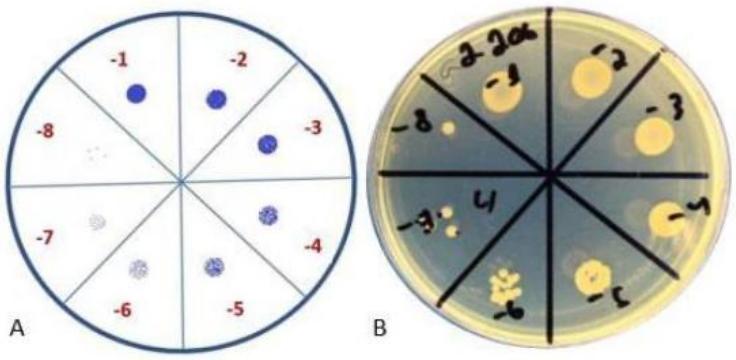


Figure 3. Colony-forming unit spot test. (**A**) Schematic representation; (**B**) visual representation.

2.5. Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Minimal Biofilm Eradication Concentration (MBEC) Detection

According to EUCASTv9.0, the MIC values of amoxicillin–clavulanic acid and ciprofloxacin are 8 mg/L and 0.25 mg/L, respectively. The strain 021UR was resistant to amoxicillin–clavulanic acid, and the MIC value was reached only at a concentration of 256 mg/L, but MBEC was not reached even at the highest concentration (1024 mg/L). The MIC value of ciprofloxacin was achieved at 0.25 mg/L but showed resistance in the biofilm; MBEC was 64 mg/L. Although strain 01206UR was susceptible to amoxicillin–clavulanic acid, and the MIC value was reached at 8 mg/mL, this antibiotic failed to eradicate the bacterial biofilm at a concentration of 1024 mg/L. The strain 01206UR was also resistant to ciprofloxacin; the MIC value was 128 mg/L, but MBEC was not reached at 1024 mg/L. The mean MIC and MBEC values in the test of amoxicillin–clavulanic acid and ciprofloxacin are represented in Figure 4. Both antibiotics show no inhibiting effect on biofilms.

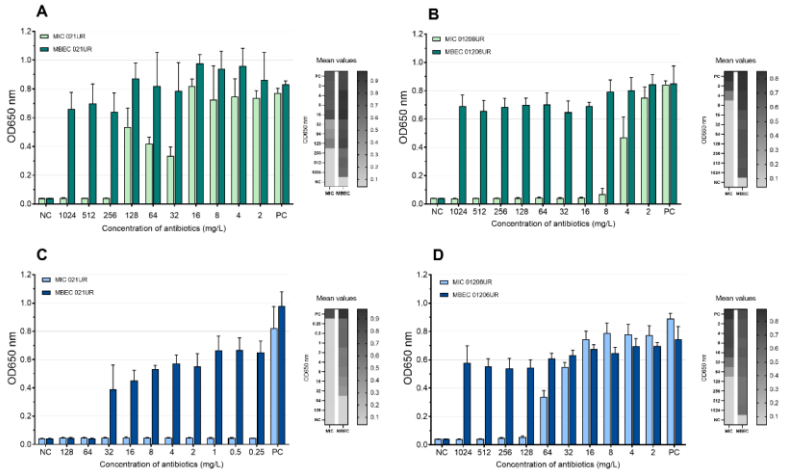


Figure 4. Mean MIC and MBEC antibiotic values. (**A**) Amoxicillin–clavulanic acid for 021UR; (**B**) amoxicillin–clavulanic acid for 01206UR; (**C**) ciprofloxacin for 021UR; (**D**) ciprofloxacin for 01206UR; NC—negative control; PC—positive control.

The mean values of the MIC and MBEC tests of the phages are represented in Figures 5 and 6. We conclude that a strain was sensitive to a phage if the OD values were <0.1 measured at 650 nm or if the result was close to the negative control. Using phages, the growth of bacterial strain 021UR was reduced in all cases, including the planktonic cells (MIC) and biofilms (MBEC), compared to the positive control, but the effect is not adequate enough in all cases to declare that the strain is completely lysed by the phage cocktail, as the growth of bacteria is not observed. The other strain, 01206UR, showed resistance to all three phage cocktails (Pyobacteriophag, Ses, and Intesti). Resistance to the Ses and Intesti phage stocks was already determined in the phage-susceptibility test. However, for Pyobacteriophag, we observed a low lytic effect, so the adaptation of Pyobacteriophag was performed. After that, efficiency improved: bacterial growth was markedly reduced in both planktonic (MIC) and biofilm-forming (MBEC) cells. However, the OD values were slightly above 0.1 for the MIC.

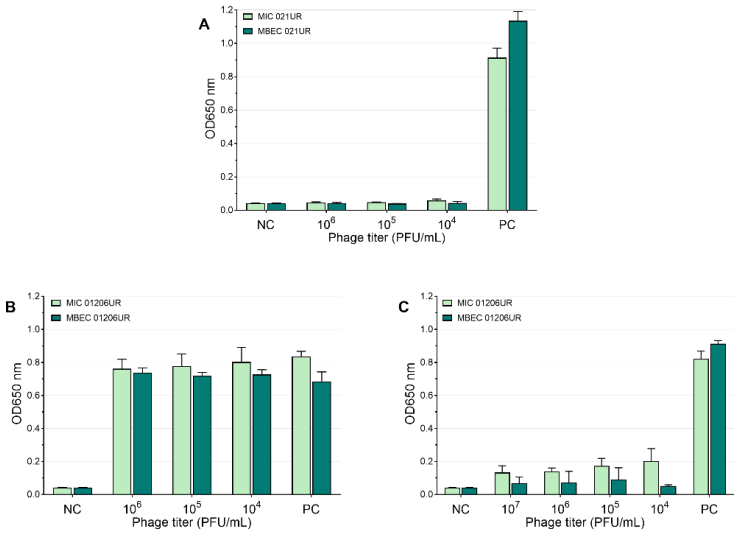


Figure 5. Pyobacteriophag effect at different concentrations represented as mean values. (**A**) MIC and MBEC in 021UR; (**B**) MIC and MBEC in 01206UR before adaptation; (**C**) MIC and MBEC in 01206UR after adaptation.

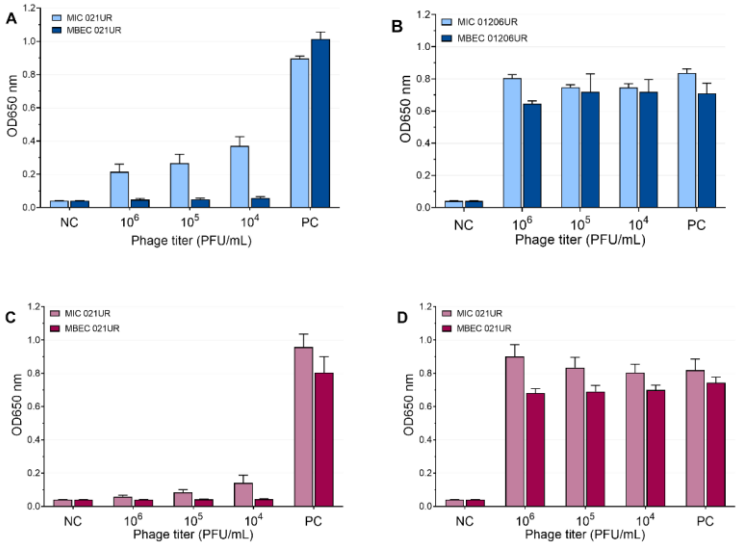


Figure 6. Ses and Intesti phage effects at different concentrations represented as mean values. (**A**) MIC and MBEC in 021UR by SES; (**B**) MIC and MBEC in 01206UR by Ses; (**C**) MIC and MBEC in 021UR by Intesti; (**D**) MIC and MBEC in 01206UR by Intesti.

3. Discussion

Our data indicate that *E. coli* isolated from patients with a UTI can often form biofilms. The results show that although amoxicillin–clavulanic acid and ciprofloxacin can successfully deal with planktonic cells, they cannot destroy biofilms. In contrast to antibiotics, our

research demonstrates that if bacteriophages affect planktonic cells, they can also destroy biofilms. In situations where the bacteriophages initially showed a weak effect against the strain, phages could be adapted, thus achieving a lytic effect in both planktonic and biofilm-forming cells.

E. coli is often associated with biofilm formation [23–26], although our research shows that the ability of bacteria to form a biofilm is highly variable depending on each individual strain. In the human body, bacteria can attach to tissues and to artificial surfaces, such as catheters and implants, to form a biofilm [11]. It is self-evident that biofilms, as more resistant forms of bacteria, will often be found in samples of patients with contributing factors, such as comorbidities, weakened immunity, and artificial devices, for example, urinary catheters. Referring to this, in our study, the strongest biofilm-producing strain, 01206UR, was collected from a patient with a transplanted kidney, chronic kidney disease, secondary hypertension, and a recurrent UTI. However, interestingly, the results reveal that the second-strongest biofilm-forming strain, 021UR, was isolated from a patient with pyelonephritis and without any other comorbidities. We did not investigate the genetic determinants of the formation of bacterial biofilms, but this would be essential to fully understand bacterial biofilms. Highly resistant bacterial strains are not necessarily the strongest biofilm formers [27,28]. For instance, the ESBL-positive 01032UR strain described in our study was resistant to amoxicillin, amoxicillin–clavulanic acid, cefotaxime, and ceftazidime. Still, compared to the other strains, it was a weak biofilm producer. The strongest biofilm producers were 021UR and 01206UR; these strains were resistant to three antibiotics. The ability of bacteria to form biofilm should be considered an essential aspect during infection and treatment. Before starting therapy, bacteria isolated from patient material should be tested for antimicrobial susceptibility and biofilm-formation ability.

Amoxicillin–clavulanic acid and ciprofloxacin are common antibiotics used for the treatment of UTIs. Referring to the antibiotic sensitivity test, the bacterial strain 021UR was resistant to amoxicillin–clavulanic acid, which was also confirmed by the MIC test in a 96-well plate; therefore, it is not unexpected that amoxicillin–clavulanic acid was unable to destroy the biofilm in this strain. The results are different for the 01206UR strain, although the bacterial strain is sensitive to amoxicillin–clavulanic acid, and the MIC value is reached at a low concentration (8 mg/L); in the case of biofilm, even at the maximum concentration (1024 mg/L), the antibiotic was unable to destroy the biofilm. Ciprofloxacin showed similar results. The strain 01206UR, determined to be resistant to ciprofloxacin, showed a high MIC value at 128 mg/L and did not destroy the biofilm even at 1024 mg/L. Ciprofloxacin showed remarkable results for the 021UR strain, i.e., although planktonic cells are destroyed, and a MIC value is reached at a very low concentration (0.25 m/L), ciprofloxacin was able to destroy the biofilm only at a much higher concentration (64 mg/L). Planktonic cells can be eradicated in the human body through the combined action of antimicrobials and host immune responses. Although antibiotics can successfully destroy planktonic bacterial cells, they are often unable to destroy biofilms. Bacteria in the biofilm often survive treatment and can cause reactivation of the infection [16]. Additionally, antibacterial treatment can suppress the normal microflora and promote the growth of other bacteria.

Occasionally, to achieve MIC and MBEC values in biofilm models, it is necessary to use high concentrations of antibiotics [18]. Such high doses cannot be used for patients because they can be harmful or even fatal to the patient; therefore, such antibiotics will not provide an effect in therapeutic doses and are not recommended for treatment. Our results show that phages can achieve a better effect on biofilms (MBEC values) than on planktonic cells (MIC values). This can be observed most clearly when analyzing the effect of the SES phage against the 021UR strain (see Figure 6) and could be explained by the fact that phages begin active replication when bacteria are released from the biofilm and become metabolically active [29]. The three phage cocktails could disrupt bacterial biofilms for the 021UR strain. However, this strain was resistant to amoxicillin–clavulanic acid, and, for ciprofloxacin, the MBEC value was reached only at a concentration of 64 mg/L.

Interestingly, the results show that although both strains, 021UR and 01206UR, are strong biofilm formers and express resistance to several antibiotics (see Table 2), they are still susceptible to phages. As a limitation, it should be mentioned that our study did not use individual phages but used commercial phage cocktails. Using commercial phage cocktails, it is difficult to multiply them because we do not have access to the original host strains on which these phages were grown and propagated. Unlike antibiotics, phages are living viruses, so their activity can be affected by various factors, such as the amount of nutrients, temperature, and pH. Therefore, it is critical to provide appropriate growth conditions during research. The Calgary biofilm device model provides fast and reproducible results in determining the minimum biofilm eradication concentration [30]. It is possible to supply dynamic conditions and add fresh nutrients to the formed biofilms, and, after their destruction, it is possible to detect viable cell regrowth.

Each bacteriophage has its spectrum of activity. Therefore, the effect against some bacterial strains may be weak, or bacteria may even be completely resistant to them. One possibility to expand the range of phage activity is to use multi-phage cocktails, as was also done in this study. The second way to improve phage activity is to provide adaptation of phages, which significantly improves their efficiency [15,21]. Pyobacteriophag was initially unable to kill the 01206UR strain, but, after adaptation, a significant improvement in the effect was observed in both the planktonic cells and biofilms (see Figure 5). In complicated cases, when antibiotics do not have the desired effect and the efficiency of phages is low, adaptation can be the solution and cure the patient.

4. Materials and Methods

4.1. Bacterial Isolates and Antimicrobial Susceptibility

Six *Escherichia coli* strains isolated from urine samples from patients with urinary tract infection (UTI) admitted to Pauls Stradins Clinical University Hospital, Latvia, were used for the study. All strains were identified using VITEK®2. Two of the most significant biofilm-formatting strains were selected for further research. Antimicrobial susceptibility for bacterial strains was determined by disk diffusion test and interpreted according to clinical breakpoints of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) v9.0.

4.2. Biofilm Screening

Flat-bottom polystyrene microtiter plates with lids (TC Plate 96-well, Suspension, F.Sarstedt, Nümbrecht, Germany) were used in the biofilm-formation assay. The inoculum was prepared using freshly incubated bacterial strains on trypticase soy agar (TSA) plates. Three to five morphologically identical colonies from TSA plates were picked with a sterile loop and transferred to 5 mL of Luria Bertani (LB) broth. The prepared samples were incubated at 37 °C overnight (16 h) and then diluted 1:100. Plates were filled with 200 µL of inoculum in each well, covered with a lid, and incubated at 37 °C for 20 h. Biofilms were stained with crystal violet according to the crystal violet assay protocol, based on the technique described by Stepanovic et al., with minor modifications [31]. After incubation, the liquid from the plates was ejected into the clinical waste container. Using an 8-channel pipette, each well was rinsed twice with sterile 0.9% NaCl solution, and each time the excess solution was shaken out into a clinical waste container. Using a multipipette, 200 µL of 0.1% crystal violet solution was poured into each well and stained for 15 min at room temperature. Subsequently, the plate was washed three times with 200 µL distilled water. Each well was filled with 200 µL of 96% ethanol. With the help of a multipipette, the solution in the wells was mixed to ensure the complete dissolution of the dye. The optical density of each well was measured with an optical spectrophotometer (TECAN INFINITE F50, Männedorf, Switzerland) at a wavelength of 620 nm. The mean OD values of each strain were compared to the cut-off value (ODc), which was defined as three standard deviations above the mean OD of the negative control (LB only). According to these values, all strains were divided into 4 groups: OD $\leq$ ODc = no biofilm producer; ODc < OD $\leq$ 2 $\times$

ODc = weak biofilm producer; 2 × ODc < OD ≤ 4 × ODc = moderate biofilm producer; 4 × ODc < OD = strong biofilm producer. The results are shown in Table 2.

4.3. Bacteriophage Cocktails and Their Propagation

Three commercially available cocktails with phages against *E. coli* were used, Ses and Intesti of ELIAVA Biopreparations Ltd. (Tbilisi, Georgia) and Pyobacteriophag of Microgen Ltd. (Perm, Perm Territory, Russia) [32,33]. The plaque assay was performed using the *E. coli* ATCC 29522 reference strain to determine the phage stock titer. Briefly, phage cocktail tenfold dilutions in 0.9% NaCl were made. Then, 50 µL of diluted phage stock were mixed with 100 µL of freshly grown bacterial suspension in 0.7% molten LB agar, previously incubated in LB broth for 16–18 h at 37 °C, and were poured onto a TSA plate. After overnight incubation at 37 °C, phage plaques on each plate were counted, and the phage titer (PFU/mL) was calculated. To achieve a higher phage cocktail titer, webbed plates of phage titration were used, and 12 mL of LB broth medium was poured on the plate and left at room temperature for 2 h. The supernatant with LB broth and overlay agar was removed and collected in 15 mL plastic tubes. Chloroform ($CHCL_3$) was added with the final concentration of 2–3%, and the tubes were mixed and left at 4 °C for 2 h. Subsequently, the tubes were centrifuged at 6000× *g* for 15 min at 4 °C, and the supernatant was filtered using a 0.2 µm filter (Syringe filter, Filtropur S, Sarstedt, Nümbrecht, Germany).

4.4. Spot Assay for Phage-Susceptibility Testing

The susceptibility of bacteriophages was detected using the spot test. For the test, the bacteria were grown overnight in LB broth. Approximately 5 mL of melted semi-liquid 0.7% LB semi-liquid melted agar was added to 100 µL of bacterial suspension in a sterile tube. The suspension was gently mixed and poured onto a thin layer of the TSA plate. The plates were left stationary until the upper layer of LB agar was completely solidified. With a pipette, 10 µL of the phage lysate 10^6 PFU/mL was dropped onto the plates and left in aseptic conditions at room temperature until the drops dried. Subsequently, the plates were incubated overnight at 37 °C. The test results were determined the following day by visually evaluating the effect on the plates and considering it as confluent (+++), semi-confluent (++), overgrown or partial lysis and individual plaques (+), or no lysis (−).

4.5. Phage Adaptation Procedure

Three iterative passages of the adaptation procedure, also known as phage training, following modified Appelman's method [20,34], were executed to increase phage infectious ability and reduce the development of bacterial phage resistance.

To prepare the dilution series of bacteriophage cocktail, 4.5 mL LB broth medium was transferred into 15 mL plastic centrifuge tubes labeled from '10^{-1}' until the dilution factor of bacteriophage lysate that was attained after the propagation procedure before. Next, a 0.5 mL aliquot of undiluted bacteriophage suspension was transferred into the first '10^{-1}' tube. After the preparation was mixed with the Vortex V-1 plus (Biosan, Riga, Latvia), 0.5 mL was shifted to the next '10^{-2}' tube. These steps of tenfold dilution were continued until the last labeled tube was reached. After vortexing, an additional 0.5 mL sample from the last tube was removed.

