



UDC 636.22/.28.09:616.98:579.861.2-085

The effect of various titers of bacteriophages on the amount of *Staphylococcus aureus* variant *bovis*

Y. V. Horiuk

Podilya State Agrarian and Engineering University, Ukraine

Article info

Received 31.03.2020

Received in revised form

04.04.2020

Accepted

20.05.2020

Podilya State Agrarian and
Engineering University

13, Schevchenko

Str., Kamianets-Podilskyi,

Khmelnyskyi region, 32300,

Ukraine

E-mail: goruky@ukr.net

Horiuk, Y. V. (2020). The effect of various titers of bacteriophages on the amount of *Staphylococcus aureus* variant *bovis*. *Veterinary Science, Technologies of Animal Husbandry and Nature Management*, 5, 26-31. DOI: 10.31890/vttp.2020.05.05

Nowadays bacteriophage treatment is more often seen as alternative to antibiotics. But collaborative mechanism of bacterial virus is not enough studied. The aim of work is to research the dynamic of bacterial virus population using different titres of bacteriophage SAVB14 and sensitive to its culture *S. aureus* var. *bovis*. To estimate the influence of bacteriophage Phage SAVB14 on amount of viable bacteria *S. aureus* var. *bovis* was taken 1 ml of phagolysate with titer of phagolysate with titers 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 BU/ml in 9 ml of nutrient broth with daily culture of tested microorganisms and kept during 12 hours. The amount of viable staphylococcus was defined every 2 hours by sowing them in the environment BD Baird-Parker Agar (HiMedia, India) according to standard methodic. The investigation was made three times. Strains *S. aureus* var. *bovis* were used in the research, that were lysed by bacteriophage Phage SAVB14 in Otto method. The results of investigation show, that different titers of bacteriophage SAVB14 adversely affected on the target bacteria *S. aureus* during first two hours. However, the more titer of phage, the more progress phage infection. Staphylococcus content when interacting with phages, the titer of which 10^6 BU / cm^3 decreases in 1.6 times in 12 hours of interaction, compared with the number of *S. aureus* var. *bovis* in broth without bacteriophage. The same results can be shown at a titer of 10^9 BU / cm^3 - the content of *S. aureus* decreased in 2.3 times compared to the control. The obtained data indicate that the introduction of phage with a titer of 10^8 BU / cm^3 in 1.3 times more effectively destroys *S. aureus* than the introduction of phagolysate with a titer of 10^7 BU / cm^3 , and in 1.5 times compared with titer 10^6 BU / cm^3 . The results obtained from the research of the effect of phage with a titer of 10^9 BU / cm^3 , almost do not differ from obtained when testing a titer of 10^8 BU / cm^3 . Therefore, to obtain desirable therapeutic effect in the use of phage drugs for the treatment of mastitis caused by *S. aureus* var. *bovis*, we recommend the use of phagolysate with a titer of at least 10^8 BU / cm^3 .

Keywords: titer of bacteriophages, Phage SAVB14, *Staphylococcus aureus* var. *bovis*.

Влияние различных титров бактериофагов на количество *Staphylococcus aureus* variant *bovis*

Ю. В. Горюк

Подольский государственный аграрно-технический университет, г. Каменец-Подольский, Украина

Сейчас фаготерапия все чаще рассматривается в качестве альтернативы антибиотикам. Однако механизмы взаимодействия фаг-бактерия изучены недостаточно. Цель работы - исследовать динамику популяции фаг-бактерия при использовании различных титров бактериофага SAVB14 и чувствительной к нему культуры *S. aureus* var. *bovis*. Для оценки влияния бактериофага Phage SAVB14 на количество жизнеспособных бактерий *Staphylococcus aureus* var. *bovis* вносили 1 мл фаголизата с титрами фагов 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 БОЕ / cm^3 в 9 мл питательного бульона с суточной культурой исследуемых микроорганизмов и выдерживали в течение 12 часов. Количество жизнеспособных стафилококков определяли каждые 2 часа путем посева их на среду BD Baird-Parker Agar (HiMedia, Индия) согласно стандартных методик. Исследования проводились в трех повторях. В опытах использовано штаммы *S. aureus* var. *bovis*, которые лизировались бактериофагом Phage SAVB14 в методе Отто. Результаты исследования показывают, что различные титры бактериофага SAVB14 пагубно действовали на целевые бактерии *S. aureus* уже в течении первых 2 часов. При этом, чем выше титр фагов, тем интенсивнее

