



© Коллектив авторов, 2025

УДК 578.347-08 : 615.37

<https://doi.org/10.24884/1607-4181-2025-32-4-37-44>

**А. М. Нифонтова¹, А. Н. Горшков^{1*}, Н. Е. Гюлиханданова¹, О. В. Шнейдер¹,
Б. И. Асланов^{1,2}, А. Е. Гончаров^{1,2}, Д. А. Лиознов^{1,3}**

¹ Научно-исследовательский институт гриппа имени А. А. Смородинцева
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 15/17

² Северо-Западный государственный медицинский университет имени И. И. Мечникова
195067, Россия, Санкт-Петербург, Пискаревский пр., д. 47

³ Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова
197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Льва толстого, д. 6-8

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ФАГОТЕРАПИИ НА ОСНОВЕ МЕТОДОВ НЕНАПРАВЛЕННОЙ УСКОРЕННОЙ ЭВОЛЮЦИИ БАКТЕРИОФАГОВ

Поступила в редакцию 12.12.2025 г.; принята к печати 14.01.2026 г.

Резюме

Резистентность бактерий к антимикробным препаратам — это одна из актуальных медицинских проблем, требующих срочного решения. Тяжесть протекания инфекционных заболеваний, вызванных бактериями с множественной лекарственной устойчивостью, является толчком к поиску иных вариантов терапии, в частности, применению бактериофагов в качестве антимикробных агентов. Потенциально фаговая терапия может быть использована и как дополнение к антибиотикам, и в качестве замены последним. Однако выделение нативного бактериофага — это трудоемкий и продолжительный по времени процесс. Кроме того, в ходе взаимодействия бактерий и фагов развиваются механизмы бактериальной защиты, направленные на ускользание от фагового воздействия. Применение технологий ускоренной эволюции, в основе которых лежит изменение генотипов бактериофагов, может быть решением этой проблемы. Полученные таким образом вирусы могут иметь уникальные свойства, помогающие не только преодолевать бактериальные механизмы устойчивости, но и расширяющие спектр литической активности, что дает возможность их применения даже в условиях постоянной эволюции бактерий. Кроме того, новые мутации могут улучшить стабильность фагов при их хранении в виде препаратов для фаговой терапии. В целом, технологии ускоренной эволюции, включая рекомбинации по протоколу Аппельмана, химический и температурный мутагенез, модификации фагов с помощью ультрафиолетового излучения, процедуры коэволюции фагов и бактерий, представляют собой доступные и сравнительно недорогие, но при этом эффективные методы преобразования фаговых геномов для расширения возможностей применения бактериофагов в медицинской практике.

Ключевые слова: фаготерапия, ускоренная эволюция, протокол Аппельмана, химический мутагенез, ненаправленная эволюция бактериофагов

Для цитирования: Нифонтова А. М., Горшков А. Н., Гюлиханданова Н. Е., Шнейдер О. В., Асланов Б. И., Гончаров А. Е., Лиознов Д. А. Совершенствование фаготерапии на основе методов ненаправленной ускоренной эволюции бактериофагов. *Учёные записки ПСПБГМУ им. акад. И. П. Павлова*. 2025;32(4):37–44. <https://doi.org/10.24884/1607-4181-2025-32-4-37-44>.

* **Автор для связи:** Андрей Николаевич Горшков, Научно-исследовательский институт гриппа имени А. А. Смородинцева, 197376, Россия, ул. Профессора Попова, д. 15/17. E-mail: angorsh@yahoo.com.

**Anna M. Nifontova¹, Andrey N. Gorshkov^{1*}, Natalia E. Gyulikhandanova¹,
Olga V. Shneider¹, Batyrbek I. Aslanov^{1,2}, Artemiy E. Goncharov^{1,2}, Dmitry A. Lioznov^{1,2}**

¹ Smorodintsev Research Institute of Influenza
15/17, Professor Popov str., Saint-Petersburg, Russia, 197376

² North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov
47, Piskarevsky pr., Saint Petersburg, Russia, 195067

³ Pavlov University
6-8, L'va Tolstogo str., Saint Petersburg, Russia, 197022

IMPROVEMENT OF PHAGE THERAPY BASED ON METHODS OF NON- DIRECTIONAL ACCELERATED EVOLUTION OF BACTERIOPHAGES

Received 12.12.2025; accepted 14.01.2026

Summary

Bacterial resistance to antimicrobials is one of the actual medical problems that require urgent solutions. The severity of the course of infectious diseases caused by multidrug-resistant bacteria is an impetus for the search for other treatment options, in particular, the

use of bacteriophages as antimicrobial agents. Potentially, phage therapy can be used both as an addition to antibiotics and as a substitute for the latter. However, isolation of a native bacteriophage is a laborious and time-consuming process. In addition, during the interaction of bacteria and phages, bacterial defense mechanisms develop, aimed at evading phage exposure. The use of accelerated evolution technologies based on changing the genotypes of bacteriophages may be a solution to this problem. Viruses obtained in this way can have unique properties that help not only overcome bacterial resistance mechanisms, but also expand the range of lytic activity, which makes it possible to use them even in conditions of constant bacterial evolution. In addition, new mutations can improve the stability of phages when they are stored as drugs for phage therapy. In general, accelerated evolution technologies, including Appelman protocol recombination, chemical and thermal mutagenesis, modification of phages using ultraviolet radiation, and phage and bacterial coevolution procedures, are affordable and relatively inexpensive, but at the same time effective methods for converting phage genomes to expand the possibilities of using bacteriophages in medical practice.

Keywords: phage therapy, accelerated evolution, Appelman's protocol, chemical mutagenesis, undirected bacteriophage evolution

For citation: Nifontova A. M., Gorshkov A. N., Gyulikhandanova N. E., Shneider O. V., Aslanov B. I., Goncharov A. E., Lioznov D. A. Improvement of phage therapy based on methods of non-directional accelerated evolution of bacteriophages. The Scientific Notes of Pavlov University. 2025;32(4):37–44. (In Russ.). <https://doi.org/10.24884/1607-4181-2025-32-4-37-44>.

