

СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ ОЧИСТКИ ФАГОВЫХ ЛИЗАТОВ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ ДЛЯ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ

Р. Б. Городничев¹✉, М. А. Корниенко¹, Н. С. Купцов¹, А. Д. Ефимов², В. И. Богдан², А. В. Летаров², Е. А. Шитиков¹, Е. Н. Ильина¹

¹ Федеральное научно-клиническое центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

² Федеральное исследовательское центр биотехнологии, Москва, Россия

Фаготерапия является перспективным методом лечения инфекций, вызванных устойчивыми к антибактериальным препаратам бактериями. Для получения безопасных терапевтических препаратов бактериофагов необходима глубокая очистка лизатов от компонентов бактериальной клетки, в частности эндотоксинов. Целью работы было исследовать применимость различных методов очистки фаголизатов для получения терапевтических препаратов. Фаги vB_KpnM_Seu621 (*Myoviridae*) и vB_KpnP_Dlv622 (*Autographiviridae*) использовали для получения лизата штамма *Klebsiella pneumoniae* KP9068. Очистку лизатов проводили методом осаждения бактериофагов с использованием полиэтиленгликоля, ультрацентрифугированием в градиенте CsCl, ультрацентрифугированием в градиенте сахарозы, с помощью центрифужных концентраторов (100 кДа), концентрированием на целлюлозных фильтрах 0,22 мкм в присутствии MgSO₄. Уровень эндотоксинов определяли ЛАЛ-тестированием. В результате действия vB_KpnM_Seu621 и vB_KpnP_Dlv622 были получены лизаты с титром $1,25 \times 10^{12} \pm 7,46 \times 10^{10}$ и $2,25 \times 10^{12} \pm 1,34 \times 10^{11}$ БОЕ/мл и концентрацией эндотоксина 3806056 ± 429410 и 189456 ± 12406 ЕД/мл соответственно. Из традиционных методов оптимальным по снижению уровня эндотоксина и сохранению концентрации фаговых частиц было ультрацентрифугирование в градиенте CsCl ($303 \pm 20 - 313 \pm 35$ ЕД/мл, $1,5 - 2,75 \times 10^{12} \pm 1,71 \times 10^{11}$ БОЕ/мл); из альтернативных — очистка в градиенте сахарозы и фильтрация в присутствии MgSO₄. Метод очистки лизатов следует подбирать для каждого препарата бактериофагов отдельно. Из способов очистки лизатов, пригодных для внутривенного и интратекального введения, перспективны метод ультрацентрифугирования в градиенте сахарозы и фильтрация в присутствии MgSO₄.

Ключевые слова: бактериофаги, бактериофаговая терапия, методы очистки, бактериальные лизаты, микробиология, эндотоксины, *Klebsiella pneumoniae*

Финансирование: исследование выполнено за счет средств, предоставленных для выполнения государственного задания «Разработка персонализированного подхода терапии инфекционных процессов с применением вирулентных бактериофагов» (ШИФР: Бактериофаг).

Вклад авторов: Р. Б. Городничев — план исследований, набор и обработка данных, написание статьи; М. А. Корниенко, А. В. Летаров, Е. А. Шитиков — план исследований, обработка данных, написание статьи; Н. С. Купцов, А. Д. Ефимов, В. И. Богдан — набор данных; Е. Н. Ильина — план исследований, написание статьи.

Соблюдение этических стандартов: вся экспериментальная работа выполнена с соблюдением норм Санитарно-эпидемиологических правил «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» СП 1.3.2322-08; Санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2518-09 — «Дополнения и изменения № 1 к санитарно-эпидемиологическим правилам «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» СП 1.3.2322-08; Санитарно-эпидемиологических правил «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» СанПиН 2.1.7.2790-10, а также Федеральных клинических рекомендаций «Рациональное применение бактериофагов в лечебной и противоэпидемической практике».

✉ Для корреспонденции: Роман Борисович Городничев
ул. Малая Пироговская, д. 1а, г. Москва, 119435; gorodnichev.r.b@gmail.com

Статья получена: 20.07.2021 Статья принята к печати: 25.08.2021 Опубликовано онлайн: 22.09.2021

DOI: 10.47183/mes.2021.029

COMPARISON OF METHODS FOR PURIFICATION OF BACTERIOPHAGE LYSATES OF GRAM-NEGATIVE BACTERIA FOR PERSONALIZED THERAPY

Gorodnichev RB¹✉, Kornienko MA¹, Kuptsov NS¹, Efimov AD², Bogdan VI², Letarov AV², Shitikov EA¹, Ilina EN¹

¹ Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

² Federal Research Center of Biotechnology, Moscow, Russia

Phage therapy is a promising method of treating antibiotic-resistant infections. To obtain a safe therapeutic formulation, bacterial cell components, including endotoxins, must be removed from the phage lysate. This study was aimed at comparing the efficacy of purification methods for phage lysates intended for therapeutic use. Phages vB_KpnM_Seu621 (*Myoviridae*) and vB_KpnP_Dlv622 (*Autographiviridae*) were grown using the KP9068 strain of *Klebsiella pneumoniae* as a host. The obtained lysates were purified using phage precipitation with polyethylene glycol, CsCl density gradient ultracentrifugation, sucrose density gradient ultracentrifugation, precipitation with 100 kDa centrifugal filter units, and phage concentration on 0.22 µm cellulose filters in the presence of MgSO₄. Endotoxin concentrations were determined by LAL testing. The obtained lysates contained $1.25 \times 10^{12} \pm 7.46 \times 10^{10}$ and $2.25 \times 10^{12} \pm 1.34 \times 10^{11}$ PFU/ml of vB_KpnM_Seu621 and vB_KpnP_Dlv622, respectively, and had endotoxin concentrations of $3,806,056 \pm 429,410$ and $189,456 \pm 12,406$ EU/ml, respectively. CsCl gradient ultracentrifugation was found to be the optimal conventional purification method in terms of reducing endotoxin concentrations and maintaining phage titers ($303 \pm 20 - 313 \pm 35$ EU/ml, $1.5 - 2.75 \times 10^{12} \pm 1.71 \times 10^{11}$ PFU/ml). Sucrose gradient ultracentrifugation and filtration in the presence of MgSO₄ were found to be the optimal non-traditional purification methods. A method for phage lysate purification should be selected for each phage preparation individually. Sucrose gradient ultracentrifugation and filtration in the presence of MgSO₄ hold promise as purification methods that can produce phage preparations suitable for intravenous administration.

Keywords: bacteriophage, phage therapy, purification methods, bacterial lysate, microbiology, endotoxin, *Klebsiella pneumoniae*

Funding: all study expenses were covered by the funds allocated for the State Assignment on the Development of a personalized approach to the therapy of infections using virulent bacteriophages (Code: Bacteriophage).

Author contribution: Gorodnichev RB — planned the study, conducted the experiments, and wrote the manuscript; Kornienko MA, Letarov AV, Shitikov EA — planned the study, analyzed its results, and wrote the manuscript; Kuptsov NS, Efimov AD, Bogdan VI — conducted the experiments; Ilina EN — planned the study and wrote the manuscript.