прогресує фагова інфекція. Содержание стафілококка при взаємодії з фагами, титр которых 10^{-6} БОЕ/см³ зменшується в 1,6 раз через 12 годин взаємодії по порівнянню з кількістю *S. aureus* в бульйоні без бактеріофага. Така ж картина спостерігається і при титрі 10^{-9} БОЕ/см³ - кількість *S. aureus* зменшилась в 2,3 рази по порівнянню з контролем. При цьому отримані дані свідчать про те, що введення фага з титром 10^{-8} БОЕ/см³ в 1,3 рази ефективніше знищує *S. aureus*, ніж введення фаголізу з титром 10^{-7} БОЕ/см³, і в 1,5 рази по порівнянню з титром 10^{-6} БОЕ/см³. Результати дослідження впливу фага з титром 10^{-9} БОЕ/см³ майже не відрізняються від тих, що отримані при експерименті з титром 10^{-8} БОЕ/см³. Отже, для досягнення бажаного терапевтичного ефекту при використанні фагових препаратів для лікування маститу, викликаного *S. aureus* var. *bovis*, ми рекомендуємо використовувати фаголизат з титром не менше 10^{-8} БОЕ/см³.

Ключеві слова: титр бактеріофагів, Phage SAvB14, *Staphylococcus aureus* var. *bovis*.

Вплив різних титрів бактеріофагів на кількість *Staphylococcus aureus* variant *bovis*

Ю. В. Горюк

¹ Подільський державний аграрно-технічний університет, м. Кам'янець-Подільський, Україна

Наведено результати досліджень динаміки популяції фаг-бактерія при використанні різних титрів бактеріофага SAvB14 та чутливої до нього культури *S. aureus* var. *bovis*. Встановлено, що чим вищий титр фагів, тим інтенсивніше прогресує фагова інфекція. При цьому введення фага з титром 10^{-8} БОЕ/см³ ефективніше знищує *S. aureus*, ніж введення фаголізу з меншим вмістом SAvB14.

Ключові слова: титр бактеріофагів, Phage SAvB14, *Staphylococcus aureus* var. *bovis*.

Вступ

Актуальність теми. Серед збудників маститу найбільше привертає увагу *Staphylococcus aureus* через низький рівень ефективності антибіотикотерапії та його здатності зберігатися в стадії у вигляді невиявлених субклінічних інфекцій (Horiuk, Kukhtyn, Perkiy, & Horiuk, 2018; Kortright, Chan, Koff, & Turner, 2019). Загальні показники стійкості *S. aureus* до антимікробних препаратів широко варіюють залежно від регіону (Horiuk, Kukhtyn, Perkiy, & Horiuk, 2018; Varela-Ortiz et al., 2018). Крім того, виділяються з молока сирого мультрезистентні штами, особливо резистентні до метициліну *S. aureus* (MRSA) та до ванкоміцину *S. aureus* (VRSA), які становлять небезпеку для людей (Kukhtyn, Horyuk, Horyuk, Yaroshenko, Vichko, & Rokotylo, 2017). Тому існує нагальна потреба у пошуку і розробці нових терапевтичних засобів лікування маститу, націлених на цей патоген. Лікування бактеріальних інфекцій бактеріофагами є одним із альтернативних методів.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. В якості альтернативи антибіотикам для знищення бактерій все частіше рекомендують застосовувати фаготерапію (Barbu, Cady, & Hubby, 2016; Fabijan, Lin, Ho, Maddocks, Zakour, & Iredell, 2020). Нині механізми лізису фагами бактеріальних клітин-господарів вивчені недостатньо. Проте відомо, що реплікація є необхідною умовою для продукування фагових віріонів: якщо інфікована клітина вивільняє літичний фаг, відповідно його бактеріальний господар буде лізований (Hobbs & Abedon, 2016; Yen, Cairns, & Camilli, 2017). Для цього фаги використовують білок амурін, який пригнічує синтез пептидоглікану клітинної стінки, або ж використовують систему холініліз. Холіні сприяють збільшенню пор в мембрані цитоплазми бактерії, через які ендолізину вивільняються в клітинну стінку, що призводить до швидкого розщеплення зв'язків пептидогліканів, а отже, порушується фізична цілісність бактеріальної стінки (Bondy-Denomy et al., 2016; Bhardwaj, Mehta, Sood, & Sharma, 2020).

