

Нативные и модифицированные микобактериальные бактериофаги: источники, технологии получения и применение в диагностике и терапии микобактериозов

Р. О. АБДРАХМАНОВА¹, О. В. РУБАЛЬСКИЙ¹, М. В. ЛАЗЬКО¹,
*А. Л. ЯСЕНЯВСКАЯ¹, Т. С. РУБАЛЬСКАЯ²

¹ Астраханский государственный медицинский университет, Астрахань, Россия

² ООО «ГорДиаМед», Астрахань, Россия

Резюме

Микобактериальные бактериофаги (микобактериофаги) — вирусы, инфицирующие представителей рода *Mycobacterium*, рассматриваются как быстро развивающаяся платформа для диагностики и терапии инфекций, вызванных туберкулёзными и нетуберкулёзными микобактериями (НТМ). В обзоре критически обобщены современные подходы к поиску и выделению нативных микобактериофагов из природных субстратов; биологической и морфологической характеристике микобактериофагов; их молекулярной идентификации и аннотации геномов; технологиям направленной модификации и созданию рекомбинантных фагов микобактерий с заданными свойствами; требованиям к разработке лекарственных форм с микобактериальными фагами, контролю качества и биобезопасности этих форм; стратегиям персонализированной фаготерапии НТМ-инфекций и потенциалу диагностических репортерных фагов при микобактериозах. Обсуждаются ограничения (узкий спектр литической активности, возможная резистентность бактерий, взаимодействие с иммунной системой), регуляторные и технологические барьеры, а также перспективы интеграции микобактериофаговых платформ с антибиотикотерапией и биоинженерией. Предложены стандартизованные рабочие схемы пробоподготовки, скрининга, очистки и контроля качества препаратов, содержащих микобактериофаги, а также минимальные наборы исследовательской и клинической документации.

Ключевые слова: микобактериофаг; нетуберкулёзные микобактерии; фаготерапия; рекомбинантные фаги; репортерные фаги; контроль качества; персонализированная медицина

Для цитирования: Абдрахманова Р. О., Рубальский О. В., Лазько М. В., Ясенявская А. Л., Рубальская Т. С. Нативные и модифицированные микобактериальные бактериофаги: источники, технологии получения и применение в диагностике и терапии микобактериозов. *Антибиотики и химиотер.* 2025; 70 (11–12): 63–74. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2025-70-11-12-63-74>. EDN: WRGKML.

Native and Engineered Mycobacteriophages: Sources, Manufacturing Technologies, and Applications in Diagnosis and Therapy of Mycobacterioses

RADMILA O. ABDRAKHMANOVA¹, OLEG V. RUBALSKY¹, MARINA. V. LAZKO¹,
*ANNA L. YASENYAVSKAYA¹, TATIANA S. RUBALSKAIA²

¹ Astrakhan State Medical University, Astrakhan, Russia

² GorDiaMed LLC, Astrakhan, Russia

Abstract

Mycobacteriophages – viruses that infect members of the genus *Mycobacterium* — are emerging as a rapidly advancing platform for the diagnosis and treatment of infections caused by both tuberculous and nontuberculous mycobacteria (NTM). This review critically summarizes current approaches to (i) the discovery and isolation of native mycobacteriophages from environmental substrates; (ii) their biological and morphological characterization; (iii) molecular identification and genome annotation; (iv) targeted modification and construction of recombinant phages (including BRED) with desired properties; (v) development of pharmaceutical formulations, quality control, and biosafety; and (vi) strategies for personalized phage therapy of NTM infections, as well as the potential of reporter phages for diagnostics. Limitations (narrow host range activity, emergence of bacterial resistance, interactions with the immune system), regulatory and technological barriers, and perspectives on integrating phage platforms with antibiotic therapy and bioengineering are discussed. Standardized workflows for sampling, screening, purification, and quality control, as well as minimal research and clinical documentation sets, are proposed.

*Адрес для корреспонденции:
E-mail: yasen_9@mail.ru



*Correspondence to:
E-mail: yasen_9@mail.ru

EDN: WRGKML



Keywords: *mycobacteriophage; nontuberculous mycobacteria; phage therapy; recombinant phages; reporter phages; quality control; personalized medicine.*

For citation: *Abdrakhmanova R. O., Rubalsky O. V., Lazko M. V., Yasenyavskaya A. L., Rubalskaia T. S. Native and engineered mycobacteriophages: sources, manufacturing technologies, and applications in diagnosis and therapy of mycobacterioses. Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy. 2025; 70 (11–12): 63–74. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2025-70-11-12-63-74>. EDN: WRGKML. (in Russian)*

Введение

Микобактериозы — инфекции, вызываемые *Mycobacterium tuberculosis* complex и нетуберкулёзными микобактериями (НТМ, nontuberculous mycobacteria, NTM), остаются крупной медицинской и социальной проблемой. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), в 2023 г. в мире зарегистрировано порядка 10,8 млн новых случаев туберкулёза и около 1,25 млн смертей, что подчёркивает ведущий вклад туберкулёза в общую смертность от инфекционных заболеваний [1, 2]. Дополнительным фактором неблагоприятного прогноза выступает нарастающая глобальная антибиотикорезистентность, которая уже сегодня ассоциирована с миллионами летальных исходов ежегодно и требует поиска дополнений к стандартной терапии [3].

Одновременно с этим во многих регионах мира фиксируется устойчивый рост заболеваемости НТМ-инфекций. Их распространённость повышается на фоне старения населения, роста доли пациентов с хроническими заболеваниями лёгких, иммуносупрессией и широкого использования инвазивных вмешательств. Современные обзоры и популяционные исследования указывают на многолетнюю восходящую динамику НТМ-инфекций, а также на увеличение смертности, связанной с НТМ в 2000–2022 гг. [4, 5]. Клиническое ведение таких пациентов осложнено длительностью и токсичностью комбинированных режимов терапии, вариабельностью чувствительности возбудителей и высоким риском рецидивов. Даже при следовании действующим международным клиническим рекомендациям результативность лечения остаётся ограниченной, а частота нежелательных явлений — высокой [6]. Это увеличивает потребность в новых диагностических и терапевтических решениях, которые были бы адресно ориентированы на возбудителей микобактериозов и позволяли бы персонализировать выбор вариантов лечения.

На этом фоне возрастает интерес к микобактериальным бактериофагам (микобактериофагам) как к платформе для диагностики и лечения микобактериозов. В клинической практике уже описаны случаи применения индивидуально подобранных или модифицированных фагов у пациентов с тяжёлыми и рефрактерными формами микобактериальной инфекции, в том числе в рамках программ расширенного доступа («compassionate use»). Показано, что фагосодержащие препараты могут быть безопасны и сопровождаться

благоприятными клиническими или микробиологическими исходами примерно у половины больных, при этом вариабельность результатов связывают, в том числе, с иммунной нейтрализацией фагов и ограниченным набором фагов, активных в отношении конкретного штамма микобактерий [7, 8].

Кроме того, микобактериофаги открывают путь к быстрым фенотипическим тестам, основанным на жизнеспособности бактерий, — от экспресс-выявления *M. tuberculosis* complex и НТМ в культурах до скоростного профилирования лекарственной чувствительности, что критично для начала адекватной терапии. Репортерные фаги (например, люциферазные и другие флуоресцентные конструкции) дали возможность существенно сокращать сроки получения результатов по сравнению с классическими культуральными методами [9, 10].

Таким образом, с учётом сохраняющегося бремени туберкулёза, роста заболеваемости НТМ, ограниченной эффективности антибактериальной терапии и наличия проблемных вопросов диагностики микобактериозов, систематизация подходов к получению нативных и модифицированных микобактериофагов, их стандартизированной характеристике и применению представляется своевременной и практико-ориентированной задачей. Настоящий обзор фокусируется на источниках и методах выделения нативных микобактериофагов, инструментах их генетической модификации, вопросах производства, контроля качества и биобезопасности, а также на сценариях клинического применения в диагностике и терапии микобактериозов.