Compliance with ethical standards: the experiments were conducted in full compliance with Biosafety Guidelines for working with risk group III–IV pathogens (SP 1.3.2322-08), Amendment 1 to Biosafety Guidelines for working with risk group III–IV pathogens (SP 1.3.2518-09), medical waste regulations (SanPin 2.1.7.2790-10), and Federal Clinical Guidelines on the rational use of bacteriophages for therapy and prevention of diseases.

✉ Correspondence should be addressed: Roman B. Gorodnichev
Malaya Pirogovskaya, 1a, Moscow, 119435; gorodnichev.r.b@gmail.com

Received: 20.07.2021 Accepted: 25.08.2021 Published online: 22.09.2021

DOI: 10.47183/mes.2021.029

Нерациональное использование антибактериальных препаратов в медицинской практике привело к появлению и повсеместному распространению устойчивых к ним микроорганизмов. По данным Всемирной организации здравоохранения, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella spp.*, *Escherichia coli*, а также *Enterobacter spp.* являются приоритетными видами для поиска новых антимикробных препаратов вследствие нарастания доли изолятов с множественной лекарственной устойчивостью [1].

Одной из наиболее перспективных альтернатив антибиотикам для терапии инфекций, вызванных бактериями с множественной лекарственной устойчивостью, является терапия с использованием препаратов вирулентных бактериофагов [2]. Вирулентные бактериофаги — природные антагонисты бактерий, способные избирательно и эффективно поражать микроорганизм. Основное достоинство фаготерапии заключается в способности бактериофагов вызывать гибель бактерий вне зависимости от их профиля чувствительности к антибиотикам [3]. Кроме того, специфичность фаготерапии настолько высока, что позволяет элиминировать возбудителя инфекции, не нарушая естественную микробиоту пациента.

Практика применения бактериофагов для терапии инфекций позволила выработать критерии, которым должны соответствовать бактериофаги и терапевтические коктейли: вирулентный характер бактериофагов; отсутствие в геноме бактериофага генов токсинов и детерминант устойчивости к антибиотикам; широкий спектр хозяев, определенный на основании данных об эффективности посева; высокий уровень продукции фаговых частиц на клетку, а также действующая концентрация бактериофага не менее 10^9 БОЕ/мл [4–7].

Однако стоит отметить, что, являясь типичными представителями вирусов, они могут размножаться только внутри бактериальной клетки, как правило, приводя к ее лизису. Таким образом, основными элементами, контаминирующими терапевтические препараты бактериофагов, являются бактериальные клетки и их компоненты, в частности эндотоксины [6]. К бактериальным эндотоксинам прежде всего относят липополисахариды внешней мембраны клеток грамотрицательных бактерий [8]. Эндотоксины обладают высокой иммуногенностью и в больших количествах могут вызывать септический (эндотоксический) шок, приводящий к внутрисосудистой коагуляции, отказу органов и даже летальному исходу [9].

В настоящее время для культивирования и очистки терапевтических препаратов бактериофагов предложено несколько подходов, из которых в лабораторной практике наиболее распространены методы осаждения бактериофагов с использованием полиэтиленгликоля (ПЭГ) и ультрацентрифугирование в градиенте CsCl [10]. К недостаткам этих подходов относят присутствие солей цезия (80 нг/мл) в конечном продукте, что существенно снижает их применимость для нужд фаготерапии [10]. В свою очередь, в качестве альтернативы можно рассматривать метод ультрацентрифугирования в градиенте сахарозы, который широко применяют в вирусологии [11, 12]. Кроме того, в последние годы в качестве способов очистки фаговых лизатов используют методы, ранее применяемые для концентрирования фагов из природных источников (ультрафильтрация 100 кДа, фильтрация в присутствии солей) [10, 12–14]. Идет также разработка хроматографических методов очистки: на основании аффинной хроматографии предложены

коммерческие продукты, позволяющие очистить фаговые лизаты от эндотоксинов, в частности колонки серии EndoTrap® (Lionex GmbH; Германия). Однако, по результатам серии исследований, было показано, что их однократное применение без предварительной очистки лизата лишь незначительно снижает концентрацию эндотоксина [13, 15, 16].

Цель данной работы состояла в оценке эффективности различных методов очистки фаговых лизатов для подготовки терапевтических препаратов бактериофагов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериальные штаммы, фаги и среды

Штамм *K. pneumoniae* KP9068 был взят из бактериологической коллекции лаборатории молекулярной генетики микроорганизмов Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства России. Штамм устойчив к цефалоспорином (цефотаксиму, цефтазидиму, цефтриаксону, цефиксиму), фторхинолонам (ципрофлоксацину, офлоксацину), тетрациклину, азитромицину, хлорамфениколу, гентамицину, ампициллину и обладает переходной чувствительностью к меропенему. На основании мультислокусного секвенирования-типирования штамм относится к сиквенс-типу 11. Методом типирования гена *wzi* [17] было установлено, что штамм KP9068 обладает типом капсулы K23. Бактериальные культуры выращивали в лизогенном бульоне (LB) (от англ. *lysogeny broth*) (HiMedia; Индия) при температуре 37 °C.

С учетом литературных данных о филогенетическом разнообразии бактериофагов в коммерческих коктейлях из коллекции лаборатории были выбраны два литических бактериофага, относящиеся к разным семействам и активные против штаммов *K. pneumoniae* с капсульным типом K23 [18].

Бактериофаги vB_KpnM_Seu621 (MT939253.1) и vB_KpnP_Dlv622 (MT939252.1) вызывают лизис штаммов *K. pneumoniae* и относятся к семействам *Myoviridae* и *Autographiviridae* соответственно [19]. Бактериофаг vB_KpnM_Seu621 характеризуется следующими морфологическими признаками: изометрической головкой размером 75 нм в диаметре и длинным сократительным хвостом длиной 104 нм. Бактериофаг vB_KpnP_Dlv622 представлен изометрической головкой размером 57 нм и коротким несократительным хвостом длиной 12 нм. Геномы бактериофагов были проанализированы ранее и не содержали генов токсинов и интеграз, которые могли бы исключать возможность их применения в терапии [19].

Наращивание бактериофагов в высоком титре осуществляли в термостатируемом шейкере при 100 об./мин и 37 °C в течение 18 ч, используя штамм *K. pneumoniae* KP9068 в качестве штамма-хозяина. Для получения максимального титра бактериофагов штамм-хозяин выращивали в жидкой среде LB до середины логарифмической фазы роста ($OD_{600\text{ nm}} = 0,3$) и инокулировали фаговым лизатом для получения множественности инфекции 0,001. Полученные фаговые лизаты очищали от клеточного дебриса центрифугированием при 3500 g в течение 15 мин и последовательным фильтрованием через фильтры 0,45 мкм (Merck Millipore; США) и 0,22 мкм (Merck Millipore; США). Концентрацию бактериофага в фаголизате оценивали стандартным методом титрования по Грациа. Титр бактериофагов

указывали в количестве бляшкообразующих единиц на мл (БОЕ/мл) [20].