З іншого боку, ендолізину, які продукують фаги, руйнують клітинні стінки шляхом гідролізу пептидогліканів (Bondy-Denomy et al., 2016). Крім того, ендолізину імітують активність ендопептидази, амідази, глікозидази та літичної трансглікозидази для знищення

бактеріальних клітин за допомогою руйнування муреїну, що підсилює дифузію віріонів в кінці циклу реплікації фага. Слід зазначити, що ці ферменти потрапляють на клітинну стінку під час розвитку фага, проте лізис клітини не відбувається до кінця літичного циклу. Фактично лізис настає, коли холіні прямо або побічно усувають механізми, які обмежують активність секреції ендолізину (Bingham, Ekunwe, Falk, Snyder, & Kleanthous, 2000; Jault et al., 2019).

Фаги також можуть перешкоджати продукуванню білків, які важливі для ключових процесів в клітині господаря, що в результаті призводить до його загибелі (Bingham, Ekunwe, Falk, Snyder, & Kleanthous, 2000; Pires, Cleto, Sillankorva, Azeredo, & Lu, 2016)

Ці механізми добре діють лише при безпосередньому контакті фагу з чутливою бактерією (Pires, Cleto, Sillankorva, Azeredo, & Lu, 2016). Існує ряд специфічних особливостей щодо динаміки комплексу фаг-бактерія, які необхідно враховувати в контексті фаготерапії. Відомо, що висока щільність фагів необхідна для того, щоб зупинити ріст чутливих до них бактерій. Крім того, знищення бактерій фагом залежить від кількості фагових частинок, що адсорбувалися на цільових мікроорганізмах (Chung, Jang, Vae, & Cho, 2014; Titze & Krömker, 2020). Зв'язування фагів з бактеріями може бути змодельовано як простий процес першого порядку стосовно концентрації бактерій та фагової популяції відповідно (Bouchart et al., 2020). Все ж є необхідність в більш широкому розумінні механізмів їх взаємодії, що допоможе краще сформувати основні принципи створення препарату для лікування маститу корів та схем його введення.

Мета роботи – дослідити динаміку популяції фаг-бактерія при використанні різних титрів бактеріофага SAvB14 та чутливої до нього культури *S. aureus* var. *bovis*.

Матеріал і методи досліджень

Для досягнення мети досліджено культури золотистого стафілокока та специфічний бактеріофаг Phage SAvB14, який виділений нами з секрету молочної залози корів, що хворі на мастит і задепонований в Державному науково-дослідному контрольному інституті штамів і мікроорганізмів. У дослідках використано штами *S. aureus* var. *bovis*, які лізувалися

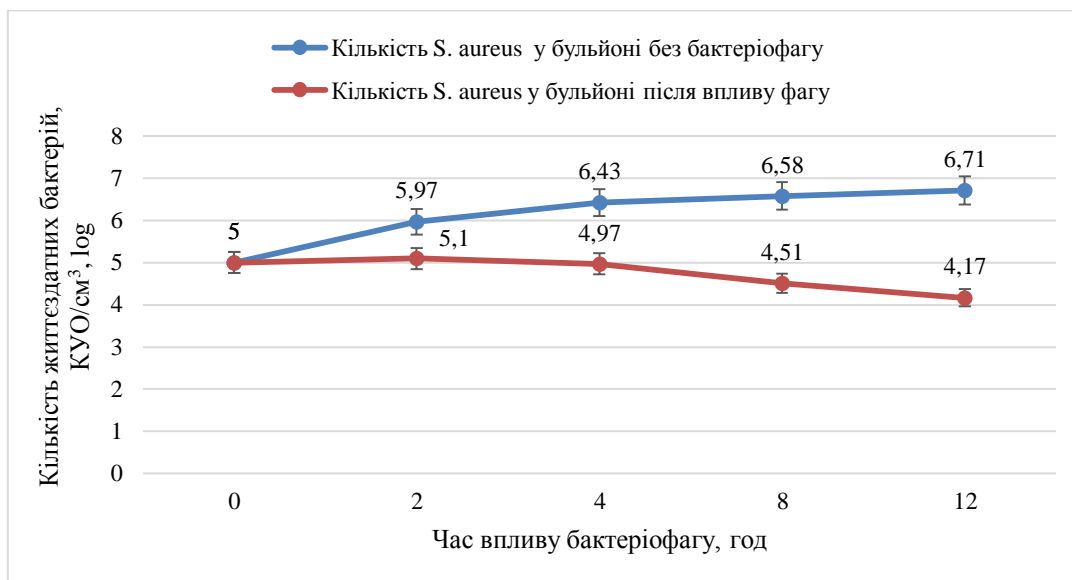
бактеріофагом *Phage SAvB14* у методі Отто (Wills, Kerrigan, & Soothill, 2005).