The infection of the bacterial strain with newly titered phages was ensured by adding 0.05 mL of overnight bacterial culture suspension to each tube containing the titered phage, except the first tube, '10^{-1}'. This tube served as a negative control tube with phage only. A positive control tube contained exclusively bacterial suspension. After an incubation period at 37 °C for 48 h, the optical density of each tube was measured at a wavelength of 600 nm (OD600). Consequent steps of phage training were applied to the phage tube at the highest dilution, but with OD600 nearer to the negative control. To remove cellular debris, the blend in the relevant tube was treated with 1:50 chloroform ($CHCl_3$) and centrifuged (15 min, 6000× *g*, 4 °C). The supernatant obtained was filtered through a 0.2 µm pore size filtration system (Syringe filter, Filtropur S, Sarstedt, Nümbrecht, Germany). The spot test

was used to assess the effect of the adapted phage on the corresponding bacterial strain. The phage concentration was determined with the bacterial strain used for the adaptation procedure using a plaque assay.

4.6. Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Minimal Biofilm Eradication Concentration (MBEC) Detection

To prepare the inoculum, bacterial strains were incubated overnight (16–18 h) on TSA plates at 37 °C. Bacterial colonies from TSA were suspended in LB broth until an optical density of 1.0 McFarland (3.0×10^8 CFU/mL) was reached and then diluted 1:30 with LB broth (final concertation approximately 1.0×10^7 CFU/mL). Sterile 96-well microplates (Nunc™ MicroWell™ 96-Well, Nunclon Delta-Treated, Flat-Bottom Microplate, Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Denmark) were filled with 150 µL of inoculum and sterile LB broth for negative control using a multichannel pipette. Subsequently, plates were covered with a 96-peg lid (Nunc™ Immuno TSP Lids) and secured with Parafilm® (Bemis Company, Inc, Neenah, WI, USA). The plates were incubated at 37 °C for 24 h at 150 rpm. After incubation, the 96-peg lid was transferred to a new 96-well plate filled with 200 µL of serial antibiotic dilution, according to the antimicrobial susceptibility of the strains. Two colons of each plate (1st and 12th) were filled with sterile LB for negative and positive control. Ten columns of the plate were filled with serial dilutions of amoxicillin/clavulanic acid (Amoksiklav, Sandoz, Ljubljana, Slovenia) and ciprofloxacin (Cipralex, KRKA, Novo Mesto, Slovenia).

After 24 h of incubation at 37 °C at 150 rpm, optical density measurements were made at 650 nm to detect minimum inhibitory concentration (MIC) values. The lid with pegs was transferred to the new plate, filled with a sterile 0.9% saline solution, and rinsed for 2 min. To determine the minimal biofilm eradication concentration (MBEC), the peg lid was transferred to a new plate (recovery plate) with 200 µL of sterile LB broth in each well. This plate was sonicated in an ultrasonication bath (Model 08855-02, Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, USA) for 30 min at a frequency of 44 Hz to remove the biofilm. After sonification, the lid with pegs was removed, and the plate was covered with a sterile lid and secured with Parafilm®. MBEC values were measured at OD650 after 24 h incubation of the recovery plate at 37 °C without rpm.

4.7. Colony-Forming Unit Spot Test

The crystal violet assay reflects the formation of the biofilm mass but does not accurately indicate the count of live bacterial cells in the biofilm. The colony-forming unit spot test is used to evaluate the number of viable cells in a broth and to confirm the biofilm-formation process (Figure 3). The colony-forming unit (CFU) spot test was performed to detect biofilm formation after 24 h and 48 h. The peg with biofilm was cut from the lid with sterile pliers, transferred to 200 µL of sterile saline, and sonicated for 30 min. Subsequently, the bacterial suspension was serially diluted, and 10 µL of each concentration was placed on TSA plates. After 16–20 h of incubation at 37 °C, the colonies were counted, and the CFU values were calculated.

4.8. Data Analysis

All experiments were performed in duplicate. All data were expressed as mean values. Microsoft Excel 10 and GraphPad Prisma 9.4.1 were used for data analysis. Mann–Whitney U test was used to compare the differences between control and treatment groups.

4.9. Ethical Statement

The study protocol was approved by the ethics committee of Riga Stradins University (document no. 8/08.09.2016).

5. Conclusions

Our results indicate that bacteriophages can successfully destroy bacterial biofilms, even when antibiotics cannot. Despite this, bacteriophages cannot be used in all situations, so each case must be evaluated individually because we lack controlled clinical studies that determine the effect of phages in biofilm-associated infections. Bacteriophages are promising agents for biofilm-associated infections, so further studies are needed to investigate the action of bacteriophages in bacterial biofilms more closely. Future research should also focus on the phage–antibiotic interaction in planktonic and biofilm-forming cells.

Author Contributions: Conceptualization, L.M. and K.R.; methodology, K.R., L.M, D.R. and J.K.; validation, L.M. and K.R.; formal analysis, K.R., L.M. and D.R.; investigation, K.R., L.M. and D.R.; data curation, K.R.; writing—original draft preparation, L.M. and K.R.; writing—review and editing, D.R., J.K. and A.P.; visualization, L.M. and K.R.; supervision, J.K. and A.P.; project administration, K.R., J.K. and A.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. WHO. Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) Report. Available online: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/341666/9789240027336-eng.pdf (accessed on 11 October 2022).
2. WHO. 2019 ANTIBACTERIAL AGENTS IN CLINICAL DEVELOPMENT an Analysis of the Antibacterial Clinical Development Pipeline. Available online: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/330420/9789240000193-eng.pdf (accessed on 11 October 2022).
3. WHO. ANTIBACTERIAL AGENTS IN PRECLINICAL DEVELOPMENT an Open Access Database. Available online: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/330290/WHO-EMP-IAU-2019.12-eng.pdf (accessed on 11 October 2022).
4. WHO. 2021 ANTIBACTERIAL AGENTS IN CLINICAL AND PRECLINICAL DEVELOPMENT: An Overview and Analysis. Available online: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/354545/9789240047655-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y (accessed on 11 October 2022).
5. Kanwal Rehman, S.H.K.; Akash, M.S.H. Toxicity of antibiotics. *Antibiot. Antimicrob. Resist. Genes Environ. Elsevier* **2022**, *1*, 234–252. [CrossRef]
6. Jennes, S.; Merabishvili, M.; Soentjens, P.; Pang, K.W.; Rose, T.; Keersebilck, E.; Soete, O.; François, P.M.; Teodorescu, S.; Verween, G.; et al. Use of bacteriophages in the treatment of colistin-only-sensitive *Pseudomonas aeruginosa* septicaemia in a patient with acute kidney injury-a case report. *Crit. Care* **2017**, *21*, 129. [CrossRef] [PubMed]
7. Flores-Mireles, A.L.; Walker, J.N.; Caparon, M.; Hultgren, S.J. Urinary tract infections: Epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat. Rev. Microbiol.* **2015**, *13*, 269–284. [CrossRef]
8. Asadi Karam, M.R.; Habibi, M.; Bouzari, S. Urinary tract infection: Pathogenicity, antibiotic resistance and development of effective vaccines against Uropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Immunol.* **2019**, *108*, 56–67. [CrossRef]
9. Klingeberg, A.; Noll, I.; Willrich, N.; Feig, M.; Emrich, D.; Zill, E.; Krenz-Weinreich, A.; Kalka-Moll, W.; Oberdorfer, K.; Schmiemann, G.; et al. Antibiotic-Resistant E. coli in Uncomplicated Community-Acquired Urinary Tract Infection. *Dtsch. Arztebl. Int.* **2018**, *115*, 494–500. [CrossRef] [PubMed]
10. Lee, D.S.; Lee, S.J.; Choe, H.S. Community-Acquired Urinary Tract Infection by. *Biomed. Res. Int.* **2018**, *2018*, 7656752. [CrossRef]
11. Trautner, B.W.; Darouiche, R.O. Role of biofilm in catheter-associated urinary tract infection. *Am. J. Infect. Control* **2004**, *32*, 177–183. [CrossRef] [PubMed]
12. ETajbakhsh, E.; Ahmadi, P.; Abedpour-Dehkordi, E.; Arbab-Soleimani, N.; Khamesipour, F. Biofilm formation, antimicrobial susceptibility, serogroups and virulence genes of uropathogenic *E. coli* isolated from clinical samples in Iran. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* **2016**, *5*, 11. [CrossRef]
13. Shah, C.; Baral, R.; Bartaula, B.; Shrestha, L.B. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) and correlation with antimicrobial resistance. *BMC Microbiol.* **2019**, *19*, 204. [CrossRef]
14. Chen, X.P.; Ali, L.; Wu, L.Y.; Liu, C.; Gang, C.X.; Huang, Q.F.; Ruan, J.H.; Bao, S.Y.; Rao, Y.P.; Yu, D. Biofilm Formation Plays a Role in the Formation of Multidrug-Resistant. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 367. [CrossRef]

15. Ballén, V.; Cepas, V.; Ratia, C.; Gabasa, Y.; Soto, S.M. Clinical *Escherichia coli*: From Biofilm Formation to New Antibiofilm Strategies. *Microorganisms* **2022**, *10*, 1103. [CrossRef] [PubMed]
16. Lebeaux, D.; Ghigo, J.-M.; Beloin, C. Biofilm-related infections: Bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **2014**, *78*, 510–543. [CrossRef] [PubMed]
17. JB, K. Antibiotic-induced biofilm formation. *Int. J. Artif. Organs* **2011**, *34*, 737–751. [CrossRef]
18. Penesyan, A.; Paulsen, I.T.; Gillings, M.R.; Kjelleberg, S.; Manefield, M.J. Secondary Effects of Antibiotics on Microbial Biofilms. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 2109. [CrossRef] [PubMed]
19. Pei, R.; Lamas-Samanamud, G.R. Inhibition of biofilm formation by T7 bacteriophages producing quorum-quenching enzymes. *Appl. Envion. Microbiol.* **2014**, *80*, 5340–5348. [CrossRef] [PubMed]
20. Eskenazi, A.; Lood, C.; Wubbolts, J.; Hites, M.; Balarjishvili, N.; Leshkasheli, L.; Askilashvili, L.; Kvachadze, L.; van Noort, V.; Wagemans, J.; et al. Combination of pre-adapted bacteriophage therapy and antibiotics for treatment of fracture-related infection due to pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 302. [CrossRef] [PubMed]
21. Liu, S.; Lu, H.; Zhang, S.; Shi, Y.; Chen, Q. Phages against Pathogenic Bacterial Biofilms and Biofilm-Based Infections: A Review. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 427. [CrossRef]
22. Laanto, E.; Mäkelä, K.; Hoikkala, V.; Ravantti, J.J.; Sundberg, L.R. Adapting a Phage to Combat Phage Resistance. *Antibiotics* **2020**, *9*, 291. [CrossRef]
23. Sharma, G.; Sharma, S.; Sharma, P.; Chandola, D.; Dang, S.; Gupta, S.; Gabrani, R. *Escherichia coli* biofilm: Development and therapeutic strategies. *J. Appl. Microbiol.* **2016**, *121*, 309–319. [CrossRef]
24. Surgers, L.; Boyd, A.; Girard, P.-M.; Arlet, G.; Decré, D. Biofilm formation by ESBL-producing strains of *Escherichia coli* and Klebsiella pneumoniae. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* **2019**, *309*, 13–18. [CrossRef]
25. Whelan, S.; O'Grady, M.C.; Corcoran, D.; Finn, K.; Lucey, B. Uropathogenic *Escherichia coli* Biofilm-Forming Capabilities are not Predictable from Clinical Details or from Colonial Morphology. *Diseases* **2020**, *8*, 11. [CrossRef] [PubMed]
26. Zhou, F.; Wang, D.; Hu, J.; Zhang, Y.; Tan, B.K.; Lin, S. Control Measurements of *Escherichia coli* Biofilm: A Review. *Foods* **2022**, *11*, 2469. [CrossRef] [PubMed]
27. Folliero, V.; Franci, G.; Dell'Annunziata, F.; Giugliano, R.; Foglia, F.; Sperlongano, R.; De Filippis, A.; Finamore, E.; Galdiero, M. Evaluation of Antibiotic Resistance and Biofilm Production among Clinical Strain Isolated from Medical Devices. *Int. J. Microbiol.* **2021**, *2021*, 9033278. [CrossRef] [PubMed]
28. Donadu, M.G.; Ferrari, M.; Mazzarello, V.; Zanetti, S.; Kushkevych, I.; Rittmann, S.K.-M.R.; Stájer, A.; Baráth, Z.; Szabó, D.; Urbán, E.; et al. No Correlation between Biofilm-Forming Capacity and Antibiotic Resistance in Environmental *Staphylococcus* spp.: In Vitro Results. *Pathogens* **2022**, *11*, 471. [CrossRef]
29. Visnapuu, A.; Van der Gucht, M.; Wagemans, J.; Lavigne, R. Deconstructing the Phage-Bacterial Biofilm Interaction as a Basis to Establish New Antibiofilm Strategies. *Viruses* **2022**, *14*, 1057. [CrossRef]
30. Ceri, H.; Olson, M.E.; Stremick, C.; Read, R.R.; Morck, D.; Buret, A. The Calgary Biofilm Device: New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms. *J. Clin. Microbiol.* **1999**, *37*, 1771–1776. [CrossRef]
31. Stepanović, S.; Vuković, D.; Hola, V.; Di Bonaventura, G.; Djukić, S.; Cirković, I.; Ruzicka, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* **2007**, *115*, 891–899. [CrossRef] [PubMed]
32. McCallin, S.; Sarker, S.A.; Sultana, S.; Oechslin, F.; Brüssow, H. Metagenome analysis of Russian and Georgian Pyophage cocktails and a placebo-controlled safety trial of single phage versus phage cocktail in healthy *Staphylococcus aureus* carriers. *Env. Microbiol.* **2018**, *20*, 3278–3293. [CrossRef]
33. Kutateladze, M. Experience of the Eliava Institute in bacteriophage therapy. *Virol. Sin.* **2015**, *30*, 80–81. [CrossRef] [PubMed]
34. Merabishvili, M.; Pirnay, J.P.; De Vos, D. Guidelines to Compose an Ideal Bacteriophage Cocktail. *Methods Mol. Biol.* **2018**, *1693*, 99–110. [CrossRef]

Trešā publikācija

frontiers | Frontiers in Medicine

CASE REPORT
published: 25 April 2022
doi: 10.3389/fmed.2022.851310

Use of Phage Cocktail BFC 1.10 in Combination With Ceftazidime-Avibactam in the Treatment of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Femur Osteomyelitis—A Case Report

Karlis Racenis[1,2]*, *Dace Rezevska*[1,3], *Monta Madelane*[4,5], *Ervins Lavrinovics*[6], *Sarah Djebara*[7], *Aivars Petersons*[2,8] *and Juta Kroica*[1]

[1] Department of Biology and Microbiology, Riga Stradins University, Riga, Latvia, [2] Center of Nephrology, Pauls Stradins Clinical University Hospital, Riga, Latvia, [3] Joint Laboratory, Pauls Stradins Clinical University Hospital, Riga, Latvia, [4] Department of Infectology, Riga Stradins University, Riga, Latvia, [5] Department of Infection Control, Riga East University Hospital, Riga, Latvia, [6] Latvian Center for Plastic, Reconstructive and Microsurgery, Riga, Latvia, [7] Centre for Infectious Diseases, Queen Astrid Military Hospital, Brussels, Belgium, [8] Department of Internal Diseases, Riga Stradins University, Riga, Latvia

OPEN ACCESS

Edited by:
Natividad Benito,
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Spain

Reviewed by:
Sebastian Leptihn,
Zhejiang University-University of Edinburgh Institute, China
Prasanth Manohar,
Zhejiang University-University of Edinburgh Institute, China

***Correspondence:**
Karlis Racenis
karlis.racenis@rsu.lv

Specialty section:
This article was submitted to Infectious Diseases - Surveillance, Prevention and Treatment, a section of the journal Frontiers in Medicine

Received: 09 January 2022
Accepted: 25 March 2022
Published: 25 April 2022

Citation:
Racenis K, Rezevska D, Madelane M, Lavrinovics E, Djebara S, Petersons A and Kroica J (2022) Use of Phage Cocktail BFC 1.10 in Combination With Ceftazidime-Avibactam in the Treatment of Multidrug-Resistant Pseudomonas aeruginosa Femur Osteomyelitis—A Case Report. Front. Med. 9:851310. doi: 10.3389/fmed.2022.851310

High-energy trauma with severe bone fractures can be complicated by infection, leading to the development of osteomyelitis. *Pseudomonas aeruginosa* is an important causative agent of such infections because of its high virulence profile and ability to develop resistance against a wide range of antimicrobials quickly. *P. aeruginosa* biofilms cause treatment failure and relapsing infections. Bacteriophages are viruses that can be used to treat biofilm-associated infections. Moreover, the combination of phages with certain antimicrobials have demonstrated synergistic and additive effects. We present a case of a 21-year-old patient with relapsing multidrug-resistant (MDR) *P. aeruginosa* femur osteomyelitis that developed after a road accident, with a proximal right femoral Grade III B open fracture and severe soft tissue damage. Despite extensive antimicrobial treatment and multiple surgical interventions with wound debridement, the infection persisted, with subsequent development of femoral osteomyelitis with a fistula. Patient care management included femoral head excision with wound debridement, intravenous (IV) ceftazidime-avibactam, and the local application of the lytic *Pseudomonas* bacteriophage cocktail BFC 1.10. Nine months after the intervention, the patient did not show any clinical, radiological, or laboratory signs of inflammation; therefore, hip replacement was performed. Nevertheless, recurrent *P. aeruginosa* infection evolved at the distal side of the femur and was successfully treated with conventional antimicrobials. In this case, wound debridement combined with antibiotics and bacteriophages resulted in bacterial eradication of proximal femoral segment, avoiding leg amputation, but failed to treat osteomyelitis in distal bone segment. An *in vitro* assessment of the isolated MDR *P. aeruginosa* strain for biofilm formation and

phage susceptibility was performed. Additionally, the antimicrobial effects of ceftazidime-avibactam and BFC 1.10 were determined on planktonic cell growth and bacterial biofilm prevention was evaluated. The isolated bacterial strains were susceptible to the bacteriophage cocktail. Strong biofilm formation was detected 6 h after inoculation. Ceftazidime-avibactam combined with BFC 1.10 was most effective in preventing planktonic cell growth and biofilm formation. In both cases, the required concentration of ceftazidime-avibactam decreased two-fold. This study demonstrates the possible use of bacteriophages and antibiotics in difficult-to-treat bone and soft tissue infections, where the additive effects of phages and antibiotics were observed.

Keywords: *P. aeruginosa*, biofilm, bacteriophage, phage therapy, osteomyelitis, multidrug resistance

INTRODUCTION

Osteomyelitis after severe bone fractures is a well-known complication. The risk of secondary surgical site infection corresponds to the severity of bone fractures according to the Gustilo-Andersson classification (1). Risk factors include biofilm formation and the type of causative agent. *Pseudomonas aeruginosa* is one of the pathogens with the highest recurrence rate owing to its broad antimicrobial resistance, high virulence profile, and the ability to form biofilms, a crucial property for chronic bacterial colonization (2, 3).

The published data illustrate that the prevalence of bacterial biofilms can reach 78.2% in chronic wounds, becoming a formidable challenge in wound care, treatment, and management (4). Multidrug resistance (MDR) and resilient biofilm production are ever-growing challenges in managing *P. aeruginosa* infections. To combat this concern, there is strong interest in developing potentially promising alternatives (5).