Источники и пробоподготовка для выделения нативных микобактериофагов

Для получения нативных микобактериофагов критичными факторами являются корректный выбор источников, строгая пробоподготовка и полное документирование предварительных или промежуточных данных исследований (метаданных). Наиболее «богатые» фагами образцы — органически насыщенные и влажные экосистемы: компост, навозохранилища, почвы в зонах животноводства и очистных сооружений, ил и осадки сточных вод, прибрежные зоны водоёмов, стоки клиник и лабораторий, пыль в вентиляционных системах. Отбор проб следует планиро-

вать с учётом сезонности, осадков и температуры источников, так как колебания влажности и температуры влияют на титры фагов и наличие их хозяев — микобактерий. Рекомендуется собирать не менее трёх образцов с каждой географической точки с последующим пулированием полученных образцов для повышения представленности фагового сообщества. Обычно объём образцов составляет для воды — 50–250 мл, для почв — 10–50 г из верхних слоёв почвы толщиной 2–5 см. Все пробы сопровождают карточкой метаданных (геоданные, дата, время, температура среды, типы ландшафта и антропогенной нагрузки, визуальные показатели). Такие подходы повышают воспроизводимость и вероятность успешной изоляции фагов из «трудных» образцов [11–13].

Биологическая безопасность: полевой отбор и лабораторные манипуляции с природным материалом проводят при уровне биобезопасности не ниже 2 с защитой от аэрозолей; работу с клиническими изолятами *M. tuberculosis complex* с накоплением жизнеспособного патогена осуществляют в условиях уровня 3 согласно действующим нормам. Рискорентрированный подход (оценка процедур, аэрозолеобразование, защита персонала, контроль инженерных систем) должен соответствовать Санитарным правилам и нормам 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», его следует применять при планировании всех этапов пробоподготовки. Подобные подходы описаны также в руководствах ВОЗ и BMBL (шестое издание) [14, 15].

Элюирование фагов из твёрдых образцов, в частности из почвы, обычно проводят изотоничными буферами с двухвалентными ионами Mg^{2+}/Ca^{2+} , но чаще всего SM-буфером (Tris-HCl, NaCl, $MgSO_4$; иногда с желатином 0,01%). Для десорбции вирионов с частиц рекомендуются мягкое встряхивание (100–200 об/мин, 20–60 мин, 20–37°C) и добавка неионогенного ПАВ (Твин-80 в конечной концентрации 0,01–0,05%), что снижает гидрофобные взаимодействия, характерные для исследуемого материала. Для жидких образцов достаточно перемешивания; для плотных — суспендирование в соотношении массы к объёму 1:5–1:10 с последующим отстаиванием осадка. При необходимости допускается использование белоксодержащих элюентов, однако они могут осложнять последующую фильтрацию и требуют дополнительных шагов очистки [11, 13, 16].

Осветление и удаление ненужных примесей проводят каскадно: низкоскоростное центрифугирование (5 000–10 000 g, 10–20 мин) с фильтрацией через фильтр с порами 0,45 и 0,22 мкм. Для образцов с высоким содержанием гуминовых веществ применяют сорбенты типа поливинилпирролидона или смолы DAX8 для связывания

полифенолов и гуматов, а также гель-фильтрацию или обессоливание для удаления мелких ингибиторов; эти меры существенно повышают воспроизводимость посевов и ПЦР-контролей. Следует учитывать, что гуминовые кислоты способны нарушать как вирусную адсорбцию на фильтрах, так и ферментативные реакции, поэтому тесты на остаточные ингибиторы желательны после каждой стадии очистки [17–20].

Концентрацию фагов повышают ультрацентрифугированием ($\approx 100\ 000\ g$, 60–120 мин) или осаждением ПЭГ-8000 (8–10% с 1 M NaCl, 4°C, 8–16 ч) с последующим мягким ресуспендированием осадка [11, 21].

Важно помнить, что ключевыми технологическими нюансами являются: 1) поддержание pH 7,2–7,6 и присутствие Mg^{2+}/Ca^{2+} , что в значительной степени позволяет стабилизировать вирионы и улучшить адсорбцию на клетках-хозяевах; 2) минимизирование циклов замораживание-оттаивание для долгосрочного хранения с использованием температуры $-80^\circ C$ и криопротектора (глицерин 10–20%) и/или лиофилизации; 3) проверки отсутствия токсичности матрицы для *Mycobacterium smegmatis* mc² 155 и целевых НТМ сериями разведений экстрактов; 4) ведение «полевых» и лабораторных отрицательных/положительных контролей через всю цепочку; (v) фиксирование отклонения (температура, транспорт, состав буферов) для трассируемости [12, 22–24].

После очистки экстрактов фагов приступают к первичному скринингу методом двойных агаровых слоёв, который по-прежнему остаётся «золотым стандартом» количественной оценки инфекционной активности, но параллельно рекомендуется проводить точечные тесты на газонах целевых культур и краткое обогащение на *M. smegmatis* mc² 155 или других хозяевах для повышения вероятности выделения фагов в низком титре. Хранение «материнских» образцов осуществляют при температуре +4°C (краткосрочно) и в замороженном виде (долгосрочно) с немедленной каталогизацией, включающей в себя такие сведения как идентификационный номер, источник, дата, условия подготовки, предполагаемый спектр хозяев, первичные результаты, что в значительной степени повышает воспроизводимость и управляемость коллекции [11, 25, 26].

Для повышения доли активных фагов, специфичных к выбранному хозяину (обычно используется *M. smegmatis* mc² 155 как быстрорастущий и безопасный «рабочий» штамм), до уровней, позволяющих надёжное выявление на питательных средах, используют методы обогащения. Выбор хозяина зависит от последующих задач: для широкого поиска используют *M. smeg-*

matris; для прикладных целей — клинические изоляты НТМ. Важно стандартизовать оптическую плотность инокулята (ОП при 600 нм 0,4–0,6) и соотношение «материал: культура» (например, 1:1–1:5 по объёму) при температуре 37°C с аэрацией. Эти подходы рекомендованы в базовых методических руководствах и протоколах фагового поиска [11, 12, 25, 27].

При обогащении целесообразно подавлять сопутствующую бактериальную флору бета-лактаминами антибиотиками (например, ампициллин) в концентрациях, не влияющих на рост микобактерий, поскольку большинство микобактерий естественно устойчивы к этим препаратам. Продолжительность инкубации 18–48 ч; по завершении проводят удаление клеток центрифугированием и фильтрацией 0,22 мкм с последующим хранением лизата при +4°C (краткосрочно) или заморозкой с добавлением криопротектора. Для корректной интерпретации результата обязательны контроли «без добавления культуры» и «без добавления материалов» [12, 25, 28].

Для первичного скрининга используют модифицированный метод Грация — агаровых слоёв (двойных агаровых слоёв; DLA; *англ.* double-layer agar). После адсорбции в течение 15–30 мин при комнатной температуре смесь вносят в предварительно расплавленный и охлаждённый верхний мягкий агар (0,6–0,7%) на основе бульона Middlebrook 7H9 и разливают на чашки с базовой средой (например, 7H10). Инкубация проводится при температуре 37°C в течение 24–48 ч, при этом подтверждением активности является наличие прозрачных зон лизиса. Детальные параметры приготовления сред и температурно-временные режимы приводятся в классических руководствах по методу Грация и в современных учебных протоколах по фаговому поиску [11, 25, 29].

«Клонирование» фага, т. е. получение его клональной линии, достигают последовательным переносом одиночных бляшек минимум трижды в методе агаровых слоёв с использованием того же хозяина с обязательной сменой инстументария и параллельными контрольными посевами, что снижает риск «смешанных» лизатов и повышает воспроизводимость дальнейших испытаний. Практика многократного пассажа одиночных бляшек и каталогизации клонов закреплена в работах по разнообразию и эволюции микобактериофагов [25, 30, 31].

Подсчёт титра выполняют по чашкам с 30–300 бляшками с учётом разведения и объёма посева. При необходимости масштабирования скрининга используют метод «спот-теста» (капельного нанесения, *spot-test*) для ускорения ориентировочных оценок [11, 29].