* **Corresponding author:** Andrey N. Gorshkov, Smorodintsev Research Institute of Influenza, 5/17, Professor Popov str., Saint Petersburg, Russia, 197376. E-mail: angorsh@yahoo.com.

Нарастающий кризис устойчивости бактерий к противомикробным препаратам представляет серьезную угрозу для общественного здравоохранения, поскольку патогены, имеющие множественную лекарственную резистентность, ежегодно вызывают миллионы инфекций. По оценке Всемирной организации здравоохранения, бактериальная резистентность к антибиотикам стала непосредственной причиной 1,27 млн смертей в 2019 г.; кроме того, около 5 млн смертей вызвано состояниями, осложненными бактериальными инфекциями, не поддающимися лечению с использованием традиционной антимикробной терапии [1]. Таким образом, научной проблемой, имеющей важнейшее практическое значение, является поиск, разработка и внедрение препаратов, альтернативных применению антибиотиков и химиотерапевтических средств. Возможным вариантом представляется использование терапевтических вирулентных бактериофагов с широким спектром антибактериальной активности [2–4]. Ряд исследователей описывают успешные случаи применения бактериофагов в качестве терапии, так, при применении фагов против инфекций, вызванных резистентными к антимикробной терапии *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii* у пациентов в хроническом критическом состоянии, нуждающихся в длительной медицинской помощи в условиях отделений реанимации и интенсивной терапии и находящихся на отделении более 21 дня, доля микст-инфекций у пациентов основной группы (41 человек) по сравнению с пациентами контрольной группы (38 человек) снизилась с 36 % до 20 %, развитие пневмоний наблюдалось реже у пациентов основной группы (за 7 дней 12,2 % против 31,6 % контрольной) [5]. Другое исследование описывает развитие нозокомиальных инфекций полирезистентных *K. pneumoniae* у пациентов с тяжелым течением COVID-19, где применение поливалентного бактериофага позволило элиминировать бактериальную инфекцию без применения традиционных антимикробных препаратов [6].

Фаговая терапия может быть использована как в сочетании с антибиотиками, так и в качестве замены последним [7–10]. Существует опыт применения такой терапии у ребенка двух лет: после хирургической стабилизации позвоночника развилось инфекционное осложнение, вызванное полирезистентным штаммом *K. pneumoniae*; традиционное антимикробное лечение не давало значительного эффекта, при добавлении к терапии поливалентного антиклебсиеллезного бактериофага бактериальный титр снизился, при выписке патоген в мазке не обнаруживался [11]. В другом случае при включении поливалентных бактериофагов в комплексное лечение послеоперационных гнойно-воспалительных осложнений в ургентной хирургии наблюдалось снижение риска возникновения внутрибольничных раневых ассоциаций и торможение процесса нарастания антибиотикорезистентности патогенных штаммов [12].

Современные молекулярно-биологические методы (секвенирование нового поколения, электронная микроскопия и пр.) активно применяются для подробной характеристики бактериофагов. В настоящее время разработаны, описаны и регламентированы методические приемы, критерии и шкалы, используемые при работе с бактериофагами. В микробиологических лабораториях могут проводиться исследования по определению спектра литической активности фаговых частиц (способности вирусов взаимодействовать со специфичным набором бактерий из репрезентативной коллекции штаммов), определение титра и индекса бактериофагов в отношении чувствительных к нему бактерий для создания терапевтических средств и количества фагов в объектах окружающей среды как санитарного показателя [13, 14].

Нужно отметить, что выделение нативного бактериофага — это трудоемкий и продолжительный по времени процесс. Кроме того, в ходе взаимодействия бактерий и фагов развиваются механизмы бактериальной защиты, направленные на избежание фагового воздействия [15]. На эффективность

фаговой терапии влияет ряд факторов, в их числе как процесс адсорбции фага на поверхности бактериальной клетки, так и способы защиты бактерий, такие как изменение поверхностных рецепторов или включение систем рестрикции-модификации [16]. Применение технологий ускоренной эволюции, в основе которых лежит изменение генотипов бактериофагов, может быть решением этих проблем. Полученные таким образом фаги могут иметь уникальные свойства, помогающие не только преодолевать бактериальные механизмы устойчивости, но и расширяющие спектр литической активности, что дает возможность их применения даже в условиях постоянной эволюции бактерий. Кроме того, фаги с мутантным геномом, полученные в ходе применения технологий ненаправленной эволюции, могут лучше сохранять стабильность при их хранении в виде препаратов для терапии.

Хорошо известно, что бактериофаги демонстрируют высокую специфичность к бактериям-хозяевам, имея узкую направленность действия не только против определенного вида бактерий, но нередко и против конкретных штаммов. Такая специализация в основном определяется взаимодействием между белками на поверхности фаговой частицы и бактериальными рецепторами [16]. Разумеется, взаимодействие между бактериями и фагами привело к появлению ряда механизмов бактериальной защиты, но и бактериофаги, в свою очередь, способны вырабатывать стратегии преодоления этих механизмов [17]. Эти стратегии являются результатом мутаций в геномах фагов, появляющихся с разной скоростью. Скорость возникновения мутаций оценивается путем анализа числа мутаций в популяции за определенный промежуток времени [18]. Экспериментальные данные оценивают скорость появления мутаций в 10^{-10} на нуклеотид в одном раунде репликации для бактерий и от 10^{-7} до 8×10^{-7} мутаций на нуклеотид в одном раунде репликации для бактериофагов, чей геном образован двуцепочечной ДНК [19]. Другие исследования указывают скорости мутаций от 2×10^{-4} до $4,7 \times 10^{-3}$ для вирулентных бактериофагов [20].

