

DOI: 10.21055/0370-1069-2025-4-163-166

УДК 616.339:616-07

К.С. Гумаюнова, М.В. Овчинникова, Н.С. Червякова, О.С. Зинина, Е.А. Глазкова, А.К. Никифоров

**Формирование рабочей коллекции бактериофагов для производства
медицинских изделий для диагностики *in vitro* чумы и холеры**

ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора располагает рабочей коллекцией бактериальных вирусов с различной литической активностью в отношении микроорганизмов I–III групп патогенности. Многие из них являются основой медицинских изделий для *in vitro* диагностики. **Цель** работы – приведение рабочей коллекции бактериофагов в соответствие с правилами создания и использования коллекций патогенных микроорганизмов и вирусов, изложенными в постановлении Правительства РФ от 30 сентября 2021 г. № 1668, и в соответствии с требованиями Федерального закона от 30 декабря 2020 г. № 492-ФЗ. **Материалы и методы.** В работе использованы штаммы рабочей коллекции бактериофагов, специфичных в отношении ПБА I–III групп. Проведена лиофилизация коллекционных штаммов бактериофагов с использованием защитных сред с разработанной рецептурой. **Результаты и обсуждение.** Проведены идентификация и паспортизация бактериофагов. Осуществлена процедура авторского депонирования бактериофагов рабочей коллекции в Государственную коллекцию патогенных бактерий ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора. В результате проведенной работы рабочая коллекция бактериофагов, специфичных в отношении микроорганизмов I–III групп патогенности, приведена в соответствие с требованиями действующего законодательства.

Ключевые слова: коллекция бактериофагов, микроорганизмы I–III групп патогенности.

Корреспондирующий автор: Гумаюнова Кристина Сергеевна, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Для цитирования: Гумаюнова К.С., Овчинникова М.В., Червякова Н.С., Зинина О.С., Глазкова Е.А., Никифоров А.К. Формирование рабочей коллекции бактериофагов для производства медицинских изделий для диагностики *in vitro* чумы и холеры. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2025; 4:163–166. DOI: 10.21055/0370-1069-2025-4-163-166

Поступила 05.05.2025. Отправлена на доработку 21.07.2025. Принята к публикации 20.08.2025.

**K.S. Gumayunova, M.V. Ovchinnikova, N.S. Chervyakova, O.S. Zinina, E.A. Glazkova,
A.K. Nikiforov**

**Development of a Working Collection of Bacteriophages for the Production
of Medical Products for *in vitro* Diagnostics of Plague and Cholera**

Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation

Abstract. The Russian Anti-Plague Institute “Microbe” of the Rosпотребнадзор has a working collection of bacterial viruses with varying lytic activity against microorganisms of pathogenicity groups I–III. Many of them are the matrix of medical products for *in vitro* diagnostics. **The aim** of the work was to bring the working collection of bacteriophages in line with the rules for the creation and use of collections of pathogenic microorganisms and viruses set out in Decree of the Government of the Russian Federation No. 1668 dated September 30, 2021 and in accordance with the requirements of Federal Law No. 492-FZ dated December 30, 2020. **Materials and methods.** The study involved the usage of a working collection of bacteriophages specific for PBAs of pathogenicity groups I–III. Collection strains of bacteriophages were lyophilized using protective media with a developed formulation. **Results and discussion.** Identification and certification of bacteriophages has been carried out. The procedure of author’s deposition of bacteriophages from the working collection into the State Collection of Pathogenic Bacteria of the Institute “Microbe” has been carried out. The working collection of bacteriophages specific for microorganisms of pathogenicity groups I–III has been brought into compliance with the applicable statutory requirements.

Key words: collection of bacteriophages, microorganisms of pathogenicity groups I–III.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Funding: The authors declare no additional financial support for this study.

Corresponding author: Kristina S. Gumayunova, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Gumayunova K.S., Ovchinnikova M.V., Chervyakova N.S., Zinina O.S., Glazkova E.A., Nikiforov A.K. Development of a Working Collection of Bacteriophages for the Production of Medical Products for *in vitro* Diagnostics of Plague and Cholera. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2025; 4:163–166. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2025-4-163-166

Received 05.05.2025. Revised 21.07.2025. Accepted 20.08.2025.

