МРНТИ 76.31.33 DOI: 10.58318/2957-5702-2025-24-44-54
Оригинальная статья

# КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ СЕРИЙ ПРЕПАРАТА ПРОТИВ ПАТОГЕНОВ ESKAPE

**Молдагулова С.У., Ұланқызы А., Джекебеков К.К., Наханова Г.Дж., Жақыпбек А.С., Өмуртай Ә.Д., Байсейт Т.И., Сырым Н.С., Еспембетов Б.А., Шораева К.А.***

ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», Национальный холдинг «QazBioPharm», Гвардейский, Республика Казахстан
* k.shorayeva@biosafety.kz.

**Аннотация.** Глобальный рост антибиотикорезистентности, особенно среди патогенов группы ESKAPE (Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa и Enterobacter cloacae), обусловливает необходимость разработки альтернативных антимикробных средств, к числу которых относится фаготерапия, основанная на использовании бактериофагов, способных специфически лизировать бактериальные клетки. Целью настоящего исследования являлся контроль качества экспериментальных серий препарата «Бактериофаг против патогенов ESKAPE», разработанного в ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» (Республика Казахстан). Объектом исследования служили три экспериментальные серии препарата (№0011224, №0021224, №0031224), для которых проведена оценка внешнего вида, извлекаемого объема, концентрации водородных ионов (pH), стерильности и специфической активности в отношении тест-культур группы ESKAPE в соответствии с требованиями СК-ESKAPE-ПР-23, Государственной фармакопеи Республики Казахстан и нормативных документов Евразийского экономического союза. Установлено, что все исследуемые серии соответствовали установленным требованиям качества, характеризовались стабильными физико-химическими показателями, подтвержденной стерильностью и высокой специфической активностью, сохранявшейся при разведениях до $10^{-7}$–$10^{-10}$. Полученные результаты свидетельствуют о стабильности, специфичности и соответствии экспериментальных серий установленным требованиям качества, что подтверждает перспективность дальнейшего изучения и внедрения данного фагопрепарата для профилактики и терапии инфекций, вызываемых антибиотикорезистентными патогенами группы ESKAPE.

**Ключевые слова:** бактериофаг, фаготерапия, ESKAPE, контроль качества, стерильность, специфическая активность.

## Введение

В условиях стремительного роста антибиотикорезистентности проблема лечения инфекций, вызванных мультирезистентными патогенами, приобретает всё большую актуальность. Особую обеспокоенность вызывает группа микроорганизмов, обозначаемая аббревиатурой ESKAPE (*Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa и Enterobacter cloacae*) [1]. Именно эти патогены наиболее часто ассоциированы с внутрибольничными инфекциями, устойчивы к широкому спектру антибиотиков и способны «ускользать» от действия существующих терапевтических средств, что и отражено в их названии [2].

Сложившаяся ситуация обусловливает необходимость поиска и внедрения альтернативных методов борьбы с бактериальными инфекциями. Одним из наиболее перспективных направлений в данной области является фаготерапия - применение бактериофагов, вирусов, специфически лизирующих бактериальные клетки. Преимуществами бактериофагов являются их видовая и штаммовая специфичность, способность к репликации в организме-хозяине и низкая токсичность. В условиях, когда эффективность традиционных антибиотиков снижается, фаготерапия рассматривается как реальная альтернатива в лечении инфекций, вызванных ESKAPE-патогенами [3,4].

На сегодняшний день в Республике Казахстан также ведутся работы по внедрению и развитию технологий производства бактериофагов, в том числе препаратов, направленных на лечение инфекций, вызванных патогенами группы ESKAPE [5,6,7,8]. Хотя промышленное производство фаговых препаратов находится на этапе становления, интерес к фаготерапии со стороны научных учреждений, фармацевтических компаний и системы здравоохранения постоянно растёт.

Как и в случае с другими биологическими лекарственными средствами, важнейшей задачей остаётся обеспечение стабильного качества, эффективности и безопасности бактериофагов. Отсутствие международных стандартов по контролю качества бактериофагов вносит дополнительные сложности в процесс их производства и регистрации. В этой связи особую актуальность приобретают национальные нормативные документы, методические рекомендации и локальные протоколы, направленные на стандартизацию процессов контроля качества и обеспечение воспроизводимости терапевтического эффекта [9,10,11,12].