Bacteriophage (phage) therapy is a non-antibiotic strategy to circumvent the rise in antibiotic resistance and combat difficult-to-treat infections in clinical settings. Lytic phages cause bacterial cell lysis. Moreover, the activity of their polysaccharide depolymerases helps overcome the carbohydrate boundaries, including extracellular polysaccharides within biofilms (6). These data suggest that bacteriophages might synergize with commonly used antibiotics to eradicate drug-resistant strains; phages might boost the potency of antibiotics (7). Variability in the possible interactions between phages and antibiotics can be determined by the mechanistic action of the chosen antibiotic class (8). Clinical cases have demonstrated the successful use of bacteriophages in bone and soft tissue infection treatment (9–11). It is important to avoid the well-known side effects of the treatment using antimicrobials. Until now, phage therapy has been safe in treating infection; however, the data are limited and may raise concerns in the future (12, 13). Therefore, phages, such as bacteriophage cocktail BFC 1.10, which are well-described and safe for patient care, should be applied for treating infections (14).

We report the case of a 21-year-old man with MDR *P. aeruginosa* osteomyelitis that developed after a trauma-related severe femoral fracture. The patient was treated with conventional antibiotics; however, the infection persisted. Additionally, he developed acute kidney injury, a side effect of colistin treatment. To avoid right leg amputation, surgical intervention with wound debridement and antimicrobial regimen combining IV ceftazidime-avibactam and local lytic *Pseudomonas* bacteriophage cocktail BFC 1.10 was used. We also evaluated biofilm formation by isolated bacterial strain, phage susceptibility, and the impact of phage-antibiotic interactions on planktonic and biofilm-forming cells.

CASE DESCRIPTION

In July 2018, a 21-year-old man was hospitalized after a road accident with open comminuted proximal right femoral and acetabular fractures, laceration of the right lower hand, and hemorrhagic shock. Wound debridement, fasciotomy, femur fracture stabilization with gamma nail, and tissue reconstruction were performed on the 14th of July. On consecutive days, the patient developed secondary MDR *P. aeruginosa,* carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*, and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE) wound infections and multiple organ dysfunction syndrome. The patient underwent five debridement procedures and therapy using a wound vacuum system. Broad-spectrum IV antimicrobial treatment with meropenem, colistin, piperacillin-tazobactam, linezolid, and fluconazole was administered, and renal replacement therapy was initiated. Regardless of the treatment, the patient developed an osteosynthesis-associated infection and osteomyelitis, and repeatedly positive wound cultures grew with VRE, MDR *P. aeruginosa*, and MDR *A. baumannii.* On the 13th of August, the gamma nail was removed, and proximal femoral segment resection was performed, followed by tissue reconstruction and lower leg external fixation. Based on the antibiogram, the antimicrobial regimen was changed to intravenous fosfomycin, meropenem, and colistin. On the 13th of September, the right thigh wound was closed using a scapular flap. The patient's condition improved gradually, and there were no signs of systemic or local inflammation. Repeated cultures of the wound were negative. The patient was discharged on the 15th of October with IV meropenem and colistin treatment, which was discontinued after two weeks due to acute kidney injury, presumably colistin-induced nephrotoxicity.

In November, purulent discharge from the right upper tight appeared. Computed tomography with contrast injection in the cutaneous wound opening revealed a fistula that connects femoral head and skin on the right upper third of the lateral femur surface (**Figure 1A**). The patient underwent fistulotomy, and MDR *P. aeruginosa* and VRE were isolated from the wound. With a presumptive diagnosis of recurrent femoral osteomyelitis, two-stage surgery was planned to preserve hip replacement surgery in the future. Local bacteriophage therapy was planned using the bacteriophage cocktail BFC 1.10 produced at Queen Astrid Military Hospital in Brussels, Belgium, consisting of phages active against *P. aeruginosa* and *S. aureus*.

DIAGNOSTIC ASSESSMENT, THERAPEUTIC INTERVENTION, FOLLOW-UP, AND OUTCOMES

The treatment was performed according to Paragraph 37 of the Declaration of Helsinki (15). The patient provided written informed consent for the use of the bacteriophages. On the 5th of December, a right femoral head excision was performed and replaced with colistin-impregnated cement spacer. The proximal femoral culture was positive for MDR *P. aeruginosa,* VRE, and *Staphylococcus epidermidis.* The pathology and intraoperative findings confirmed femoral head osteomyelitis with fistula (**Figures 1B,C**). After surgery, the patient was treated with IV colistin for 7 days and linezolid for 23 days. On the 7th of December, 2,000 mL of BFC 1.10 cocktail with 10^7 plaque-forming units (PFU) per mL of each phage were shipped to Latvia. Prefilled sterile containers containing 30, 40 or 50 mL of phage solution were prepared under sterile conditions. Three days before the procedure, the patient was treated with IV ceftazidime-avibactam, which was continued for 15 days. On the 13th of December, bone cement was removed; wound and acetabular cultures were taken, and were positive for MDR *P. aeruginosa.* Next, wound rinsing with 50 mL BFC 1.10 bacteriophage suspension was performed intraoperatively, tissue damage was replaced with a serratus muscle flap, and an irrigation system for local bacteriophage application was installed (**Figure 1D**). For the first 7 days, the patient was treated with 40 mL (1 ml/min) of BFC 1.10 three times daily and then with 30 mL (1 ml/min) of BFC 1.10 two times daily via an irrigation catheter for another 7 days. The wound was rinsed with 50 ml of 4.2% sodium bicarbonate solution before the phage application using syringe. Together with the local phage treatment, linezolid and ceftazidime-avibactam were continued. During and after phage treatment on days 1, 3, 4, 7, 10, and 15, no bacterial cultures from the wound grew. Phages were isolated from the wound in the morning buffer sample before phage administration on days 1, 3, 4, 7, 10, and 15. At the end of treatment, the wound healed with no local or systemic signs of infection. When the irrigation catheter was removed, the tip of the catheter was positive for *Candida tropicalis*, which was not treated (**Figure 2**). No adverse effects, such as fever, local rash, itchiness, or other symptoms, were noted during phage therapy. Patient was discharged with lower leg external fixation until hip replacement surgery. Two months later, the wound healed and there were no signs of inflammation (**Figure 1E**) that was reassured with magnetic resonance imaging (MRI) of the right hip. Three months after phage treatment, computed tomography of the right hip and femur revealed no fluid collection or signs of osteomyelitis. In the following six months, two punctures from the right femur were performed and were culture negative, three months before hip replacement lower leg external fixation was removed. On the 3rd of September 2019, a hip replacement with a silver-coated implant was performed. During the surgery bacterial cultures were taken, the distal part of the femur was positive for MDR *P. aeruginosa* and VRE (fosfomycin susceptible), but acetabular bone and proximal part muscular tissue were culture negative. Patient received one dose of IV vancomycin for perioperative prophylaxis and IV colistin that was continued until microbiology results. Once the cultures came back positive patient was kept on IV colistin and IV fosfomycin. Sixteen days later DAIR (debridement, antibiotics and implant retention) was performed because of hematoma development and possible prosthesis infection, swabs taken during the surgery from periprosthetic tissue in distal segment were positive for MDR *P. aeruginosa*. On 4th of October punctures from periprosthetic tissue were performed and were culture negative. Three days later patient was discharged and continued antimicrobial therapy in outpatient setting with colistin and fosfomycin. For this episode patient received colistin for six weeks and fosfomycin for five months. During the follow-up period a year later, there were no local signs of infection, and the patient noted limited mobility in the right leg; however, he could continue to play basketball. Radiography of the right hip and femur 15 months later did not reveal any signs of inflammation (**Supplementary Figure 1**).

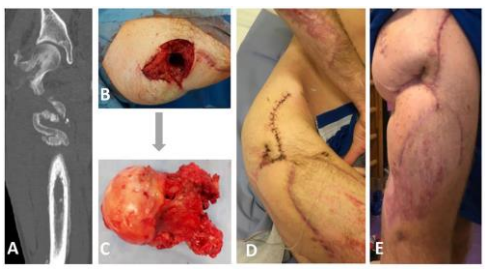


FIGURE 1 | Clinical and radiological appearance of the patient prior, during, and after bacteriophage therapy. **(A)** Computed tomography revealing a fistula that connects femoral head and skin on the right upper third of the lateral femur surface. **(B,C)** Intraoperative findings from the right femoral head excision on the 5th of December revealing the presence of a femoral fistula. **(D)** Postoperative photograph showing irrigation system for local bacteriophage application. **(E)** The appearance of the wound two months after bacteriophage therapy.

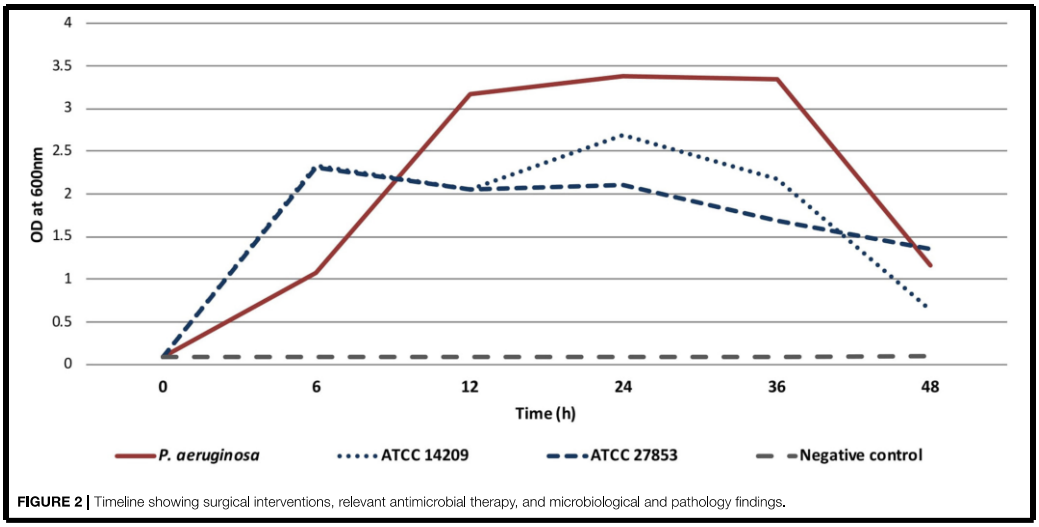


FIGURE 2 | Timeline showing surgical interventions, relevant antimicrobial therapy, and microbiological and pathology findings.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Isolate and Reference Strains

The bacterial strains used in this study were as follows: *P. aeruginosa* strain isolated from the patient wound of the right thigh and two *P. aeruginosa* reference strains, ATCC 14209 and ATCC 27853, which served as models for potent biofilm formation ability (16).

Antimicrobial Susceptibility

To detect antimicrobial susceptibility disk-diffusion test was performed. To detect minimum inhibitory concentration (MIC), the MICRONAUT-S Pseudomonas MIC AST plate by broth microdilution test was used (Merlin-Diagnostika, Germany). Acquired values were interpreted according to the EUCAST.

Bacteriophage Cocktail

The bacteriophage cocktail BFC 1.10, obtained from the Queen Astrid Military Hospital in Brussels, Belgium, consisted exclusively of lytic *P. aeruginosa* phages 14/1 (exhibiting a myovirus morphotype) and PNM (exhibiting a podovirus morphotype) and *S. aureus* phage ISP (exhibiting a myovirus morphotype). Active pharmaceutical ingredients (API) of the BFC 1, the three phages, were produced in accordance with quality and safety requirements compatible with clinical use. Whole genome sequencing of phages was performed and proved the lytic nature of the phages and the absence of toxin-coding genes. The BFC 1.10 was sterile and purified from the endotoxin, the final pH of the cocktail was 7.29 (14, 17). For local phage application, BFC 1.10 was diluted using 0.9% saline at Queen Astrid Military Hospital to a concentration of 10^7 PFU/mL for each phage. Safe and potent use of BFC 1.10 has previously been demonstrated in the local and systemic treatment of *P. aeruginosa* and *S. aureus* infections (9, 18, 19). Phage susceptibility was assessed using the spot test on double-layer trypticase soy agar (TSA) plates with BFC 1.10 concentration of 10^7 PFU/ml for each phage (20).

Propagation of the Bacteriophage Cocktail BFC 1.10

The propagation procedure was a crucial step in increasing the original titer of the bacteriophage cocktail for *in vitro* testing. The procedures for phage propagation were as follows: selection of webbed plates after plaque assay testing, flooding of the plates with 5–7 ml of trypticase soy broth (TSB), collection of supernatant and soft overlay agar. Afterwards 2% chloroform ($CHCl_3$) treatment for 2 h at 4°C, and removal of bacterial debris using centrifugation at 6,000× *g* for 15 min at 4°C and filtration using a 0.20 μm filter were performed. Phage lysate acquisition was followed by consecutive purification procedure with filter Amicon® Ultra-15 (Merck Millipore Ltd, Ireland) that was executed by centrifugal filtration of 1.5–3 ml previously harvested high titer phage lysate at 4,000× g for 20 min at 4°C. The supernatant was then collected and the final concentration was determined using plaque assay.

Model of Biofilm Formation

A sterile 96-well flat-bottomed microtiter plate (96-well TC plate; Suspension, F, Sarstedt, Germany) was used to study biofilm formation. To prepare the bacterial inoculum, three to four morphologically similar colonies from the patient or reference

P. aeruginosa strain from an overnight culture were selected, inoculated in TSB, and diluted 1:100. Subsequently, 200 μL of the prepared inoculum was pipetted into each well and incubated at 35°C for 6, 12, 24, 36, or 48 h. Sterile TSB was used as a negative control. After incubation, each well was rinsed two times with 250 μL of sterile 0.9% saline. The biofilm was stained with 200 μL of 0.1% crystal violet dye for 25 min, followed by rinsing thrice with 250 μL of distilled water. During decolorization, 200 μL of 96% ethanol was added. Biofilm formation was measured spectrophotometrically at 600 nm (OD_{600}) using a 96-well compatible reader (Tecan Infinite F50, Männedorf, Switzerland). A cutoff optical density value of < 0.10 was used for bacterial growth.

BFC 1.10 and Ceftazidime-Avibactam Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Biofilm Prevention Concentration (BPC) Detection

To determine the biofilm formation capacity and the impact of antimicrobials on biofilms, a modified Calgary biofilm method was used. The inoculum was prepared by suspending the colonies of overnight bacterial cultures in TSB. The turbidity of the prepared inoculum was adjusted to 1.0 McFarland standard and diluted to 1:30, reaching a concentration of approximately 1×10^7 CFU/mL. 96-well microplates (Nunc™ MicroWell™ 96-Well, Nunclon Delta-Treated, Flat-Bottom Microplate, Thermo Fisher Scientific, Denmark) containing 150 μL of two-fold diluted antibiotics and/or phages were inoculated with 5 μL of the diluted bacterial suspension and sealed with a 96-peg lid (Nunc™ Immuno TSP Lids). Afterward, the plates were incubated at 35°C for 22 h at 150 rpm. Optical density measurements at OD_{650} were performed to determine the MIC values. The pegged lid was rinsed for two minutes with 200 μL of sterile 0.9% saline and then transferred to a recovery plate containing 200 μL of sterile TSB. Subsequently, the recovery plate was sonicated in an ultrasonication bath (Model 08855-02, Cole-Parmer, USA) for 25 min at a frequency of 44 kHz to dislodge the biofilm. The non-pegged recovery plate was incubated at 35 °C for 22 h, and the optical density was measured at OD_{650} to determine BPC (21–23). BPC values were interpreted and adopted from EUCAST clinical breakpoints.

Statistical Analysis

IBM SPSS Statistics version 27 and Microsoft Excel 10 were used for data analysis.

RESULTS

Bacteriophage Cocktail

Phage spot testing of MDR *P. aeruginosa* isolated from the patient before the treatment showed positive lytic effect with partial lysis that is observed on agar as incomplete lysis of bacteria. Using phage propagation, a high-titer phage stock was obtained, resulting in a significant increase in the phage titer from 1.6×10^7 PFU/mL to 2.5×10^9 PFU/mL.

Biofilm Formation

The isolated MDR *P. aeruginosa* strain demonstrated potent ($OD_{600} > 1$) biofilm formation ability after 6 h, reaching the highest biomass production at 24 h, which persisted until 36 h. Similar results were obtained for both the reference strains (**Figure 3**).

The Impact of BFC 1.10 and Ceftazidime-Avibactam on Bacterial Growth and Biofilm Formation

The MIC and BPC values of ceftazidime-avibactam were 8 and 16 mg/L, respectively. Thus, according to the EUCAST standard, acquired values showed susceptibility of planktonic cells but failed to prevent biofilm formation. The phage cocktail BFC 1.10 demonstrated no bacterial growth with a titer of 5×10^7 PFU/mL and prevented biofilm formation only when applied with the highest titer of 1.6×10^9 PFU/mL. An additive antimicrobial effect of ceftazidime-avibactam and BFC 1.10 was observed in the planktonic state of *P. aeruginosa* strain (when detecting MIC) and on prevention of biofilm formation (BPC). When ceftazidime-avibactam was used in combination with BFC 1.10, the MIC and BPC values of ceftazidime-avibactam reduced from 8 to 4 mg/L ($p = 0.03$) and from 16 to 8 mg/L ($p = 0.023$), respectively, compared to those obtained using ceftazidime-avibactam alone (**Figure 4**). Antibiograms of isolated *P. aeruginosa* strains in different time periods are shown in **Supplementary Table 1**.

DISCUSSION

Infections are frequent complications of severe high-energy trauma, and posttraumatic osteomyelitis can develop in up to 19% of cases (24). Antimicrobial resistance has become an emerging major public health problem during the last few decades. Factors such as trauma-related severe bone fractures (Grade III, Gustilo-Anderson classification) and extensive soft tissue damage are associated with a remarkably high risk for developing surgical site infection (SSI) (4–52%) (25). Importantly, a considerable increase in the proportion of infections caused by gram-negative bacilli and polymicrobial flora has been observed, notably in grade III injuries, predicting a poorer prognosis (26). Infections caused by *P. aeruginosa* are difficult to treat and have a high recurrence rate (2, 27, 28). *Pseudomonas* infections require a prolonged treatment course and a combination of two or more different classes of antimicrobials. In cases of osteomyelitis, *P. aeruginosa* infection is associated with an increased risk of amputation. Additionally, *P. aeruginosa* can rapidly reveal a multidrug-resistant profile, making the infection more complicated to manage (29, 30).