Gumayunova K.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1341-3037>
Ovchinnikova M.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1736-7453>
Chervyakova N.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3133-3820>

Zinina O.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4951-091X>
Glazkova E.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5959-3491>
Nikiforov A.K., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1130-3504>

С момента открытия явления бактериофагии исследователи СССР, а затем Российской Федерации заняли лидирующие позиции в направлении его изучения. Несмотря на то, что исследование вирусов бактерий переживало различные периоды, именно изучение системы «фаг – клетка» позволило сформулировать базовые принципы, на которых основаны многие направления современной молекулярной биологии [1].

В последнее десятилетие наблюдается рост интереса к изучению и применению препаратов бактериофагов, обусловленный их строгой специфичностью, а также проблемой широкой антибиотикорезистентности ряда патогенных микроорганизмов.

В схеме лабораторной диагностики многих инфекционных болезней для индикации, идентификации и дифференциации возбудителей бактериофаги прочно заняли свою нишу благодаря своей экономичности, воспроизводимости, точности и скорости применения метода. Для повышения эффективности фагодиагностики в настоящее время ведутся разработки новых и совершенствование существующих препаратов [2].

Под эгидой реализации Стратегии предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 года, утвержденной распоряжением Правительства Российской Федерации от 25 сентября 2017 г. № 2045-р, в соответствии с Федеральным законом от 30 декабря 2020 г. № 492-ФЗ «О биологической безопасности в Российской Федерации» и постановлением Правительства РФ от 30 сентября 2021 г. № 1668, где изложены правила создания, пополнения, ведения и использования коллекций патогенных микроорганизмов и вирусов, а также создание и ведение национального каталога коллекционных штаммов патогенных микроорганизмов и вирусов на предприятиях и в научно-исследовательских центрах, созданы и продолжают создаваться коллекции фагов для конструирования на их основе биологических продуктов разной направленности [3].

Основные функции и принципы ведения коллекций бактериофагов аналогичны таковым коллекций бактериальных штаммов, но имеют свои особенности и специфику. Это формирование, поддержание в жизнеспособном состоянии и учет централизованного коллекционного фонда объектов; обеспечение качественными образцами типовых, нетиповых и референтных штаммов для научно-исследовательских, производственных работ микробиологического профиля и учебного процесса; хранение коллекционного фонда в лиофилизированном состоянии или в условиях низкотемпературного замораживания, или криоконсервации; ведение баз данных, паспортизация и каталогизация фагов; консультативная и научно-методическая помощь научным и практическим учреждениям по вопросам систематики и номенклатуры, оказание услуг по поиску и подбору штаммов с заданными характеристиками; осуществление дея-

тельности по депонированию и защите интеллектуальной собственности [4]; расширение географии поиска активных рас фагов для конструирования универсальных основ бактериофаговых препаратов против эпидзначимых инфекционных агентов с изучением кандидатных фагов для последующего введения в состав маточных культур для получения целевого продукта на основе бактериофагов.

На сегодня ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора располагает коллекцией бактериальных вирусов с различной литической активностью в отношении микроорганизмов I–III групп патогенности. В коллекцию включены уникальные фаги, лизирующие возбудителей чумы, холеры и псевдотуберкулеза. Многие из них являются основой медицинских изделий для *in vitro* диагностики [5]. Так, разработаны и серийно выпускаются четыре зарегистрированных на территории РФ диагностических холерных препарата бактериофагов: фаг дифференциально-диагностический (ДДФ), бактериофаги диагностические холерные классический и эльтор, бактериофаги диагностические холерные эльтор *ctx+* и *ctx-*, бактериофаги диагностические холерные ТЭПВ-1-7; для индикации чумного микроба – бактериофаги Покровской (П) и Л-413С; для идентификации возбудителя псевдотуберкулеза – псевдотуберкулезный бактериофаг [6].

Несмотря на многолетний опыт работы по выделению и изучению бактериофагов, конструированию и производству на их основе диагностических препаратов, коллекция фагов ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора для решения научно-производственных задач не в полной мере отвечает требованиям, предъявляемым к коллекциям бактериофагов как к фонду штаммов вирусов, организованному по признакам их происхождения, видового родства, способу воздействия на организм хозяина и поддерживаемому в жизнеспособном состоянии с сохранением исходных характеристик.