Осаждения бактериофагов с использованием ПЭГ

Осаждение фагов с помощью ПЭГ 6000 (Диа-М; Россия) проводили по описанной ранее методике, с небольшими модификациями [21]. К 10 мл фагового лизата добавляли 2,5 мл стерильного раствора 20%-го ПЭГ 6000 в 2,5 М хлориде натрия. Пробу перемешивали путем переворачивания без использования вортекса, охлаждали во льду в течение часа и центрифугировали 20 мин при 20 000 g. Осторожно удаляли большую часть надосадочной жидкости. Повторяли центрифугирование в течение 10 мин при 20 000 g, надосады удаляли. Полученный осадок, содержащий частицы бактериофага, ресуспендировали в 1 мл стерильного SM-буфера (100 mM NaCl, 10 mM MgSO₄, 50 mM Трис-HCl, pH 7,5, и 0,01% (вес/объем) желатина). Пробу перемешивали с помощью вортекса и инкубировали в течение часа на льду. Затем образцы вновь перемешивали с помощью вортекса для удаления остатков ПЭГ и центрифугировали в течение 1 мин при 13 000 g; супернатант переносили в новую пробирку для дальнейших исследований.

Ультрацентрифугирование в градиенте хлористого цезия

Очистку бактериофагов методом ультрацентрифугирования в градиенте CsCl осуществляли по методике, описанной ранее [21]. Фаговые лизаты (аликвота 70 мл) центрифугировали в течение часа при 75 000 g и 20 °C (ротатор Beckman Type 45Ti (Beckman Coulter; США)). Супернатант аккуратно сливали, а полученный осадок ресуспендировали в 800 мкл SM-буфера. Далее готовили растворы с различной концентрацией хлористого цезия в SM-буфере (1,3–1,4–1,45–1,5–1,6 г/мл). Полученные растворы CsCl были использованы для создания градиента, начиная с раствора с наибольшей концентрацией хлористого цезия и заканчивая раствором с его минимальной концентрацией. Растворы CsCl наносили по 800 мкл в каждый слой. Последним в центрифужный стакан добавляли один из концентрированных фаговых образцов (800 мкл). Пробу центрифугировали в течение часа при 75 000 g и 20 °C на роторе Beckman SW50.1 (Beckman Coulter; США). Опалесцирующий слой, богатый бактериофагами, отбирали, доводили SM-буфером до объема 1 мл и помещали в мешок для диализа (Thermo FS; США). Диализ проводили в течение 18 ч против десятикратного объема SM-буфера при 4 °C и постоянном перемешивании жидкости с заменой буфера каждые 4 ч. После проведения диализа образцы дополнительно стерилизовали пропусканием через фильтры 0,22 мкм (Merck Millipore; США).

Ультрацентрифугирование в градиенте сахарозы

Очистку бактериофагов методом ультрацентрифугирования в градиенте сахарозы проводили в соответствии со стандартной методикой с небольшими модификациями [11].

Фаговые лизаты (аликвота 70 мл) центрифугировали в течение часа при 75 000 g и 20 °C на роторе Beckman Type 45Ti (Beckman Coulter; США). Каждый из полученных осадков ресуспендировали в 800 мкл SM-буфера. Далее готовили растворы с различной концентрацией сахарозы

(20, 30, 40, 50 и 60%) в буфере 50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl pH 7,5. Растворы сахарозы были использованы для создания градиента, начиная с раствора с наибольшей концентрацией сахарозы (60%) и заканчивая раствором с минимальной концентрацией (20%). Каждый раствор наносили по 800 мкл. Последним в центрифужный стакан добавляли один из концентрированных фаговых лизатов (800 мкл). Центрифугирование проводили в течение часа при 75 000 g и 20 °C на роторе Beckman Type SW50.1 (Beckman Coulter; США). Свободные фаговые частицы образовывали видимый опалесцирующий слой между слоями, содержащими 50 и 60%-е растворы сахарозы. Этот слой собирали и доводили SM-буфером до объема 1 мл.

Очистка с применением центрифужных концентраторов (100 кДа)

Фаговые лизаты в объеме 1 мл наносили на центрифужные концентраторы Microcon с пределом отсека по молекулярной массе 100 кДа (Millipore; США) и центрифугировали при 10 000 g в течение 10 мин. Для того чтобы получить частицы бактериофага, осевшие на фильтре концентратора, на фильтр добавляли 300 мкл стерильного SM-буфера, после чего фильтр концентратора переворачивали, вставляли в новую стерильную пробирку и центрифугировали 3 мин при 1000 g. Очищенный лизат доводили до 1 мл стерильным SM-буфером.

Концентрирование на целлюлозных фильтрах диаметром 0,22 мкм в присутствии MgSO₄

Для очистки бактериофагов методом концентрирования на фильтре 0,22 мкм в присутствии MgSO₄ использовали аликвоты фаговых лизатов (50 мл), предварительно очищенные от клеточного дебриса [14]. В лизаты добавляли сухой MgSO₄ ч.д.а. («Диа-М»; Россия) до конечной концентрации 50 mM. Пробу перемешивали путем переворачивания без использования вортекса до полного растворения MgSO₄. Полученные суспензии медленно фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм с мембраной из сложных эфиров целлюлозы (mixed cellulose ester GSWP filter) (Millipore; США). Фильтр разрезали на мелкие части (~ 1 мм²) и погружали в 5 мл стерильного SM-буфера. Для полной элюции частиц бактериофага с поверхности фильтра суспензию инкубировали на ультразвуковой бане в течение 4 мин. После обработки ультразвуком крупные частицы фильтра осаждали с помощью центрифугирования при 3500 g в течение 10 мин, надосады отбирали для дальнейшей работы.

Определение концентрации эндотоксина в исследуемых образцах

Концентрацию эндотоксинов определяли количественно турбидиметрическим методом ЛАЛ с использованием коммерческих наборов Endosafe® (Charles River; США) в соответствии с инструкцией. Анализ мутности проводили с использованием планшетного спектрофотометра и длины волны 405 нм (Multiskan Ascent, Thermo; США).

Статистический анализ данных

Статистический анализ данных (ANOVA-тест, расчет стандартных отклонений) проводили с использованием

программы GraphPad Prisma (v.8.0.1) (GraphPad Software; США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дизайн исследования

В исследовании было проведено сравнение пяти различных методов очистки фаговых лизатов: осаждение бактериофагов с использованием ПЭГ, ультрацентрифугирование в градиенте CsCl, ультрацентрифугирование в градиенте сахарозы, очистка с помощью центрифужных концентраторов 100 кДа, концентрирования на целлюлозных фильтрах с порами 0,22 мкм в присутствии $MgSO_4$. Очистку лизатов каждым из используемых способов проводили в трех независимых биологических повторах. Для оценки эффективности анализировали изменение титра бактериофага и концентрацию эндотоксина в конечном препарате.