Настоящая работа посвящена анализу существующих подходов к контролю качества экспериментальных серий бактериофагов, предназначенных для борьбы с инфекциями, вызванными патогенами ESKAPE-группы. В статье рассматриваются современные методы оценки активности фагов, особенности стандартизации многофаговых композиций, проблемы стабильности фаговых препаратов при хранении, а также пути повышения эффективности контроля качества на всех этапах производственного процесса.

Целью работы является выбор методов контроля качества бактериофагов, а именно препарата бактериофаг против патогенов ESKAPE, а также обеспечение надежности опытно-промышленных серий выпускаемых биопрепаратов, что является важным шагом на пути интеграции фаготерапии в современные медицинские технологии.

**Материалы и методы**

В качестве объекта исследования был использован препарат «Бактериофаг против патогенов ESKAPE», экспериментальные серии № 0011224, № 0021224 и № 0031224, изготовленные в ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» (далее НИИПББ). Препарат обладает способностью вызывать специфический лизис бактерий Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa и Enterobacter cloacae; препарат предназначен для перорального применения в объеме 90 (3 дозы по 30 мл) мл.

Оценка качества препарата проводилась в соответствии с требованиями внутреннего нормативного документа НИИПББ «Спецификация качества СК-ESKAPE-ПР-23» [13], регламентирующего показатели и методы контроля для препарата «Бактериофаг против патогенов ESKAPE».

Отбор проб осуществляли в соответствии с требованиями ГОСТ 18321-73 - «Статистический контроль качества. Методы случайного отбора выборок штучной продукции» [14] путем выполнения следующих мероприятий: из различных мест каждой серии осуществляли выборку в объеме, рассчитанном по формуле:

$n = 0{,}4\sqrt{N}$

где: $n$ - количество упаковок, флаконов (ампул), подлежащих контролю (объем выборки); $N$ - общее количество упаковок, флаконов (ампул) в серии;

- в соответствии со стандартом организации, отобранная выборка делили поровну: одну часть использовали для проведения лабораторных испытаний, вторая часть поставили на хранение в архив на срок 18 месяцев с соблюдением установленного температурного режима.

Определение внешнего вида препарата осуществляли в соответствии с требованиями ГФ РК том I, статья 2.2.1 [9].

Определение правильности упаковки и маркировки, внешнего вида, цвета, наличия посторонних примесей, плесени, трещин во флаконах лекарственного препарата «Бактериофаг против патогенов ESKAPE» серий № 0011224, №0021224, №0031224. Для определения внешнего вида, наличия посторонней примеси, плесени, изменения консистенции, трещин ампул проводили визуально в проходящем свете. Одновременно проверяли плотность укупорки флаконов.

Определение извлекаемого объема осуществляли следующим образом: из каждой серии вакцины отбирали три единицы флакона. Содержимое каждого флакона последовательно

переливали в сухой мерный цилиндр, калиброванный на объем заполнения 100 мл. После переливания каждого образца измеряли суммарный объем жидкости. Средний объем рассчитывали путем деления общего объема на количество исследованных флаконов. Расчет проводили с точностью до 0,01 мл [9].

Определение концентрации водородных ионов *(pH)* заключается в измерении разности потенциалов между двумя электродами pH-метра, погруженными в исследуемую пробу согласно ГФ РК том I, статья 2.2.3 [9]. Для анализа вакцины отбирали 20 см³ препарата из объединённой пробы, промытые электроды погружали в образец, и через 30 секунд фиксировали значение pH. При этом допускаемое расхождение между результатами не превышало 0,1 единицы pH.