Similarly, for the patient in our clinical case, infection was caused by the polymicrobial flora of MDR *P. aeruginosa,* carbapenem-resistant *A. baumannii*, and VRE. In addition to the recurrent infection, femur osteomyelitis, predominantly caused by MDR *P. aeruginosa,* developed despite several debridement procedures and extensive antimicrobial treatment. Multiple factors determine the high virulence and subsequent persistence

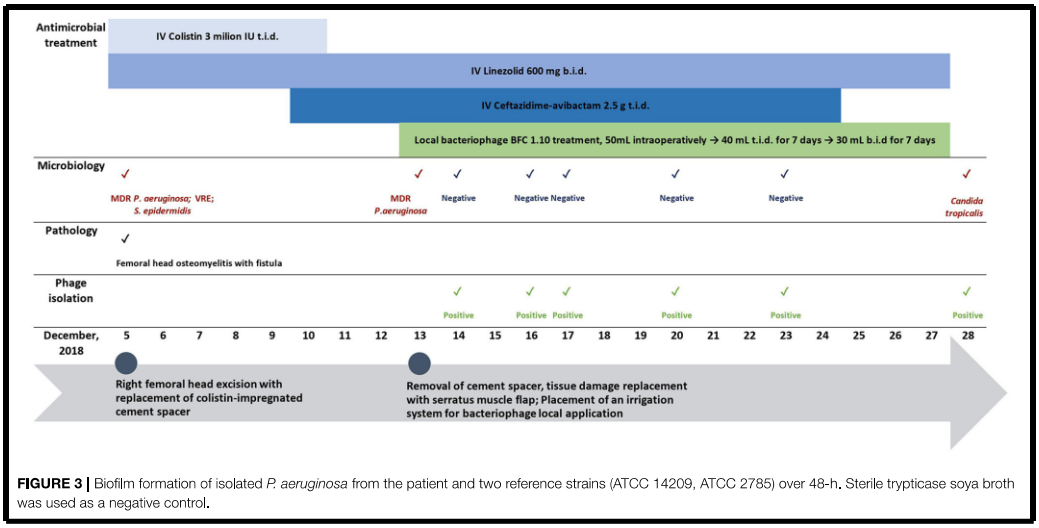


FIGURE 3 | Biofilm formation of isolated *P. aeruginosa* from the patient and two reference strains (ATCC 14209, ATCC 2785) over 48-h. Sterile trypticase soya broth was used as a negative control.

of infection of *P. aeruginosa*, such as potential adaptation to various environmental factors, production of exotoxins leading to possible severe tissue damage, the rapid development of antimicrobial resistance, and the ability to produce highly structured biofilms (31). The ability *of P. aeruginosa* to produce biofilms is a critical factor that reduces host defense, leading to chronic relapsing infections owing to long-term colonization and bacterial persistence (32). The necrotic tissue and bones in osteomyelitis serve as the surfaces for biofilm-associated infections (33). The presence of biofilms leads to reduced efficacy of the antibiotic treatment due to several factors, such as limited antibiotic diffusion in the biofilm matrix, differences in bacterial metabolic activity, and the quorum sensing system (34). Our study results demonstrate a strong biofilm formation capability of the isolated MDR *P. aeruginosa* (**Figure 3**) that affected conventional treatment causing failure.

In the case of MDR *P. aeruginosa* infections, potentially life-threatening complications can occur due to the limited treatment options and possible toxic side effects of antimicrobials. Adverse drug effects can complicate further treatment. Drug nephrotoxicity was observed in our patient while using colistin; therefore, the colistin treatment was given with close monitoring and discontinued as soon as possible to preserve renal function.

The isolated MDR *P. aeruginosa* strain was susceptible to ceftazidime-avibactam. However, the risk of resistance development toward ceftazidime-avibactam is high, especially in multidrug-resistant strains (35). Bacteriophages as natural bacterial viruses, cause bacterial lysis and may be used as alternative antimicrobials. Their ability to self-replicate and produce polysaccharide depolymerases makes them an attractive tool for combating *P. aeruginosa* biofilm-associated infections (9). Several *in vitro* studies have shown a synergistic effect between antimicrobials and antipseudomonal bacteriophages; however, such phenomena are not always observed. This may be explained by the mechanism of action of antimicrobials and the difference in the required environmental factors for biofilm formation; the latter can also be a reason for the disparity in laboratory and clinical results (8, 36, 37). Case reports on the management of *P. aeruginosa* periprosthetic joint infection and aortic graft infection have demonstrated the synergistic effect of phages and antibiotics, including ceftazidime, which led to the resolution of biofilm-associated infections (10, 38). Therefore, an antipseudomonal strategy with dual antimicrobial therapy of local bacteriophage application and IV ceftazidime-avibactam combined with surgical intervention and wound debridement was applied. An additive effect of BFC 1.10 and ceftazidime-avibactam for planktonic cell growth and biofilm prevention was observed. Furthermore, the antibiotic concentration required for biofilm prevention decreased to the MIC cutoff value according to the EUCAST standard, making the strain susceptible to ceftazidime-avibactam (**Figure 4**). Most importantly, our treatment using phages locally and IV antibiotics led to the eradication of infection in proximal part of femur and pelvis, this was crucial for endoprosthesis reconstruction. No less important in terms of patient management, the side effects of applied therapy were not observed.

Six months after completing treatment, the patient's wounds remained dry and closed, and laboratory inflammatory markers remained stable within normal ranges. Despite the resolution of the proximal femur side infection, MDR *P. aeruginosa* and VRE infection persisted at the distal part of femur. This was not anticipated as there were no local or radiological signs of distal part infection. Therefore, our treatment of

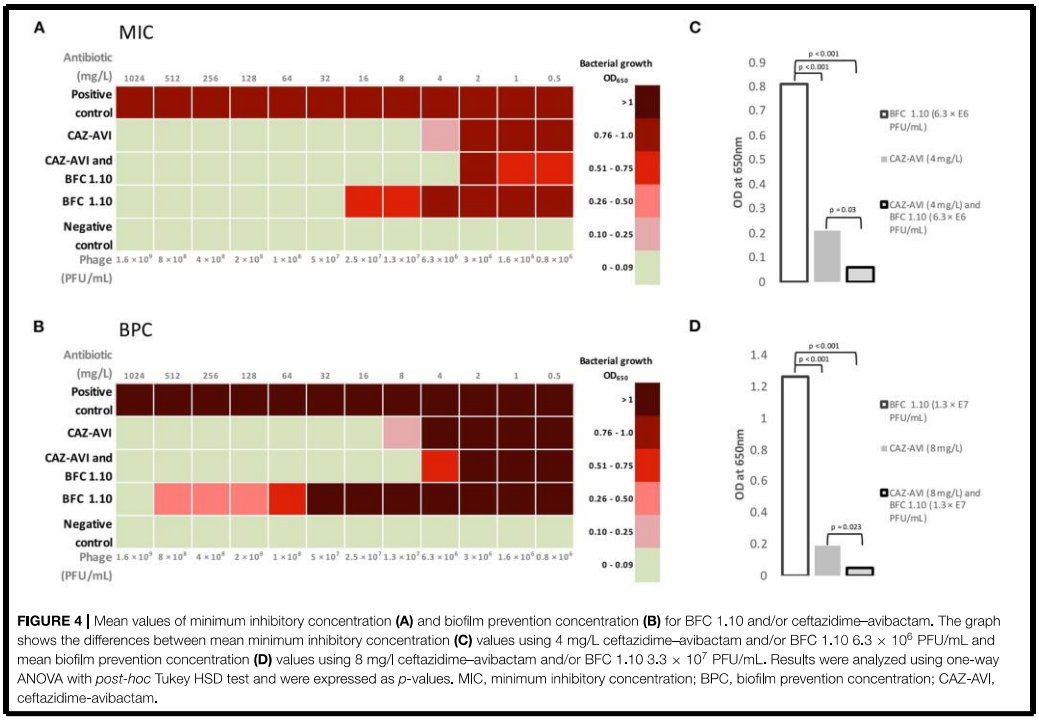


FIGURE 4 | Mean values of minimum inhibitory concentration **(A)** and biofilm prevention concentration **(B)** for BFC 1.10 and/or ceftazidime–avibactam. The graph shows the differences between mean minimum inhibitory concentration **(C)** values using 4 mg/L ceftazidime–avibactam and/or BFC 1.10 6.3 × 10^6 PFU/mL and mean biofilm prevention concentration **(D)** values using 8 mg/l ceftazidime–avibactam and/or BFC 1.10 3.3 × 10^7 PFU/mL. Results were analyzed using one-way ANOVA with *post-hoc* Tukey HSD test and were expressed as *p*-values. MIC, minimum inhibitory concentration; BPC, biofilm prevention concentration; CAZ-AVI, ceftazidime-avibactam.

bacteriophages and antimicrobials did not lead to resolution of infection but led to eradication of osteomyelitis in acetabular bone. Fortunately, distal segment infection after right hip endoprosthesis implantation was successfully treated with DAIR and suppressive therapy using colistin and fosfomycin. To avoid persistent infection in another bone segment more accurate investigation such as labeled leukocyte scintigraphy or PET/CT could be performed. Unfortunately, at that time it was not available in Latvia for osteomyelitis diagnostics. Another solution might be bacteriophage systemic application; however, it is recommended to us phages topically if possible. Phage application in femoral canal could be helpful but, in this case, we did not perform because the canal consisted of sclerotic lesions and it was not possible to insert an irrigation system in it. In case of endoprosthesis associated infections a hydrogel coating with impregnated bacteriophages could be used. Such approach has been described and can retain the implant; however, the data is very limited (39).

PERSPECTIVE

We have demonstrated a safe local phage therapy in combination with ceftazidime-avibactam for relapsing biofilm-associated femur osteomyelitis caused by hard-to-treat MDR *P. aeruginosa* that led to eradication of bacterial infection locally where phages were used but failed to treat osteomyelitis in distal bone segment. Future studies are needed to confirm such approaches, ideally through randomized clinical trials. However, several concerns regarding the phage-antibiotic interactions and pharmacodynamics of the phages should also be addressed.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by Ethics Committee of Riga East Clinical University Hospital. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

KR wrote the first version of the manuscript. KR, DR, and MM reviewed the literature. MM, EL, KR, and SD planned the patient management. EL and MM participated in patient care. EL performed the surgeries. KR and DR performed laboratory testing and data analysis. KR, DR, JK, and AP conceptualized the manuscript. All authors participated in the improvement of the manuscript, read, and approved the final version of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the specialists at Queen Astrid Military Hospital: Peggy De Lenher, Jean-Paul Pirnay, and Maya Merabishvili for their help.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2022.851310/full#supplementary-material

REFERENCES

1. Fang C, Wong TM, Lau TW, To KK, Wong SS, Leung F. Infection after fracture osteosynthesis - Part I. *J Orthop Surg (Hong Kong).* (2017) 25:2309499017692712. doi: 10.1177/2309499017692712
2. Depypere M, Morgenstern M, Kuehl R, Senneville E, Moriarty TF, Obremskey WT, et al. Pathogenesis and management of fracture-related infection. *Clin Microbiol Infect.* (2020) 26:572–8. doi: 10.1016/j.cmi.2019.08.006
3. Guerra MTE, Gregio FM, Bernardi A, Castro CC. Infection rate in adult patients with open fractures treated at the emergency hospital and at the ULBRA university hospital in Canoas, Rio Grande do Sul, Brazil. *Rev Bras Ortop.* (2017) 52:544–8. doi: 10.1016/j.rbo.2016.09.004
4. Malone M, Bjarnsholt T, Mcbain AJ, James GA, Stoodley P, Leaper D, et al. The prevalence of biofilms in chronic wounds: a systematic review and meta-analysis of published data. *J Wound Care.* (2017) 26:20–5. doi: 10.12968/jowc.2017.26.1.20
5. Chegini Z, Khoshbayan A, Taati Moghadam M, Farahani I, Jazireian P, Shariati A. Bacteriophage therapy against Pseudomonas aeruginosa biofilms: a review. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* (2020) 19:45. doi: 10.1186/s12941-020-00389-5
6. Stone E, Campbell K, Grant I, Mcauliffe O. Understanding and exploiting phage–host interactions. *Viruses.* (2019) 11:567. doi: 10.3390/v11060567
7. Tagliaferri TL, Jansen M, Horz HP. Fighting pathogenic bacteria on two fronts: phages and antibiotics as combined strategy. *Front Cell Infect Microbiol.* (2019) 9:22. doi: 10.3389/fcimb.2019.00022
8. Gu Liu C, Green SI, Min L, Clark JR, Salazar KC, Terwilliger AL, et al. Phage-antibiotic synergy is driven by a unique combination of antibacterial mechanism of action and stoichiometry. *MBio.* (2020) 11:e01462–20. doi: 10.1128/mBio.01462-20
9. Onsea S, Djebara M, Depypere S, Merabishvili M, Depypere M, Spriet I, et al. Bacteriophage application for difficult-to-treat musculoskeletal infections: development of a standardized multidisciplinary treatment protocol. *Viruses.* (2019) 11:891. doi: 10.3390/v11100891
10. Tkhilaishvili T, Winkler T, Müller M, Perka C, Trampuz A. Bacteriophages as adjuvant to antibiotics for the treatment of periprosthetic joint infection caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* (2019) 64:e00924–19. doi: 10.1128/AAC.00924-19
11. Eskenazi A, Lood C, Wubbolts J, Hites M, Balarjishvili N, Leshkasheli L, et al. Combination of pre-adapted bacteriophage therapy and antibiotics for treatment of fracture-related infection due to pandrug-resistant Klebsiella pneumoniae. *Nat Commun.* (2022) 13:302. doi: 10.1038/s41467-021-27656-z
12. Clarke AL, De Soir S, Jones JD. The safety and efficacy of phage therapy for bone and joint infections: a systematic review. *Antibiotics (Basel).* (2020) 9:795. doi: 10.3390/antibiotics9110795
13. Liu D, Van Belleghem JD, de Vries CR, Burgener E, Chen Q, Manasherob R, et al. The safety and toxicity of phage therapy: a review of animal and clinical studies. *Viruses.* (2021) 13:1268. doi: 10.3390/v13071268
14. Merabishvili M, Pirnay JP, Verbeken G, Chanishvili N, Tediashvili M, Lashkhi N, et al. Quality-controlled small-scale production of a well-defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials. *PLoS ONE.* (2009) 4:e4944. doi: 10.1371/journal.pone.0004944
15. Association WM. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA.* (2013) 310:2191–4. doi: 10.1001/jama.2013.281053
16. Cao H, Lai Y, Bougouffa S, Xu Z, Yan A. Comparative genome and transcriptome analysis reveals distinctive surface characteristics and unique physiological potentials of Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853. *BMC Genomics.* (2017) 18:459. doi: 10.1186/s12864-017-3842-z
17. Pirnay JP, Blasdel BG, Bretaudeau L, Buckling A, Chanishvili N, Clark JR, et al. Quality and safety requirements for sustainable phage therapy products. *Pharm Res.* (2015) 32:2173–9. doi: 10.1007/s11095-014-1617-7
18. Rose T, Verbeken G, Vos DD, Merabishvili M, Vaneechoutte M, Lavigne R, et al. Experimental phage therapy of burn wound infection: difficult first steps. *Int J Burns Trauma.* (2014) 4:66–73.
19. Jennes S, Merabishvili M, Soentjens P, Pang KW, Rose T, Keersebilck E, et al. Use of bacteriophages in the treatment of colistin-only-sensitive *Pseudomonas aeruginosa* septicaemia in a patient with acute kidney injury—a case report. *Critical Care.* (2017) 21:129. doi: 10.1186/s13054-017-1709-y
20. Racenis K, Kroica J, Rezevska D, Avotins L, Skuditis E, Popova A, et al. *S. aureus* colonization, biofilm production, and phage susceptibility in peritoneal dialysis patients. *Antibiotics.* (2020) 9:582. doi: 10.3390/antibiotics9090582
21. Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A. The Calgary Biofilm device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol.* (1999) 37:1771–6. doi: 10.1128/JCM.37.6.1771-1776.1999
22. Fernández-Olmos A, García-Castillo M, Maiz L, Lamas A, Baquero F, Cantón R. *In vitro* prevention of Pseudomonas aeruginosa early biofilm formation with antibiotics used in cystic fibrosis patients. *Int J Antimicrob Agents.* (2012) 40:173–6. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2012.04.006
23. Harrison JJ, Turner RJ, Ceri H. High-throughput metal susceptibility testing of microbial biofilms. *BMC Microbiol.* (2005) 5:53. doi: 10.1186/1471-2180-5-53
24. Kremers HM, Nwojo ME, Ransom JE, Wood-Wentz CM, Melton LJ, Huddleston PM. Trends in the epidemiology of osteomyelitis: a population-based study, 1969 to 2009. *J Bone Joint Surg Am.* (2015) 97:837–45. doi: 10.2106/JBJS.N.01350
25. Gustilo RB, Mendoza RM, Williams DN. Problems in the management of type III (severe) open fractures: a new classification of type III open fractures. *J Trauma.* (1984) 24:742–6. doi: 10.1097/00005373-198408000-00009
26. Benito N, Mur I, Ribera A, Soriano A, Rodríguez-Pardo D, Sorlí L, et al. The Different microbial etiology of prosthetic joint infections according to route of acquisition and time after prosthesis implantation, including the role of multidrug-resistant organisms. *J Clin Med.* (2019) 8:673. doi: 10.3390/jcm8050673
27. Garner MR, Sethuraman SA, Schade MA, Boateng H. Antibiotic prophylaxis in open fractures: evidence, evolving issues, and recommendations. *J Am Acad Orthop Surg.* (2020) 28:309–15. doi: 10.5435/JAAOS-D-18-00193
28. Sudduth JD, Moss JA, Spitler CA, Pham VH, Jones LC, Brown JT, et al. Open fractures: are we still treating the same types of infections? *Surg Infect (Larchmt).* (2020) 21:766–72. doi: 10.1089/sur.2019.140
29. Cerioli M, Batailler C, Conrad A, Roux S, Perpoint T, Becker A, et al. Implant-associated bone and joint infections: experience in a