На первом этапе были получены фаговые лизаты с титром $1,25 \times 10^{12} \pm 7,46 \times 10^{10}$ БОЕ/мл и $2,25 \times 10^{12} \pm 1,34 \times 10^{11}$ БОЕ/мл для vB_KpnM_Seu621 и vB_KpnP_Dlv622 соответственно. Предварительную очистку от бактериального дебриса и живых клеток бактерий проводили фильтрацией через фильтры 0,22 мкм (Millipore; США). Концентрация эндотоксина в исходном фаговом лизате составила $3\,806\,056 \pm 429\,410$ ЕЭ/мл для фага vB_KpnM_Seu621 и $189\,456 \pm 12\,406$ ЕЭ/мл для фага vB_KpnP_Dlv622 (рис. 1).

Все полученные препараты были протестированы на стерильность путем посева аликвоты 50 мкл на агаризованную питательную среду. Для полученных значений концентрации частиц бактериофага и уровня эндотоксина были подсчитаны средние значения и стандартное отклонение. Кроме того, проведен расчет содержания эндотоксина в единоразовой терапевтической дозе. Согласно литературным данным, за эффективную терапевтическую дозу было принято значение фаговых частиц, равное 10^9 [22–24].

Изменение концентрации эндотоксина в зависимости от метода очистки

На первом этапе исследования проводили анализ эффективности традиционных лабораторных методов очистки: переосаждение бактериофагов в присутствии ПЭГ и ультрацентрифугирование в градиенте CsCl. Переосаждение бактериофагов с использованием ПЭГ снижало концентрацию эндотоксина на 2–3 порядка (p -value < 0,0001) до значений от 3000 ± 324 до 3817 ± 486 ЕЭ/мл. Ультрацентрифугирование в градиенте CsCl, являющееся золотым стандартом очистки фаговых лизатов, позволило снизить уровень эндотоксина более существенно: от 303 ± 35 до 313 ± 20 ЕЭ/мл (p -value < 0,0001) (см. рис. 1).

В качестве альтернативных методов очистки, позволяющих в дальнейшем беспрепятственно использовать бактериофаги в терапии, были выбраны ультрацентрифугирование в градиенте сахарозы, очистка с использованием центрифужных концентраторов 100 кДа и медленная фильтрация через целлюлозные фильтры с порами 0,22 мкм в присутствии $MgSO_4$. Ультрацентрифугирование в градиенте сахарозы снизило концентрацию эндотоксина в лизате фага vB_KpnM_Seu621 на четыре порядка (p -value < 0,0001) до 200 ± 28 ЕЭ/мл, а для фагового лизата vB_KpnP_Dlv622 — всего на два порядка (p -value < 0,0001) до 3368 ± 348 ЕЭ/мл. Использование концентраторов 100 кДа единообразно снизило концентрацию эндотоксина примерно на 1,5 порядка (p -value < 0,0001) для каждого из препаратов: $56\,148 \pm 7832$ ЕЭ/мл для фага vB_KpnM_Seu621 и 3850 ± 593 ЕЭ/мл для vB_KpnP_Dlv622. Метод фильтрации в присутствии $MgSO_4$ показал эффективность, сравнимую с переосаждением с ПЭГ (p -value > 0,9999), и приводил к снижению концентрации эндотоксина на два-три порядка — от 3187 ± 368 до 3502 ± 372 ЕЭ/мл (p -value < 0,0001) (см. рис. 1).

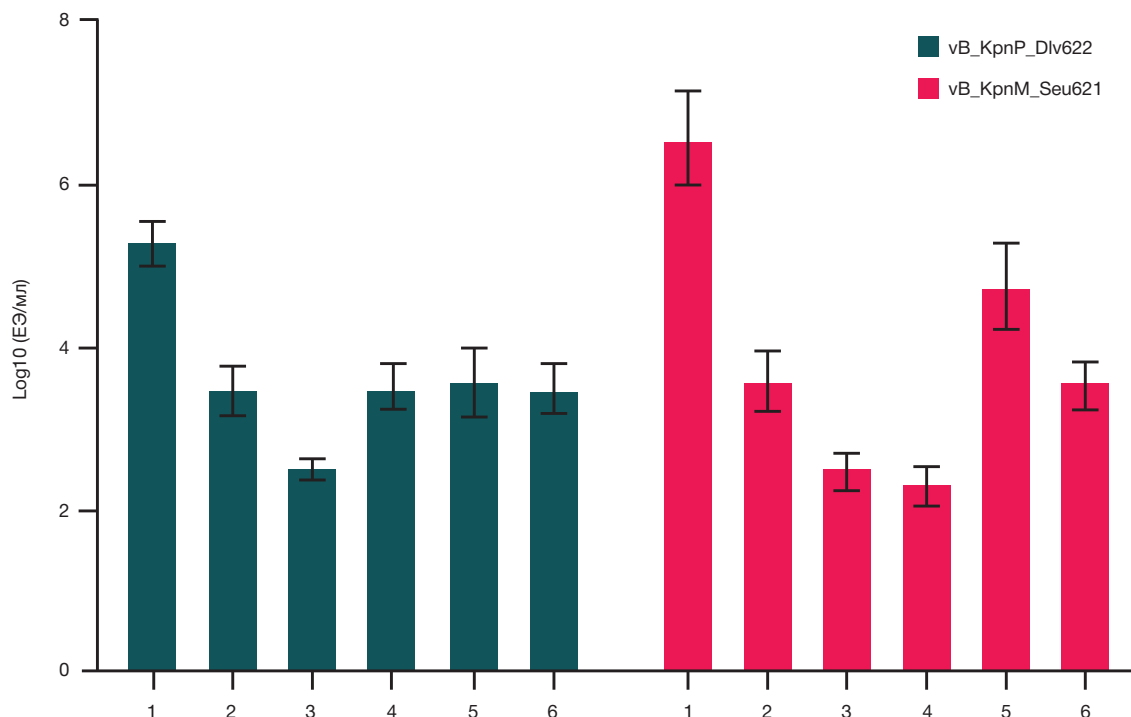


Рис. 1. Уровень эндотоксина в очищенных различными методами лизатах бактериофагов vB_KpnM_Seu621 и vB_KpnP_Dlv622. 1 — исходный лизат; 2 — осаждение с ПЭГ; 3 — ультрацентрифугирование в градиенте CsCl; 4 — ультрацентрифугирование в градиенте сахарозы; 5 — концентратор 100 кДа; 6 — фильтрация через поры 0,22 мкм в присутствии $MgSO_4$.