Характерной особенностью генома бактериофагов является его мозаичность, где каждый модуль представляет собой один или несколько генов [21, 22]. Причиной возникновения такого мозаицизма является процесс негомологичной рекомбинации генов, который впервые был изучен на примере фага λ и далее подтвержден полногеномным секвенированием нечетных Т-фагов [23]. Благодаря такой структуре генома становятся возможными генетические механизмы рекомбинации и появления спонтанных мутаций, вследствие чего бактериофаг способен приобретать литическую активность в отношении бактерий, которые ранее были устойчивы к нему, т. е. к расширению

спектра литической активности фага [24]. Этот принцип лежит в основе технологии (или протокола) Аппельмана [25, 26]. По протоколу Аппельмана один или несколько фагов в составе фагового коктейля выращиваются на пуле, состоящем из нескольких бактериальных культур, в числе которых могут быть как чувствительные к данным вирусам штаммы, так и резистентные образцы. При этом поддерживается эволюционная неизменность бактерий, входящих в пулы. Последовательные пересевы (как правило, 10–30 пассажей) подобной смеси позволяют фагам приобретать способность к лизису ранее устойчивых штаммов бактерий. При этом отмечается, что процесс рекомбинации происходит быстрее в случае, если пассируется не один фаг, а несколько (по крайней мере, три разных фага) одновременно [24]. Имеются документированные примеры более быстрого достижения успеха в расширении литической активности: E. Morello et al. (2011) описывают значительное улучшение в лизирующей способности фагов, пассирующихся на клинических изолятах *Pseudomonas aeruginosa* после всего 5 пересевов [27]. Чувствительность ранее резистентных бактериальных штаммов возрастает по мере увеличения числа пассажей [26]. Эффективность работы фагов с расширенным спектром литической активности подтверждается спот-тестом и методом двойных агаровых слоев [28, 29].

Схожим с протоколом Аппельмана методом ненаправленной модификации является метод коэволюции бактерий и фагов. Технология данного метода отличается от метода Аппельмана тем, что фаг и бактерия-хозяин пересеваются в новую среду одновременно, что позволяет им постоянно коэволюционировать и адаптироваться к генетическим изменениям друг друга, таким образом, значительно повышается уровень инфективности бактериофагов [30]. Так, V. P. Friman et al. (2016) отмечают, что фаги, прошедшие несколько раундов коэволюции с клиническими изолятами *P. aeruginosa*, приобрели способность не только более эффективно лизировать бактерий синегнойной палочки других штаммов, но и лучше преодолевать защитные механизмы, используемые представителями этого вида патогена [30]. Другие исследования показывают, что частота возникновения бактериальной устойчивости к фагам, модифицированным в процессе коэволюции со штаммом РАО 1 *P. aeruginosa*, становится ниже по сравнению с нативными вирусами [31].

Еще одним методом ненаправленной ускоренной эволюции является использование физических факторов, вызывающих случайные мутации в геноме. Ультрафиолетовое (УФ, UV) облучение может быть использовано в качестве такого фактора. Нуклеиновые кислоты, составляющие фаговый геном, способны поглощать УФ-излучения разных типов (UVA, UVB или UVC), в результате чего

появляются повреждения РНК или ДНК, в частности, появление пиримидиновых димеров [32]. Устранение подобных повреждений приводит к появлению мутаций. Однако, поскольку воздействие ультрафиолетом может приводить к эрадикации вирусов, помимо подбора типа УФ-излучения важным является подбор сопутствующих условий, в частности, температуры и значений pH, при которых проводится облучение фаговых частиц. Так, для Т-четных фагов и фага RB69, инфицирующих штаммы *Escherichia coli*, приемлемыми для выживания и приобретения мутаций при облучении УФ-лучами являются повышенные температуры (30–43 °С) и щелочные значения pH (не ниже 9,0) [33]. Помимо этого, введение в среду фотосенсибилизаторов, таких как рибофлавин, и красителей, например, бриллиантового голубого, способствует выживаемости бактериофагов в процессе воздействия ультрафиолетовыми лучами типа А [34, 35]. Некоторые ранние работы описывали расширение спектра литической активности фагов (а именно, фага Т7), прошедших через модификацию посредством ультрафиолетового облучения, но большинство исследований фокусируется на стабильности, которую приобретают фаги после такого воздействия [36].

Другим обсуждаемым методом ненаправленной эволюции является применение высоких температур. В одном из исследований фаг Т7 пассировался при температурах от 58 °С (являющейся пороговой для исходного фага) и заканчивая 72 °С [37]. В результате этих экспериментов в шести популяциях Т7 фагов появилась 61 точечная мутация в 30 различных сайтах, 41 мутация возникла параллельно в 12 сайтах. Большая часть модификаций появилась в участках ДНК, кодирующих протеины хвоста фагов, меньшая — в тех сайтах, что ответственны за капсид. Предполагается, что мутации, влияющие на хвостовой участок фага, изменяют число хозяев, которые мутантный фаг способен инфицировать. В другой работе при проведении экспериментов по термостабилизации фага Ф6, специфичного к штаммам *Pseudomonas phaseolicola*, было обнаружено, что мутации, понижающие термостабильность, приводят к возрастанию скорости роста мутантных фагов по сравнению с нативным фагом [38]. Хотя авторы описываемых работ не ставили перед собой задачу исследования расширения спектра литической активности, вероятно, использование полученных ими данных для экспериментальной работы по определению изменений в круге хозяев бактериофагов. Кроме того, эксперименты по воздействию высоких температур на бактериофаги демонстрируют возможность фагов проявлять резистентность к изменяющимся условиям окружающей среды, что полезно как для их хранения в составе терапевтических препаратов, так и для понимания функционирования этих вирусов *in vivo*.