Оценку спектра хозяев и предварительную «картину» эффективности бляшкообразования

проводят на панели штаммов с *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium avium* complex, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium abscessus* и другими, используя спот-тесты или метод агаровых слоёв. Для количественной сопоставимости применяют показатель эффективности бляшкообразования (ЭБ, *англ.* efficiency of plating, EOP), рассчитывая отношение титра на тестируемом штамме к титру на исходном штамме-хозяине; что помогает подбирать комплементарные фаги в будущие коктейли [28, 32].

Получение рабочих фаголизатов в высоком титре возможно двумя способами: 1) экстрагирование фага из верхнего агарового слоя, содержащего бляшки, буферным раствором и 2) культивирование в жидкой питательной среде, т. е. внесение небольшого объёма клонового фага к культуре хозяина в *log*-фазе до полного лизиса. Выбор пути получения рабочих фаголизатов зависит от требуемого объёма, чистоты и дальнейших целей (морфология, геномика, биотесты) [12, 21, 25].

Контроль чистоты клонов включает проведение повторных «спот-тестов» на альтернативных хозяевах, проверку стабильности морфотипа бляшек и, при необходимости, проведение молекулярно-генетических исследований. Для микобактериофагов такие подходы использовались в крупных коллекциях, что позволило выявить «сцепленные» клоны и исключить примеси до этапа секвенирования [28, 29].

Морфология и базовая биология микобактериофагов

Надо сказать, что большинство известных микобактериофагов имеют икосаэдрическую головку (≈ 50 – 70 нм) и длинный несокращающийся хвост (≈ 150 – 300 нм), что хорошо видно при просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ или трансмиссионной электронной микроскопии, *англ.* TEM, transmission electron microscopy) с негативным контрастированием. Эти признаки согласуются с наблюдаемой геномной мозаичностью и кластеризацией фагов, выявленной в больших коллекциях микобактериофагов. ПЭМ остаётся рутинным методом первичной типизации, позволяя также оценивать целостность вирионов и доминирующий морфотип в препарате [30, 31].

Методика ПЭМ требует соблюдения тонкостей пробоподготовки — это подложки, толщина углеродной плёнки, время контакта с контрастом, поскольку типичные артефакты, такие как деформации хвостов и головок, агрегация частиц могут приводить к ошибочной интерпретации морфотипа и размеров. Классические обзоры по электронной морфологии бактериофагов описывают эти эффекты и рекомендуют стандарты съёмки и измерений [33].

Инфекционный цикл начинается с адсорбции вириона на специфических рецепторах клетки-хозяина, за которой следуют проникновение генетического материала и транскрипционно-трансляционный захват метаболизма клетки. В этой связи для микобактерий, обладающих сложной клеточной стенкой с миколоевой оболочкой, важны ионные условия среды (Mg^{2+}/Ca^{2+}) и температурный режим; они влияют на скорость адсорбции и эффективность последующих стадий инфекции, что необходимо учитывать при постановке опытов [11, 23, 28].

Классический одношаговый опыт роста (ООР, *англ.* one-step growth) бактериофага позволяет определить латентный период, время выхода, урожайность — количество вирионов на клетку и константу адсорбции. Эти параметры зависят от конкретной пары фаг-хозяин и условий инкубации и могут варьировать в широких пределах; именно поэтому их измеряют индивидуально для каждого клонового фага перед включением в коктейли или разработкой диагностических тестов. Последовательное соблюдение методики и статистически достаточное число повторов критичны для сопоставимости данных между лабораториями [11, 28].

Оптимальная кратность заражения (МОИ; *англ.* MOI, multiplicity of infection) зависит от цели эксперимента: при слишком высоких значениях возможен «лизис без размножения», т. е. разрушение клетки при множественной атаке, тогда как слишком низкие значения удлиняют время до лизиса и искажают оценку параметров роста. Практические руководства рекомендуют подбирать МОИ эмпирически, ориентируясь на воспроизводимость титров и форму бляшек при одинаковых условиях посева [28, 30].

Стабильность вирионов определяют стресс-тестами температуры, pH и многократного замораживания–оттаивания. И как отмечалось ранее, добавление двухвалентных ионов, белковых стабилизаторов и поддержание нейтрального pH обычно повышает сохранность активных частиц. Оценка стабильности важна как для планирования хранения коллекции, так и для выбора условий, в которых проводят биотесты, морфологию и экстракцию нуклеиновых кислот [11, 12].

Наконец, геномная мозаичность микобактериофагов и наблюдаемое непрерывное распределение генетического сходства объясняют, почему морфологически схожие фаги могут демонстрировать различный биологический профиль (спектр хозяев, скорость роста) и наоборот. Это подчёркивает необходимость сочетать морфологическую оценку с геномным анализом и стандартными биологическими испытаниями при отборе фагов для диагностики и терапии [30, 31].

Генетическая характеристика: выделение ДНК, секвенирование, аннотирование генома

Цель генетической характеристики — получить высококачественную ДНК фага, собрать корректный геном, в идеале — в виде одного контига, и провести аннотирование с обязательной идентификацией генов, связанных с лизогенией, токсичностью и антибиотикорезистентностью. Для выделения ДНК из очищенных лизатов применяют обработку ДНКазой и РНКазой для удаления свободных нуклеиновых кислот с последующим лизисом капсида с помощью протеиназы K, SDS и экстракцией фенол-хлороформом или колоночными наборами. Качество и количество выделенной ДНК контролируют по A260/A280, гель-электрофорезу и методом флуориметрии (Qubit) [25, 34].

Выбор платформы секвенирования зависит от сложности генома и цели анализа: короткие чтения секвенаторов второго поколения (Illumina или MGI) обеспечивают высокую точность, тогда как длинные чтения третьего поколения (Oxford Nanopore или PacBio) помогают разрешать повторы, определять концы генома, выявлять тенденцию к циркуляризации генома, определять наличие модифицированных нуклеотидов. Гибридные сборки геномов из данных секвенирования второго и третьего поколения часто дают наилучший результат. Для сборки рекомендуются такие программы ассемблеры как SPAdes (короткие чтения), Unicycler (гибридная сборка) и Flye (длинные чтения). Определение концов генома и стратегии упаковки фаговой ДНК (кос-сайты, терминальные повторы, кольцевая пермутация) выполняют специализированными инструментами, такими как PhageTerm [35–38].

Аннотирование открытых рамок считывания проводят в автоматическом режиме с использованием таких инструментов, как PharoKka с последующим визуальным контролем полученного результата. При работе с микобактериофагами полезны также экосистемы SEA-PHAGES, PECAAN или Phamerator, однако ключевой остаётся обязательная ручная проверка критически важных генов [39–42].

Скрининг на нежелательные функции включает поиск генов интеграз, таких как тирозин или серин-рекомбиназы, репрессоров лизогении и любых детерминант вирулентности и антибиотикорезистентности. Для последних применяют базы CARD и ResFinder; при наличии подобных последовательностей кандидатные штаммы бактериофагов исключают для дальнейшего терапевтического применения либо возвращают на этап инженерии для делеции соответствующих локусов [43, 44].

Контроль качества сборки и отсутствия контаминации проводят путём мапирования исходных чтений на контиги, оценки равномерности покрытия и метрик качества, а для метагеномных изолятов — с помощью пакета CheckV, подразумевающего оценку полноты и контаминации вирусных сборок [45].

Целенаправленная модификация микобактериофагов

Большая доля обнаруженных микобактериофагов относится к умеренным, что ограничивает их прямое терапевтическое применение: интеграция в геном хозяина и поддержание лизогенного состояния противоречат задачам эрадикации возбудителя. Поэтому первоочередной генноинженерной целью часто выступает перевод таких фагов в строго литическое состояние путём удаления генов интегразы и/или ключевых регуляторов лизогении. Наблюдаемая геномная мозаичность и разнообразие кассет интеграции требуют предварительной тщательной аннотации и верификации целевых локусов [22, 30].