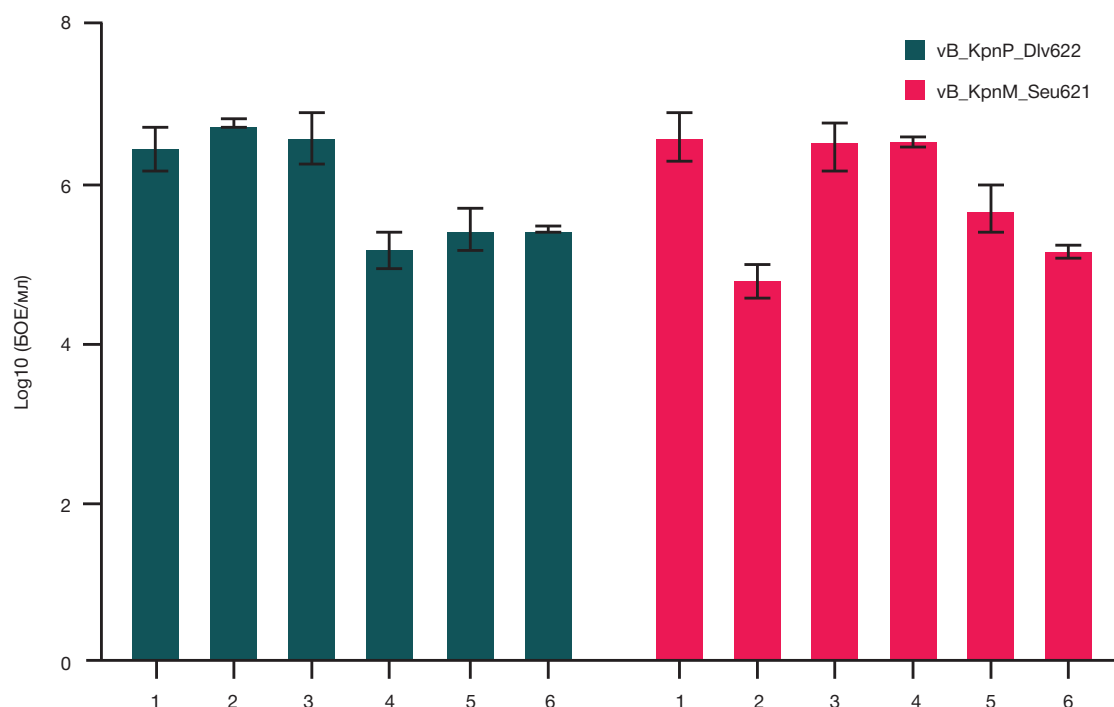


Рис. 2. Концентрация частиц бактериофага в очищенных различными методами лизатах бактериофагов vB_KpnM_Se621 и vB_KpnP_Dlv622. 1 — исходный лизат; 2 — осаждение с ПЭГ; 3 — ультрацентрифугирование в градиенте CsCl; 4 — ультрацентрифугирование в градиенте сахарозы; 5 — концентратор 100 кДа; 6 — фильтрация через поры 0,22 мкм в присутствии MgSO₄

Изменение титра бактериофагов в зависимости от метода очистки

Важной характеристикой при терапии бактериофагами является титр фаговых частиц в препарате, в связи с чем, при очистке требуется сохранение или даже увеличение (за счет концентрирования) титра фаговых частиц.

Изменение концентрации частиц бактериофагов в очищенном препарате при использовании общепринятых лабораторных методов было различным. При переосаждении бактериофагов с использованием ПЭГ фаг vB_KpnM_Se621 достоверно не менялся, а титр фага vB_KpnP_Dlv622 напротив резко снизился на три порядка (p -value < 0,0001) до $1 \times 10^9 \pm 5,7 \times 10^7$ БОЕ/мл (рис. 2). Золотой стандарт очистки, метод ультрацентрифугирования в градиенте CsCl, продемонстрировал более стабильный результат: титр обоих фагов достоверно не изменялся (p -value > 0,9999) (см. рис. 2).

Ультрацентрифугирование в градиенте сахарозы снизило (p -value < 0,0001) концентрацию фага vB_KpnM_Se621 до $5 \times 10^9 \pm 2,9 \times 10^8$ БОЕ/мл, в то время как концентрация фага vB_KpnP_Dlv622 достоверно не изменялась. Использование центрифужных концентраторов 100 кДа также снизило (p -value < 0,0001) титр обоих фагов до $1,5-5 \times 10^{10} \pm 3,1 \times 10^9$ БОЕ/мл. Фильтрация в присутствии MgSO₄ снизило (p -value < 0,0001) титр бактериофагов на 2–3 порядка до $1,5 \times 10^{10} \pm 1,1 \times 10^9$ БОЕ/мл и $5 \times 10^9 \pm 2,5 \times 10^8$ БОЕ/мл для фагов vB_KpnM_Se621 и vB_KpnP_Dlv622 соответственно (см. рис. 2).

Использование центрифужных концентраторов 100 кДа также снизило (p -value < 0,0001) титр обоих фагов до $1,5-5 \times 10^{10} \pm 3,1 \times 10^9$ БОЕ/мл. Фильтрация в присутствии MgSO₄ снизило (p -value < 0,0001) титр бактериофагов на 2–3 порядка до $1,5 \times 10^{10} \pm 1,1 \times 10^9$ БОЕ/мл и $5 \times 10^9 \pm 2,5 \times 10^8$ БОЕ/мл для фагов vB_KpnM_Se621 и vB_KpnP_Dlv622 соответственно (см. рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Фаговую терапию применяют в клинической практике с начала XX в., и она эффективна при лечении и профилактике инфекционных процессов различной этиологии, в особенности гнойно-воспалительных ран, отитов и кишечных инфекций [25–27]. В связи с ростом доли бактерий с множественной лекарственной устойчивостью в ряде случаев необходимо использование препаратов бактериофагов внутривенно либо интратекально.

Таблица. Число доз терапевтического коктейля бактериофагов vB_KpnM_Se621 и vB_KpnP_Dlv622 и содержание эндотоксина в дозе из расчета на 100 мл исходного фаголизата

Способ очистки	Бактериофаг			
	vB_KpnM_Se621		vB_KpnP_Dlv622	
	Число доз, шт.	Содержание эндотоксина, ЕЭ/доза 10^9 БОЕ	Число доз, шт.	Содержание эндотоксина, ЕЭ/доза 10^9 БОЕ
Исходный фаголизат	125 000	3045	225 000	84
Осаждение с ПЭГ	50 000	0,76	10	3000
Ультрацентрифугирование в градиенте CsCl	3850	0,11	2100	0,21
Ультрацентрифугирование в градиенте сахарозы	7	40	2800	2
Концентратор 100 кДа	15	3743	50	77
Фильтрация через поры 0,22 мкм в присутствии MgSO ₄	150	47	50	128

Согласно современным стандартам фармакологии, для внутривенного применения препараты бактериофагов должны соответствовать определенным критериям чистоты и эффективности. По рекомендации фармакопейной статьи «ОФС.1.2.4.0006.15 Бактериальные эндотоксины», число единиц эндотоксина, содержащихся в препаратах, не должно превышать 5 ЕЭ/кг в час для внутривенного и 0,2 ЕЭ/кг в час для интратекального введения [28]. Согласно литературным данным, рекомендуемая доза введенного бактериофага, обеспечивающая стабильный бактерицидный эффект, должна быть не ниже 10^9 БОЕ на дозу [22–24].

В описанных случаях внутривенного введения фаговых лизатов для терапии инфекционного процесса, как правило, использовались препараты бактериофагов, очищенные от эндотоксина с применением стандартных лабораторных методов: осаждением бактериофага с ПЭГ, ультрацентрифугированием в градиенте CsCl и аффинной хроматографии [10, 22–24]. Представленные способы хорошо отработаны для фагов семейства *Myoviridae* и нитчатых фагов *E. coli*, однако их эффективность для бактериофагов других семейств, равно как и для других видов бактерий-хозяев, остается не до конца изученной.