Определение стерильности препарата проводили методом прямого посева согласно ГФ РК том I, статья 1, 2.6.1 [9] в соотношении 1:10 (одна часть препарата на десять частей питательной среды), используя объединённую асептически общую пробу из трёх и более флаконов; посев осуществляли отдельными стерильными пипетками на 6 пробирок с тиогликолевой средой (по 3 пробирки инкубировали при 30-35 °С и 20-25 °С соответственно) и 3 пробирки со средой на основе гидролизатов соевых бобов и казеина, которые инкубировали при 20-25 °С в течение 14 суток, с параллельным контролем стерильности питательных сред, которые инкубировали в тех же, условиях и в тех же сроках, что и испытуемые препараты.

Определение специфической активности препаратов оценивали методом Аппельмана (Рис. 1) [10]. Для оценки специфической способности лизировать бактерии были использованы тест-культуры: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter cloacae*. из коллекции НИИПББ. Испытания проводили с соблюдением правил асептики, в пробирках, содержащих по 4,5 мл питательного ГРМ-бульона, готовили ряд последовательных десятикратных разведений бактериофага от $10^{-1}$ до $10^{-10}$ с обязательной сменой одноразовой пипетки при каждом разведении. Для приготовления первого разведения добавили 0,5 мл образца препарата к 4,5 мл бульона.

В качестве контроля использовали пробирку с 4,5 мл бульона без фага. После этого во все пробирки с полученными разведениями бактериофага пипеткой вносили по 0,03 мл взвеси суточной агаровой культуры бактерии Enterococcus faecium, содержащей $10^9$ микробных клеток в 1 мл по стандарту мутности (10 МЕ). Так же испытание проводили для остальных бактерии Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa и Enterobacter cloacae. И инкубировали 18±1 ч при температуре 37±1 °С.

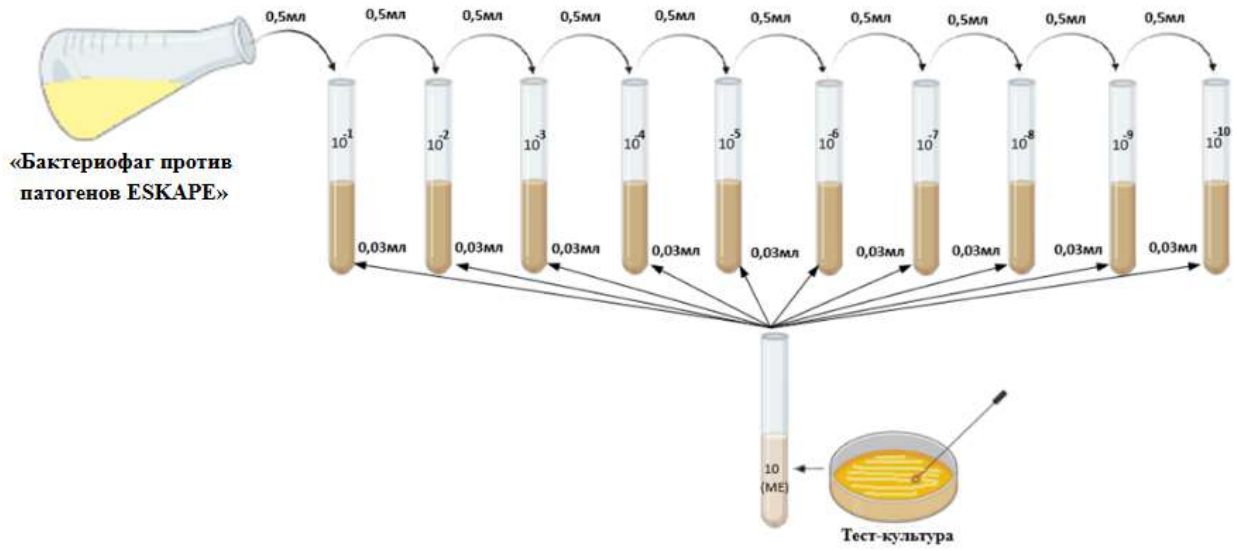



Рисунок 1. Схема определения подлинности по методу Аппельмана

Для статистической обработки данных использовали общепринятые методы математической статистики в соответствии с рекомендациями, изложенными в ГФ РК том I, статья 2.9.40 [9], а также требованиями ГОСТ 34100.3.1–2017 «Оценка качества. Статистические методы. Руководство

по выражению неопределенности измерений» [15]. Полученное среднее значение сравнивается с номинальным объемом, установленным в нормативной документации на препарат СК-ESKAPE-ПР-23 [13].