Еще одним способом внесения случайных модификаций в фаговый геном является воздействие химических мутагенов. Один из первых документированных методов химического мутагенеза основан на применении этилметансульфоната (ЭМС) — органического соединения, индуцирующего случайные изменения в генетическом материале по механизму замещения нуклеотидов. При взаимодействии ЭМС с ДНК происходит алкилирование гуанина, при этом формируется O^6 -этилгуанидин, что, в свою очередь, приводит к транзиции, когда вместо цитозина в пару к O^6 -этилгуанидину встает тимин [39]. Энтони Лавлес провел первые документированные модификации бактериофагов Т2 этилметансульфонатом в 1958 г. и описал два вида фенотипических проявлений полученных мутаций [40]. Одним из наблюдений стало изменение формы бляшки, образуемой мутантным фагом на бактериальной культуре *E. coli*. Кроме того, внесенные этилметансульфонатом мутации расширили спектр литической активности модифицированного бактериофага. Эксперименты по использованию ЭМС в качестве мутагенного вещества проводили и в последнее десятилетие. Этилметансульфонат был применен для внесения изменений в геном фагов Т3 и Т7 в двух последовательных повторах в концентрациях 1 мМ и 180 мМ [41]. По проведении секвенирования авторы наблюдали ряд мутаций, возникших параллельно, но независимо друг от друга. Основные мутации пришлись на последовательности, кодирующие место соединения капсида головки вириона и его хвоста. Также возникли мутации в участке, несущем информацию о белке, играющем важную роль в процессе инъекции фаговой ДНК в бактерию-хозяина. По завершении химического мутагенеза авторы данной работы проводили пассирование мутантных фагов при различных температурах (от 50 до 68 °С), задаваясь целью улучшить термостабильность полученных вирусов. В результате мутантные фаги были высокоустойчивы к повышенным температурам. Авторы предполагают, что таким образом можно культивировать и другие требуемые фенотипические характеристики у фагов-мутантов, например, изменения в спектре литической активности. Стабильность бактериофагов, подвергшихся воздействию химического мутагенеза, описана и другими авторами, которые наряду с ЭМС применяли ММС (метилметансульфонат) для воздействия на фаги Т7 [39]. Помимо вывода о том, что ЭМС является более эффективным мутагеном по сравнению с ММС, было показано, что мутантные фаги демонстрируют лучшую устойчивость к воздействию ультрафиолетового облучения по сравнению с нативными вариантами, таким образом была повышена стабильность бактериофагов к разрушающим условиям внешней среды.

Кроме ЭМС, исследователи описывали и применение других агентов, вызывающих алкили-

рование, таких как метилметансульфонат, этилтансульфонат и пропилапропансульфонат [42]. Результатом использования этих веществ для модификации фага T4 стало воздействие метильных групп на гуанины и аденины на позиции 7-N и аденины на позициях 1- и 3-, тогда как этилирование приводило к этерификации фосфатных групп в фаговой ДНК. Кроме того, число активных мутантных фагов было выше при применении этилтансульфоната.

Другой метод описывает введение пиримидина 5-бромоурацила в среду, где выращивалась культура *E. coli*, которую позже заражали фагом T4 [43]. Авторы данной работы полагают, что в результате 5-бромоурацил способен встраиваться в фаговый геном, что в итоге приводит к точечным мутациям в процессе транскрипции. В результате таких мутаций чаще всего появлялись синонимичные мутации, которые не приводили к изменению синтезируемого белка и его функций, однако также возникали миссенс- и нонсенс-мутации, результирующие в изменении функций синтезируемого белка либо приводящие к синтезу нефункционирующего белка соответственно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нарастающая мультилекарственная резистентность патогенных бактерий несет в себе высокую угрозу. Применение терапевтических бактериофагов может стать ответом этой проблеме. Несмотря на то, что бактерии совершенствуют механизмы ускользания от фагового воздействия, методы ненаправленной ускоренной эволюции способны помочь в преодолении создаваемых патогенами препятствий. Такие инструменты ненаправленной ускоренной эволюции как рекомбинации по протоколу Аппельмана, химический и температурный мутагенез, модификации фагов с помощью ультрафиолетового излучения, процедура коэволюции фагов и бактерий это не только экспериментально доказанные эффективные методы преобразования геномов, но и доступные и сравнительно недорогие технологии. Эти процедуры могут помочь в создании фаговых коктейлей, где набор фагов может быть активным как против ряда актуальных клинических штаммов одной бактерии, так и против мультибактериальной инфекции. Кроме того, модифицированные таким образом фаги могут быть применены в персонализированной терапии, уничтожая патогенную микрофлору, поразившую индивидуального пациента.

Конфликт интересов

Авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest.

Соответствие нормам этики

Авторы подтверждают, что соблюдены права людей, принимавших участие в исследовании, включая получение информированного согласия в тех случаях, когда оно необходимо, и правила обращения с животными в случаях их использования в работе. Подробная информация содержится в Правилах для авторов.

Compliance with ethical principles

The authors confirm that they respect the rights of the people participated in the study, including obtaining informed consent when it is necessary, and the rules of treatment of animals when they are used in the study. Author Guidelines contains the detailed information.

Финансирование

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-15-20022, <https://rscf.ru/project/24-15-20022>, и за счет гранта Санкт-Петербургского научного фонда № 24-15-20022.

Financing

The research was carried out at the expense of a grant from the Russian Science Foundation № 24-15-20022, <https://rscf.ru/project/24-15-20022>, and at the expense of a grant from the Saint Petersburg Science Foundation № 24-15-20022.