В качестве объектов настоящего исследования были выбраны два бактериофага, относящиеся к разным семействам. Бактериофаги vB_KpnM_Seu621 и vB_KpnP_Dlv622 вызывали лизис штамма хозяина и имели близкую концентрацию фаговых частиц в лизате ($1,25\text{--}2,25 \times 10^{12} \pm 1,34 \times 10^{11}$ БОЕ/мл), однако детектируемое количество эндотоксина в лизатах отличалось в 20 раз (см. рис. 1), что соответствует литературным данным, согласно которым уровень эндотоксина в лизатах варьирует в значительных пределах ($101\text{--}105$ ЕЭ/ 10^9 БОЕ) в зависимости от таксономического положения фагов [10, 12, 13]. Следуя общепринятым рекомендациям по минимальному титру бактериофагов в терапевтической дозе 10^9 БОЕ/мл и максимальной концентрации эндотоксина в 325 ЕЭ/мл для внутривенного введения (из расчета однократного введения дозы в 1 мл пациенту с массой тела 65 кг), можно отметить, что разбавление исходного лизата бактериофага vB_KpnP_Dlv622 позволяет применять его для внутривенного введения, однако концентрация эндотоксина в лизате бактериофага vB_KpnM_Seu621 при аналогичной подготовке была на порядок выше допустимой (табл.).

Являющийся золотым стандартом метод ультрацентрифугирования в градиенте CsCl показал наивысшую эффективность очистки (см. табл.). В литературе описано несколько случаев успешной терапии при внутривенном введении очищенных этим способом фаговых лизатов [22, 23]. Однако использование солей цезия в качестве градиента накладывает ограничения на метод, так как даже после процедуры диализа в составе очищенного препарата может содержаться остаточное количество металла [10]. По литературным данным, методом ультрацентрифугирования в градиенте CsCl можно удалить до 99,6% всего эндотоксина, однако даже для данного метода эффективность может колебаться от 18 до 99,6% [13].

Распространенный в лабораторной практике метод осаждения бактериофагов в присутствии ПЭГ показал неодинаковую способность к осаждению бактериофагов разных семейств. Так, для бактериофага vB_KpnM_Seu621 семейства *Myoviridae* этим методом был получен очищенный препарат с достаточно высоким титром. В то

же время для бактериофага семейства *Autographiviridae* отмечена значительная потеря титра, что снизило эффективность метода. Данные об эффективности переосаждения фагов с ПЭГ в литературе также не однозначны: этот метод не одинаково эффективен для переосаждения морфологически разных фагов и может требовать изменения состава солевой фракции или длины молекулы ПЭГ [10, 12, 29]. Было показано, например, что для нитчатого фага *E. coli* M13 переосаждение с ПЭГ удаляет до 88% эндотоксина из лизата, тогда как для фага семейства *Myoviridae* этим же методом удалось снизить количество эндотоксина в 20 раз [12].

Метод ультрацентрифугирования в градиенте сахарозы широко применяют для очистки вирусных суспензий, однако редко — для очистки фаговых лизатов [11]. Согласно полученным результатам, данный метод позволил получить очищенные от эндотоксина препараты бактериофагов, пригодные для внутривенного и даже, в случае фага vB_KpnP_Dlv622, интратекального введения. При этом следует отметить, что падение титра фага vB_KpnM_Seu621 позволило получить лишь семь доз очищенного препарата, что может быть недостаточным для одного полного курса персонализированного лечения. Подбор правильной концентрации градиента, скорости и времени центрифугирования может решить эту проблему и позволить оптимизировать протокол для каждого конкретного фага.

Размер молекулы эндотоксина обычно не превышает 10–20 кДа, поэтому ультрафильтрация с применением концентраторов 100 кДа может быть эффективной для очистки фаговых лизатов. Данный метод показал не одинаковую эффективность очистки и приводил к падению титра обоих бактериофагов. Высокая концентрация эндотоксина в случае фага *Myoviridae* может быть вызвана образованием мицелл эндотоксина, которые достигают размера 1000 кДа и не проходят сквозь поры фильтра [30]. Модифицированная версия данного метода в виде тангенциальной фильтрации показала эффективную элиминацию до 90% всего эндотоксина из фаголизата, однако данная методика не тестировалась на фагах семейства *Podoviridae* [10].

Медленную фильтрацию через целлюлозные фильтры с порами 0,22 мкм в присутствии MgSO_4 наиболее часто используют для концентрирования бактериофагов из природных источников воды, однако данный метод может быть применен и для очистки фаговых лизатов. Несмотря на падение титра бактериофага в процессе очистки, этим методом удалось получить достаточное число доз препаратов, подходящих для внутривенного лечения. Стоит отметить, что метод показал удовлетворительные результаты независимо от таксономической принадлежности бактериофагов и был фактически единственным альтернативным методом, позволившим получить очищенный препарат фага *Myoviridae*.

По времязатратности обсуждаемых методов очистки наиболее быстрыми являются ультрафильтрация с применением концентраторов 100 кДа и медленная фильтрация в присутствии MgSO_4 , занимающие в среднем 1 и 2 ч соответственно. Ультрацентрифугирование в градиенте CsCl, сахарозы и осаждение с ПЭГ занимают в среднем по 3,5 ч, однако для безопасного применения фаговые лизаты, очищенные методами ультрацентрифугирования в градиенте CsCl и осаждением с ПЭГ, требуют последующей очистки диализом, что увеличивает время очистки на 18 ч. В связи с этим

наименее времязатратными методами подготовки фаговых лизатов для применения в терапии являются ультрафильтрация с применением концентраторов 100 кДа, медленная фильтрация в присутствии $MgSO_4$ и ультрацентрифугирование в градиенте сахарозы.

По результатам данного исследования и литературным данным, количество эндотоксина и эффективность различных методов неодинаковы для бактериофагов разных семейств. Вследствие различия в размерах и/или константы седиментации фагов оптимальный метод очистки или комбинацию таких методов следует рекомендовать к применению в зависимости от филогенетического положения конкретного бактериофага.

ВЫВОД

Вследствие индивидуальных особенностей фагов оптимально подбирать метод очистки или их комбинацию индивидуально для каждого фага. Несмотря на это, самыми перспективными методами очистки фаговых лизатов семейств *Myoviridae* и *Autographiviridae* можно назвать ультрацентрифугирование в градиенте сахарозы и медленную фильтрацию в присутствии $MgSO_4$. Данные методы не только позволяют в достаточной мере очистить лизат от эндотоксина и компонентов среды, но и реализуются без применения потенциально токсичных для человека реактивов.