Для оцінки впливу бактеріофага *Phage SAvB14* на кількість життєздатних бактерій *S. aureus var. bovis* носили 1 мл фаголізату з титрами фагів 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} БУО/мл у 9 мл поживного бульйону з добовою культурою досліджуваних мікроорганізмів та витримували протягом 12 год. Через кожні дві години відсівали для визначення кількості *S. aureus*. Кількість життєздатних стафілококів визначали шляхом посіву їх на середовище BD Baird-Parker Agar (HiMedia, Індія) згідно із стандартними методиками. Дослідження проводили в трьох повторах.

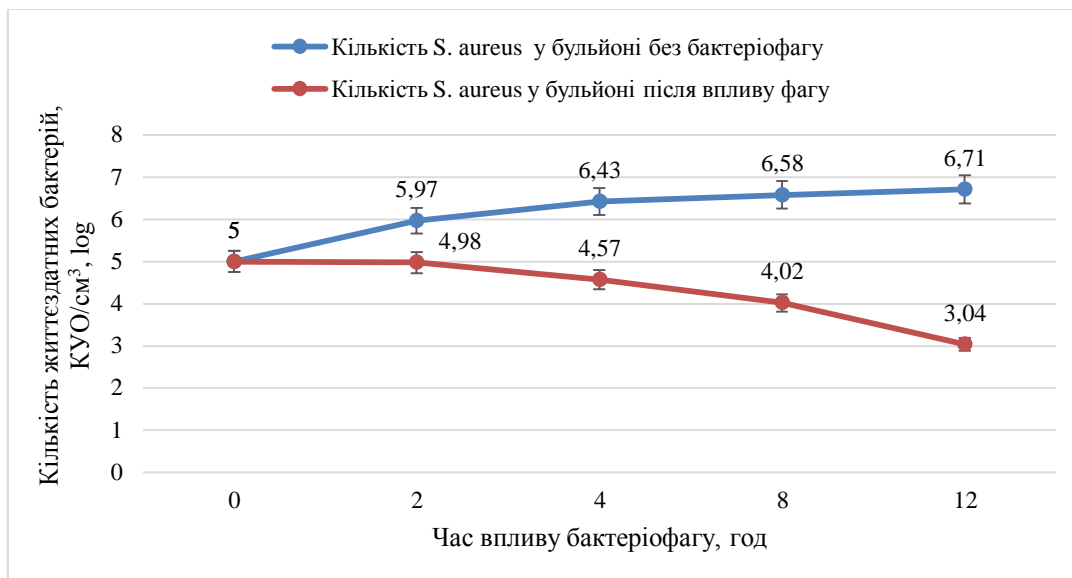
Статистичну обробку результатів здійснювали методами варіаційної статистики з використанням програми Statistica 6.0 (StatSoft Inc., USA). Застосовували непараметричні методи досліджень (критерії Уїлкоксона, Манна–Уїтні). Визначали середнє арифметичне (\bar{x}), стандартну похибку середньої величини (SE). Різницю між порівнюваними величинами вважали достовірною за $P < 0,05$.