Расчеты включают:

Среднее значение:

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + x_3}{3}$$

Стандартное отклонение:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1}\sum(x_i + \bar{x})^2}$$

Стандартная неопределенность среднего:

$$u = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Расширенная неопределенность:

$$U = 2 * u$$

где коэффициент охвата k=2, соответствующий уровню доверия 95 % согласно [15].

Полученные значения сравнивали с нормативами, установленными в технической и фармакопейной документации ГФ РК, том 1, статья 2.9.17 [9]. При отклонении измеренных параметров от нормативных пределов более чем на предел расширенной неопределенности, результат оценивали как несоответствующий требованиям [15].

Для построения доверительных интервалов и оценки надежности результатов использовали табличные значения t-критерия Стьюдента при соответствующем числе степеней свободы (n – 1) и уровне значимости α = 0,05.

**Результаты**

При визуальном осмотре флаконов всех трех серий препарата «Бактериофаг против патогенов ESKAPE» не выявил дефектов упаковки, изменения цвета. Все флаконы были герметично укупорены, обеспечивая сохранность состава, так же определили следующие характеристики: прозрачная жидкость светло-желтоватого оттенка, без признаков посторонней примеси, плесени или трещин на флаконе. Препарат расфасован в флаконы объёмом 100 мл из бесцветного стекла, заполняемые на 90 мл (3 дозы). Каждый флакон укупорен резиновой пробкой серого цвета и обкатывается металлическим колпачком типа «Flip Off» синего цвета. На каждом флаконе имеется самоклеящаяся этикетка, выполненная из этикеточной бумаги. В коробке прилагается инструкция по применению на русском и государственном языке.

На следующем этапе проводили определение извлекаемого объема препарата, результаты которого представлены в таблице 1.

Таблица 1. Результаты извлекаемого объема препарата «Бактериофаг против патогенов ESKAPE»

| Наименование материала | Повторность | Объем, мл | Ср. знач. мл | Стандартное отклонение | Стандартная неопределённость среднего | Расширенная неопределённость |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | $\bar{x}$ | $s$ | $u$ | $U$ |
| Бактериофаг против патогенов ESKAPE, серия №0011224 | 1 | 90,2 | 90,23 | 0,057735027 | 1,732050808 | 0,066 |
| | 2 | 90,2 | | | | |
| | 3 | 90,3 | | | | |
| Бактериофаг против патогенов ESKAPE, серия №0021224 | 1 | 90,2 | 90,27 | 0,057735027 | 1,732050808 | 0,066 |
| | 2 | 90,3 | | | | |
| | 3 | 90,3 | | | | |
| Бактериофаг против патогенов ESKAPE, серия №0031224 | 1 | 90,3 | 90,23 | 0,057735027 | 1,732050808 | 0,066 |
| | 2 | 90,2 | | | | |
| | 3 | 90,2 | | | | |

Анализ данных таблицы 1 показал, что извлекаемый объем препарата исследуемых серий бактериофага против патогенов ESKAPE полностью отвечают требованиям СК-ESKAPE-ПР-23 [13], а также соответствует требованиям ГФ РК Т1 2.9.17 [9]. Средний извлекаемый объем каждой серии соответствовал нормативным значениям с незначительными отклонениями в пределах допустимой погрешности, что подтверждает стабильность дозирования. Среднее значение объема не ниже номинального 90 мл при значениях неопределенности не более ±0,066 мл с доверительной вероятностью 95 %.

Далее была проведена оценка концентрации водородных ионов (pH) в испытуемых пробах препарата, результаты которой приведены в таблице 2.