Литература

1. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis*. 2018; 18 (3): 318–27. DOI: 10.1016/S1473-3099(17)30753-3.
2. Lin DM, Koskella B, Lin HC. Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World J Gastrointest Pharmacol Ther*. 2017; 8 (3): 162. DOI: 10.4292/wjgpt.v8.i3.162.
3. Акимкин В. Г., Дарбеева О. С., Колков В. Ф. Бактериофаги: исторические и современные аспекты их применения: опыт и перспективы. *Клиническая практика*. 2010; 4 (4): 48–54.
4. Pirnay JP, Blasdel BG, Bretaudeau L, Buckling A, Chanishvili N, Clark JR, et al. Quality and safety requirements for sustainable phage therapy products. *Pharm Res*. 2015; 32 (7): 2173–9. DOI: 10.1007/s11095-014-1617-7.
5. Шкода А. С., Митрохин С. Д., Ведяшкина С. Г., Орлова О. Е., Бастрикин С. Ю., Галицкий А. А., и др. Персонализированная фаготерапия пациентов, страдающих инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи: методические рекомендации. 2019; 37 с. Доступно по ссылке: <https://niioz.ru/upload/iblock/259/259f65904e633b948cd2e6a1d04742f0.pdf>.
6. Petrovic-Fabijan A, Khalid A, Maddocks S, Ho J, Gilbey T, Sandaradura I, et al. Phage therapy for severe bacterial infections: a narrative review. *Med J Aust*. 2020; 212 (6): 279–85. DOI: 10.5694/mja2.50355.
7. Aleshkin AV, Shkoda AS, Bochkareva SS, Ershova ON, Mitrokhin SD, Kiseleva IA, et al. Concept of individualized medicine based on personalized phage therapy for intensive care unit patients suffering from healthcare-associated infections. *Infektsionnye Bolezni*. 2017; 15 (4): 49–54. DOI: 10.20953/1729-9225-2017-4-49-54.
8. Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H, et al. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J*. 1994; 8 (2): 217–25. DOI: 10.1096/FASEBJ.8.2.8119492.
9. Raetz CRH, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem*. 2002; 71 (1): 635–700. DOI: 10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414.
10. Luong T, Salabarria AC, Edwards RA, Roach DR. Standardized bacteriophage purification for personalized phage therapy. *Nat Protoc*. 2020; 15 (9): 2867–90. DOI: 10.1038/s41596-020-0346-0.
11. Guo Y, Cheng A, Wang M, Zhou Y. Purification of anadid herpesvirus 1 particles by tangential-flow ultrafiltration and sucrose gradient ultracentrifugation. *J Virol Methods*. 2009; 161 (1): 1–6. DOI: 10.1016/J.JVIROMET.2008.12.017.
12. Hietala V, Horsma-Heikkinen J, Carron A, Skurnik M, Kiljunen S. The Removal of Endo- and Enterotoxins From Bacteriophage Preparations. *Front Microbiol*. 2019; 10: 1674. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01674.
13. Van Belleghem JD, Merabishvili M, Vergauwen B, Lavigne R, Vanechoutte M. A comparative study of different strategies for removal of endotoxins from bacteriophage preparations. *J Microbiol Methods*. 2017; 132: 153–9. DOI: 10.1016/j.mimet.2016.11.020.
14. Van Twest R, Kropinski AM. Bacteriophage enrichment from water and soil. *Methods Mol Biol*. 2009; 501: 15–21. DOI: 10.1007/978-1-60327-164-6_2.
15. Cooper CJ, Denyer SP, Maillard J-Y. Stability and purity of a bacteriophage cocktail preparation for nebulizer delivery. *Lett Appl Microbiol*. 2014; 58 (2): 118–22. DOI: 10.1111/lam.12161.
16. Merabishvili M, Pirnay J-P, Verbeken G, Chanishvili N, Tediashvili M, Lashkhi N, et al. Quality-controlled small-scale production of a well-defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials. *PLoS One*. 2009; 4 (3): 4944. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0004944.
17. Brisse S, Passet V, Haugaard AB, Babosan A, Kassis-Chikhani N, Struve C et al. Wzi gene sequencing, a rapid method for determination of capsulartype for *klebsiella* strains. *J Clin Microbiol*. 2013; 51 (12): 4073–8. DOI: 10.1128/JCM.01924-13.
18. Gorodnichev RB, Volozhantsev NV, Krasilnikova VM, Bodoev IN, Kornienko MA, Kuptsov NS, et al. Novel *Klebsiella pneumoniae* K23-specific bacteriophages from different families: similarity of depolymerases and their therapeutic potential. *Front Microbiol*. 2021; 12: 669618. DOI: 10.3389/FMICB.2021.669618.
19. Mazzocco A, Waddell TE, Lingohr E, Johnson RP. Enumeration of bacteriophages using the small drop plaque assay system. *Bacteriophages*. 2009; 81–85. DOI: 10.1007/978-1-60327-164-6.
20. Maniatis T, Sambrook J, Fritsch EF. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Inglis J. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1984; 2230 p.
21. Schooley RT, Biswas B, Gill JJ, 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): 1–15. DOI: 10.1128/AAC.00954-17.
22. Dedrick RM, Guerrero-Bustamante CA, Garlena RA, Russell DA, Ford K, Harris K, et al. Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus*. *Nat Med Springer US*. 2019; 25 (5): 730–33. DOI: 10.1038/s41591-019-0437-z.
23. Rubalskii E, Ruemke S, Salmoukas C, Boyle EC, Warnecke G, Tudorache I, et al. Bacteriophage therapy for critical infections related to cardiothoracic surgery. *Antibiotics*. 2020; 9 (5): 1–12. DOI: 10.3390/ANTIBIOTICS9050232.
24. Pinto AM, Cerqueira MA, Bañobre-López M, Pastrana LM, Sillankorva S. Bacteriophages for chronic wound treatment: from traditional to novel delivery systems. *Viruses*. 2020; 12 (2): 1–29. DOI: 10.3390/v12020235.
25. Wills QF, Kerrigan C, Soothill JS. Experimental bacteriophage protection against *Staphylococcus aureus* abscesses in a rabbit model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49 (3): 1220–1. DOI: 10.1128/AAC.49.3.1220-1221.2005.
26. Fish R, Kutter E, Wheat G, Blasdel B, Kutateladze M, Kuhl S. Bacteriophage treatment of intransigent diabetic toe ulcers: a

case series. *Journal of wound care*. 2016; 25 (Sup 7): 27–33. DOI: 10.12968/JOWC.2016.25.SUP7.S27.

27. ОФС.1.2.4.0006.15 Бактериальные эндотоксины. Фармакопей. рф [Электронный ресурс]. Доступно по ссылке: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-2-4-0006-15-bakterialnye-endotoksiny/> (дата обращения: 30.08.2021).
28. Zhang ZR, Shen JT, Dai JY, Sun YQ, Dong YS, Xiu ZL. Separation

and purification of Klebsiella phage by two-step salting-out extraction. *Sep Purif Technol*. 2020; 242 (2): 116784. DOI: 10.1016/j.seppur.2020.116784.

29. Bergstrand A, Svanberg C, Langton M, Nydén M. Aggregation behavior and size of lipopolysaccharide from *Escherichia coli* O55:B5. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2006; 53 (1): 9–14. DOI: 10.1016/J.COLSURFB.2006.06.007.