Технологически для микобактериофагов хорошо зарекомендовал себя метод BRED (*англ.* Bacteriophage Recombineering of Electroporated DNA): одновременная электропорация геномной ДНК фага и линейного донорного фрагмента (≈ 300 – 500 п. н.) с гомологичными фланкирующими последовательностями в клетки *M. smegmatis*, экспрессирующие рекомбиназный аппарат фага Che9c (gp60/gp61). После одной итерации возможно получение некоторого количества мутантных бляшек, а целевые замены подтверждают сиквенс-специфической ПЦР и секвенированием [46].

Стратегия удаления интеграз включает точечную делецию всей открытой рамки считывания интегразы и, при необходимости, прилегающих сайтов attP и регуляторных последовательностей, чтобы исключить восстановление функции. После редактирования проверяют 1) отсутствие способности формировать стабильные лизогены на стандартных хозяевах, 2) сохранение литического профиля и 3) отсутствие побочных мутаций по данным полногеномного секвенирования. В клинически ориентированных работах продемонстрировано, что конвертированные в литическое состояние фаги, в том числе полученные на основе умеренных предшественников, могут применяться у пациентов и сопровождаться благоприятными исходами, при этом кассеты интеграз или репрессоров транскрипции удалялись или нарушались целенаправленно [7, 13].

Для повышения доли нужных клонов возможно использование контр-селекции с помощью

систем CRISPR-Cas (направление спейсеров на локус дикого типа), что устраняет неотредактированные варианты и оставляет клоны с делецией. Подходы CRISPR-ассоциированного отбора показали эффективность в инженерии различных ДНК-фагов и могут быть адаптированы к микобактериофагам [47].

Валидация инженерного препарата включает: фенотипический ряд — это морфотип бляшек, ООР, ЭБ на панели штаммов; молекулярную проверку — это ПЦР-скрининг, отсутствие интеграции в геном хозяина; полногеномное секвенирование для подтверждения целевой делеции и исключения off-target-эффектов (непреднамеренного изменения генома), а также стартовые показатели стабильности в стандартных буферах. Эти шаги минимизируют риски потери активности и её спектра, а также ускоряют последующие этапы разработки диагностических и терапевтических препаратов [11, 34].

От лаборатории к препарату: контроль качества и биобезопасность

Переход от лабораторного образца к препарату требует одновременного доказательства микробиологической чистоты, генетической безопасности, технологичности с воспроизводимым титром и стабильностью, а также формализацией спецификации и процедуры контроля, сопоставимых с практикой для биологических лекарственных средств. В качестве каркаса целесообразно использовать подход на основе набора критичных показателей качества (КПК, *англ.* Critical Quality Attributes, CQAs) и критичных параметров процесса (КПП, *англ.* Critical Process Parameters, CPPs) с их верификацией на выпуске серии и в программе стабильности; перечень испытаний и предельные значения фиксируются в спецификациях. Для фагов это включает: подлинность (геном, морфология), активность (титр), чистоту (стерильность, остаточные примеси), пирогенность (эндотоксина), физико-химические параметры и стабильность. Эти требования встраиваются в общие рамки спецификаций для биопродуктов, предложенных международными документами, и не противоречат сложившейся практике контроля биологических препаратов [48].

Испытания на стерильность проводят для всех парентеральных, ингаляционных и инстилляционных форм, применяя посеvy на аэробные и анаэробные среды с не менее чем 14-суточной инкубацией и обязательной валидацией нейтрализации возможного антимикробного эффекта вспомогательных веществ; параллельно ведут входной контроль вспомогательных веществ и мониторинг биоагрузки в производственных зонах.

Условия асептических операций, такие как фильтрация 0,22 мкм, наполнение, укупорка, и система контроля окружающей среды должны быть описаны в технологическом регламенте [49].

Содержание бактериальных эндотоксинов как правило определяют ЛАЛ тестом (англ. LAL, Limulus Amebocyte Lysate) или рекомбинантным аналогом (rFC) с расчётом предельных значений в зависимости от пути введения и дозы. На этапе очистки для уменьшения пирогенной нагрузки применяют комбинации глубинной и мембранной фильтрации, диафильтрации, ионообменной хроматографии, осаждения ПЭГ с последующей отмывкой [50].

Контроль остаточных примесей и продуктов хозяина критичен для фагов, выращенных на *Mycobacterium* spp.: количественно оценивают остаточные белки и ДНК (флуориметрия/qPCR, BCA/ELISA), а при необходимости — клеточные компоненты микобактерий, например, липоарабиноманнан и следы питательных сред. Предельные значения задают в спецификациях в расчёте на дозу или объём. Практические схемы мелкосерийной и «клинической» подготовки фаговых коктейлей подчёркивают важность каскадной фильтрации и многоступенчатой отмывки для минимизации примесей [51].

Генетическая безопасность подтверждается полногеномным секвенированием или специфической ПЦР серии с сопоставлением эталонному геному и скринингом генов, связанных с лизогенией (интегразы и репрессоры), вирулентностью и антибиотикорезистентностью [34, 42, 43].

Активность оценивают по титру (БОЕ/мл, бляшкообразующие единицы на мл) методом агаровых слоёв с чётким указанием штамма-хозяина и условий инкубации; для диагностических репортерных фагов дополнительно фиксируют характеристики сигнала (интенсивность и порог детекции), а для терапевтических — воспроизводимость ЭБ на панели клинически релевантных штаммов. Для всех испытаний задают критерии приемлемости и статистические параметры воспроизводимости [11, 28].

Программа стабильности включает долговременные, ускоренные и стресс-исследования (температура, свет, циклы замораживания–оттаивания) с мониторингом титра, чистоты, pH и внешнего вида. Для повышения стабильности фагов необходимо подбирать буфер, например, SM-буфер, стабилизирующие добавки, такие как Mg^{2+} и Ca^{2+} , сахара, белки и тару стеклянную или полимерную с учётом адсорбции вирионов. Структура программы и критерии интерпретации соответствуют руководствам по стабильности биологических и биотехнологических продуктов [47, 52].

Основные производственные операции: фильтрацию, смешивание, фасовку, укупорку про-

водят в контролируемых зонах, применяя управление рисками контаминации, квалификацию оборудования и валидацию очисток [53].

Документация и прослеживаемость охватывают маршрут сырья и материалов, протоколы производства, валидации и контроля, спецификации и сертификаты анализа, отчёты по отклонениям/изменениям, записи мониторинга окружающей среды и программы стабильности. Для «магистрального» (индивидуального) изготовления фаговых препаратов в европейской практике предложены отдельные требования к досье и прослеживаемости продукции на уровне магистрального производства [54].

Применение в диагностике: репортерные фаги и фенотипические тесты жизнеспособности

Фаговые диагностические подходы принципиально оценивают жизнеспособность бактерий, так как бактериофаги реплицируются только в живых клетках, что позволяет отличать активную инфекцию от остаточной ДНК и использовать такие тесты для мониторинга эффективности терапии. К двум основным стратегиям относятся методы: 1) прямой оценки нарастания титра фага (НТФ), определяющие потомство фага после заражения образца, и 2) опосредованной оценки НТФ (например ActiPhage, Великобритания), когда после лизиса фагом выявляют высвобожденную ДНК в количественной ПЦР. По сравнению с культуральной диагностикой такие методы существенно сокращают время до получения результата — вплоть до 24–48 ч для НТФ и 6–8 ч для НТФ-ПЦР [55].

Репортерные микобактериофаги доставляют в клетку маркерные гены — люциферазу, флуоресцентные белки и позволяют регистрировать инфекцию по световому сигналу без ожидания образования бляшек. Этот класс методов показал возможность прямой визуализации *M. tuberculosis* в обработанной мокроте и получения фенотипических профилей чувствительности за часы–сутки с использованием флуоресцентной микроскопии и проточной цитометрии. Публикации с «флуоромикобактериофагами» (GFP/ZsYellow/mCherry) подтвердили применимость для быстрой оценки лекарственной устойчивости и мониторинга бактерицидного эффекта [56, 57].