Таблица 2. Результаты концентрации водородных ионов (pH) «Бактериофаг против патогенов ESKAPE»

| Наименование материала | Повторность | Объем, мл | Ср. знач. мл | Стандартное отклонение | Стандартная неопределённость среднего | Расширенная неопределённость |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | $\bar{x}$ | $s$ | $u$ | $U$ |
| Бактериофаг против патогенов ESKAPE, серия №0011224 | 1 | 7,43 | 7,43 | 0,015275252 | 0,001393601 | 0,002787203 |
| | 2 | 7,42 | | | | |
| | 3 | 7,45 | | | | |
| Бактериофаг против патогенов ESKAPE, серия №0021224 | 1 | 7,44 | 7,44 | 0,005773503 | 0,001395476 | 0,002790952 |
| | 2 | 7,44 | | | | |
| | 3 | 7,45 | | | | |
| Бактериофаг против патогенов ESKAPE, серия №0031224 | 1 | 7,40 | 7,40 | 0,005773503 | 0,001387977 | 0,002775954 |
| | 2 | 7,41 | | | | |
| | 3 | 7,40 | | | | |

Согласно полученным данным из таблицы 2 видно, что среднее значение pH для первой экспериментальной серии №0011224 составляет 7,43, тогда как, для экспериментальной серии №0021224 – 7,44, а для №0031224 – 7,40. Значения pH всех серий находятся в пределах физиологической нормы согласно требований СК-ESKAPE-ПР-23, что подтверждает их стабильность. Также, указана неопределенность измерений, которая составляет ±0,0028 для серий №0011224 и №0021224, и ±0,0027 для серии №0031224. Полученные данные свидетельствуют о высокой воспроизводимости полученных результатов.

На последующем этапе испытания была проведена оценка стерильности препарата. Результаты стерильности испытуемых проб экспериментальных серий препарата на тиогликолевой среде и среде Сабуро при температурных режимах 30-35 °С и 20-25 °С, продемонстрировали полное отсутствие роста микроорганизмов на питательных средах в течение всего периода инкубаций, что подтверждает отсутствие бактериальных загрязнений**.** По итогам проведенного нами испытания все исследованные экспериментальные серии препарата признаны стерильными и соответствует требованиям СК-ESKAPE-ПР-23 [13].

Полученные результаты по оценке специфической активности бактериофагов, входящих в состав препарата представлены в таблице 3. Определение специфической активности проводили для трех экспериментальных серий препарата в трехкратной постановке для каждой тест-культуры. Учет результатов определяли по отсутствию видимого роста бактерий в присутствии бактериофага. Специфичность бактериофага была выражена в виде отрицательной степени десяти, соответствующей наибольшему разведению, при котором визуально не наблюдался рост контрольного штамма; для оценки стабильности лизиса инкубацию продлевали до 2 суток.

Таблица 3. Результаты специфической активности препарата «Бактериофаг против патогенов ESKAPE» по методу Аппельмана

| | Бактериофаг против патогенов ESKAPE, серия № | **«Бактериофаг против патогенов ESKAPE», 3 серии, в трех повторностях** | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | $10^{-1}$ -$10^{-6}$ | $10^{-7}$ | $10^{-8}$ | $10^{-9}$ | $10^{-10}$ |
| *Enterococcus faecium* | №0011224 | - - - | +++ | +++ | +++ | +++ |
| | №0021224 | - - - | +++ | +++ | +++ | +++ |
| | №0031224 | - - - | +++ | +++ | +++ | +++ |
| *Staphylococcus aureus* | №0011224 | - - - | - - - | +++ | +++ | +++ |
| | №0021224 | - - - | - - - | +++ | +++ | +++ |
| | №0031224 | - - - | - - - | +++ | +++ | +++ |
| *Klebsiella pneumoniae* | №0011224 | - - - | - - - | - - - | - - - | +++ |
| | №0021224 | - - - | - - - | - - - | - - - | +++ |
| | №0031224 | - - - | - - - | - - - | - - - | +++ |
| *Acinetobacter baumannii* | №0011224 | - - - | +++ | +++ | +++ | +++ |
| | №0021224 | - - - | +++ | +++ | +++ | +++ |
| | №0031224 | - - - | +++ | +++ | +++ | +++ |
| *Pseudomonas aeruginosa* | №0011224 | - - - | - - - | - - - | +++ | +++ |
| | №0021224 | - - - | - - - | +++ | +++ | +++ |
| | №0031224 | - - - | - - - | - - - | +++ | +++ |
| *Enterobacter cloacae* | №0011224 | - - - | - - - | +++ | +++ | +++ |
| | №0021224 | - - - | - - - | - - - | +++ | +++ |
| | №0031224 | - - - | - - - | - - - | +++ | +++ |
| Примечание: – отсутствие роста микробов в пробирке;<br>+ наличие роста микробов в пробирке. | | | | | | |