ЛИТЕРАТУРА

1. WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024: bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance - Geneva: World Health Organization. 2024. 72 p.
2. Pelegrin A. C., Palmieri M., Mirande-Meunier C. et al. *Pseudomonas aeruginosa*: a clinical and genomic update // FEMS Microbiology reviews. – 2021. – Vol. 45, № 6. – fuab026.
3. Rafiei S., Bouzari M. Genomic analysis of vB_PaSHSN4 bacteriophage and its antibacterial activity (in vivo and in vitro) against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn // Scientific reports. – 2024. – Vol. 14, № 1. – P. 2007. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-50916-5>.
4. Poirel L., Madec J., Lupo A. et al. Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* // Microbiology spectrum. – 2018. – Vol. 6, № 4. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.arba-0026-2017>.
5. Гречко А. В., Гуркова М. М., Жданова М. А. Профилактика рецидивов нозокомиальных пневмоний с использованием комплекса бактериофагов в ОРИТ // Анестезиология и реаниматология. – 2024. – Т. 2. – С. 39–48. <https://doi.org/10.17116/anaesthesiology202402139>.
6. Долинный С. В., Краева Л. А., Бургасова О. А., Огаркова Д. А. Оценка клинических данных и видового состава возбудителей верхних дыхательных путей у пациентов с COVID-19 с определением чувствительности к основным этиотропным препаратам // Врач. – 2023. – Т. 2. – С. 42–46. <https://doi.org/10.29296/25877305-2023-02-09>.
7. Skurnik M., Alkalay-Oren S., Boon M. Phage therapy // Nature reviews methods primers. – 2025. – Vol. 5, № 9. <https://doi.org/10.1038/s43586-024-00377-5>.
8. Sohail H. A., Coffey A., Debrowsa K. et al. Bacteriophages: emerging applications in medicine, food, and biotechnology // Phage. – 2020. – Vol. 1, № 2. – P. 75–82. <https://doi.org/10.1089/phage.2020.29004.has>.
9. Paranos P., Skliros D., Zrelavs N. Therapeutic application of a jumbo bacteriophage against metallo- β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates // Journal of biomedical science. – 2025. – Vol. 32, № 74. <https://doi.org/10.1186/s12929-025-01169-z>.

10. Jo D., Kim H., Lee Y. et al. Characterization and genomic study of EJP2, a novel jumbo phage targeting antimicrobial resistant *Escherichia coli* // *Frontiers in microbiology*. – 2023. – Vol. 12, № 14. – P. 1194435. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1194435>.
11. Любимова Л. В., Павлова С. И., Пчелова Н. Н., Любимов Е. А. Применение поливалентного клебсиеллезного бактериофага при инфекции после реконструктивно-пластической операции на позвоночнике у ребенка (клинический случай) // *Acta medica Eurasica*. – 2024. – Т. 1. – С. 66–73. <https://doi.org/10.47026/2413-4864-2024-1-66-73>.
12. Паришин Д. С., Топчиев М. А., Пятаков С. Н. и др. Результаты фаготерапии инфекционных осложнений в неотложной абдоминальной хирургии // *Таврический медико-биологический вестник*. – 2022. – Т. 25, № 2. – С. 72–80.
13. Асланов Б. И., Зуева Л. П., Кафтырева Л. А. Рациональное применение бактериофагов в лечебной и противоэпидемической практике // *Ремедиум Приволжье*. – 2014. – 54 с.
14. Давыдов А. С. Оценка качества лечебно-профилактических бактериофагов по показателям «Подлинность» и «Специфическая активность». – М.: 2021. – 77 с.
15. Кураташвили А. Ю., Плеханов Н. А., Карпунина Л. В., Заднова С. П. Системы устойчивости к фагам в штаммах *Vibrio cholerae* // *Проблемы особо опасных инфекций*. – 2024. – Т. 2. – С. 20–26. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2024-2-20-26>.
16. Ranveer S. A., Dasriya V., Ahmad M. F. et al. Positive and negative aspects of bacteriophages and their immense role in the food chain // *NPJ Science of food*. – 2024. – Vol. 8, № 1. – P. 1. <https://doi.org/10.1038/s41538-023-00245-8>.
17. Borin J. M., Lee J. J., Lucia-Sanz A. et al. Rapid bacteria-phage coevolution drives the emergence of multiscale networks // *Science*. – 2023. – Vol. 382, № 6671. – P. 674–678. <https://doi.org/10.1126/science.adi5536>.
18. Drummond A. J., Pybus O. G., Rambaut A. et al. Measurably evolving populations // *Trends in ecology and evolution*. – 2003. – Vol. 18, № 9. – P. 481–488. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(03\)00216-7](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00216-7).
19. Sanjuan R., Nebot M. R., Chirico N. et al. Viral mutation rates // *Journal of virology*. – 2010. – Vol. 84, № 19. – P. 9733–9748.
20. Kupczok A., Neve H., Huang K. D. et al. Rates of mutation and recombination in Siphoviridae phage genome evolution over three decades // *Molecular biology and evolution*. – 2018. – Vol. 35, № 5. – P. 1147–1159. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy027>.