References

1. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis*. 2018; 18 (3): 318–27. DOI: 10.1016/S1473-3099(17)30753-3.
2. Lin DM, Koskella B, Lin HC. Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World J Gastrointest Pharmacol Ther*. 2017; 8 (3): 162. DOI: 10.4292/wjgpt.v8.i3.162.
3. Akimkin VG, Darbeeva OS, Kolkov VF. Bakteriofagi: istoricheskie i sovremennye aspekty ih primeneniya: opyt i perspektivy. *Klinicheskaya praktika*. 2010; 4 (4): 48–54. Russian.
4. Pirnay JP, Blasdel BG, Bretaudeau L, Buckling A, Chanishvili N, Clark JR, et al. Quality and safety requirements for sustainable phage therapy products. *Pharm Res*. 2015; 32 (7): 2173–9. DOI: 10.1007/s11095-014-1617-7.
5. Shkoda AS, Mitrohin SD, Vedjashkina SG, Orlova OE, Bastrikin SYu, Galickij AA, i dr. Personalizirovannaja fagoterapija pacientov, stradajushih infekcijami, svjazannymi s okazaniem medicinskoj pomoshhi: metodicheskie rekomendacii. 2019; 37 s. Dostupno po ssylke: <https://niioz.ru/upload/iblock/259/259f65904e633b948cd2e6a1d04742f0.pdf>. Russian.
6. Petrovic-Fabijan A, Khalid A, Maddocks S, Ho J, Gilbey T, Sandaradura I, et al. Phage therapy for severe bacterial infections: a narrative review. *Med J Aust*. 2020; 212 (6): 279–85. DOI: 10.5694/mja2.50355.
7. Aleshkin AV, Shkoda AS, Bochkareva SS, Ershova ON, Mitrokhin SD, Kiseleva IA, et al. Concept of individualized medicine based on personalized phage therapy for intensive care unit patients suffering from healthcare-associated infections. *Infektsionnye Bolezni*. 2017; 15 (4): 49–54. DOI: 10.20953/1729-9225-2017-4-49-54.
8. Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H, et al. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J*. 1994; 8 (2): 217–25. DOI: 10.1096/FASEBJ.8.2.8119492.
9. Raetz CRH, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem*. 2002; 71 (1): 635–700. DOI: 10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414.
10. Luong T, Salabarria AC, Edwards RA, Roach DR. Standardized bacteriophage purification for personalized phage therapy. *Nat Protoc*. 2020; 15 (9): 2867–90. DOI: 10.1038/s41596-020-0346-0.
11. Guo Y, Cheng A, Wang M, Zhou Y. Purification of anadid herpesvirus 1 particles by tangential-flow ultrafiltration and sucrose gradient ultracentrifugation. *J Virol Methods*. 2009; 161 (1): 1–6. DOI: 10.1016/J.JVIROMET.2008.12.017.
12. Hietala V, Horsma-Heikkinen J, Carron A, Skurnik M, Kiljunen S. The Removal of Endo- and Enterotoxins From Bacteriophage Preparations. *Front Microbiol*. 2019; 10: 1674. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01674.
13. Van Belleghem JD, Merabishvili M, Vergauwen B, Lavigne R, Vanechoutte M. A comparative study of different strategies for removal of endotoxins from bacteriophage preparations. *J Microbiol Methods*. 2017; 132: 153–9. DOI: 10.1016/j.mimet.2016.11.020.
14. Van Twest R, Kropinski AM. Bacteriophage enrichment from water and soil. *Methods Mol Biol*. 2009; 501: 15–21. DOI: 10.1007/978-1-60327-164-6_2.
15. Cooper CJ, Denyer SP, Maillard J-Y. Stability and purity of a bacteriophage cocktail preparation for nebulizer delivery. *Lett Appl Microbiol*. 2014; 58 (2): 118–22. DOI: 10.1111/lam.12161.
16. Merabishvili M, Pirnay J-P, Verbeken G, Chanishvili N, Tediashvili M, Lashkhi N, et al. Quality-controlled small-scale production of a well-defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials. *PLoS One*. 2009; 4 (3): 4944. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0004944.
17. Brisse S, Passet V, Haugaard AB, Babosan A, Kassis-Chikhani N, Struve C et al. Wzi gene sequencing, a rapid method for determination of capsulartype for klebsiella strains. *J Clin Microbiol*. 2013; 51 (12): 4073–8. DOI: 10.1128/JCM.01924-13.
18. Gorodnichev RB, Volozhantsev NV, Krasnikova VM, Bodoev IN, Kornienko MA, Kuptsov NS, et al. Novel Klebsiella pneumoniae K23-specific bacteriophages from different families: similarity of depolymerases and their therapeutic potential. *Front Microbiol*. 2021; 12: 669618. DOI: 10.3389/FMICB.2021.669618.
19. Mazzocco A, Waddell TE, Lingohr E, Johnson RP. Enumeration of bacteriophages using the small drop plaque assay system. *Bacteriophages*. 2009; 81–85. DOI: 10.1007/978-1-60327-164-6.
20. Maniatis T, Sambrook J, Fritsch EF. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Inglis J. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1984; 2230 p.
21. Schooley RT, Biswas B, Gill JJ, 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): 1–15. DOI: 10.1128/AAC.00954-17.
22. Dedrick RM, Guerrero-Bustamante CA, Garlena RA, Russell DA, Ford K, Harris K, et al. Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus*. *Nat Med Springer US*. 2019; 25 (5): 730–33. DOI: 10.1038/s41591-019-0437-z.
23. Rubalskii E, Ruemke S, Salmoukas C, Boyle EC, Warnecke G, Tudorache I, et al. Bacteriophage therapy for critical infections related to cardiothoracic surgery. *Antibiotics*. 2020; 9 (5): 1–12. DOI: 10.3390/ANTIBIOTICS9050232.
24. Pinto AM, Cerqueira MA, Bañobre-López M, Pastrana LM, Sillankorva S. Bacteriophages for chronic wound treatment: from traditional to novel delivery systems. *Viruses*. 2020; 12 (2): 1–29. DOI: 10.3390/v12020235.
25. Wills QF, Kerrigan C, Soothill JS. Experimental bacteriophage protection against *Staphylococcus aureus* abscesses in a rabbit model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49 (3): 1220–1. DOI: 10.1128/AAC.49.3.1220-1221.2005.
26. Fish R, Kutter E, Wheat G, Blasdel B, Kutateladze M, Kuhl S. Bacteriophage treatment of intransigent diabetic toe ulcers: a case series. *Journal of wound care*. 2016; 25 (Sup 7): 27–33. DOI: 10.12968/JOWC.2016.25.SUP7.S27.
27. ОФС.1.2.4.0006.15 Бактериальные эндотоксины. Фармакопей. рф [Электронный ресурс]. Доступно по ссылке: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-2-4-0006-15-bakterialnye-endotoksiny/> (дата обращения: 30.08.2021). Russian.
28. Zhang ZR, Shen JT, Dai JY, Sun YQ, Dong YS, Xiu ZL. Separation and purification of Klebsiella phage by two-step salting-out extraction. *Sep Purif Technol*. 2020; 242 (2): 116784. DOI: 10.1016/j.seppur.2020.116784.
29. Bergstrand A, Svanberg C, Langton M, Nydén M. Aggregation behavior and size of lipopolysaccharide from *Escherichia coli* O55:B5. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2006; 53 (1): 9–14. DOI: 10.1016/J.COLSURFB.2006.06.007.