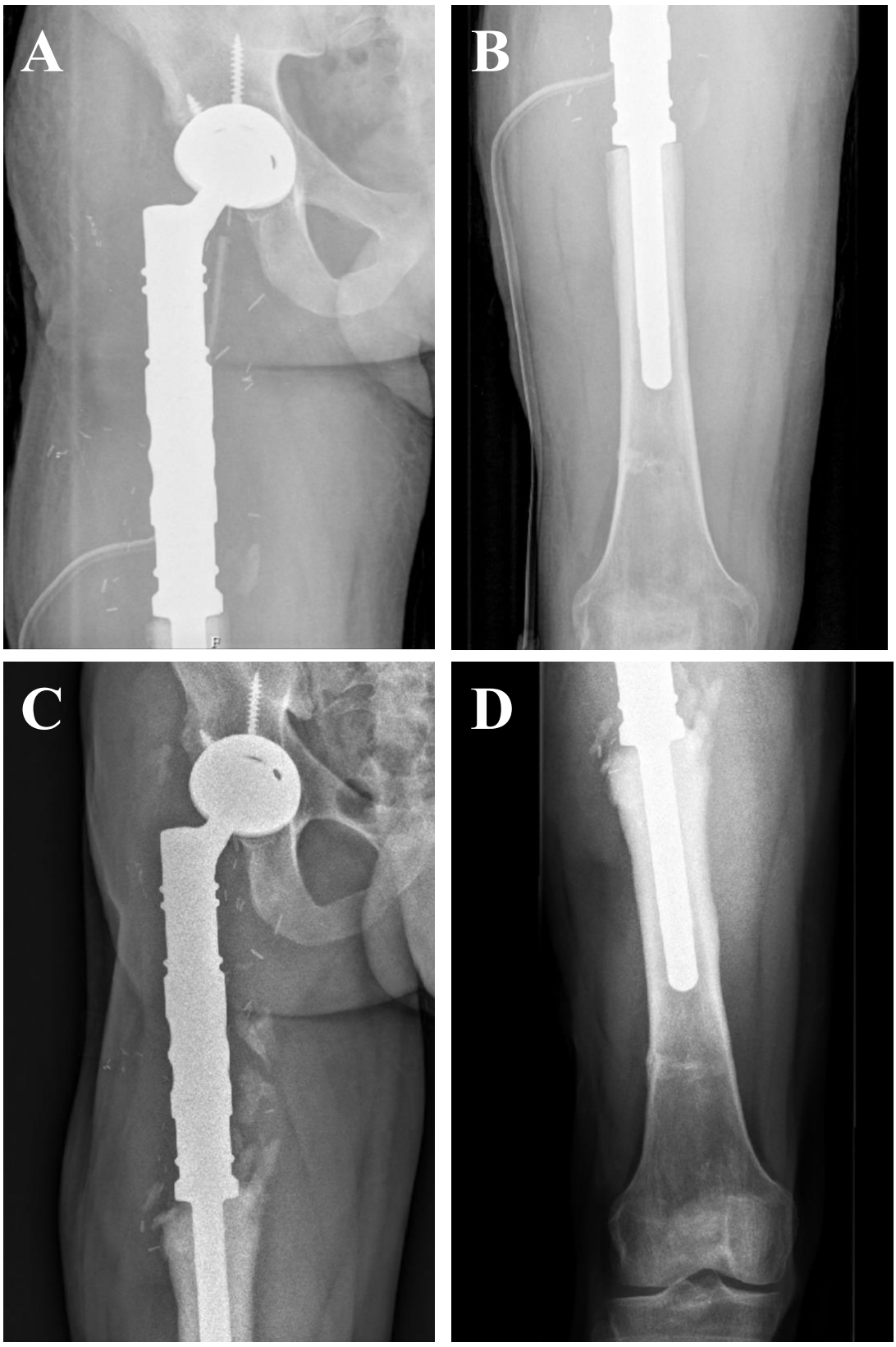
Regional Reference Center in France. *Front Med (Lausanne).* (2020) 7:513242. doi: 10.3389/fmed.2020.513242
30. Tice AD, Hoaglund PA, Shoultz DA. Risk factors and treatment outcomes in osteomyelitis. *J Antimicrob Chemother.* (2003) 51:1261–8. doi: 10.1093/jac/dkg186
31. Ruffin M, Brochiero E. Repair process impairment by. *Front Cell Infect Microbiol.* (2019) 9:182. doi: 10.3389/fcimb.2019.00182
32. Thi MTT, Wibowo D, Rehm BHA. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Int J Mol Sci.* (2020) 21:8671. doi: 10.3390/ijms21228671
33. Junka A, Szymczyk P, Ziółkowski G, Karuga-Kuzniewska E, Smutnicka D, Bil-Lula I, et al. Bad to the bone: on *in vitro* and *ex vivo* microbial biofilm ability to directly destroy colonized bone surfaces without participation of host immunity or osteoclastogenesis. *PLoS ONE.* (2017) 12:e0169565. doi: 10.1371/journal.pone.0169565
34. Singh S, Singh SK, Chowdhury I, Singh R. Understanding the mechanism of bacterial biofilms resistance to antimicrobial agents. *Open Microbiol J.* (2017) 11:53–62. doi: 10.2174/1874285801711010053
35. Wang Y, Wang J, Wang R, Cai Y. Resistance to ceftazidime-avibactam and underlying mechanisms. *J Glob Antimicrob Resist.* (2020) 22:18–27. doi: 10.1016/j.jgar.2019.12.009
36. Pires DP, Vilas Boas D, Sillankorva S, Azeredo J. Phage therapy: a step forward in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Virol.* (2015) 89:7449–56. doi: 10.1128/JVI.00385-15
37. Manohar P, Madurantakam Royam M, Loh B, Bozdogan B, Nachimuthu R, Leptihn S. Synergistic effects of phage-antibiotic combinations against. *ACS Infect Dis.* (2022) 8:59–65. doi: 10.1021/acsinfecdis.1c00117
38. Chan BK, Turner PE, Kim S, Mojibian HR, Elefteriades JA, Narayan D. Phage treatment of an aortic graft infected with. *Evol Med Public Health.* (2018) 2018:60–6. doi: 10.1093/emph/eoy005
39. Ferry T, Batailler C, Petitjean C, Chateau J, Fevre C, Forestier E, et al. The potential innovative use of bacteriophages within the DAC. *Front Med (Lausanne).* (2020) 7:342. doi: 10.3389/fmed.2020.00342

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Racenis, Rezevska, Madelane, Lavrinovics, Djebara, Petersons and Kroica. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

**Labā augšstilba rentgenogramma 9 dienas (A un B attēls)
un 15 mēnešus (C un D attēls) pēc gūžas endoprotezēšanas**



Ceturtā publikācija

viruses

MDPI

Article

Successful Bacteriophage-Antibiotic Combination Therapy against Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Left Ventricular Assist Device Driveline Infection

Karlis Racenis [1,2,3,*], Janis Lacis [4,5], Dace Rezevska [1,6], Laima Mukane [1], Aija Vilde [7], Ints Putnins [5], Sarah Djebara [8], Maya Merabishvili [9], Jean-Paul Pirnay [9], Marika Kalnina [10], Aivars Petersons [2,3], Peteris Stradins [4,5], Sandis Maurins [1] and Juta Kroica [1]

1 Department of Biology and Microbiology, Riga Stradins University, LV-1007 Riga, Latvia
2 Department of Internal Diseases, Riga Stradins University, LV-1007 Riga, Latvia
3 Center of Nephrology, Pauls Stradins Clinical University Hospital, LV-1002 Riga, Latvia
4 Department of Surgery, Riga Stradins University, LV-1007 Riga, Latvia
5 Centre of Cardiac Surgery, Pauls Stradins Clinical University Hospital, LV-1002 Riga, Latvia
6 Joint Laboratory, Pauls Stradins Clinical University Hospital, LV-1002 Riga, Latvia
7 Department of Infection Prevention and Control, Pauls Stradins Clinical University Hospital, LV-1002 Riga, Latvia
8 Center for Infectious Diseases, Queen Astrid Military Hospital, B-1120 Brussels, Belgium
9 Laboratory for Molecular and Cellular Technology, Queen Astrid Military Hospital, B-1120 Brussels, Belgium
10 Institute of Radiology, Pauls Stradins Clinical University Hospital, LV-1002 Riga, Latvia
* Correspondence: karlis.racenis@rsu.lv

Abstract: There is considerable interest in the use of bacteriophages (phages) to treat *Pseudomonas aeruginosa* infections associated with left ventricular assist devices (LVADs). These infections are often challenging to manage due to high rates of multidrug resistance and biofilm formation, which could potentially be overcome with the use of phages. We report a case of a 54-year-old man with relapsing multidrug-resistant *P. aeruginosa* LVAD driveline infection, who was treated with a combination of two lytic antipseudomonal phages administered intravenously and locally. Treatment was combined with LVAD driveline repositioning and systemic antibiotic administration, resulting in a successful outcome with clinical cure and eradication of the targeted bacteria. However, laboratory in vitro models showed that phages alone could not eradicate biofilms but could prevent biofilm formation. Phage-resistant bacterial strains evolved in biofilm models and showed decreased susceptibility to the phages used. Further studies are needed to understand the complexity of phage resistance and the interaction of phages and antibiotics. Our results indicate that the combination of phages, antibiotics, and surgical intervention can have great potential in treating LVAD-associated infections. More than 21 months post-treatment, our patient remains cured of the infection.

Keywords: phage therapy; biofilm; LVAD infection; phage resistance; multidrug resistance; case report; PET/CT

check for updates

Citation: Racenis, K.; Lacis, J.; Rezevska, D.; Mukane, L.; Vilde, A.; Putnins, I.; Djebara, S.; Merabishvili, M.; Pirnay, J.-P.; Kalnina, M.; et al. Successful Bacteriophage-Antibiotic Combination Therapy against Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Left Ventricular Assist Device Driveline Infection. *Viruses* **2023**, *15*, 1210. https://doi.org/10.3390/v15051210

Academic Editor: Mikael Skurnik

Received: 26 March 2023
Revised: 15 May 2023
Accepted: 17 May 2023
Published: 20 May 2023

Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

For patients suffering from advanced chronic heart failure, the left ventricular assist device (LVAD) is used as a bridge to heart transplantation or, in some cases, as destination therapy [1]. The annual incidence of LVAD implantation appears to be on the rise in recent years [2]. The main complications of LVAD are bleeding, thrombosis, pump failure, and infection, with the latter occurring in 50% of patients [3]. Like other implantable devices, infections associated with LVADs are complex to treat and often require device repositioning [4]. *Pseudomonas aeruginosa* is a frequently encountered pathogen that causes LVAD driveline-associated infections, which are challenging to manage due to the bacterium's

high rates of multidrug resistance and biofilm formation. These infections can lead to increased mortality rates, necessitating surgical intervention with debridement as a common treatment option [5].

Bacteriophages, or phages, are viruses that infect and kill bacteria by replicating and lysing the host cell. They offer a promising approach to treating *P. aeruginosa* biofilm-associated infections, as they can produce enzymes such as polysaccharide depolymerase that degrade the biofilm and thus destroy it [6]. Proper use of antibiotics and surgical intervention, in combination with phages, can lead to a higher treatment success rate. The lack of effective antibiotics has led to a more common use of phages, mainly in combination with conventional antimicrobials [7].

In the literature, we found 10 case reports using phages for LVAD-associated infections; the information is summarised in Table S1. The main causative agents of these infections were as follows: in five cases, *S. aureus*; in one case, *S. aureus* and *P. mirabilis*; and in four cases, *P. aeruginosa*, of which three were MDR strains. Treatment in four cases involved surgery, antibiotics, and phage application [8–11]; in five cases, antibiotic and phage application [9,12–14]; and in one case, surgery and phage application [15]. These results show that phage therapy is commonly supplemented with antibiotics, and phages are rarely used as a single antimicrobial agent. Of the 10 patients, only 4 patients were cured and bacterial eradication was achieved. Some reasons for treatment failure were lack of lytic activity against the causative agent, as described by Püschel et al. [15], and neutralizing antibody development, as in a case of a 60-year-old male described by Aslam et al. [9]. The treatment modalities involved intravenous phage application and/or local application; the duration of treatment varied from 1 day to approximately 14 weeks. The phage concentration for intravenous application ranged from 10^7 to 10^{11} PFU/mL, and for topical application, from 10^6 to 10^9 PFU/mL. The data in the literature show that the application of phage therapy in these cases is variable without consensus and clear evidence of the most suitable application for an effective outcome.

The presence of adverse events is another factor that contributes to the possible use of novel treatment applications. In case reports where phage therapy was used for LVAD infection treatment, mild nausea was noted in a case described by Mulzer et al. [8]. In a case of phage treatment for an 82-year-old man published by Aslam et al. [9], using high intravenous phage concentrations at a concentration of 10^{11} PFU/mL, the patient developed fever, wheezing, shortness of breath, and symptoms disappeared when the phage concentration was decreased to 10^{10} PFU/mL. In another case described by Tkhilaishvili et al. [10], increased liver markers were observed, but they returned to a normal range after lowering the dose of phages.

Although there are several case reports for the application of phage therapy in LVAD infection treatment, several gaps are still present, such as the dosage and routes of phage application, duration of treatment, combination of antibiotics, and development of phage resistance. Data suggest that the development of phage resistance in bacteria can cause trade-offs, potentially leading to reduced virulence and/or increased susceptibility to antibiotics [16]. Currently, there is a lack of clinical trial data on the use of phages for LVAD-associated infections. Therefore, the current understanding is based on individual clinical cases with varying outcomes.

In our article, we focus on the use of a combined treatment of phages, antibiotics, and surgical treatment for LVAD driveline infection. We present evidence of in vitro development of phage resistance that could interfere with infection eradication and makes it important to add antibiotics for treatment. The role of phages in biofilm eradication is not completely understood; therefore, we investigated the phage antibiofilm effect and also used surgical debridement for the patient's treatment.

2. Case Description and Diagnostic Assessment

In November 2016, a 50-year-old male patient was admitted to our institution for LVAD HeartMate 3 (HM3) device implantation as a bridge to heart transplantation candidacy due to dilatation cardiomyopathy with severe end-stage heart failure (INTERMACS profile 1). In 2017, the patient was placed on the heart transplant waiting list.

In October 2020, the patient was readmitted with purulent discharge from the LVAD HM3 driveline exit site, inflammation of the exit site (Figure 1A), febrile temperature, and elevated inflammatory markers—C-reactive protein (CRP) 44 mg/L.

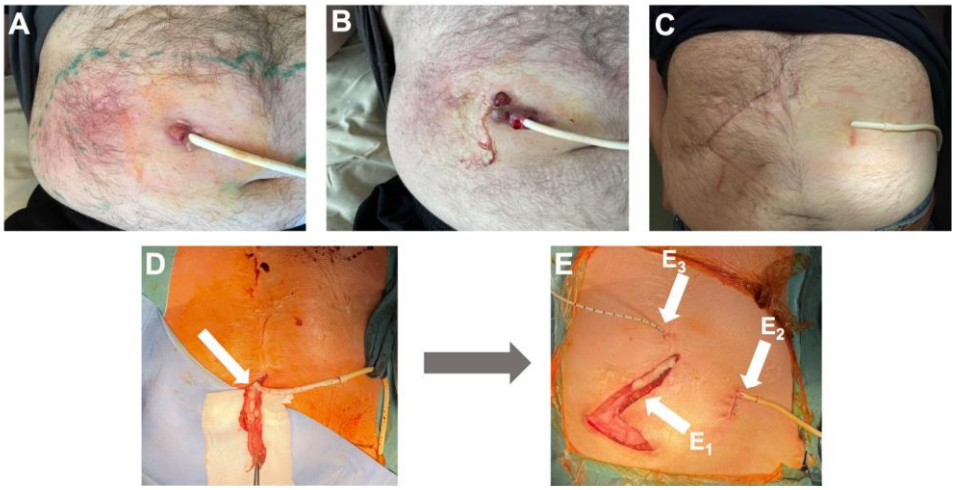


Figure 1. The appearance of the wound before, during, and after surgery. (**A**) The wound in October 2020 before antibacterial treatment. (**B**) The wound in March 2021 before antibacterial treatment. (**C**) The wound in October 2021 with no local signs of infection, four months after phage treatment and surgery. (**D**) Removal of the velour from the LVAD driveline during surgery; velour indicated with an arrow. (**E**) In a picture of surgery, arrow E_1 is pointing at the previous driveline canal, arrow E_2 indicates the exit site of the new driveline canal, and arrow E_3 indicates an 8-Fr catheter for local phage infusion in the new canal.

The symptoms mentioned first appeared 46 months after LVAD HM3 implantation. Immediate antibacterial therapy with piperacillin/tazobactam was started for two weeks. The exit site wound swabs were positive for *P. aeruginosa* (Table 1). After wound improvement, antibacterial treatment was changed to prolonged suppressive ciprofloxacin therapy, and the patient was discharged at the end of October 2020.

Nineteen weeks later, in March 2021, the patient was hospitalized again due to increased purulent discharge and fistula formation along the driveline (Figure 1B). The results of the wound swab showed the presence of multidrug-resistant (MDR) *P. aeruginosa* with no alternative oral antibiotics available. Intravenous antibiotic therapy with colistin was initiated with a loading dose of 9 million and then 3 million international units (IU) three times a day and continued until surgical intervention. A decision was made to prepare the patient for driveline repositioning. Fluorine-18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography integrated with computed tomography (^{18}F-FDG PET/CT) showed an active metabolic process along the driveline up to the level of the abdominal muscle, with a slight infiltration of the rectus abdominis muscle, representing infection.

Table 1. Antibiotic and phage susceptibility of the patient's consecutive *P. aeruginosa* isolates.

Strain	**CN573**	**PA01**	**PA02**	**PA03**	**PAP01**	**PAP02**
Type of the isolate	Phage host strain	Discharge from LVAD driveline exit site	Discharge from LVAD driveline exit site	Discharge from LVAD driveline exit site	Velour from the driveline	Velour from the driveline
Isolation time		4 October 2020	5 March 2021	19 Apri 2021	16 June 2021	16 June 2021
Antibiotics						
AMK	S (MIC $\leq$ 4)	S	S	S	S (MIC $\leq$ 4)	S (MIC $\leq$ 4)
FEP	I (MIC = 4)	ND	ND	ND	I (MIC = 2)	I (MIC = 4)
CAZ	I (MIC = 2)	I	R	I	I (MIC = 2)	I (MIC = 2)
CAZ/AVI	S (MIC $\leq$ 1)	ND	ND	ND	S (MIC $\leq$ 1)	S (MIC $\leq$ 1)
CIP	I (MIC = 0.25)	I	R	R	I (MIC = 0.25)	I (MIC = 0.25)
CST	S (MIC = 2)	ND	S	S	S (MIC $\leq$ 1)	S (MIC = 2)
FOF	R (MIC > 128)	R (MIC > 128)	R (MIC > 128)	ND	R (MIC > 128)	R (MIC > 128)
IPM	I (MIC $\leq$ 1)	I	R	R	I (MIC $\leq$ 1)	I (MIC $\leq$ 1)
MEM	S (MIC = 1)	S	R	I	S (MIC $\leq$ 0.125)	S (MIC = 1)
TOB	S (MIC = 0.5)	ND	R	R	S (MIC = 0.5)	S (MIC = 0.5)
TZP	I (MIC = 8)	I	R	I	I (MIC = 4)	I (MIC = 8)
Phage PNM	++++	ND	ND	++ EOP = 0.001	++ EOP = 0.0005	ND
Phage PT07	++++	ND	ND	+++ EOP = 0.1	+++ EOP = 0.1	ND

ND, not determined; R, resistant; S, susceptible; I, susceptible, increased exposure; MIC, minimum inhibitory concentration, mg/l; AMK, amikacin; FEP, cefepime; CAZ, ceftazidime; CAZ/AVI, ceftazidime/avibactam; CIP, ciprofloxacin; CST, colistin; FOF, fosfomycin; IPM, imipenem; MEM, meropenem; TOB, tobramycin; TZP, piperacillin/tazobactam; ++++, confluent lysis; +++, semiconfluent lysis; ++, partial lysis; EOP, the efficiency of plating.

To enhance the likelihood of a successful treatment outcome, phages were applied locally and intravenously during the intraoperative and postoperative phases. This decision was made based on a lack of response to previous treatments. Additionally, ceftazidime/avibactam and amikacin were the only remaining intravenous alternatives (Table 1). Two lytic phages, PNM and PT07, were shipped from the Queen Astrid Military Hospital (QAMH, Brussels, Belgium) to Riga (Latvia), and the phage treatment modality was discussed with the local treatment team and QAMH specialists. The treatment was conducted in accordance with Article 37 of the Declaration of Helsinki [17], and written informed consent was obtained from the patient prior to the procedure.