Как видно из результатов таблицы 3, препарат продемонстрировал высокую эффективность подавлять рост основных представителей группы патогенов ESKAPE при различных разведениях ($10^{-1}$ -$10^{-10}$). Для *Enterococcus faecium и Acinetobacter baumannii* было отмечено подавление роста до разведения $10^{-6}$, при более высоких разведениях ($10^{-7}$ и выше) наблюдается рост микробов, что указывает на снижение концентрации активных фагов. Для *Staphylococcus aureus* препарат сохраняет эффективность вплоть до разведения 10-7, тогда как для Klebsiella pneumoniae эффективное подавление наблюдается до разведения 10-9 включительно, что демонстрируют устойчивость при более высоких разведениях. Для Pseudomonas aeruginosa и Enterobacter cloacae подавление роста бактерий наблюдалось преимущественно до разведений $10^{-7}$–$10^{-8}$, тогда как при более высоких разведениях фиксировался рост микробных клеток.

Таким образом, полученные данные подтверждают высокую специфическую активность препарата «Бактериофаг против патогенов ESKAPE» в отношении целевых бактерий и свидетельствуют о стабильности качества препарата в трёх разных экспериментальных сериях производства.

**Обсуждение**

В ходе исследования были проведены комплексные испытания препарата «Бактериофаг против патогенов ESKAPE» на соответствие установленным требованиям спецификации качества СК-ESKAPE-ПР-23 [13]. Сильной стороной данного исследования является использование сразу трёх экспериментальных серий, что позволяет оценить межсерийную вариабельность и служит дополнительным подтверждением стабильности и качества выпускаемой продукции [16].

Стоит отметить, что препарат соответствует требованиям по физико-химическим параметрам (табл. 1, 2), в частности по уровню pH (7,0–7,1), что имеет важное значение для обеспечения стабильности бактериофагов. Отсутствие посторонних примесей и подтверждённая стерильность свидетельствуют о микробиологической безопасности препарата, что является критически важным условием его потенциального клинического применения [17]. Важным аспектом обеспечения биобезопасности при разработке и производстве фаговых препаратов является контроль возможной бактериальной контаминации на всех этапах технологического процесса. Кроме того, в современной практике разработки фаготерапевтических средств значительное внимание уделяется генетической характеристике бактериофагов, включая анализ их геномов на предмет отсутствия

генов вирулентности, токсинов и детерминант антибиотикорезистентности. Такие подходы рассматриваются как важный элемент обеспечения безопасности и эффективности фаговых препаратов [18,19].

Как известно из литературных источников, одним из ключевых показателей качества жидких лекарственных форм, включая бактериофаги, является извлекаемый объём, отражающий точность дозирования и соблюдение надлежащей производственной практики (GMP) [12]. Согласно требованиям спецификации качества на препарат «Бактериофаг против патогенов ESKAPE» [13], извлекаемый объем во флаконе должен составлять 90±0,5 мл, а значения расширенной неопределённости измерений - не превышать ±0,066 мл при доверительной вероятности 95 %, что подтвердилась результатами настоящего испытания, проведенного с использованием трех экспериментальных серий препарата.