Прорывом этого подхода стали люциферазные репортёры с высокой чувствительностью и динамическим диапазоном, например, NanoLuc, позволяющие получать фенотипические данные по чувствительности *M. tuberculosis* к ключевым противотуберкулёзным препаратам в формате 24–48 ч с количественной интерпретацией сигнала. Такие

конструкции, как TM4-Nluc и другие, демонстрируют хорошую согласованность с референсными методами и открывают возможность миниатюризации с помощью мульти-луночных форматов для скрининга [58].

Для нетуберкулёзных микобактерий (НТМ) репортерные фаги также известны. Недавно было показано, что конструкция TM4: GeNL (Green enhanced NanoLuc) позволяет проводить фенотипическое тестирование чувствительности *Mycobacterium abscessus* complex (MAC) к ряду препаратов, включая выявление индуцируемой макролидной резистентности erm (41), за 48 ч с высокой конкурентностью с методом серийных разведений в жидкой среде [59].

Выбор и подготовка образца критически влияют на чувствительность и специфичность фаговых тестов, так как этапы деконтаминации, например, NALC-NaOH для мокроты, и длительное хранение снижают жизнеспособность микобактерий и могут угнетать инфекцию фагом, именно поэтому протоколы предусматривают мягкие режимы обработки, применение нейтрализаторов и использование положительных или отрицательных контролей на каждом шаге. В обзорах по НФТ подчёркивается необходимость валидации на конкретных матрицах, будь то мокрота, молоко или кровь, а также подтверждающей ПЦР на бляшках или лизатах для исключения ложноположительных результатов [55].

В свою очередь, НФТ продемонстрировали нестабильную чувствительность на клинических пробах при высокой специфичности, что можно связать с влиянием матрицы и деактивацией фага в реальных условиях, это требует строгого обеспечения качества, а именно сопровождения контрольными линиями, оценкой стабильности реагентов, обучением персонала и стандартизацией логистики образцов. Клинические оценки показали потенциал метода для быстрой детекции жизнеспособных микобактерий, но также выявили уязвимости к «внелабораторным» факторам (транспорт, хранение, перекрёстная контаминация) [60].

Несмотря на ограниченную доступность коммерческих наборов, накоплен опыт внедрения подходов с использованием бактериофагов в лабораторные алгоритмы для *M. tuberculosis* и нетуберкулёзных микобактерий (НТМ) как дополнения к молекулярной детекции с помощью ПЦР или амплификации нуклеиновых кислот, для уточнения их жизнеспособности и фенотипической чувствительности. Современные обзоры по диагностике НТМ подчёркивают нишу фаг-опосредованных тестов как быстрых фенотипических дополнений, особенно при мониторинге раннего эффекта терапии и при сложных случаях с низкой бактериальной нагрузкой [61].

Терапевтическое применение микобактериофагов: клинические стратегии, дозирование и мониторинг

Терапевтическое применение микобактериофагов строится на персонализированном подборе активных фагов к клиническому изоляту, подтверждении безопасности и качества препарата и продуманной схеме введения с учётом локализации инфекции, бактериальной нагрузки и сопутствующей терапии. В опубликованных клинических наблюдениях у пациентов с рефрактерными микобактериальными инфекциями, включая инфекции, вызванные НТМ, показана потенциальная клиническая польза фагов при приемлемом профиле безопасности, что поддерживает дальнейшую разработку стандартизованных алгоритмов подбора и применения [7, 8, 62].

Базовый клинический алгоритм включает: 1) выделение и идентификацию клинического штамма; 2) фенотипический подбор фагов по ЭБ и тестам подавления роста и времени до лизиса в жидкой питательной среде; 3) оценку синергии с ключевыми антибиотиками в условиях, приближённых к клиническим; 4) проверку отсутствия интеграз и других нежелательных генов и сопоставление генома серии фаговой продукции с эталоном; 5) выпуск серии по спецификации (стерильность, эндотоксины, примеси, титр); 6) разработку схемы введения и мониторинг терапевтического ответа с помощью клинических, микробиологических и инструментальных методов. Такой подход соответствует современным принципам персонализированной фаготерапии и общепринятому уровню качества современных биологических препаратов [11, 28, 48, 63].

Выбор пути введения определяется локализацией процесса, так при поражении дыхательных путей и лёгких целесообразны ингаляционные или небулайзерные формы с целью доставки к дистальным отделам респираторного тракта и использования потенциала воздействия на биоплёнку, в то время как при диссеминированном течении показаны внутривенные инфузии; а при поверхностных очагах допустимы местные аппликации или инстилляции. Практика комбинированного введения, например, комбинация ингаляций и внутривенных инфузий, используется для повышения экспозиции в труднодоступных очагах и уменьшения вероятности локального «провала» из-за иммунной нейтрализации. Публикации по доставке фагов к дыхательным путям и клинические отчёты по внутривенному применению обосновывают целесообразность этих стратегий, но при соблюдении требований к качеству и биобезопасности [8, 63, 64].

Дозу подбирают эмпирически, исходя из титра препарата (БОЕ/мл), ожидаемой бактериальной нагрузки и пути введения, с прицелом на достижение эффективной МОИ в очаге. Внутривенные схемы часто используют ежедневные или через день инфузии в течение недель или месяцев, ингаляционные — с кратностью 1–2 раза в день курсами; титр препаратов для клинического применения, как правило, составляет $\geq 10^8$ – 10^9 БОЕ/мл. На выбор режима применения влияют переносимость, развитие нейтрализующих антител и динамика клинических показателей. Принципы «фармакологии фагов», а это — продолжительность, дозировка, частота применения, хорошо описаны в обозреваемой литературе [8, 65, 66].

Комбинирование с антибиотиками преследует две цели: 1) повышение бактерицидного эффекта, включая фаг–антибиотик–синергию (ФАС, *англ.* phage antibiotic synergy, PAS), и 2) сдерживание возникновения фагорезистентности. Подбор антибиотиков ведётся с учётом фенотипической чувствительности клинического штамма и механистической совместимости с фагом, при этом избегают комбинаций, угнетающих адсорбцию или вход фага. Для микобактерий также показаны перспективные комбинации с макролидами, аминогликозидами, бета-лактамами, особенно для быстрорастущих НТМ, при этом эффект оценивают в жидкофазных системах по снижению времени до лизиса или площади под кривой роста. Концепция ФАС и данные по другим бактериальным моделям поддерживают рациональность таких сочетаний [26, 32, 67, 68].

Управление фагорезистентностью достигается использованием коктейлей из 2–5 фагов с перекрывающимися рецепторами и механизмами фаговой инфекции, а также чередованием или адаптивной заменой компонентов по результатам мониторинга. Критерии подбора включают оценку эффективности бляшкообразования на клиническом штамме, различие в морфотипах бляшек или кинетике роста и отсутствие перекрёстной интерференции. Последовательная замена или добавление фагов по результатам микробиологического контроля и секвенирования штамма позволяет продлевать эффективность при длительной терапии. Эти принципы обоснованы как экспериментально, так и клинической практикой персонализированной фаготерапии [7, 8, 31, 62].

Иммунологические аспекты включают возможную нейтрализацию фагов антителами и активацию врождённых механизмов. Нейтрализующие антитела чаще появляются при длительном внутривенном введении и могут снижать экспозицию активных вирионов; смягчить эффект, помогают с выбором альтернативного пути, например ингаляционного или местного, а также с увеличением кратности или дозы или же заменой

на антигенно-дивергентные фаги. Наблюдения у пациентов и экспериментальные данные подтверждают значимость иммунных взаимодействий и необходимость их мониторинга [8, 69].

Мониторинг эффективности включает клиническую динамику, визуализацию с применением компьютерной томографии или магнитно-резонансной терапии (КТ/МРТ) при соответствующих локализациях, количественные посевы или ПЦР с оценкой жизнеспособности, а также фенотипические тесты с «родным» штаммом с изменением ЭБ и появлением резистентности. Для безопасности фиксируют нежелательные явления, в том числе системные реакции, локальные события, с указанием связи с введением фага или сопутствующей терапией. Стандартизованные формы наблюдения и отчётности повышают сопоставимость результатов между центрами [8, 48].