3. Therapeutic Intervention

On 16 June 2021, the operation began with extensive tissue debridement along the course of the driveline, including partial removal of the rectus abdominis muscle. During debridement, multiple wound swabs were cultured to rule out undetected microorganisms and to understand the depth of the infectious process roughly and retrospectively. To increase adhesion in subcutaneous tissue, the outer layer of the LVAD driveline is covered with velour, which complicates the chance of eradication of microorganisms. Therefore, the driveline's outer layer was removed and sent for microbiological investigation (Figure 1D). The operation was continued with wound irrigation and local treatment with Prontosan® solution (B. Braun, Germany) with betaine surfactant and 0.1% Polyaminipropyl Biguanide (Polihexanide) as active substances. Then, a new subcutaneous canal was prepared in the anterior abdominal wall to reposition the driveline. To reduce the chance that fluid or tissue material might enter the new modular cable connector and ensure sterility during repositioning, a sterile ultrasound probe cover was used to cover the sides of the subcutaneous tunnel. The new subcutaneous canal and the previous canal infected with *P.*

aeruginosa were irrigated with 250 mL 0.9% NaCl and then with 250 mL 4.2% $NaHCO_3$, to make the surrounding environment more alkaline. Five minutes later, 50 mL of phage suspension consisting of PNM and PT07, each at a concentration of 10^7 plaqueforming units (PFU)/mL, was applied to each wound. A new modular cable already connected to the LVAD controller was guided through the subcutaneous tunnel. The driveline was temporarily disconnected from the old modular cable and connected to the new one. After ensuring that the hemodynamics of the patient were stable and the LVAD was running, the driveline was repositioned through the subcutaneous tunnel. An 8-Fr catheter was inserted along the driveline to administer the phage solution. The wound was left open for secondary healing (Figure 1E).

Intravenous application of phages PNM and PT07 that showed lytic activity against patient isolate (Table 1), with a titer of 10^7 PFU/mL each, started 2 h before surgery using an infusion pump at a rate of 13 mL/h for 6 h through a central venous catheter with a total volume of 80 mL, which was repeated once per day for 8 days. On the next day after surgery, the wound was rinsed using an 8-Fr catheter with 50 mL of PNM and PT07, with a titer of 10^7 PFU/mL each, and this procedure was continued daily for three days. Prior to local application of phages, the wound was rinsed through the catheter with 250 mL 0.9% NaCl, and then with 250 mL 4.2% $NaHCO_3$. Intravenous antibiotic therapy consisting of ceftazidime/avibactam 2.5 g over two hour infusion three times a day and amikacin 750 mg (7.5 mg/kg weight) over 60 minute infusion two times a day was started 2 h before the operation. Amikacin was continued for four weeks, and ceftazidime/avibactam for six weeks (Figure 2). Intraoperative wound samples showed the presence of *P. aeruginosa* at all wound levels (Table 1). Changes in wound dressing and swabbing were performed daily and did not show the presence of *P. aeruginosa*. Six days after repositioning the driveline, the secondary healing wound did not reveal the presence of infection and was closed. During phage treatment, no adverse events were observed. The phage titer in the patient's blood was stable for seven consecutive treatment days with a concentration of 10^2 PFU/mL. Phages were no longer detected from the first day after cessation of phage administration (Figure 2).

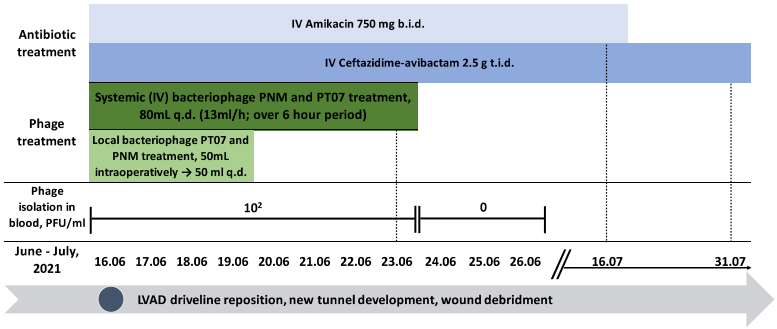


Figure 2. Timeline showing antibiotic and phage treatment modalities, surgical interventions, and phage concentrations detected in the patient's blood. The blood samples for phage concentration detection were taken 2 h after intravenous phage administration.

4. Follow-Up and Outcomes

Six weeks after the driveline repositioning control, a ^{18}F-FDG PET/CT scan was performed, showing slight residual metabolic activity in the most proximal part of the driveline, but to a lesser extent than before the driveline repositioning (Figure 3B). Considering that PET/CT was performed early after repositioning and most likely represented reactive changes, the wound showed no signs of inflammation, with inflammatory markers

(CRP and white blood cell count) within normal limits. The patient was discharged on postoperative day 45.

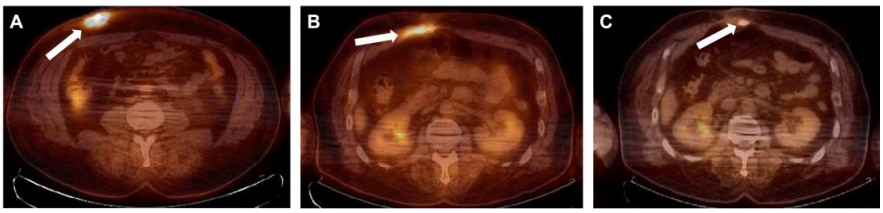


Figure 3. ^{18}F-FDG FDG PET/CT images. (**A**) April 2021—condition after implantation of the LVAD. Hypermetabolic changes in the skin, subcutaneous tissue, and muscles along the way of the LVAD cable in the anterior abdominal wall from its entrance gate to the rectus abdominis muscles corresponding to (most likely chronic) inflammation. No other pathological hypermetabolic changes during the whole-body exam or in other implanted devices or cables, and no any dissemination focuses. (**B**) July 2021—comparison with the previous PET/CT exam; hypermetabolic changes along the way of the LVAD cable are seen to a much less extent but visible near the rectus abdominis muscles and in subcutaneous tissue, most likely representing reactive changes due to recent cable repositioning. (**C**) February 2022—slight hypermetabolic changes along the way of the LVAD cable are seen with less metabolic activity and extent, but likely without clinical significance. No other dissemination focuses of infection are seen during the whole-body examination. Hypermetabolic changes are indicated with arrows.

Thirty-four weeks after the operation, another control PET/CT scan was performed, which showed no signs of significant metabolic activity (Figure 3C). The patient was regularly checked and showed no signs of recurrence 21 months after treatment (Figure 1C).

5. Materials and Methods

5.1. Bacterial Isolate Identification and Antimicrobial Susceptibility

P. aeruginosa isolated from the patient's wound and LVAD exit-site discharges (Table 1), as well as a reference strain CN573, a host and propagation strain for PT07 and PNM phages, was used. CN573 is a bacterial strain isolated from bone marrow in the 1970s at the Eliava Institute of Bacteriophage, Microbiology and Virology. This strain has been characterised and used for the production of *P. aeurginosa* phages; it has the absence of temperate phages [18]. The Microflex LT system, a matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometer (MALDI-TOF MS) manufactured by Bruker Daltonics GmbH & Co. KG in Bremen, Germany, was utilized to identify bacterial isolates using flex analysis software (version 3.4). The disk diffusion method was applied to determine the antimicrobial susceptibility of the *P. aeruginosa* isolates. The determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibiotics was performed using the MICRONAUT-S Pseudomonas MIC AST plates and the broth microdilution test (Merlin-Diagnostika, Bonn, Germany), or using an E-test (bioMérieux, France) for fosfomycin. The tests were performed, and the results were interpreted according to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) breakpoints.

5.2. Phages, Phage Susceptibility, Efficiency of Plating (EOP)

Two lytic phages, podovirus PNM and myovirus PT07, were used for patient treatment. Phages were produced and provided by the Queen Astrid Military Hospital in Brussels, Belgium. Phage preparations were made in accordance with quality and safety requirements for small-scale phage productions for human treatments. These requirements involve genetic analysis to ensure the absence of unwanted genes, such as toxin-coding and antibiotic resistance genes, and the determination of the lytic nature of phages [18]. The quality control of the used phage stock was performed by Sciensano, the Belgian federal

research institute for public health, to confirm phage identity and titer, pH, endotoxin level, and bioburden of the produced phage lots before the application of the phages. For patient treatment, both phages were shipped at a titer of 10^9 PFU/mL, and before their clinical application, solutions were diluted to 10^7 PFU/mL in 0.9% NaCl. For in vitro testing, PNM was provided at a concentration of 10^{12} PFU/mL and PT07 at 10^{11} PFU/mL.

The susceptibility of the target strain to the phages was determined using a spot test. One hundred microliters of an overnight bacterial culture was mixed with soft Tryptic Soy Agar (TSA; 0.7% agar) and poured on a TSA plate. After solidification of the top agar, 10 µL of the desired phage at a concentration of 10^7 PFU/mL was spotted and left to dry for approximately 20–30 min. The plates were incubated for 16–18 h at 35 °C, and the result was visually evaluated as confluent lysis (++++), semiconfluent lysis (+++), partial lysis (++), individual plaques (+), or without lysis (-).

To determine the efficiency of plating (EOP), 100 µL of an overnight bacterial culture was mixed with 50 µL of the desired phage solution using serial phage dilutions from 10^{-1} to 10^{-9}. Approximately 5–6 mL of previously melted 0.7% TSA was added and gently mixed, then poured on a TSA plate and grown for 16–18 h at 35 °C. Plaques were counted to determine the phage concentration in the bacterial isolate, and the titer was calculated. The EOP was calculated by dividing the phage titer of the tested isolate by the phage titer of its host *P. aeruginosa* strain (CN573). All experiments were performed in duplicate.

5.3. Biofilm Formation

Biofilm formation was studied using a crystal-violet assay. Briefly, a sterile 96-well flat-bottom microtiter plate (96-well TC plate; Suspension, F, Sarstedt, Germany) was used in the assay. The inoculum was obtained by making a suspension in Tryptic Soy Broth (TSB) of three to four colonies of TSA. The suspension was then cultured overnight and subsequently diluted to 1:100 in TSB and used for inoculum. Two hundred microliters of inoculum was added to each well, and the plate was incubated at 35 °C for 2, 4, 8, 16, 24, or 32 h. Only broth was used as a negative control. The wells were rinsed with 250 µL of sterile 0.9% NaCl after incubation. Then, the biofilm was stained with 200 µL of 0.1% crystal violet for 25 min, rinsed thrice with 250 µL of distilled water, and decolorized by the addition of 200 µL of 96% ethanol. Biofilm formation was measured spectrophotometrically (Tecan Infinite F50, Männedorf, Switzerland) at 600 nm (OD600) wavelength. Bacterial growth was considered to occur at an optical density value of >0.10. Each bacterial strain had more than 12 replications.

5.4. Detection of Bacterial Growth Suppression, Minimum Biofilm Eradication Concentration (MBEC), and Biofilm Prevention Concentration (BPC) Using Turbidity Reduction Assay

Bacterial strains were incubated at 35 °C overnight and mixed in TSB to reach a 1.0 MacFarland standard. For the inoculum, the broth was further diluted to 1:30 to achieve a concentration of 1.0×10^7 colony-forming units (CFU)/mL. A sterile flat-bottom 96-well plate (Nunc™ MicroWell™ 96-Well, Nunclon Delta-Treated, Flat-Bottom Microplate, Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Denmark) was filled with inoculum, 150 µL per well. Subsequently, the 96-well plate was covered with a 96-peg lid (Nunc™ Immuno TSP Lids) and incubated in a shaking table incubator (Infors^{TM} HT Ecotron, Basel, Switzerland) at 35 °C, 150 rpm for 24 h. The 96-peg lid was then transferred to a 96-well challenge plate containing 200 µL TSB per well of the desired phage or phage combination with phage titers of 10^7–10^9 PFU/mL. After 12 h of incubation at 35 °C, 150 rpm, suppression of bacterial growth was determined by measuring the optical density of the plate at 600 nm wavelength. The lid was transferred to another challenge plate with the same phages and their concentrations for 12 h of incubation to increase the phage effect. After a total of 24 h of incubation with phages, bacterial growth suppression was determined. The 96-peg lid was transferred to a fresh 96-well TSB plate, 200 µL per well, and sonicated for 25 min at 44 Hz using an ultrasonication bath (Model 08855-02, Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, USA) to remove established biofilm. To recover the bacteria from the biofilm, the plate

was covered with a sterile lid without pegs and incubated for 22 h at 35 °C stationary. To determine the minimum biofilm eradication concentration (MBEC), the optical density was measured at 600 nm wavelength.

The biofilm prevention concentration (BPC) was determined by inoculating bacteria and phages in their respective concentrations at the same time. Bacterial growth suppression was determined after 12 h of incubation of the inoculum plate. The plate was then changed to another challenge plate with phages and incubated for 12 h more, and after 24 h of incubation, again bacterial growth suppression was determined. The 96-peg lid was transferred to a 96-well sterile TSB plate and sonicated, then stationary incubated for 22 h at 35 °C, and the optical density for determining BPC was measured.

Between all steps after incubation, the 96-peg lid was rinsed in 0.9% NaCl, 200 µL per well, for 2 min and then transferred to the next 96-well plate. All 96-well plates used in the experiments were sealed with Parafilm® (Bemis Company, Inc, Neenah, WI, USA). The tests were produced in at least 10 replicates. Sterile TSB was used for the negative control that has OD < 0.10; for the positive control, TSB with only bacteria was used.

5.5. Detection of Differences in Phage Susceptibility and Phage Resistance of PAP01 in Bacterial Growth Suppression, MBEC, and BPC Models

To test for changes in phage susceptibility, bacterial cultures from turbidity reduction assay in 96-well plates were recovered on Mueller Hinton Agar (MHA) with 5% sheep blood. This was performed once the microtiter plate incubation was finished, and OD was detected. Twenty-two bacterial cultures were taken randomly from different microtiter plates described in Section 5.4. using patient isolate PAP01. Cultures were taken from wells using a sterile 1 µL loop. Then the MHA inoculation was performed using the streaking method, and the plates were incubated for 24 h at 35 °C. Then three to four colonies from the MHA plate were inoculated in TSB and incubated overnight. Phage spot tests were performed using recovered bacteria as described in Section 5.2.

The cut-off value to determine phage resistance was calculated using a positive control (bacteria only). Bacteria were considered resistant to the phage if the measured OD > OD mean—(3 × SD) of the positive control. Phage resistance was detected after 12, 24, and 46 h with respect to the microtiter plate from which bacterial cultures were recovered. To show the difference between the measured mean optical density of the well (OD_{well}) compared with the optical density of resistance cut-off value (OD_{CF}), a ratio (OD_{ratio}) was used $OD_{ratio} = OD_{well}/OD_R$. If the value was less than 1, bacteria were not considered resistant, but if the value was greater than or equal to 1, bacteria were considered resistant to phage.

5.6. Phage Concentration Detection in Peripheral Blood Samples

A phage plaque assay was performed to determine the titer of infective phages in peripheral blood samples that were collected 2 h after intravenous phage administration in plastic EDTA blood-drawing tubes. To execute the aforementioned assay, 100 µL of PAP01 suspension was mixed with 50 µL of the peripheral blood sample. The mixture was then introduced into 0.7% TSA soft agar to spread onto 1.5% TSA solid agar plates. The blood phage level, i.e., the detected concentration of phages, was expressed as PFU/mL. Phage was measured in blood, in duplicate, for 11 consecutive days. The detection range for this experiment was 10^1–10^8 PFU/mL.

5.7. ^{18}F-FDG PET/CT Imaging

Whole-body ^{18}F-FDG PET/CT scans were performed from the top of the head, including the extremities. Additionally, low-dose CT was performed to process attenuation correction (CT-AC) and used for anatomical co-registration of PET findings. ^{18}F-FDG PET/CT images were acquired 60–75 min after the intravenous injection of ^{18}F-FDG (3.3 MBq per kg), using an ^{18}F-FDG PET/CT combined with a third-generation multi-slice spiral CT scanner with a dedicated full-ring PET scanner, which had a high-count-rate-capability lutetium-yttrium

oxyorthosilicate (LYSO)-based camera with time-of-flight (TOF) technology. Emission scans of ^{18}F-FDG PET/CT were acquired 45 s–2 min per bed in 3D mode. PET and CT images (non-corrected and attenuation-corrected) were evaluated in a rotating maximum-intensity projection and a cross-sectional plane view (transverse–sagittal–coronal). Images with increased focal uptake, with higher intensity than surrounding tissues, which did not correspond to the physiological distribution of ^{18}FDG, were defined as positive.

5.8. Data Analysis

Statistical and graphical analyses were performed using GraphPad Prism software (version 9) and MS Excel (version 10). The results were analysed using the Mann–Whitney *U* test.

6. Results

6.1. Bacterial Isolates, Their Susceptibility to Antibiotics and Phages

In total, five bacterial isolates were used, all identified as *P. aeruginosa*. For further biofilm modeling and phage testing, the PAP01 isolate obtained from the driveline velour removed during surgery was used. For antimicrobial susceptibility results, phage susceptibility testing and EOP results, see Table 1.

6.2. Phage Effect against Planktonic Cells, Biofilm Eradication, Prevention of Biofilm Formation, and Bacterial Resistance to Phages

Patient isolate PAP01 showed weak biofilm production in crystal-violet assay (Figure S1). The results of the biofilm eradication test in PAP01 showed that only phage PNM alone at a concentration 10^9 PFU/mL could decrease biofilm formation to some extent (Figure 4). Other phage concentrations of PNM and PT07, the combination of PT07 and PNM at any concentration, did not have a biofilm eradication effect. Planktonic cell growth after 12 h decreased for all phages and concentrations tested; however, after 24 h, this effect persisted only for PNM at concentrations of 10^7–10^8 PFU/mL and for a combination of phages at the tested concentrations. In all cases, except for PT07 concentrations 10^7 versus 10^8 PFU/mL, the bacterial growth suppression effect after 12 h was better when higher phage concentrations were used. This was not observed 24 h later, and was even the opposite was observed for PNM at concentrations 10^7 versus 10^9, and 10^8 versus 10^9 PFU/mL. Phage resistance developed in all cases after 24 h; however, it was less common in phage combination and reached 100% in bacterial cells recovered from biofilms for PT07 at all concentrations tested and for PNM at concentration of 10^7 PFU/mL. In comparison, the phage biofilm eradication effect was achieved in the host strain CN573: the emergence of resistance was low, and it developed only against the PNM phage and was 20% (Figure S2).

The biofilm prevention capacity in PAP01 for PT07 and the combination of PNM with PT07 were determined at all tested concentrations. PNM alone did not prevent biofilm formation; on the contrary, the use of 10^7 and 10^8 PFU/mL concentrations led to a higher bacterial growth compared with untreated PAP01. Bacterial growth suppression was observed for all phages and their tested concentrations 12 and 24 h after incubation. Phage resistance developed for all phages tested in bacteria recovered from biofilms; it reached 100% for PT07 at all tested concentrations. Bacterial resistance was observed only after 46 h of incubation for PNM phage and a combination of both phages. The resistance rate to PNM and phage combination differed in cells recovered from the biofilm (Figure 5).