В связи с этим целью данной работы является приведение в соответствие с требованиями, изложенными в Постановлении Правительства РФ от 30 сентября 2021 г. № 1668, и в соответствии с Федеральным законом от 30 декабря 2020 г. № 492-ФЗ «О биологической безопасности в Российской Федерации» рабочей коллекции бактериофагов ФКУН Российский противочумный институт «Микроб», специфичных в отношении микроорганизмов I–III групп патогенности.

Материалы и методы

В работе использованы штаммы бактериофагов рабочей коллекции ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора.

В настоящее время фаги, находящиеся в рабочей коллекции, хранятся в жидком состоянии и ежегодно подвергаются обновлению маточного ма-

териала с обязательным контролем основных характеристик. Отсутствие стандартности питательных сред, используемых для поддержания жизнеспособности культур бактериофагов, приводит к снижению количественного показателя специфической активности и качественных показателей биологических свойств при хранении.

Первый этап исследования направлен на разработку технологии стабилизации свойств коллекционных штаммов монофагов. В предварительных экспериментах нами были определены количественные составы криопротектирующих сред для каждого монофага отдельно [7]. В работе для лиофилизации монофагов холерных использовали стабилизатор, состоящий из пептона 10 %, желатина 1,5 %, трегалозы 1 %. Для лиофилизации чумных псевдотуберкулезных монофагов применяли среду, содержащую в своем составе пептон 10 %, желатин 1,5 %, тиомочевину 1,5 %. Защитные среды обеспечивали сохранность показателя фаговых частиц на 75 и на 77 % соответственно, что позволяло осуществлять успешное воспроизводство бактериофага на протяжении всего срока экспериментального хранения – 7 лет при температуре от 4 до 8 °C.

В качестве метода стабилизации вирусного материала выбрана именно лиофилизация как метод, позволяющий максимально сохранить жизнеспособность бактериальных и вирусных культур, а также объем, исходную структуру материала и его первоначальные свойства как в процессе стабилизации, так и при последующем хранении [8, 9]. Образцы бактериофагов соединяли с соответствующей защитной средой в соотношении 1:1 и подвергали лиофилизации на сублимационной установке (Heto Power Dry PL 9000/50, Дания) в течение 36 ч при изменении температуры материала от минус (40±5) °C до (25±2) °C. В качестве альтернативного метода стабилизации использовали хранение монофагов при температуре минус 70 °C в низкотемпературном морозильнике (Thermo Scientific, США). В результате проведенных экспериментов отмечена стабильность свойств лиофилизированных образцов в течение 63 мес. vs 12 мес. при минус 70 °C.

Результаты и обсуждение

Одной из важных задач коллекционной деятельности является идентификация и паспортизация культур бактерий и вирусов, которые необходимы для использования в биотехнологической отрасли, а также для защиты авторских прав на штаммы, используемые в коммерческих целях. Исходя из требований, предъявляемых к паспортам бактериальных коллекционных штаммов, нами предложен вариант информационного поля, содержащего данные о коллекционных штаммах бактериофагов. Содержание паспорта включало видовое название штамма, описание способа его получения, а также информацию о культурально-морфологических свойствах, раз-

мерах, условиях сохранения, составе среды хранения и титре фага. Так как коллекция бактериофагов в основном состоит из производственных штаммов, на основе которых изготавливаются коммерческие серии диагностических препаратов, в паспорте указывали биологические свойства и производственные показатели фага (скорость адсорбции, длительность латентного периода и/или минимальный латентный период, его урожайность и множественность инфекции). Необходимо отметить, что форма паспорта подразумевает открытые поля, которые можно дополнять по мере получения новых данных. Так, например, после проведения полногеномного секвенирования в паспорт вносили информацию о размере генома и маркерных генетических детерминантах, определяющих различные процессы в жизненном цикле бактериофагов (гены рекомбиназ и белков сегрегации плазмид, гены вирулентности и т.д.). Наряду с этим, молекулярно-генетический анализ уточнял/определял таксономическое положение бактериофага и являлся одним из методов установления аутентичности объекта.