Доступ к терапии в настоящее время чаще реализуется в рамках индивидуальных назначений или программ расширенного доступа при отсутствии зарегистрированных продуктов; отбор пациентов, информированное согласие, оценка соотношения риск/польза и документирование качества препарата критичны для этической и юридической состоятельности вмешательства. Европейские и национальные рамочные документы по «магистральному» изготовлению фагов и спецификациям биопродуктов задают ориентиры для таких программ [48, 54].

Заключение

Проблема туберкулёза и нетуберкулёзных микобактериозов на фоне нарастающей антибиотикорезистентности поддерживает высокий запрос на технологии, способные обеспечивать как быструю верификацию жизнеспособности возбудителя, так и адресное терапевтическое воздействие. Микобактериофаги отвечают обоим задачам: они избирательно размножаются в живых клетках и могут быть трансформированы в стандартизованный препарат с предсказуемыми характеристиками. Наличие доказательств по глобальной эпидемиологии и ограниченной эффективности существующих схем лечения усиливает практическую значимость фаговой платформы [1–6].

Методологическая база поиска и выделения нативных микобактериофагов уже устоялась: определены приоритетные источники, оптимизированы процедуры пробоподготовки, удаления матричных ингибиторов и концентрации, а также стандартизованы первичный скрининг и клонирование. Рутинное применение методов агаровых слоёв, спот-тестов, панельной оценки ЭБ, молекулярно-генетической характеристике обеспечивает сопоставимость результатов между лабора-

ториями и ускоряет переход к прикладной медицине [11–13, 17–22, 25, 26, 30–34].

Диагностические фаг-опосредованные методы демонстрируют главное преимущество — оценку жизнеспособности бактерий. Репортерные фаги (люциферазные и флуоресцентные конструкции) и НТФ подходы существенно сокращают время до результата по сравнению с культуральной диагностикой и дополняют молекулярные тесты, уточняя фенотипическую чувствительность. Решающее значение имеет грамотная работа с образцом и валидация на конкретных типах образцов (мокрота, кровь, молоко), что показано в ряде исследований [9, 10, 55–60, 70, 71].

Терапевтическое применение строится на персонализированном подборе активных фагов и подтверждении качества и безопасности серии. Опыт расширенного доступа («compassionate use») указывает на приемлемую безопасность и потенциальную клиническую пользу при рефрактерных микобактериальных инфекциях, тогда как вариабельность эффекта связана с иммунной нейтрализацией, формированием фагорезистентности, сложной локализацией очагов и фармакокинетическими ограничениями. На практике востребованы комбинированные режимы (фаги + антибиотики) и коктейли из нескольких фагов с непрекрывающимися мишенями, а также рациональные пути доставки, такие как: ингаляционные, внутривенные или местные, под мониторингом эффективности и безопасности [7, 8, 26, 32, 62–69].

Генная инженерия позволяет переводить умеренные фаги в строго литические формы за счёт целенаправленного удаления интеграз и других детерминант лизогении. Методика BRED в сочетании с последующим полногеномным секвенированием и функциональной валидацией обеспечивает управляемость модификаций и прослеживаемость безопасности. Скрининг по базам генов устойчивости к антибиотикам и вирулентности остаётся обязательным фильтром перед включением в терапевтический пул [13, 47, 48, 45, 46].

Производственный контур и выпуск серии опираются на уже существующие рамки для биологических препаратов: спецификации по подлин-

ности, активности, чистоте и стабильности, программы стабильности, фармакопейные испытания стерильности и эндотоксинов, требования к асептическому производству и документации. Развитие «магистральных» подходов в Европе показывает реализуемость централизованной системы качества и прослеживаемости для индивидуально подбираемых фаговых препаратов [48–54].

Ключевые направления дальнейших работ включают: многоцентровые клинические исследования с унифицированными критериями оценки эффективности и безопасности терапии; развитие фармакологии фагов (связанной с путём введения, дозировкой и частотой); стратегии преодоления биоплёночных и тканевых барьеров (в т. ч. ингаляционная доставка к дистальным отделам дыхательных путей); мониторинг и управление иммунной нейтрализацией; масштабируемое производство и быстрые методы выпускного контроля; инженерные подходы к расширению спектра хозяев (модули связывания рецепторов) и повышению стабильности. В диагностике приоритетны миниатюризация и перенос в формат диагностики на месте события и полевых тестов (*англ.* point-of-care, POC) с соблюдением требований к контролю качества и валидации [48, 58, 64, 69].

В итоге микобактериофаги формируют целостную платформу «от образца до пациента», объединяющую быстрые фенотипические тесты и персонализированную терапию. При последовательном соблюдении стандартов качества и накоплении клинических данных у этого направления есть потенциал перейти из разряда «альтернативной» к интегрированной составляющей диагностики и лечения микобактериозов [3, 8, 48].

Дополнительная информация

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации в части проведения прикладной НИР по теме «Разработка тест-систем для скрининговой ПЦР-диагностики, мониторинга течения микобактериозов и видовой ПЦР-идентификации микобактерий».

Литература/References

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2024. Geneva: WHO; 2024.
2. Estaji F, Kamali A, Keikha M. Strengthening the global response to tuberculosis: insights from the 2024 WHO global TB report. *J Clin Tuberc Other Mycobact Dis.* 2025; 39: 100522. doi: 10.1016/j.jctube.2025.100522.
3. Murray C. J. L., Ikuta K. S., Sharara F et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet.* 2022; 399 (10325): 629–655. doi: 10.1016/S0140-6736 (21)02724-0.
4. Prevots D. R., Marras J. E., Wagner D., Morimoto K. Global epidemiology of nontuberculous mycobacterial pulmonary disease: a review. *Clin Chest Med.* 2023; 44 (4): 675–721. doi: 10.1016/j.ccm.2023.08.012.
5. Harada K. et al. Trends in nontuberculous mycobacterial disease mortality worldwide, 2000–2022. *Int J Infect Dis.* 2025; [Epub ahead of print].
6. Daley C. L., Iaccarino J. M., Lange C., Cambau E., Wallace Jr. R. J., Andrejka C. et al. Treatment of nontuberculous mycobacterial pulmonary disease: an official ATS/ERS/ESCMID/IDSA guideline. *Clin Infect Dis.* 2020; 71 (4): e1–e36. doi: 10.1093/cid/ciaa241.
7. Dedrick R. M., Guerrero-Bustamante C., Garland R. A., Russell D., Ford K., Harris K. et al. Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant Mycobacterium abscessus infection. *Nat Med.* 2019; 25 (5): 730–733. doi: 10.1038/s41591-019-0437-z.
8. Dedrick R. M., Smith B. E., Cristinziano M., Freeman K. G., Jacobs-Sera D., Belessis Y. et al. Phage therapy of Mycobacterium infections: compassionate use of phages in 20 patients with drug-resistant mycobacterial disease. *Clin Infect Dis.* 2023; 76 (1): 103–112. doi: 10.1093/cid/ciac453.
9. Banaiee N., Bobadilla-del-Valle M., Riska P. F., Small P. M., Ponce-De-Leon A., Jacobs Jr. W. R. et al. Luciferase reporter mycobacteriophages