6.3. Differences in Phage Susceptibility in Bacteria Recovered from the 96-Well Plates Used in Turbidity Reduction Assay

We evaluated the emergence of changes in phage susceptibility in bacterial cultures recovered from 22 wells from different microtiter plates used in MBEC and BPC detection models for PAP01 isolate. In 1 case, bacteria could not be recovered. In 14 of the remaining 21 cases, the phage lytic effect decreased, and in 7 of 21 cases, “no change” in the lytic effect was observed. In the biofilm eradication model, “no change” in phage lytic activity was observed more frequently than in the biofilm prevention model (see Table 2).

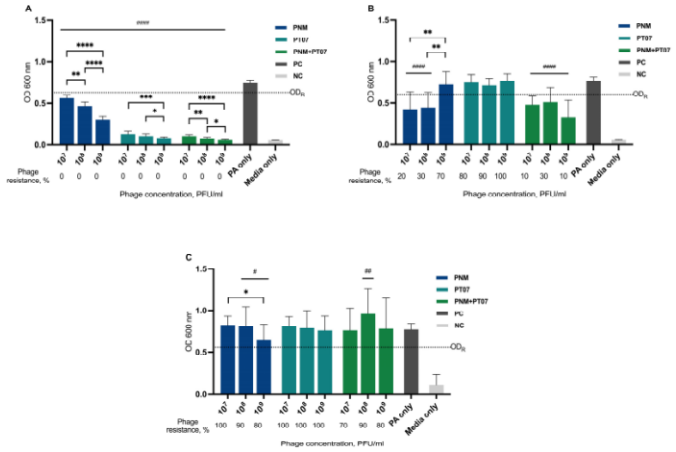


Figure 4. Bacterial growth suppression and MBEC of PNM, PT07, or both combined against PAP01 in a biofilm eradication model. The bars represent mean values + standard deviations. The number of phage-resistant strains in % is represented below the bars. (**A**) Bacterial growth suppression after 12 h; (**B**) Bacterial growth suppression after 24 h; (**C**) MBEC; PC—positive control, untreated PAP01; NC—negative control, media only; OD_R line represents the cut-off value to determine phage resistance; bars with a hash sign are statistically different from the positive control, and bars with an asterisk represent the statistical difference between concentrations of the same phage; */# *p*-value < 0.05, **/## *p*-value < 0.01, *** *p*-value < 0.001 and ****/#### *p*-value < 0.0001.

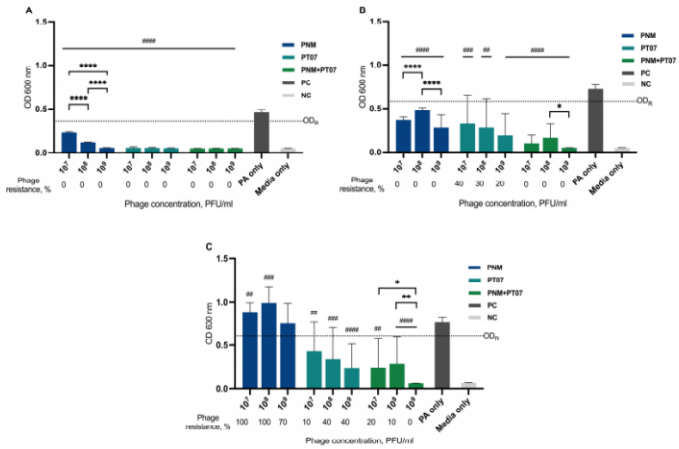


Figure 5. Bacterial growth suppression and BPC of PNM, PT07, or both combined against PAP01 in a biofilm prevention model. The bars represent mean values + standard deviations. The number of phage-resistant strains in % is represented below the bars. (**A**) Bacterial growth suppression after 12 h; (**B**) Bacterial growth suppression after 24 h; (**C**) BPC; PC—positive control, untreated PAP01; NC—negative control, media only; OD_R line represents the cut-off value to determine phage resistance; bars with a hash sign are statistically different from the positive control, and bars with an asterisk represent the statistical difference between concentrations of the same phage; * *p*-value < 0.05, **/## *p*-value < 0.01, ### *p*-value < 0.001 and ****/#### *p*-value < 0.0001.

Table 2. Differences in phage susceptibility from recovered bacteria in PAP01 models.

		Resistance Detection Time, h	Phage Tested in Well, PFU/mL	OD_{ratio}	PNM Susceptibility	PT07 Susceptibility	Susceptibility Change
Biofilm Eradication Model	1	12	PT07, 10^7	0.32	ND	+++	No change
	2	12	PT07, 10^8	0.25	ND	++	Decrease
	3	12	PNM, 10^7	0.94	+	ND	Decrease
	4	24	PT07, 10^7	1.53	ND	+++	No change
	5	24	PNM, 10^9	1.54	++	ND	No change
	6	24	PT07 + PNM, 10^8	1.12	-	++	Decrease
	7	24	PT07 + PNM, 10^9	0.10	-	+++	Decrease
	8	46	PT07, 10^7	1.54	ND	+++	No change
	9	46	PNM, 10^8	1.85	++	ND	No change
	10	46	PT07 + PNM, 10^8	2.32	-	-	Decrease
Biofilm Prevention Model	11	24	PT07, 10^7	1.31	ND	++	Decrease
	12	24	PT07, 10^8	1.41	ND	++	Decrease
	13	24	PT07, 10^8	0.09		No bacteria recovered	
	14	24	PNM, 10^8	0.84	-	ND	Decrease
	15	24	PT07 + PNM, 10^7	0.45	-	++	Decrease
	16	24	PT07 + PNM, 10^8	0.71	-	-	Decrease
	17	46	PT07, 10^7	1.29	ND	+++	No change
	18	46	PT07, 10^7	0.77	ND	++	Decrease
	19	46	PT07, 10^8	1.24	ND	++	Decrease
	20	46	PNM, 10^9	0.72	-	ND	Decrease
	21	46	PT07 + PNM, 10^7	0.33	+	+++	Decrease
	22	46	PT07 + PNM, 10^8	0.33	++	+++	No change

ND, not determined; Resistance detection time is the time after incubation of the 96-well plate from which the bacterial cultures were recovered; OD_{ratio}, is the ratio between OD_{well} to OD_{CF}; OD_{well}, measured OD of the well at 600 nm; OD_R, calculated OD cut-off value for resistance detection of the positive control; +++, semiconfluent lysis; ++, partial lysis; +, individual plaques; -, without lysis.

7. Discussion

We present a case of persistent LVAD driveline infection with MDR *P. aeruginosa* that was successfully treated with local and systemic application of phages in combination with antibiotics and surgical treatment, including LVAD driveline relocation. No adverse events were observed. The application of phages in in vitro models showed that phage–bacteria interactions vary in planktonic cells versus bacterial biofilms. In an in vitro model, phage therapy could not eradicate the biofilm produced by the patient's bacterial strain, but it could prevent the formation of the biofilm. Therefore, proper surgical intervention with complete bacterial debridement is crucial. In complex biofilm-associated and MDR infections, proper investigation, including hybrid imaging such as ^{18}F-FDG PET/CT, is helpful to understand the extent of the infection.

LVAD implantation has become more common in recent years, mainly as a bridge to heart transplantation. In addition to right ventricular failure, bleeding, thromboembolism, and pump malfunction, infection is one of the common complications observed [19]. Only 58.9% of patients with LVAD are estimated to not develop the first major infection in the first year after device implantation; at three years after device implantation, only 38.2% of patients have not had a major infection [2]. Driveline infections are among the most common infections associated with LVAD, with a prevalence of 18.8–100% of all infections related to LVAD [20]. The primary pathogens causing such infections are Gram-positive cocci. However, Gram-negative bacilli are becoming a common and concerning problem for patients with LVAD because they are frequently having multidrug resistance. In the ASSIST-ICD study in which 19 centers were involved, *P. aeruginosa* infections were detected in 13.7% of cases [21,22]. The standard treatment for driveline-associated infections involves systemic antibiotics; however, commonly, such an approach leads to treatment failure, and surgical relocation of LVAD driveline is necessary. In a study in Warsaw, Poland, the primary success rate with antibiotics was only 27%, driveline repositioning was needed for 73.1% of patients, and the mortality in these patients was 11.5% [4].

Multidrug resistance is a common feature in *P. aeruginosa* infections, ranging from 11.5 to 24.7%. In relapsing and chronic infections, treatment is challenging due to the lack of effective antibiotics and changes in the resistance pattern of *P. aeruginosa* during

treatment [23]. In recent years, the application of phages has become increasingly attractive for the treatment of MDR and extensively drug-resistant (XDR) *P. aeruginosa* infections due to their ability to destroy extracellular matrix and to reach inner structures and cells in biofilms, and to increase the effectiveness of antibiotics. Phage therapy in combination with antibiotics has been used in several case reports for different indications involving *P. aeruginosa* infections [6].

Our results show that the topical and intravenous application of phages combined with antibiotics and surgical treatment can be most appropriate for the successful outcome of infections associated with LVAD. There are two more cases of MDR *P. aeruginosa* LVAD-associated infection treatment described using phages. In one case, the same treatment modality was used with clinical cure and bacterial eradication [10]. In the other case, only phages and antibiotics were used, and the treatment failed, with relapse of infection and development of phage resistance during treatment [14]. Our case also shows that intravenously applied phages in concentration 10^7 were safe and did not elicit side effects similar to the results presented by Aslam et al. [9]. Therefore, for future phage applications, a dosage of 10^7 PFU/mL for antipseudomonal phages could be optimal. However, only in 7 out of 10 published cases such information is given, which makes it hard to compare (Table S1).

The application of phages in an in vitro biofilm model yielded varying results. Both phages, when used in the host (maternal) strain CN573 could lyse planktonic cells and eradicate established biofilm (Figure S2). In contrast, for the patient isolate, PAP01, biofilm eradication was not achieved (Figure 4). One of the obstacles that could explain these results is the bacterial susceptibility to the phages used, which was better for CN573 than for PAP01; for instance, the EOP for PAP01 using PNM was only 0.0005. When pre-adapted to host bacteria, as was the case for PNM and PT07 in CN573, phages are more efficient. Therefore, the best phage therapy results are expected to be achieved using personalized phage preparations, containing phages that were selected, or even pre-adapted, to better target the patient's infecting strain(s) [24]. However, such an approach is time- and cost-consuming, making phage therapy harder to apply in a clinical setting. However, it is important to note that last-resort antibiotic treatment is also highly expensive and not always available. Another critical factor is the structure of the biofilm; according to our results, *P. aeruginosa* strain CN573 produced greater biofilm than strain PAP01, assuming that it would be easier for phages to eradicate the biofilm of PAP01. However, this was not observed and could be explained by differences in biofilm density. Hu et al. showed that phage penetration depends on biofilm density [25]. This is one of the limitations of our study because we did not determine the biofilm density, and other methods, such as confocal laser scanning microscopy, should be used to identify the biofilm density. This could clarify whether the weak biofilm eradication effect of the phages in PAP01 was associated with the density of the biofilm.

The development of phage-resistant bacterial strains can occur quickly both in vitro and in vivo [26]; by reducing the density of the biofilm, the presence of phage-resistant strains can be detected [6]. In our study, resistance to phages was observed in the biofilm eradication model, with an incidence rate ranging from 70% to 100% for PNM and PT07, as well as for their combinations, using three different concentrations. Therefore, this could explain their failure to eradicate the biofilm. Resistance was present in the biofilm prevention model but it was less common; for PNM, it was 80–100%; for PT07, 10–40%, but when using a combination of these phages, it was 10–20% (Figure 5). Strategies involving combined treatment of phages and antibiotics can lead to a better outcome because the development of resistance against one agent can elicit increased susceptibility to another agent. A study by Burmeister et al. showed that there is even a trade-off between phage resistance and antibiotic resistance, which means that in phage-resistant strains, a possible susceptibility to antibiotics can evolve [27]. However, the interaction of phages and antibiotics is complex and does not always exhibit a synergistic effect; on the contrary, even antagonistic effects could be observed. The effect of phage-antibiotic combinations depends

on the administration order, the concentration of phage, and the antibiotic's and the phage's mechanism of action [28,29]. A crucial limitation of our study is the lack of investigation of antibiotics used in different combinations with phages and their antibiofilm effect.

The current standard treatment of LVAD biofilm-associated infections involves debridement and antibiotic therapy. Surgical intervention is crucial to mechanically remove and eliminate biofilm from the driveline [20]. Similarly, in our case, debridement and repositioning of the driveline were performed and, most likely, were the cornerstone for biofilm eradication; however, the formation of new biofilm and the development of bacteremia or septicaemia from the residual bacterial cells were prevented with antibiotics and phages.

Another reason to supplement antibiotic treatment with phages is the rapid development of antibiotic resistance in *P. aeruginosa.* This happens due to the presence of intrinsic and acquired resistance mechanisms [30]. Bacterial isolates of our patient also showed changes in the pattern of resistance to antibiotics throughout the time of infection (Table 1). Therefore, we cannot be sure that resistance to amikacin and ceftazidime-avibactam will not occur during treatment. This explains the need to use other effective agents as phages in MDR bacterial infections.

8. Conclusions

We describe a successful case of phage treatment of MDR *P. aeruginosa* LVAD driveline infection that was performed together with surgical intervention, debridement, and antibiotic therapy. More research should be conducted, focusing on phage dosage, duration of treatment, phage interaction with antibiotics, and the impact of phage resistance.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: https://www.mdpi.com/article/10.3390/v15051210/s1, Figure S1: Biofilm formation of *P. aeruginosa* PAP01 and CN573 strains using crystal violet assay; Figure S2: Bacterial growth suppression and MBEC of PNM, PT07, or both combined, against CN573 in a biofilm eradication model; Table S1: Phage therapy case reports for LVAD-associated infection treatment.

Author Contributions: Conceptualization, K.R. and J.K.; methodology, K.R., A.P., J.K., J.L., A.V., I.P., D.R., M.M., J.-P.P. and S.D.; software, K.R. and L.M.; formal analysis, K.R., S.M., L.M., D.R. and M.K.; investigation, K.R., J.L., I.P., L.M., D.R. and S.M.; resources, J.K. and P.S.; data curation, K.R., L.M. and D.R.; writing—original draft preparation, K.R., J.L. and M.K.; writing—review and editing, K.R., L.M., A.V., A.P., P.S., J.-P.P. and J.K.; visualization, K.R. and M.K.; supervision, J.K., A.P. and P.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The study did not require ethical approval.

Informed Consent Statement: Written informed consent has been obtained from the patient to publish this paper.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to patient privacy.

Acknowledgments: The authors acknowledge and thank Dace Rudzite, a clinical microbiologist from Riga East University Hospital, and Inese Jansone from Pauls Stradins Clinical University Hospita, for their support in antibacterial susceptibility testing.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Frigerio, M. Left Ventricular Assist Device: Indication, Timing, and Management. *Heart Fail. Clin.* **2021**, *17*, 619–634. [CrossRef] [PubMed]
2. Molina, E.J.; Shah, P.; Kiernan, M.S.; Cornwell, W.K.; Copeland, H.; Takeda, K.; Fernandez, F.G.; Badhwar, V.; Habib, R.H.; Jacobs, J.P.; et al. The Society of Thoracic Surgeons Intermacs 2020 Annual Report. *Ann. Thorac. Surg.* **2021**, *111*, 778–792. [CrossRef] [PubMed]
3. Kilic, A.; Acker, M.A.; Atluri, P. Dealing with surgical left ventricular assist device complications. *J. Thorac. Dis.* **2015**, *7*, 2158–2164. [CrossRef]