Следующий этап работы заключался в проведении процедуры авторского депонирования бактериофагов рабочей коллекции в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов Российского противочумного института «Микроб». Депонирование оригинальных производственных штаммов бактериофагов имеет большую значимость в связи с выполнением ряда важных функций: гарантирует сохранность уникальных фаговых изолятов; обеспечивает централизованную регистрацию, систематизацию и обогащение данных о бактериофагах; регулирует правовой статус бактериофагов и их доступность для научных исследований и иных применений; обеспечивает воспроизводимость исследований. Соответственно депонирование штаммов обеспечивает их систематизированное хранение, изучение и регулирующую доступность с защитой от несанкционированного использования [10].

Отобранные штаммы бактериофагов лиофилизировали по указанному выше режиму с использованием защитных сред по разработанным рецептурам. Каждый бактериофаг паспортизировали и осуществляли процедуру авторского депонирования в Государственную коллекцию патогенных бактерий ФКУН противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора.

Таким образом, рабочая коллекция бактериофагов, специфичных в отношении микроорганизмов I–III групп патогенности, приведена в соответствие с требованиями Федерального закона от 30 декабря 2020 г. № 492-ФЗ «О биологической безопасности в Российской Федерации» и Постановления Правительства РФ от 30 сентября 2021 г. № 1668 «Об утверждении Правил создания, пополнения, ведения и использования коллекций патогенных микроорганизмов и вирусов, а также Правил создания и ведения национального каталога коллекционных штаммов

патогенных микроорганизмов и вирусов». Наличие в арсенале экспериментально-производственных мощностей открытой пополняемой охарактеризованной рабочей коллекции бактериофагов способствует расширению возможностей использования фонда штаммов бактериальных вирусов при конструировании и производстве медицинских изделий для *in vitro* диагностики опасных инфекционных болезней и проведения научных изысканий различной направленности.

Работа выполнена в рамках НИР 89-2-21 «Научно-прикладные аспекты производства и совершенствования препаратов для иммунопрофилактики и диагностики опасных бактериальных и вирусных инфекций» (2021–2025 гг.).

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Финансирование. Авторы заявляют об отсутствии дополнительного финансирования при проведении данного исследования.