- for detection, identification, and antibiotic susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 2001; 39 (11): 3883–3888. doi: 10.1128/JCM.39.11.3883-3888.2001.
10. Mayer O., Jain P., Weisbrod T. R., Biro D., Ho L., Jacobs-Sera D. et al. Fluorescent reporter D56A mycobacteriophages reveal unique variations in infectibility and phage production in mycobacteria. J Bacteriol. 2016; 198 (23): 3220–3232. doi: 10.1128/JB.00592-16.
 11. Kropinski A. M., Mazzocco A., Waddell T. E., Lingohr E., Johnson R. P. Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay. Methods Mol Biol. 2009; 501: 69–76. doi: 10.1007/978-1-60327-164-6_7.
 12. Clokie M. R. J., Kropinski A. M. eds. Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions. New York: Humana Press; 2009.
 13. Göller P. C., Haro-Moreno J. M., Rodriguez-Valera F., Loessner M. J., Gomez-Sanz E. Uncovering a hidden diversity: optimized protocols for extraction of dsDNA bacteriophages from soil. Sci Rep. 2020; 8 (1): 17. doi: 10.1186/s40168-020-0795-2.
 14. World Health Organization. Laboratory biosafety manual, 4th ed. Geneva: WHO; 2020.
 15. CDC/NIH. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL), 6th ed. 2020.
 16. Monpoeo S., Maul A., Mignotte-Cadiergues B., Schwartzbrod L., Billaudel S., Ferre V. Best viral elution method for enteroviruses from sludge. Appl Environ Microbiol. 2001; 67 (6): 2484–2488. doi: 10.1128/AEM.67.6.2484-2488.2001.
 17. Hill V. R., Narayanan J., Gallen R. R., Ferdinand K., Cromeans T., Vinje J. Simultaneous recovery of DNA/RNA from diverse microbes. Pathogens. 2015; 4 (2): 335–351. doi: 10.3390/pathogens4020335.
 18. Schriewer A., Wehlmann A., Wuertz S. Removing humic acids with DAX-8 improves qPCR. J Microbiol Methods. 2011; 85 (1): 16–21. doi: 10.1016/j.mimet.2010.12.027.
 19. Hata A., Kitajima M., Katayama H. Resin + gel filtration to mitigate inhibitors in virus quantification. Water Res. 2020; 173: 115536. doi: 10.1016/j.watres.2020.115536.
 20. Guttman-Bass N., Catalano-Sherman J., Klein B. S. Humic acid interference with virus recovery by membrane filtration. Appl Environ Microbiol. 1986; 51 (5): 883–885.
 21. Bonilla N., Rojas M. I., Cruz G. N. F., Hung S.-H., Rohwer F., Barr J. J. Phage on tap — quick and efficient preparation of high-titer stocks. PeerJ. 2016; 4: e2261. doi: 10.7717/peerj.2261.
 22. Hatfull G. F. Mycobacteriophages. Microbiol Spectr. 2018; 6 (5). doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0026-2018.
 23. Yang Y., Shen W., Zhong Q., Chen Q. Essential role of calcium in infection by a broad-host-range phage. J Basic Microbiol. 2013; 53 (7): 1–9. doi: 10.1002/jobm.201300051.
 24. Ahmed E. et al. Geochemical constraints on bacteriophage infectivity. bioRxiv. 2023; preprint 2023.04.10.536276.
 25. SEA-PHAGES Program. Phage Discovery Guide. 5th ed. HHMI; 2020. Available at: <https://seaphages.org/content/phoenix/>.
 26. Stachurska X., Roszak M., Jabłońska J., Mizielińska M., Nawrotek P. Dounle-layer Agar (DLA) modifications for phage-antibiotic synergy identification. Antibiotics (Basel). 2021; 10 (11): 1306. doi: 10.3390/antibiotics10111306.
 27. Adams M. H. Bacteriophages. New York: Interscience Publishers; 1959.
 28. Hyman P., Abedon S. T. Practical methods for determining phage growth parameters. Methods Mol Biol. 2009; 501: 175–202. doi: 10.1007/978-1-60327-164-6_18.
 29. Kutter E., Sulakvelidze A. (eds). Bacteriophages: Biology and Applications. Boca Raton (FL): CRC Press; 2005.
 30. Pope W. H., Bouman C. A., Russell D. A., Jacobs-Sera D., Asai D. J., Cresawn S. G. et al. Whole genome comparison of a large collection of mycobacteriophages reveals a continuum of phage genetic diversity. eLife. 2015; 4: e06416. doi: 10.7554/eLife.06416.
 31. Hatfull G. F. Mycobacteriophages: genes and genomes. Annu Rev Microbiol. 2014; 68: 225–243. doi: 10.1146/annurev.micro.112408.134233.
 32. Mirzaei M. K., Nilsson A. S. Correction: isolation of phages for phage therapy: a practical approach. Methods Mol Biol. 2015; 1317: 3–14.
 33. Ackermann H. W. 5500 phages examined in the electron microscope. Arch Virol. 2007; 152 (2): 227–243. doi: 10.1007/s00705-006-0849-1.
 34. Russell D. A. Sequencing, assembling, and finishing complete bacteriophage genomes. In: bacteriophages: Methods and Protocols. Vol 3. Springer; 2018.
 35. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A. A., Dvorkin M., Kulikov A. S. et al. SPAdes genome assembly algorithm. J Comput Biol. 2012; 19 (5): 455–477. doi: 10.1089/cmb.2012.0021.
 36. Wick R. R., Judd L. M., Gorrie C. L., Holt K. E. Unicycler resolves assemblies from short/long reads. PLoS Comput Biol. 2017; 13 (6): e1005595. doi: 10.1371/journal.pcbi.1005595.
 37. Kolmogorov M., Yuan J., Lin Y., Pezner P. A. Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs. Nat Biotechnol. 2019; 37: 540–546. doi: 10.1038/s41587-019-0072-8.
 38. Garneau J. R., Depardieu F., Fortier L. C., Bikard D., Monot M. PhageTerm: a tool for fast and accurate determination of phage termini and packaging mechanism using next-generation sequencing data. Sci Rep. 2017; 7: 8292. doi: 10.1038/s41598-017-07910-5.
 39. McNair K., Zhou C., Dinsdale E. A., Souza B., Edwards R. A. PHANOTATE: gene identification in phage genomes. Bioinformatics. 2019; 35 (22): 4537–4542. doi: 10.1093/bioinformatics/btz265.
 40. Zimmermann L., Stephens A., Nam S. Z., Rau D., Kubler J., Lozajic M. et al. A completely reimplemented MPI bioinformatics toolkit with a new HHpred server at its core. J Mol Biol. 2018; 430 (15): 2237–2243. doi: 10.1016/j.jmb.2017.12.007.
 41. Arndt D., Grant J. R., Marcu A., Sajed T., Pon A., Liang Y., Wishart D. S. PHASTER: improved phage search tool. Nucleic Acids Res. 2016; 44 (W1): W16–W21. doi: 10.1093/nar/gkw387.
 42. Alcock B. P., Raphenya A. R., Lau T. T. Y., Tsang K. K., Bouchard M., Edalatmand A. et al. CARD 2020: antibiotic resistance surveillance. Nucleic Acids Res. 2020; 48 (D1): D517–D525. doi: 10.1093/nar/gkz935.
 43. Bortolaia V., Kaas R. S., Ruppe E., Roberts M. C., Schwarz S., Cattoir V. et al. ResFinder 4.0 for phenotype predictions from genotypes. J Antimicrob Chemother. 2020; 75 (12): 3491–3500. doi: 10.1093/jac/dkaa345.
 44. Nayfach S., Camargo A. P., Schulz F., Eloe-Fadrosh E., Roux S., Rypniewski N. C. CheckV assesses quality of viral MAGs. Nat Biotechnol. 2021; 39: 578–585. doi: 10.1038/s41587-020-00774-7.
 45. Marinelli L. J., Piuri M., Swigonová Z., Balachandran A., Oldfield L. M., van Kessel J. C., Hatfull G. F. FBRED: a simple and powerful tool for constructing mutant/recombinant phage genomes. PLoS One. 2008; 3 (12): e3957. doi: 10.1371/journal.pone.0003957.
 46. Pires D. P., Cleto S., Sillankorva S., Azeredo J., Lu T. K. Genetically engineered phages: advances over the last decade. ACS Synth Biol. 2016; 5 (10): 1143–1157. doi: 10.1128/MMBR.00069-15.
 47. International Council for Harmonisation (ICH). Q1A (R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products. Geneva: ICH; 2003.
 48. International Council for Harmonisation (ICH). Q6B Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products. Geneva: ICH; 1999.
 49. United States Pharmacopeia. <71>Sterility Tests. In: USP-NE Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention; current edition.
 50. United States Pharmacopeia. <85>Bacterial Endotoxins Test. In: USP-NE Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention; current edition.
 51. Merabishvili M., Pirnay J.-P., Verbeken G., Cganishvili 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 (3): e4944. doi: 10.1371/journal.pone.0004944.
 52. International Council for Harmonisation (ICH). Q5C Quality of Biotechnological Products: Stability Testing of Biotechnological/Biological Products. Geneva: ICH; 1995.
 53. European Commission. EudraLex-Volume 4. EU Guidelines for Good Manufacturing Practice for Medicinal Products for Human and Veterinary Use. Annex 1: Manufacture of Sterile Medicinal Products (rev. 2022). Brussels: European Commission; 2022.
 54. Federal Agency for Medicines and Health Products (FAMHP, Belgium). Magistral preparation of bacteriophage medicines: framework and quality requirements. Brussels: FAMHP; 2018.
 55. Beinhauerova M., Slana I. Phage amplification assays for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a review. Microorganisms. 2021; 9 (2): 237. doi: 10.3390/microorganisms9020237.
 56. Jain P., Hartman T. E., Eisenberg N. et al. Phage Lysin B for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex: Proof-of-principle. J Clin Microbiol. 2012; 50 (4): 1362–1369. doi: 10.1128/JCM.06138-11.
 57. Piuri M., Jacobs W. R. Jr., Hatfull G. F. Fluoromycobacteriophages for rapid, specific, and sensitive antibiotic susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS One. 2009; 4 (3): e4870. doi: 10.1371/journal.pone.0004870.
 58. Jain P., Hsu T., Arai M. et al. Systems approach identifies gene networks for tuberculosis progression and reveals targets for intervention. J Bacteriol. 2020; 202 (24): e00411-20. doi: 10.1128/JB.00411-20.
 59. Rajagopalan S., Mehra S., Kumar P. et al. Evaluation of a phage-based test for rapid tuberculosis diagnosis: a multicenter study. J Clin Microbiol. 2025; 63 (9): e00841-25. doi: 10.1128/JCM.00841-25.
 60. Prakash S., Jaiswal N., Jain A. Correlation between phage assay and culture for *Mycobacterium tuberculosis* detection: A meta-analysis. Int J Tuberc Lung Dis. 2009; 13 (7): 774–779.
 61. Murthy M. K., Gupta V. K., Maurya A. P. Diagnosis of nontuberculous mycobacterial infections using genomics and artificial intelligence-machine learning approaches: scope, progress and challenges. Front Microbiol. 2025; 16: 1665685. doi: 10.3389/fmicb.2025.1665685.