Результати

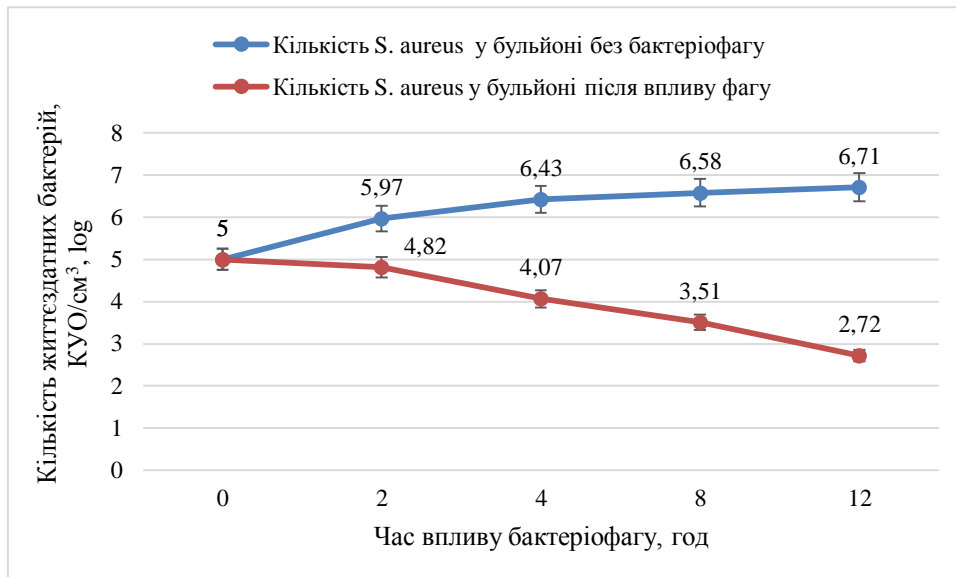
На рис. 1 наведено результати дослідження впливу різних титрів бактеріофага *Phage SAvB14* на штами чутливих бактерій *S. aureus var. bovis* протягом 12-ти годин.



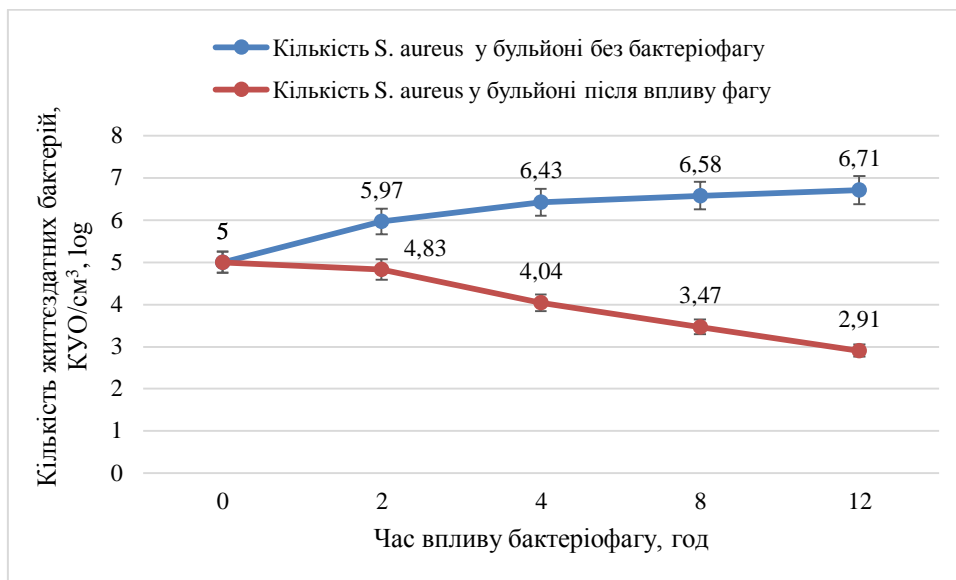
А – титр фагів 10^{-6} БУО/см³;



Б – титр фагів 10^{-7} БУО/см³



В – титр фагів 10^{-8} БУО/см³;



Г – титр фагів 10^{-9} БУО/см³.

Рис. 1. Вплив різних титрів бактеріофагів на кількість життєздатних клітин *S. aureus*.