Особый интерес представляет анализ специфической активности препарата в отношении представителей ESKAPE-группы, поскольку именно эти микроорганизмы представляют наибольшую угрозу в связи с их устойчивостью к большинству антибиотиков [20,21]. В настоящей работе было установлено, что испытуемый препарат демонстрирует высокую специфическую активность против всех шести тест-культур, входящих в группу ESKAPE (Табл. 3). При этом, наивысшая активность зафиксирована в отношении *Klebsiella pneumoniae* (до разведения $10^{-10}$), что имеет важное клиническое значение, учитывая распространённость карбапенем-резистентных штаммов этого возбудителя. А умеренная активность зафиксирована против *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus* и *Acinetobacter baumannii* (титр до $10^{-7}$-$10^{-8}$), что также соответствует требованиям к спецификации качества на препарат «Бактериофаг против патогенов ESKAPE» [13].

Сравнение между тремя сериями показало высокую воспроизводимость и стабильность состава препарата, поскольку вариации титров между сериями находятся в пределах одну логарифмической единицы (эквивалентно разнице не более чем в 10 раз по количеству активных фагов), что указывает на надёжность производственного процесса и консистентности фаговой композиции [22,23]. Данные результаты поддерживают эффективность фаготерапии как альтернативы традиционной антибиотикотерапии в условиях растущей антибиотикорезистентности [24].

Результаты оценки качества экспериментальных серий препарата «Бактериофаг против патогенов ESKAPE» подтверждают его соответствие установленным стандартам. Высокая специфическая активность, стабильный pH, стерильность и надлежащее качество упаковки свидетельствуют о готовности препарата к дальнейшему применению в практике фаготерапии для борьбы с патогенами группы ESKAPE.

**Заключение**

Результаты испытуемых серии препарата «Бактериофаг против патогенов ESKAPE» № 0011224, № 0021224 и № 0031224 по извлекаемому объему составили 90,23, 90,27 и 90,23, соответственно при неопределенности ±0,066; значения pH составили 7,43, 7,44 и 7,40, соответственно при неопределенности ±0,0028; по стерильности подтверждает отсутствие бактериальных загрязнений; подтверждают высокую специфическую активность препарата в отношении тест-культур группы ESKAPE.

Таким образом, полученные результаты испытания препарата подтверждают, что все исследуемые серий Бактериофага против патогенов ESKAPE соответствуют требованиям спецификации качества СК-ESKAPE-ПР-23 [13] разработчика по параметрам внешний вид, извлекаемый объём, уровень pH, стерильность и специфическая активность.

**Финансирование**

Работа выполнена в рамках научно-технической программы ИРН BR218004/0223 «Совершенствование мер обеспечения биологической безопасности в Казахстане: противодействие опасным и особо опасным инфекциям» на 2024 год. Работа выполнена при финансовой поддержке Комитета науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан. Финансовая поддержка включала обеспечение экспериментальной базы, проведение лабораторных исследований и анализ полученных данных.

**Благодарность**

Авторы выражают искреннюю благодарность сотрудникам лаборатории «Микробиология» ТОО «Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности» за участие в

проведении экспериментальных исследований, техническую поддержку и помощь в лабораторных исследованиях.

**Конфликт интересов:** Конфликт интересов не заявлен.

**Литература**


1. Santajit S., Indrawattana N. Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens // BioMed Research International. — 2016. — Vol. 2016. — Art. ID 2475067. https://doi.org/10.1155/2016/2475067.

2. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019. — Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC, 2019. — 148 p.

3. Kortright K. E., Chan B. K., Koff J. L., Turner P. E. Phage therapy: A renewed approach to combat antibiotic-resistant bacteria // Cell Host & Microbe. — 2019. — Vol. 25, No. 2. — P. 219–232.

4. Ragupathi N. K. D., Sethuvel D. P. M., Gopikrishnan M., Dwarakanathan H. T., Murugan D., Biswas I., Bakthavachalam Y. D. et al. Phage based therapy against biofilm producers in gram negative ESKAPE pathogens // Microbial Pathogenesis. — 2023. — Vol. 178. — Art. 106029. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023.106064.

5. Еспембетов Б. А., Булатов Е. А., Сармыкова М. К., Серікбай Е. Б., Самбетбаев А. А. Выделение бактериофагов против возбудителя мыта лошадей Streptococcus equi и изучение их биологических свойств // Izdenister Natigeler. — 2021. — № 2 (90). — С. 17–26. https://doi.org/10.37884/2-2021/2.