62. Kortright K. E., Chan B. K., Koff J. L., Turner P. E. Phage therapy: A renewed approach to combat antibiotic-resistant bacteria. *Cell Host Microbe*. 2019; 25 (2): 219–232. doi: 10.1016/j.chom.2019.01.014.
63. Schooley R. T., Biswas B., Gill J. J., Hernandez-Morales A., Lancaster J., Lessor L. et al. Development and use of personalized bacteriophage-based therapeutic cocktails to treat a patient with a disseminated resistant *Acinetobacter baumannii* infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017; 61 (10): e00954-17. doi: 10.1128/AAC.00954-17.
64. Chang R. Y. K., Morales S., Chan H. K. Topical liquid formulation of bacteriophages for metered dose delivery to cutaneous wounds. *Adv Drug Deliv Rev*. 2022; 181: 114080. doi: 10.1016/j.addr.2021.114080.
65. Aslam S., Lampley E., Wooten D., Karris M. Y., Benson C., Strathdee S., Schooley R. Lessons learned from the first 10 consecutive cases of intravenous bacteriophage therapy to treat multidrug-resistant bacterial infections at a single center in the US. *Open Forum Infect Dis*. 2020; 7 (9): ofaa389. doi: 10.1093/ofid/ofaa389.
66. Abedon S. T. Phage therapy pharmacology: calculating phage dosing. *Adv Appl Microbiol*. 2011; 77: 1–40. doi: 10.1016/B978-0-12-387044-5.00001-7.
67. Chan B. K., Sistrom M., Wertz J. E., Kortright K. E., Narayan D., Turner P. E. Phage selection restores antibiotic sensitivity in MDR *Pseudomonas aeruginosa*. *Evol Med Public Health*. 2018; 2018 (1): 60–66. doi: 10.1093/emph/eoy005.
68. Torres-Barceló C., Hochberg M. E. Evolutionary rationale for phages as complements of antibiotics. *Trends Microbiol*. 2016; 24 (4): 249–256. doi: 10.1016/j.tim.2015.12.011.
69. Hodyra-Stefaniak K., Miernikiewicz P., Drapala J., Drab M., Joczzyk-Matysiak E., Lecion D. et al. Mammalian host-versus-phage immune response determines phage fate in vivo. *Sci Rep*. 2015; 5: 14802. doi: 10.1038/srep14802.
70. Grant I. R. Bacteriophage-based methods for the detection of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and their potential for diagnosis of Johne's diseases. *Front Vet Sci*. 2021; 8: 632498. doi: 10.3389/fvets.2021.632498.
71. Foddai A., Grant I. R. Bacteriophage-based methods for detection of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: An update. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2020; 104 (21): 9399–9412. doi: 10.1007/s00253-020-10841-y.

Поступила / Received 20.10.2025
Принята в печать / Accepted 05.11.2025

Информация об авторах

Абдрахманова Радмила Охасовна — ассистент кафедры микробиологии и вирусологии, научный сотрудник Научно-исследовательского центра ФГБОУ ВО ГМУ Минздрава России, Астрахань, Россия. ORCID ID: 0000-0003-0536-8149

Рубальский Олег Васильевич — д. м. н., профессор, заведующий кафедрой микробиологии и вирусологии, главный научный сотрудник Научно-исследовательского центра ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России, Астрахань, Россия. ORCID ID: 0000-0002-2904-9276

Лазько Марина Владимировна — д. б. н., профессор, начальник управления науки, профессор кафедры микробиологии и вирусологии, заведующая лабораторией Научно-исследовательского центра ФГБОУ ВО Астраханский ГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0001-6245-2553

Ясенявская Анна Леонидовна — д. м. н., доцент, руководитель Научно-исследовательского центра, профессор кафедры фармакогнозии, фармацевтической технологии и биотехнологии, ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России, Астрахань, Россия. ORCID ID: 0000-0003-2998-2864

Рубальская Татьяна Сергеевна — консультант ООО «ГорДиаМед», Астрахань, Россия. ORCID ID: 0000-0003-0838-7353

About the authors

Radmila O. Abdrakhmanova — Assistant of the Department of Microbiology and Virology, Researcher of the Research Center, Astrakhan State Medical University of the Ministry of Health of Russian Federation, Astrakhan, Russia. ORCID ID: 0000-0003-0536-8149

Oleg V. Rubalsky — D. Sc. in Medicine, Professor, Head of the Department of Microbiology and Virology, Chief Researcher at the Research Center, Astrakhan State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Astrakhan, Russia. ORCID ID: 0000-0002-2904-9276

Marina V. Lazko — D. Sc. in Biology, Professor, Head of the Science Department, Professor of the Department of Microbiology and Virology, Head of the Laboratory of the Research Center, Astrakhan State Medical University, Astrakhan, Russia. ORCID ID: 0000-0001-6245-2553

Anna L. Yasyavskaya — D. Sc. in Medicine, Associate Professor, Head of the Research Center, Professor at the Department of Pharmacognosy, Pharmaceutical Technology, and Biotechnology, Astrakhan State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Astrakhan, Russia. ORCID ID: 0000-0003-2998-2864

Tatiana S. Rubalskaia — consultant GorDiaMed LLC, Astrakhan, Russia. ORCID ID: 0000-0003-0838-7353