Список литературы

1. Зурабов А.Ю., Каркищенко Н.Н., Попов Д.В., Жиленков Е.Л., Попова В.М. Создание отечественной коллекции бактериофагов и принципы разработки лечебно-профилактических фаговых препаратов. *Биомедицина*. 2012; (1):134–8.
2. Гумаюнова К.С., Зинина О.С., Овчинникова М.В., Гаевская Н.Е., Синягина Ю.В., Никифоров А.К. Оценка результатов испытаний экспериментального фага для диагностики холеры эльтор. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова*. 2021; 17(4):34–40.
3. Давыдов Д.С., Парфенюк Р.Л., Дурманова З.В., Мовсесянц А.А. Основные требования к порядку ведения коллекций производственных штаммов бактериофагов. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2024; (4):146–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-4-146-149.
4. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., Осин А.В. Коллекционная деятельность в области использования патогенных микроорганизмов в обеспечении биологической безопасности Российской Федерации. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2016; 1(14): 37–46.
5. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. М.: ЗАО «Шико»; 2013. 560 с.
6. Синягина Ю.В., Овчинникова М.В., Зинина О.С., Гумаюнова К.С., Никифоров А.К. Современный обзор производства диагностических и лечебно-профилактических бактериофагов. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова*. 2022; 18(4):62–71.
7. Гумаюнова К.С., Овчинникова М.В., Зинина О.С., Синягина Ю.В., Малькова А.А., Комиссаров А.В., Синицына Н.В., Глазкова Е.А. Выбор среды стабилизации при лиофилизации маточных культур бактериофагов. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова*. 2024; 20(2):101–8.
8. Cagol N., Bonani W., Maniglio D., Migliaresi C., Motta A. Effect of cryopreservation on cell-laden hydrogels: Comparison of different cryoprotectants. *Tissue Engineering – Part C: Methods*. 2018; 24(1):20–31. DOI: 10.1089/ten.tec.2017.0258.
9. Gan K.H., Bruttini R., Crosser O.K., Liapis A.I. Freeze-drying of pharmaceuticals in vials on trays: effects of drying chamber wall temperature and tray side on lyophilization performance. *International Journal of Heat and Mass Transfer*. 2005; 48:1675–87.
10. Gracheva I.V., Plotnikov O.P., Osin A.V. Current state of microorganisms depositing procedure in collection centers. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2010; 1(103):11–7. DOI: 10.21055/0370-1069-2010-1(103)-11-17.
11. Gan K.H., Bruttini R., Crosser O.K., Liapis A.I. Freeze-drying of pharmaceuticals in vials on trays: effects of drying chamber wall temperature and tray side on lyophilization performance. *International Journal of Heat and Mass Transfer*. 2005; 48:1675–87.
12. Gracheva I.V., Plotnikov O.P., Osin A.V. Current state of microorganisms depositing procedure in collection centers. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2010; 1(103):11–7. DOI: 10.21055/0370-1069-2010-1(103)-11-17.
13. Zurabov A.Yu., Karkishchenko N.N., Popov D.V., Zhilenkov E.L., Popova V.M. Creation of a domestic collection of bacteriophages and principles of developing therapeutic and prophylactic phage preparations. *Biomeditsina [Biomedicine]*. 2012; (1): 134–8.
14. Gumayunova K.S., Zinina O.S., Ovchinnikova M.V., Gaevskaya N.E., Sinyagina Yu.V., Nikiforov A.K. Evaluation of the results of tests of an experimental phage for the diagnosis of El Tor cholera. *Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov*. 2021; 17(4):34–40.
15. Davydov D.S., Parfenyuk R.L., Durmanova Z.V., Movsesyants A.A. [Basic requirements for the procedure of maintaining collections of industrial strains of bacteriophages]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2024; (4):146–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-4-146-149.
16. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., Osin A.V. Collection activities in the field of using pathogenic microorganisms to ensure biological safety of the Russian Federation. *Infektsionnye Bolezni: Novosti, Mneniya, Obuchenie [Infectious Diseases: News, Opinions, Training]*. 2016; 1(14):37–46.
17. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. Laboratory Diagnostics of Dangerous Infectious Diseases. Practice Guidelines. Moscow: CJSC “Shiko”; 2013. 560 p.
18. Sinyagina Yu.V., Ovchinnikova M.V., Zinina O.S., Gumayunova K.S., Nikiforov A.K. A modern review of the production of diagnostic and therapeutic-prophylactic bacteriophages. *Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov*. 2022; 18(4):62–71.
19. Gumayunova K.S., Ovchinnikova M.V., Zinina O.S., Sinyagina Yu.V., Mal'kova A.A., Komissarov A.V., Sinitsyna N.V., Glazkova E.A. Selection of a stabilization medium for lyophilization of bacteriophage stock cultures. *Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov*. 2024; 20(2):101–8.
20. Cagol N., Bonani W., Maniglio D., Migliaresi C., Motta A. Effect of cryopreservation on cell-laden hydrogels: Comparison of different cryoprotectants. *Tissue Engineering – Part C: Methods*. 2018; 24(1):20–31. DOI: 10.1089/ten.tec.2017.0258.
21. Gan K.H., Bruttini R., Crosser O.K., Liapis A.I. Freeze-drying of pharmaceuticals in vials on trays: effects of drying chamber wall temperature and tray side on lyophilization performance. *International Journal of Heat and Mass Transfer*. 2005; 48:1675–87.
22. Gracheva I.V., Plotnikov O.P., Osin A.V. Current state of microorganisms depositing procedure in collection centers. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2010; 1(103):11–7. DOI: 10.21055/0370-1069-2010-1(103)-11-17.

Authors:

Gumayunova K.S., Ovchinnikova M.V., Chervyakova N.S., Zinina O.S., Glazkova E.A., Nikiforov A.K. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Об авторах:

Гумаюнова К.С., Овчинникова М.В., Червякова Н.С., Зинина О.С., Глазкова Е.А., Никифоров А.К. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.