З даних рисунка видно, що титр бактеріофагів прямопропорційно впливав на кількісний вміст *S. aureus var. bovis*. Вміст золотистого стафілокока вже протягом перших двох годин взаємодії з літичними фагами *SAvB14* зменшувався. Так, кількість життєздатних клітин бактерій при титрі 10^{-6} БУО/см³ зменшилася у 1,2 рази ($P < 0,05$), при титрі 10^{-7} , 10^{-8} та 10^{-9} БУО/см³ - приблизно у 1,3 рази ($P < 0,05$). Проте, при збільшенні часу взаємодії ми спостерігали, що чим більший був початковий титр фагів, тим інтенсивніше прогресувала фагова інфекція. Вже через 12 годин впливу бактеріофагів на чутливі до нього бактерії, їх кількість при титрі 10^{-8} БУО/см³ була меншою у 1,5 та 1,1 рази ($P < 0,05$), ніж при титрах 10^{-6} та 10^{-7} БУО/см³ відповідно.

Обговорення

Ключовим аспектом оцінювання фармакології антибактеріальних засобів є їх мінімальна інгібуюча концентрація (Titze & Krömker, 2020). Це найменша антибактеріальна концентрація препарату, яка впливає на запобігання росту бактерій. Проте, визначити МІК для фагових препаратів практично неможливо, оскільки ключовим моментом фаготерапії є те, що фаги здатні

до реплікації, що відповідно призводить до збільшення їх концентрації (Horiuk, 2019; Bouchart et al., 2020). Тим не менше, повинна існувати деяка мінімальна концентрація фагів, яка здатна спричинити бажаний антибактеріальний ефект.

Метою фаготерапії є максимізація кількості фагів, які потрапляють та заражують якомога більше бактерій, що призведе до клінічно незначного їх рівня, не викликаючи при цьому побічних ефектів (Capparelli, Parlato, Borriello, Salvatore, & Iannelli, 2007; Barbu, Cady, & Hubby, 2016; Horiuk, 2018). Для цього не тільки титр фагів, але і титр бактерій повинен бути достатньо високим, при цьому титр фагів повинен проходити «поріг поглинання», тобто коли реплікація фагів перевищує реплікацію бактерій. Це може бути досягнуто за допомогою традиційного дозування препарату (пасивне лікування), що забезпечує один цикл фагової інфекції. Або ж за допомогою наступних циклів реплікації фагів, тобто активного лікування (Capparelli, Parlato, Borriello, Salvatore, & Iannelli, 2007; Jault et al., 2019).

Наші дослідження показують, що використання різних титрів бактеріофага *SAvB14* знищувало цільові

бактерії *S. aureus* вже протягом перших 2 годин. Слід зазначити закономірність – чим вищий титр фагів, тим інтенсивніше прогресувала фагова інфекція.

Також можна вважати, що відбувалася реплікація фагів наступних поколінь, оскільки кількість життєздатних бактерій не збільшувалася. Так, вміст стафілокока при взаємодії з фагами, титр яких був 10^6 БУО/см³ (найменший взятий у дослід) зменшувався в 1,6 разів ($P < 0,05$) через 12 годин взаємодії у порівнянні з контролем. Таку ж картину спостерігали і при найвищому титрі (10^9 БУО/см³) – вміст *S. aureus var. bovis* зменшився у 2,3 рази ($P < 0,05$) у порівнянні з контролем.

У природних умовах популяція бактерій – це не однорідна сукупність однаково сприйнятливих клітин. Всі бактерії генетично різні, крім того деякі з них можуть виявляти часткову або ж повну стійкість (Yen, Cairns, & Camilli, 2017). Також може виникати просторова гетерогенність, наприклад її можна спостерігати коли бактерії, що знаходяться у заглибинах тканин, починають активно рости і при цьому титр фагів знижується. Сприятливі бактерії не будуть розміщуватися рівномірно, на їх ріст будуть впливати зовнішні фактори, такі як наявність поживних речовин, температура, рН тощо (Horiuk, Kukhtyn, Horiuk, & Mizyk, 2019; Geng et al., 2020).

Одним із способів вирішення цих проблем є підтримання високого титру фагів у вогнищі інфекції протягом певного періоду. Аналіз отриманих нами даних показав, що внесення фага з титром 10^8 БУО/см³ у 1,2 рази ($P < 0,05$) ефективніше знищував *S. aureus var. bovis*, ніж при внесенні фаголізату з титром 10^7 БУО/см³, та у 1,5 рази ($P < 0,05$) порівняно з титром 10^6 БУО/см³. Результати отримані при дослідженні впливу фага з титром 10^9 БУО/см³ майже не відрізнялися від тих, що отримані при випробуванні титру 10^8 БУО/см³.