21. Morris P., Marinelli L. J., Jacobs-Sera D. et al. Genomic characterization of Mycobacteriophage Giles: evidence for phage acquisition of host DNA by illegitimate recombination // *Journal of bacteriology*. – 2008. – Vol. 190, № 6. – P. 2172–2182. <https://doi.org/10.1128/JB.01657-07>.
22. Krylov V., Pleteneva E., Bourkaltseva M. et al. Myoviridae bacteriophages of *Pseudomonas aeruginosa*: a long and complex evolutionary pathway // *Research in microbiology*. – 2003. – Vol. 154, № 4. – P. 269–275. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(03\)00070-6](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(03)00070-6).
23. Hendrix R. W. Bacteriophage genomics // *Current opinion in microbiology*. – 2003. – Vol. 6, № 5. – P. 506–511. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2003.09.004>.
24. Burrows B. H., Molineux I. J., Fralick J. A. Directed in vitro evolution of therapeutic bacteriophages: the Appelmans protocol // *Viruses*. – 2009. – Vol. 11, № 3. – P. 241.
25. Sulakvelidze A., Alavidze Z., Glenn J. M. Jr. Bacteriophage therapy // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2001. – Vol. 45, № 3. – P. 649–659. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.3.649-659.2001>.
26. Mapes A. C., Trautner B. W., Liao K. S., Ramig R. F. Development of expanded host range phage active on biofilms of multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* // *Bacteriophage*. – 2016. – Vol. 6, № 1. – P. e1096995.
27. Morello E., Saussereau E., Maura D., Huerre M., Touqui L. et al. Pulmonary bacteriophage therapy on *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis strains: first steps towards treatment and prevention // *PLOS one*. – 2011. – Vol. 6, № 2. – e16963.
28. Пчелин И. М., Гончаров А. Е., Асланов Б. И., Азаров Д. В. Спектры литической активности бактериофагов // *Антибиотики и химиотерапия*. – 2023. – Т. 68, № 11–12. – С. 59–66. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-11-12-59-66>.
29. Abedon S. T., Yin J. Bacteriophage plaques: theory and analysis // *Methods in molecular biology*. – 2009. – Vol. 501, № 161. – P. 74.
30. Friman V. P., Soanes-Brown D., Sierocinski P. et al. Pre-adapting parasitic phages to a pathogen leads to increased pathogen clearance and lowered resistance evolution with *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis bacterial isolates // *Journal of evolutionary biology*. – 2016. – Vol. 29, № 1. – P. 188–198. <https://doi.org/10.1111/jeb.12774>.
31. Betts A., Vasse M., Kaltz O., Hochberg M. E. Back to the future: evolving bacteriophages to increase their effectiveness against the pathogen *Pseudomonas aeruginosa* PAO 1 // *Evolutionary applications*. – 2013. – Vol. 6, № 7. – P. 1054–1063. <https://doi.org/10.1111/eva.12085>.
32. Izumizawa Y., Yang S.-J., Negishi T., Negishi K. DNA lesion and mutagenesis induced in phageM13mp2 by UVA, UVB and UVC irradiation // *Nucleic acids symposium series*. – 2000. – Vol. 44, № 1. – P. 73–74.
33. Smith L. A., Drake J. W. Aspects of the ultraviolet photobiology of some T-even bacteriophages // *Genetics*. – 1998. – Vol. 148, № 4. – P. 1611–1618.
34. Sommerfeld F., Weyersberg L., Vatter P. Photoinactivation of the bacteriophage PhiX174 by UVA radiation and visible light in SM buffer and DMEM-F12 // *BMC Research Notes*. – 2024. – Vol. 17, № 1. – P. 3. <https://doi.org/10.1186/s13104-023-06658-8>.
35. Wdowiak M., Magiera A., Tomczynska M. et al. Protecting bacteriophages under UV irradiation with brilliant blue FCF for targeted bacterial control // *Biofilm*. – 2025. – Vol. 9, № 9. – P. 100286. <https://doi.org/10.1016/j.biofilm.2025.100286>.
36. Meyer M., Witte W. Mutagenesis in bacteriophage T7. II. UV induced mutagenesis // *Zeitschrift fur Allgemeine Mikrobiologie*. – 1976. – Vol. 16, № 4. – P. 283–287.
37. Cole A. W., Tran S. D., Ellington A. D. Heat adaptation of phage T7 under an extended genetic code // *Virus Evolution*. – 2021. – Vol. 7, № 2. – P. veab100. <https://doi.org/10.1093/ve/veab100>.
38. Singhal S., Leon Guerrero C. M., Whang S. G. et al. Adaptations of an RNA virus to increasing thermal stress // *PLOS one*. – 2017. – Vol. 12, № 12. – P. e0189602.
39. Dodson L. A., Masker W. E. Survival and mutagenesis of bacteriophage T7 damaged by methyl methanesulfonate and ethyl methanesulfonate // *Mutation research/fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis*. – 1986. – Vol. 162, № 2. – P. 137–144.
40. Loveless A. Increased rate of plaque-type and host-range mutation following treatment of bacteriophage in vitro with ethyl methane sulphonate // *Nature*. – 1958. – Vol. 181. – P. 1212–1213.
41. Favor A. H., Llanos C. D., Youngblut M. D. Optimizing bacteriophage engineering through an accelerated evolution platform // *Scientific reports*. – 2020. – Vol. 10, № 1. – P. 13981. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70841-1>.