4. Juraszek, A.; Smólski, M.; Kołsut, P.; Szymański, J.; Litwiński, P.; Kuśmierski, K.; Zakrzewska-Koperska, J.; Sterliński, M.; Dziodzio, T.; Kuśmierczyk, M. Prevalence and management of driveline infections in mechanical circulatory support—A single center analysis. *J. Cardiothorac. Surg.* **2021**, *16*, 216. [CrossRef] [PubMed]
5. Lumish, H.S.; Cagliostro, B.; Braghieri, L.; Bohn, B.; Mondellini, G.M.; Antler, K.; Feldman, V.; Kleet, A.; Murphy, J.; Tiburcio, M.; et al. Driveline Infection in Left Ventricular Assist Device Patients: Effect of Standardized Protocols, Pathogen Type, and Treatment Strategy. *ASAIO J.* **2022**, *68*, 1450–1458. [CrossRef] [PubMed]
6. Chegini, Z.; Khoshbayan, A.; Taati Moghadam, M.; Farahani, I.; Jazireian, P.; Shariati, A. Bacteriophage therapy against Pseudomonas aeruginosa biofilms: A review. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **2020**, *19*, 45. [CrossRef] [PubMed]
7. Suh, G.A.; Lodise, T.P.; Tamma, P.D.; Knisely, J.M.; Alexander, J.; Aslam, S.; Barton, K.D.; Bizzell, E.; Totten, K.M.C.; Campbell, J.L.; et al. Considerations for the Use of Phage Therapy in Clinical Practice. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2022**, *66*, e0207121. [CrossRef]
8. Mulzer, J.; Trampuz, A.; Potapov, E.V. Treatment of chronic left ventricular assist device infection with local application of bacteriophages. *Eur. J. Cardio-Thoracic Surg.* **2019**, *57*, 1003–1004. [CrossRef] [PubMed]
9. Aslam, S.; Lampley, E.; Wooten, D.; Karris, M.; Benson, C.; Strathdee, S.; Schooley, R.T. Lessons Learned From the First 10 Consecutive Cases of Intravenous Bacteriophage Therapy to Treat Multidrug-Resistant Bacterial Infections at a Single Center in the United States. *Open Forum Infect. Dis.* **2020**, *7*, ofaa389. [CrossRef]
10. Tkhilaishvili, T.; Merabishvili, M.; Pirnay, J.P.; Starck, C.; Potapov, E.; Falk, V.; Schoenrath, F. Successful case of adjunctive intravenous bacteriophage therapy to treat left ventricular assist device infection. *J. Infect.* **2021**, *83*, e1–e3. [CrossRef]
11. Rojas, S.V.; Junghans, S.; Fox, H.; Lazouski, K.; Schramm, R.; Morshuis, M.; Gummert, J.F.; Gross, J. Bacteriophage-Enriched Galenic for Intrapericardial Ventricular Assist Device Infection. *Antibiotics* **2022**, *11*, 602. [CrossRef] [PubMed]
12. Aslam, S.; Pretorius, V.; Lehman, S.M.; Morales, S.; Schooley, R.T. Novel bacteriophage therapy for treatment of left ventricular assist device infection. *J. Heart Lung Transpl.* **2019**, *38*, 475–476. [CrossRef] [PubMed]
13. Rubalskii, E.; Ruemke, S.; Salmoukas, C.; Boyle, E.C.; Warnecke, G.; Tudorache, I.; Shrestha, M.; Schmitto, J.D.; Martens, A.; Rojas, S.V.; et al. Bacteriophage Therapy for Critical Infections Related to Cardiothoracic Surgery. *Antibiotics* **2020**, *9*, 232. [CrossRef] [PubMed]
14. Tkhilaishvili, T.; Potapov, E.; Starck, C.; Mulzer, J.; Falk, V.; Trampuz, A.; Schoenrath, F. Bacteriophage therapy as a treatment option for complex cardiovascular implant infection: The German Heart Center Berlin experience. *J. Heart Lung Transpl.* **2022**, *41*, 551–555. [CrossRef] [PubMed]
15. Püschel, A.; Skusa, R.; Bollensdorf, A.; Gross, J. Local Treatment of Driveline Infection with Bacteriophages. *Antibiotics* **2022**, *11*, 1310. [CrossRef] [PubMed]
16. Nale, J.Y.; Clokie, M.R. Preclinical data and safety assessment of phage therapy in humans. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2021**, *68*, 310–317. [CrossRef]
17. Association, W.M. World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA* **2013**, *310*, 2191–2194. [CrossRef]
18. Merabishvili, M.; Pirnay, J.P.; Verbeken, G.; Chanishvili, N.; Tediashvili, M.; Lashkhi, N.; Glonti, T.; Krylov, V.; Mast, J.; Van Parys, L.; et al. Quality-controlled small-scale production of a well-defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e4944. [CrossRef]
19. Varshney, A.S.; DeFilippis, E.M.; Cowger, J.A.; Netuka, I.; Pinney, S.P.; Givertz, M.M. Trends and Outcomes of Left Ventricular Assist Device Therapy: JACC Focus Seminar. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2022**, *79*, 1092–1107. [CrossRef]
20. O'Horo, J.C.; Abu Saleh, O.M.; Stulak, J.M.; Wilhelm, M.P.; Baddour, L.M.; Rizwan Sohail, M. Left Ventricular Assist Device Infections: A Systematic Review. *ASAIO J.* **2018**, *64*, 287–294. [CrossRef]
21. Rahal, A.; Ruch, Y.; Meyer, N.; Perrier, S.; Minh, T.H.; Schneider, C.; Lavigne, T.; Marguerite, S.; Ajob, G.; Cristinar, M.; et al. Left ventricular assist device-associated infections: Incidence and risk factors. *J. Thorac. Dis.* **2020**, *12*, 2654–2662. [CrossRef] [PubMed]
22. Tattevin, P.; Flécher, E.; Auffret, V.; Leclercq, C.; Boulé, S.; Vincentelli, A.; Dambrin, C.; Delmas, C.; Barandon, L.; Veniard, V.; et al. Risk factors and prognostic impact of left ventricular assist device-associated infections. *Am. Heart J.* **2019**, *214*, 69–76. [CrossRef] [PubMed]
23. Kunz Coyne, A.J.; El Ghali, A.; Holger, D.; Rebold, N.; Rybak, M.J. Therapeutic Strategies for Emerging Multidrug-Resistant Pseudomonas aeruginosa. *Infect. Dis. Ther.* **2022**, *11*, 661–682. [CrossRef] [PubMed]
24. Glonti, T.; Pirnay, J.P. In Vitro Techniques and Measurements of Phage Characteristics That Are Important for Phage Therapy Success. *Viruses* **2022**, *14*, 1490. [CrossRef] [PubMed]
25. Hu, J.; Miyanaga, K.; Tanji, Y. Diffusion properties of bacteriophages through agarose gel membrane. *Biotechnol. Prog.* **2010**, *26*, 1213–1221. [CrossRef]
26. Castledine, M.; Padfield, D.; Sierocinski, P.; Soria Pascual, J.; Hughes, A.; Mäkinen, L.; Friman, V.P.; Pirnay, J.P.; Merabishvili, M.; de Vos, D.; et al. Parallel evolution of *Pseudomonas aeruginosa* phage resistance and virulence loss in response to phage treatment in vivo and in vitro. *Elife* **2022**, *11*, e73679. [CrossRef] [PubMed]
27. Burmeister, A.R.; Fortier, A.; Roush, C.; Lessing, A.J.; Bender, R.G.; Barahman, R.; Grant, R.; Chan, B.K.; Turner, P.E. Pleiotropy complicates a trade-off between phage resistance and antibiotic resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **2020**, *117*, 11207–11216. [CrossRef]

28. Leclerc, Q.J.; Lindsay, J.A.; Knight, G.M. Modelling the synergistic effect of bacteriophage and antibiotics on bacteria: Killers and drivers of resistance evolution. *PLoS Comput. Biol.* **2022**, *18*, e1010746. [CrossRef]
29. Gu Liu, C.; Green, S.I.; Min, L.; Clark, J.R.; Salazar, K.C.; Terwilliger, A.L.; Kaplan, H.B.; Trautner, B.W.; Ramig, R.F.; Maresso, A.W. Phage-Antibiotic Synergy Is Driven by a Unique Combination of Antibacterial Mechanism of Action and Stoichiometry. *mBio* **2020**, *11*, e01462-20. [CrossRef]
30. Wheatley, R.; Diaz Caballero, J.; Kapel, N.; de Winter, F.H.R.; Jangir, P.; Quinn, A.; Del Barrio-Tofiño, E.; López-Causapé, C.; Hedge, J.; Torrens, G.; et al. Rapid evolution and host immunity drive the rise and fall of carbapenem resistance during an acute Pseudomonas aeruginosa infection. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 2460. [CrossRef]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Fāgu terapijas klīniskie gadījumi LVAD asociētu infekciju ārstēšanā

N	Pacienta vecums, dzimums	Ierosinātājs	Ārstēšanas veids	Izmantotais fāgs/-i	Fāgu terapijas raksturojums	Fāgu terapijas ilgums	Blakusparādības	Iznākums, piezīmes	Pilsēta, valsts	Atsauce
1	65 gadus vecs vīrietis	MSSA	Antibakteriāla un fāgu	AB-SA01 kokteilis, kurš sastāv no 3 līitiskiem *S. aureus* fāgiem (*Myoviridae*).	I/v q12 (3×10^9 PFU/ml)	28 dienas	Blakusparādības netika novērotas.	Klīniska izveseļošanās, baktērijas saglabāšanās organismā. * Nedēļu pēc ārstēšanas pacientam tika veikta sirds transplantācija. Septiņus mēnešus pēc transplantācijas netika novērota reinfekcija.	Sandjego, Kalifornija, ASV	*Aslam*, 2019 (120)
2	67 gadus vecs vīrietis	MSSA	Ķirurģiska, fāgu, antibakteriāla	Komerciālais ELIAVA fāgu kokteilis PYO, kas sastāv no Sb-1 un ISP (*Myoviridae*) fāgiem, aktīviem pret *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Proteus spp.*, *P. aeruginosa un E. coli*, un ELIAVA stafilokoku fāgs Sb-1 (*Myoviridae*), aktīvs pret *Staphylococcus spp.*	Lokāla fāgu ievade (1:1) PYO (10^6 PFU/ml, 5 ml) un Sb-1 (10^7 PFU/ml, 5 ml) operācijas laikā, pēc tam izmantojot drenas operācijas vietā q8	10 dienas	Slikta dūša.	Klīniska izveseļošanās, baktērijas eradikācija.	Berlīne, Vācija	*Mulzer*, 2019 (115)
3	61 gadu vecs vīrietis	*S. aureus*	Antibakteriāla un fāgu	*Myoviridae* fāgs CH1, aktīvs pret *S. aureus*.	Lokāla ievade caur drenu krūškurvī (1×10^9 PFU/ml, 2 ml) q12	7 dienas	Blakusparādības netika novērotas.	Klīniska izveseļošanās, baktērijas eradikācija. * 20 mēnešus vēlāk pacients nomira no sirds transplantāta mazspējas.	Hannovere, Vācija	*Rubalskii*, 2020 (119)
4	51 gadu vecs vīrietis	*S. aureus*	Antibakteriāla un fāgu	Četri *S. aureus Myoviridae* fāgi –CH1, Sa30, SCH1 un SC111.	Intranazāli 2 ml q24, orāli 10–20 ml q24, lokāla ievade caur drenu 10 ml q24 (8 dienas), 10–20 ml q12 (6 dienas) (1×10^9 PFU/ml	14 dienas	Blakusparādības netika novērotas.	Neveiksmīga ārstēšana, pacients nomira 1,5 mēnešus vēlāk no *S. aureus* sepses. * *S. aureus* eradikāciju panāca deguna dobumā, baktēriju daudzums samazinājās izdalījumos no drenas.	Hannovere, Vācija	*Rubalskii*, 2020 (119)

N	Pacienta vecums, dzimums	Ierosinātājs	Ārstēšanas veids	Izmantotais fāgs/-i	Fāgu terapijas raksturojums	Fāgu terapijas ilgums	Blakusparādības	Iznākums, piezīmes	Pilsēta, valsts	Atsauce
5	60 gadu vecs vīrietis	MDR *P. aeruginosa*	Antibakteriāla un fāgu	GD-1, kura sastāvā ir 3 fāgi.	I/v q8 ($1,9 \times 10^7$ PFU/ml)	6 nedēļas	Blakusparādības netika novērotas.	Neveiksmīga ārstēšana, bakterēmijas attīstība otrajā ārstēšanas nedēļā. * Otrās ārstēšanas nedēļas laikā parādījās fāgus neitralizējošās antivielas serumā.	Sandjego, Kalifornija, ASV	*Aslam*, 2020 (116)
6	82 gadus vecs vīrietis	*P. aeurginosa*	Ķirurģiska, fāgu, antibakteriāla	Pirmā epizode: SDSU1 (2 fāgi PAK-P un E217) SDSU2 (2 fāgi PAK_P1, PAK_P5) kokteilis. Otrā epizode: PPM3 (4 fāgi) kokteilis.	Pirmā epizode: I/v q8 (2×10^5 PFU/ml) q12 ($7,58 \times 10^5$ un 4×10^{10} PFU/ml). Vienreizēja lokāla fāgu ievade operācijas laikā Otrā epizode: I/v q12 (1×10^9 PFU/ml)	Pirmā epizode: 73 dienas Otrā epizode: 4 nedēļas	Drudzis, klepus, elpas trūkums, izmantojot fāgu SDSU1 1×10^{11} PFU/ml koncentrācijā. Simptomi izzuda un fāgu panesamība bija laba, samazinot devu uz 10^{10} PFU/ml.	Neveiksmīga ārstēšana, recidivējošas bakterēmijas attīstība pirmās ārstēšanas epizodes pēdējā nedēļā. Otrā ārstēšanas epizodē bakterēmija attīstījās 4. nedēļā.	Sandjego, Kalifornija, ASV	*Aslam*, 2020 (116)
7	53 gadus vecs vīrietis	MDR *P. aeruginosa*	Ķirurģiska, fāgu, antibakteriāla	Trīs līdziski *P. aeruginosa* fāgi (*Podoviridae* PNM; *Myoviridae* PT07 un 14/1).	I/v 7h infūzija (10^7 PFU/ml, 10 ml/h) Lokāli q12h (10^8 PFU/ml, 50 ml), izmantojot brūču pārsiešanas materiālu	5 dienas	Gamma-glutmiltransferāzes un tiešā bilirubīna pieaugums (GGT). Aknu bojājuma rādītāji normalizējās, samazinot fāgu devu par log 0,5 PFU/ml.	Klīniska izveseļošanās, baktērijas eradikācija. * Četrus mēnešus vēlāk pacients mira no neinfekciozas dabas cēloņa.	Berlīne, Vācija	*Tkhilaishvili*, 2021 (117)
8	68 gadus vecs vīrietis	MDR *P. aeruginosa*	Antibakteriāla un fāgu	Autofāga un PYO kokteiļi no ELIAVA.	Lokāli izmantojot brūču pārsiešanas materiālu ar autofāgu (10^8 PFU/ml) un PYO (10^6 PFU/ml) q12	12 dienas autofāgs un 5 dienas PYO	Nav pieejamu datu.	Recidivējošas *P. aeruginosa* infekcijas attīstība, fāgu rezistences attīstība.	Berlīne, Vācija	*Tkhilaishvili*, 2022 (121)

N	Pacienta vecums, dzimums	Ierosinātājs	Ārstēšanas veids	Izmantotais fāgs/-i	Fāgu terapijas raksturojums	Fāgu terapijas ilgums	Blakusparādības	Iznākums, piezīmes	Pilsēta, valsts	Atsauce
9	57 gadus vecs vīrietis	MSSA un *Proteus mirabilis*	Ķirurģiska, fāgu, antibakteriāla	SniPha 360 komerciālais līdzsvarots fāgu kokteilis pret: *commercial Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Streptococcus pyogenes, Proteus vulgaris* un *Proteus mirabilis.*	Vienreizēja lokāla fāgu ievade operācijas laikā, izmantojot viskozu materiālu, kurš piesūcināts ar fāgu (20 mL SniPha 360 (1×10^7 PFU/ml).	1 diena (vienreizēja deva)	Nav pieejamu datu.	MSSA infekcijas recidīvs 2 mēnešus vēlāk. *P. mirabilis* eradikācija. * *In vitro* testi parādīja, ka fāgu preparātam nav līdzsvarota efekta pret *S. aureus,* bet ir tikai pret *P. mirabilis.*	Rostoka, Vācija	*Püschel,* 2022 (122)
10	51 gadu vecs vīrietis	MSSA	Ķirurģiska, fāgu, antibakteriāla	SniPha 360 komerciālais līdzsvarots fāgu kokteilis.	Vienreizēja lokāla fāgu ievade operācijas laikā, izmantojot viskozu materiālu, kurš piesūcināts ar fāgu (20 mL SniPha 360 (1×10^7 PFU/ml).	1 diena (vienreizēja deva)	Nav pieejamu datu.	MSSA infekcijas recidīvs 6 mēnešus vēlāk.	Bočuma, Vācija	*Rojas*, 2022 (118)

Pirmā Ētikas komitejas atļauja

Veidlapa Nr. E-9 (2)

RSU ĒTIKAS KOMITEJAS LĒMUMS NR. 32 / 28.01.2016.

Rīga, Dzirciema iela 16, LV-1007
Tel. 67061596

	Komitejas sastāvs	Kvalifikācija	Nodarbošanās
1.	Profesors Olafs Brūvers	Dr.theo.	teologs
2.	Profesore Vija Sīle	Dr.phil.	filozofs
3.	Asoc.prof. Santa Purviņa	Dr.med.	farmakologs
4.	Asoc.prof. Voldemārs Arnis	Dr.biol.	rehabilitologs
5.	Profesore Regīna Kleina	Dr.med.	patologs
6.	Profesors Guntars Pupelis	Dr.med.	ķirurgs
7.	Asoc.prof. Viesturs Liguts	Dr.med.	toksikologs
8.	Docente Iveta Jankovska	Dr.med.	
9.	Docents Kristaps Circenis	Dr.med.	

Pieteikuma iesniedzējs: **Dr. Kārlis Rāceņis, rezidents**
Tālākizglītības fakultāte

Pētījuma nosaukums: „ Meticilīnrezistentā Staphylococcus aureus nēsātāju īpatsvars un raksturojums PSKUS pacientiem un darbiniekiem dažādu profilu nodaļās"

Iesniegšanas datums: 25.01.2016.

Pētījuma protokols: Izskatot iesniegtos pētījuma dokumentus (protokolu) (protokolu) ir redzams, ka pētījuma mērķis tiek sasniegts veicot deguna, cirkšņu un padušu iztriepes paņemšanu no pacientiem/dalībniekiem un pacientu medicīniskās dokumentācijas (medicīnas vēstures) izpēti, iegūto datu apstrādi un analīzi, kā arī izsakot priekšlikumus. Personu (pacientu, dalībnieku) datu aizsardzība, brīvprātīga informēta piekrišana piedalīties pētījumā un konfidencialitāte tiek nodrošināta. Līdz ar to pieteikums atbilst pētījuma ētikas prasībām.

Izskaidrošanas formulārs: ir

Piekrišana piedalīties pētījumā: ir

Komitejas lēmums: **piekrist** pētījumam

Komitejas priekšsēdētājs Olafs Brūvers Tituls: Dr. miss., prof.

Paraksts

LATVIJAS UNIVERSITĀTE ĒTIKAS KOMITEJA

Ētikas komitejas sēdes datums: 28.01.2016.

Otrā Ētikas komitejas atļauja

Veidlapa Nr. E-9 (2)

RSU ĒTIKAS KOMITEJAS LĒMUMS NR. 8 / 08.09.2016.

Rīga, Dzirciema iela 16, LV-1007
Tel. 67061596

	Komitejas sastāvs	Kvalifikācija	Nodarbošanās
1.	Profesors Olafs Brūvers	Dr.theo.	teologs
2.	Profesore Vija Sīle	Dr.phil.	filozofs
3.	Asoc.prof. Santa Purviņa	Dr.med.	farmakologs
4.	Asoc.prof. Voldemārs Arnis	Dr.biol.	rehabilitologs
5.	Profesore Regīna Kleina	Dr.med.	patalogs
6.	Profesors Guntars Pupelis	Dr.med.	ķirurgs
7.	Asoc.prof. Viesturs Liguts	Dr.med.	toksikologs
8.	Docente Iveta Jankovska	Dr.med.	
9.	Docents Kristaps Circenis	Dr.med.	

Pieteikuma iesniedzējs: **Kārlis Rācenis**
Medicīnas fakultāte, doktorantūra

Pētījuma nosaukums: „ Bakteriofāgu antibakteriālā efekta izvērtējums in vitro un in vivo sistēmās, efektīva bakteriofāgu diagnostiskā algoritma izveide pret no pacienta materiāla izdalītiem E.coli un Enterococcus spp. mikroorganismiem"

Iesniegšanas datums: 08.09.2016.

Pētījuma protokols: Izskatot iesniegtos pētījuma dokumentus (protokolu) ir redzams, ka pētījuma mērķis tiek sasniegts veicot ar pacientiem, bez kāda apdraudējuma veselībai un dzīvībai, klīniski-analītisku darbu (bakteriālo materiālu izpēte un analīzes...), izmantojot arī laboratorijas dzīvniekus-peles (nepieciešamās atļaujas tiek saņemtas no Pārtikas un veterinārā dienesta), pacientu medicīniskās dokumentācijas (medicīnas vēstures) izpēti, iegūto datu apstrādi un analīzi, kā arī izsakot priekšlikumus. Personu (pacientu, dalībnicku) datu aizsardzība, brīvprātīga informēta piekrišana piedalīties pētījumā un konfidencialitāte tiek nodrošināta. Līdz ar to pieteikums atbilst medicīnas pētījuma ētikas prasībām.

Izskaidrošanas formulārs: ir

Piekrišana piedalīties pētījumā: ir

Komitejas lēmums: **piekrist** pētījumam

Komitejas priekšsēdētājs Olafs Brūvers Tituls: Dr. miss., prof.

Paraksts

RĪGAS STRADIŅA UNIVERSITĀTE ĒTIKAS KOMITEJA

Ētikas komitejas sēdes datums: 08.09.2016.