Висновки та пропозиції

Для розробки препарату на основі бактеріофагів ми рекомендуємо використовувати фаголізат з титром не менше 10^8 БУО/см³. Введення такої кількості фагів може забезпечити необхідний терапевтичний ефект при лікуванні захворювань, спричинених *S. aureus var. bovis*.

References

Barbu, E. M., Cady, K. C., & Hubby, B. (2016). Phage therapy in the era of synthetic biology. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 8(10), a023879. DOI: [10.1101/cshperspect.a023879](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a023879)

Bhardwaj, S. B., Mehta, M., Sood, S., & Sharma, J. (2020). Isolation of a Novel Phage and Targeting Biofilms of Drug-Resistant Oral Enterococci. *Journal of global infectious diseases*, 12(1), 11–15. DOI: [10.4103/jgid.jgid.110.19](https://doi.org/10.4103/jgid.jgid.110.19)

Bingham, R., Ekanwe, S. I., Falk, S., Snyder, L., & Kleantous, C. (2000). The major head protein of bacteriophage T4 binds specifically to elongation factor Tu. *Journal of Biological Chemistry*, 275(30), 23219–23226. DOI: [10.1074/jbc.M002546200](https://doi.org/10.1074/jbc.M002546200)

Bondy-Denomy, J., Qian, J., Westra, E. R., Buckling, A., Guttman, D. S., Davidson, A. R., & Maxwell, K. L. (2016). Prophages mediate defense against phage infection through diverse mechanisms. *The ISME journal*, 10(12), 2854–2866. DOI: [10.1038/ismej.2016.79](https://doi.org/10.1038/ismej.2016.79)

Bouchart, F., Vidal, O., Lacroix, J. M., Spriet, C., Chamary, S., Brutel, A., & Hornez, J. C. (2020). 3D printed bioceramic for phage therapy against bone nosocomial

infections. *Materials Science and Engineering: C*, 111, 110840. DOI: [10.1016/j.msec.2020.110840](https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110840)

Capparelli, R., Parlato, M., Borriello, G., Salvatore, P., & Iannelli, D. (2007). Experimental phage therapy against *Staphylococcus aureus* in mice. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(8), 2765–2773. DOI: [10.1128/AAC.01513-06](https://doi.org/10.1128/AAC.01513-06)

Chung, I. Y., Jang, H. J., Bae, H. W., & Cho, Y. H. (2014). A phage protein that inhibits the bacterial ATPase required for type IV pilus assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(31), 11503–11508. DOI: [10.1073/pnas.1403537111](https://doi.org/10.1073/pnas.1403537111)

Fabijan, A. P., Lin, R. C., Ho, J., Maddocks, S., Zakour, N. L. B., & Iredell, J. R. (2020). Safety of bacteriophage therapy in severe *Staphylococcus aureus* infection. *Nature microbiology*, 1-8. 5, 465–472. DOI: [10.1038/s41564-019-0634-z](https://doi.org/10.1038/s41564-019-0634-z)

Geng, H., Zou, W., Zhang, M., Xu, L., Liu, F., Li, X., & Xu, Y. (2020). Evaluation of phage therapy in the treatment of *Staphylococcus aureus*-induced mastitis in mice. *Folia Microbiologica*, 65(2), 339–351. DOI: [10.1007/s12223-019-00729-9](https://doi.org/10.1007/s12223-019-00729-9)

Hobbs, Z., & Abedon, S. T. (2016). Diversity of phage infection types and associated terminology: the problem with 'lytic or lysogenic'. *FEMS microbiology letters*, 363(7), 1–8. DOI: [10.1093/femsle/fnw047](https://doi.org/10.1093/femsle/fnw047)

Horiuk, Y. V. (2019). Lytic Activity of Staphylococcal Bacteriophage on Different Biotypes of *Staphylococcus aureus*. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*, 21(94), 115–120. DOI: [10.32718/nvlvet9421](https://doi.org/10.32718/nvlvet9421)