42. Bautz E., Freese E. On the mutagenic effect of alkylating agents // *Genetics*. – 1960. – Vol. 46, № 12. – P. 1585–1594.

43. Terzaghi B. E., Streisinger G., Stahl F. W. The mechanism of 5-bromouracil mutagenesis in the bacteriophage T4 // *Genetics*. – 1962. – Vol. 48, № 9. – P. 1519–1524.

REFERENCES

1. WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024: bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance - Geneva: World Health Organization. 2024. 72 p.
2. Pelegrin A. C., Palmieri M., Mirande-Meunier C. et al. *Pseudomonas aeruginosa*: a clinical and genomic update // *FEMS Microbiology reviews*. 2021;45(6):fuab026.
3. Rafiei S., Bouzari M. Genomic analysis of vB_PaS-HSN4 bacteriophage and its antibacterial activity (in vivo and in vitro) against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn // *Scientific reports*. 2024;14(1):2007. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-50916-5>.
4. Poiriel L., Madec J., Lupo A. et al. Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* // *Microbiology spectrum*. 2018;6(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.arba-0026-2017>.
5. Grechko A. V., Gurkova M. M., Zhdanova M. A. et al. Prevention of nosocomial pneumonia recurrence using a bacteriophage cocktail in intensive care unit // *Russian Journal of Anesthesiology and Reanimatology*. 2024;(2):39–48. (In Russ., In Engl.) <https://doi.org/10.17116/anaesthesiology202402139>.
6. Dolinny S., Kraeva L., Burgasova O. et al. Assessment of clinical data and the species composition of pathogens in the upper respiratory tract of patients with COVID-19 and determination of sensitivity to essential etiotropic drugs // *Vrach*. 2023;34(2):42–46. (In Russ.). <https://doi.org/10.29296/25877305-2023-02-09>.
7. Skurnik M., Alkalay-Oren S., Boon M. Phage therapy // *Nature reviews methods primers*. 2025;5(9). <https://doi.org/10.1038/s43586-024-00377-5>.
8. Sohail H. A., Coffey A., Debrowsa K. et al. Bacteriophages: emerging applications in medicine, food, and biotechnology // *Phage*. 2020;1(2):75–82. <https://doi.org/10.1089/phage.2020.29004.has>.
9. Paranos P., Skliros D., Zrelavs N. Therapeutic application of a jumbo bacteriophage against metallo- β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates // *Journal of biomedical science*. 2025;32(74). <https://doi.org/10.1186/s12929-025-01169-z>.
10. Jo D., Kim H., Lee Y. et al. Characterization and genomic study of EJP2, a novel jumbo phage targeting antimicrobial resistant *Escherichia coli* // *Frontiers in microbiology*. 2023;12(14):1194435. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1194435>.
11. Lyubimova L. V., Pavlova S. I., Pchelova N. N., Lyubimov E. A. the use of a polyvalent klebsiella bacteriophage in infection after reconstructive plastic surgery on the spine in a child (a clinical case) // *Acta medica Eurasica*. 2024;1:66–73. (In Russ.). <https://doi.org/10.47026/2413-4864-2024-1-66-73>.
12. Parshin D. S., Topchiev M. A., Pyatakov S. N. et al. Results of phagothrapy of infectious complications in emergency abdominal surgery // *Tavrishesky medical and Biological bulletin*. 2022;25(2):72–80. (In Russ.).
13. Aslanov B. I., Zueva L. P., Kaftyreva L. A. Rational use of bacteriophages in therapeutic and antiepidemic practice // *Remedium Privolzhye*. 2014. 54 p. (In Russ.).
14. Davydov A. S. Evaluation of the quality of therapeutic and prophylactic bacteriophages by indicators of “Authenticity” and “Specific activity”. Moscow, 2021, 77 p. (In Russ.).
15. Kuratashvili A. Yu., Plekhanov N. A., Karpunina L. V., Zadnova S. P. Systems of Phage Resistance in *Vibrio cholerae* Strains // *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2024;(2):20–26. (In Russ.). <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2024-2-20-26>.
16. Ranveer S. A., Dasriya V., Ahmad M. F. et al. Positive and negative aspects of bacteriophages and their immense role in the food chain // *NPJ Science of food*. 2024;8(1):1. <https://doi.org/10.1038/s41538-023-00245-8>.
17. Borin J. M., Lee J. J., Lucia-Sanz A. et al. Rapid bacteria-phage coevolution drives the emergence of multiscale networks // *Science*. 2023;382(6671):674–678. <https://doi.org/10.1126/science.adi5536>.
18. Drummond A. J., Pybus O. G., Rambaut A. et al. Measurably evolving populations // *Trends in ecology and evolution*. 2003;18(9):481–488. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(03\)00216-7](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00216-7).
19. Sanjuan R., Nebot M. R., Chirico N. et al. Viral mutation rates // *Journal of virology*. 2010;84(19):9733–9748.
20. Kupczok A., Neve H., Huang K. D. et al. Rates of mutation and recombination in Siphoviridae phage genome evolution over three decades // *Molecular biology and evolution*. 2018;35(5):1147–1159. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy027>.
21. Morris P., Marinelli L. J., Jacobs-Sera D. et al. Genomic characterization of Mycobacteriophage Giles: evidence for phage acquisition of host DNA by illegitimate recombination // *Journal of bacteriology*. 2008;190(6):2172–2182. <https://doi.org/10.1128/JB.01657-07>.
22. Krylov V., Pleteneva E., Bourkaltseva M. et al. Myoviridae bacteriophages of *Pseudomonas aeruginosa*: a long and complex evolutionary pathway // *Research in microbiology*. 2003;154(4):269–275. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(03\)00070-6](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(03)00070-6).
23. Hendrix R. W. Bacteriophage genomics // *Current opinion in microbiology*. 2003;6(5):506–511. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2003.09.004>.
24. Burrowes B. H., Molineux I. J., Fralick J. A. Directed in vitro evolution of therapeutic bacteriophages: the Appel-mans protocol // *Viruses*. 2009;11(3):241.
25. Sulakvelidze A., Alavidze Z., Glenn J. M. Jr. Bacteriophage therapy // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2001;45(3):649–659. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.3.649-659.2001>.
26. Mapes A. C., Trautner B. W., Liao K. S., Ramig R. F. Development of expanded host range phage active on biofilms of multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* // *Bacteriophage*. –2016;6(1):e1096995.
27. Morello E., Sausseureau E., Maura D., Huerre M., Touqui L. et al. Pulmonary bacteriophage therapy on *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis strains: first steps towards treatment and prevention // *PLOS one*. 2011;6(2):e16963.
28. Pchelin I. M., Goncharov A. E., Aslanov B. I., Azarov D. V. Lytic Activity Spectra of Bacteriophages // *Antibiotics and Chemotherapy*. 2023;68(11–12):59–66. (In Russ.). <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-11-12-59-66>.
29. Abedon S. T., Yin J. Bacteriophage plaques: theory and analysis // *Methods in molecular biology*. 2009;501(161):74.
30. Friman V. P., Soanes-Brown D., Sierocinski P. et al. Pre-adapting parasitic phages to a pathogen leads to increased pathogen clearance and lowered resistance evolution with *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis bacterial isolates // *Journal of evolutionary biology*. 2016;29(1):188–198. <https://doi.org/10.1111/jeb.12774>.
31. Betts A., Vasse M., Kaltz O., Hochberg M. E. Back to the future: evolving bacteriophages to increase their effectiveness against the pathogen *Pseudomonas aeruginosa* PAO 1 // *Evolutionary applications*. 2013;6(7):1054–1063. <https://doi.org/10.1111/eva.12085>.

32. Izumizawa Y., Yang S.-J., Negishi T., Negishi K. DNA lesion and mutagenesis induced in phageM13mp2 by UVA, UVB and UVC irradiation // *Nucleic acids symposium series*. 2000;44(1):73–74.
33. Smith L. A., Drake J. W. Aspects of the ultraviolet photobiology of some T-even bacteriophages // *Genetics*. 1998;148(4):1611–1618.
34. Sommerfeld F., Weyersberg L., Vatter P. Photoinactivation of the bacteriophage PhiX174 by UVA radiation and visible light in SM buffer and DMEM-F12 // *BMC Research Notes*. 2024;17(1):3. <https://doi.org/10.1186/s13104-023-06658-8>.
35. Wdowiak M., Magiera A., Tomczynska M. et al. Protecting bacteriophages under UV irradiation with brilliant blue FCF for targeted bacterial control // *Biofilm*. 2025;9(9):100286. <https://doi.org/10.1016/j.biofilm.2025.100286>.
36. Meyer M., Witte W. Mutagenesis in bacteriophage T7. II. UV induced mutagenesis // *Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie*. 1976;16(4):283–287.
37. Cole A. W., Tran S. D., Ellington A. D. Heat adaptation of phage T7 under an extended genetic code // *Virus Evolution*. 2021;7(2):veab100. <https://doi.org/10.1093/ve/veab100>.
38. Singhal S., Leon Guerrero C. M., Whang S. G. et al. Adaptations of an RNA virus to increasing thermal stress // *PLOS one*. 2017;12(12):e0189602.
39. Dodson L. A., Masker W. E. Survival and mutagenesis of bacteriophage T7 damaged by methyl methanesulfonate and ethyl methanesulfonate // *Mutation research/fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis*. 1986;162(2):137–144.
40. Loveless A. Increased rate of plaque-type and host-range mutation following treatment of bacteriophage in vitro with ethyl methane sulphonate // *Nature*. 1958;181:1212–1213.
41. Favor A. H., Llanos C. D., Youngblut M. D. Optimizing bacteriophage engineering through an accelerated evolution platform // *Scientific reports*. 2020;10(1):13981. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70841-1>.
42. Bautz E., Freese E. On the mutagenic effect of alkylating agents // *Genetics*. 1960;46(12):1585–1594.
43. Terzaghi B. E., Streisinger G., Stahl F. W. The mechanism of 5-bromouracil mutagenesis in the bacteriophage T4 // *Genetics*. 1962;48(9):1519–1524.

Информация об авторах

Нифонтова Анна Михайловна, аспирант, Научно-исследовательский институт гриппа имени А. А. Смородинцева (Санкт-Петербург, Россия), ORCID: 0009-0003-4643-0030; **Горшков Андрей Николаевич**, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела биотехнологии, Научно-исследовательский институт гриппа имени А. А. Смородинцева (Санкт-Петербург, Россия), ORCID: 0000-0003-2303-1144; **Гюлиханданова Наталия Евгеньевна**, зам. директора по проектной работе, Научно-исследовательский институт гриппа имени А. А. Смородинцева (Санкт-Петербург, Россия), ORCID: 0000-0001-6907-0144; **Шнейдер Ольга Вадимовна**, кандидат медицинских наук, зав. клинико-диагностической лабораторией – врач клинической лабораторной диагностики, Научно-исследовательский институт гриппа имени А. А. Смородинцева (Санкт-Петербург, Россия), ORCID: 0000-0001-8341-2454; **Асланов Батырбек Исмелович**, доктор медицинских наук, профессор, зав. кафедрой эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии, заведующий лабораторией молекулярной эпидемиологии и исследований бактериофагов, Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова (Санкт-Петербург, Россия), ORCID: 0000-0002-6890-8096; **Гончаров Артемий Евгеньевич**, доктор медицинских наук, профессор кафедры эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и исследований бактериофагов, Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова (Санкт-Петербург, Россия), ORCID: 0000-0002-5206-6656; **Люзнов Дмитрий Анатольевич**, доктор медицинских наук, профессор, директор, Научно-исследовательский институт гриппа имени А. А. Смородинцева (Санкт-Петербург, Россия), зав. кафедрой инфекционных болезней и эпидемиологии, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова (Санкт-Петербург, Россия), ORCID: 0000-0003-3643-7354.

Information about authors

Nifontova Anna M., Postgraduate Student, Smorodintsev Research Institute of Influenza (Saint Petersburg, Russia), ORCID: 0009-0003-4643-0030; **Gorshkov Andrey N.**, Cand. of Sci. (Biol.), Leading Research Fellow, Department of Biotechnology, Smorodintsev Research Institute of Influenza (Saint Petersburg, Russia), ORCID: 0000-0003-2303-1144; **Gyulikhandanova Natalia E.**, Deputy Director for R&D, Smorodintsev Research Institute of Influenza (Saint Petersburg, Russia), ORCID: 0000-0001-6907-0144; **Shneider Olga V.**, Cand. of Sci. (Med.), Head of the Clinical Diagnostic Laboratory – Clinical Laboratory Diagnostics Ddoctor, Smorodintsev Research Institute of Influenza (Saint Petersburg, Russia), ORCID: 0000-0001-8341-2454; **Aslanov Bатыrbek I.**, Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Department of Epidemiology, Parasitology and Disinfection, Head of the Laboratory of Molecular Epidemiology and Bacteriophage Research, North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov (Saint Petersburg, Russia), ORCID: 0000-0002-6890-8096; **Goncharov Artemiy E.**, Dr. Sci. (Med.), Professor, Department of Epidemiology, Parasitology and Disinfection, Leading Research Fellow of the Laboratory of Molecular Epidemiology and Bacteriophage Research, North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov (Saint Petersburg, Russia), ORCID: 0000-0002-5206-6656; **Lioznov Dmitry A.**, Dr. Sci. (Med.), Professor, Director, Smorodintsev Research Institute of Influenza, Head of the Department of Infectious Diseases and Epidemiology, Pavlov University (Saint Petersburg, Russia), ORCID: 0000-0003-3643-7354.