Horiuk, Y. V., Kukhtyn, M. D., Horiuk, V. V., & Mizyk, V. P. (2019). Effect of Temperature on the lytic activity of Bacteriophage PHAGE SAVB14, specific for STAPHYLOCOCCUS AUREUS VARIANT BOVIS. *Veterinary Science, Technologies of Animal Husbandry and Nature Management*, 4, 37–40. DOI: [0.31890/vtpp.2019.04.07](https://doi.org/0.31890/vtpp.2019.04.07)

Horiuk, Y.V. (2018). Fagothrapy of cows mastitis as an alternative to antibiotics in the system of obtaining environmentally safe milk. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*, 20(88), 42–47. DOI: [10.32718/nvlvet8807](https://doi.org/10.32718/nvlvet8807)

Horiuk, Yu. V., Kukhtyn, M.D., Perkiy, Y.B. & Horiuk, V.V. (2018). Resistance of the main pathogens of mastitis of cows to modern antimicrobial drugs. *Science and Technology Bulletin of SRC for Biosafety and Environmental Control of AIC*, 6(2), 49–53.

Horiuk, Yu.V., Kukhtyn, M.D., Perkiy, Yu.B., & Horiuk, V.V. (2018). Distribution of main pathogens of mastitis in cows on dairy farms in the western region of Ukraine. *Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies*, 20(83), 115–119. DOI: [10.15421/nvlvet8322](https://doi.org/10.15421/nvlvet8322)

Jault, P., Leclerc, T., Jennes, S., Pirnay, J. P., Que, Y. A., Resch, G., & Schaal, J. V. (2019). Efficacy and tolerability of a cocktail of bacteriophages to treat burn wounds infected by *Pseudomonas aeruginosa* (PhagoBurn): a randomised, controlled, double-blind phase 1/2 trial. *The Lancet Infectious Diseases*, 19(1), 35–45. DOI: [10.1016/S1473-3099\(18\)30482-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30482-1)

Kortright, K. E., Chan, B. K., Koff, J. L., & Turner, P. E. (2019). Phage therapy: a renewed approach to combat antibiotic-resistant bacteria. *Cell host & microbe*, 25(2), 219–232. DOI: [10.1016/j.chom.2019.01.014](https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.01.014)

Kukhtyn, M. D., Horyuk, Y. V., Horyuk, V. V., Yaroshenko, T. Y., Vichko, O. I., & Pokotylo, O. S. (2017). Biotype characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products of private production in the

- western regions of Ukraine. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 8(3), 384–388. DOI: [10.15421/021759](https://doi.org/10.15421/021759)
- Pires, D. P., Cleto, S., Sillankorva, S., Azeredo, J., & Lu, T. K. (2016). Genetically engineered phages: a review of advances over the last decade. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 80(3), 523–543. DOI: [10.1128/MMBR.00069-15](https://doi.org/10.1128/MMBR.00069-15)
- Titze, I., & Krömker, V. (2020). Antimicrobial Activity of a Phage Mixture and a Lactic Acid Bacterium against *Staphylococcus aureus* from Bovine Mastitis. *Veterinary Sciences*, 7(1), 1–13. DOI: [10.3390/vetsci7010031](https://doi.org/10.3390/vetsci7010031)
- Varela-Ortiz, D. F., Barboza-Corona, J. E., González-Marrero, J., León-Galván, M. F., Valencia-Posadas, M., Lechuga-Arana, A. A., & Gutiérrez-Chávez, A. J. (2018). Antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis cases and in vitro efficacy of bacteriophage. *Veterinary research communications*, 42(3), 243–250. DOI: [10.1007/s11259-018-9730-4](https://doi.org/10.1007/s11259-018-9730-4)
- Wills, Q. F., Kerrigan, C., & Soothill, J. S. (2005). Experimental bacteriophage protection against *Staphylococcus aureus* abscesses in a rabbit model. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(3), 1220–1221. DOI: [10.1128/AAC.49.3.1220-1221.2005](https://doi.org/10.1128/AAC.49.3.1220-1221.2005)
- Yen, M., Cairns, L. S., & Camilli, A. (2017). A cocktail of three virulent bacteriophages prevents *Vibrio cholerae* infection in animal models. *Nature communications*, 8(1), 1–7. DOI: [10.1038/ncomms14187](https://doi.org/10.1038/ncomms14187)