6. Еспембетов Б. А., Сармыкова М. К., Нуртаева С. Б. Бактериофаг для лечения мыта лошадей // Ғылым және білім. — 2023. — Т. 2, № 2. — С. 11–21. https://doi.org/10.52578/2305-9397-2023-2-2-11-21.

7. Еспембетов Б. А., Сырым Н. С., Исабеков С. С. Анализ циркуляции условно-патогенной микрофлоры и эффективность дезинфекционных мероприятий препаратом «Полифаг» в убойном пункте ТОО «Кордай-Инвест» // Izdenister Natigeler. — 2023. — № 1 (89). — С. 13–22. https://doi.org/10.37884/3-2022/02.

8. Искакова Ж. Ж., Ахметова Г. Ж., Турумтаева Л. С., Искакова А. С. Бактериофаги в лечении и профилактике инфекций, вызванных устойчивыми к антибиотикам микроорганизмами // Вестник Казахского национального медицинского университета им. С. Д. Асфендиярова. — 2022. — № 4 (88). — С. 63–68.

9. Государственная фармакопея Республики Казахстан. Национальный центр экспертизы лекарственных средств и изделий медицинского назначения и медицинской техники. — [Электронный ресурс]. — Режим доступа: https://www.ndda.kz

10. Решение Совета ЕЭК от 04.07.2023 № 77 «О внесении изменений в Правила проведения исследований биологических лекарственных средств ЕАЭС». — С. 149.

11. ISO 10705-4:2001. Water quality — Detection and enumeration of bacteriophages — Part 4: Enumeration of bacteriophages infecting Bacteroides fragilis. — Актуализированная версия, подтверждённая в 2024 г.

12. Good Manufacturing Practice (GMP) — Стандарты надлежащей производственной практики для терапевтических продуктов, включая бактериофаги.

13. СК-ESKAPE-ПР-23. Спецификация качества препарата «Бактериофаг против патогенов ESKAPE». — Внутренний нормативный документ ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности».

14. ГОСТ 18321-73. Статистический контроль качества. Методы случайного отбора выборок штучной продукции. — Межгосударственный стандарт.

15. ГОСТ 34100.3.1–2017 (ISO/IEC Guide 98-3:2008). Неопределенность измерений. Ч. 3. Руководство по выражению неопределенности измерений (GUM). Дополнение 1. — М.: Стандартинформ, 2017.

16. El-Sagheer R. M., Mahmoud M. A. W., Mansour M. M. M., Aboshady M. S. On the comparison between the reliability of units produced by different production lines // 2022. — [Электронный ресурс].

17. Бочкарева С. С. Конструирование препаратов бактериофагов и клинико-иммунологические аспекты фаготерапии и фагопрофилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи: дис.— Москва, 2022. — 274 с.

18. Pirnay J.-P., Verbeken G., Ceyssens P.-J., Huys I., De Vos D., Ameloot C., Fauconnier A. The magistral phage // Viruses. — 2018. — Vol. 10, No. 2. — Art. 64. — DOI: https://doi.org/10.3390/v10020064

19. Погожова М. П., Гаевская Н. Е., Водопьянов А. С., Писанов Р. В., Аноприенко А. О., Романова Л. В., Тюрина А. В.Биологические свойства и генетическая характеристика экспериментальных диагностических бактериофагов Vibrio cholerae // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2021. Т. 98, № 3. С. 290–297. https://doi.org/10.36233/0372-9311-39

20. Abduljaba M. H., Salih T. S. Antimicrobial activity of ten local actinobacterial strains against ESKAPE, Bacillus subtilis and Pseudomonas baetica pathogens // South Asian Journal of Research in Microbiology. — 2022. — Vol. 10, No. 4. — P. 1–9. DOI:10.9734/sajrm/2022/v13i4253.

21. Rice L. B. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE // The Journal of Infectious Diseases. — 2008. — Vol. 197, No. 8. — P. 1079–1081. https://doi.org/10.1086/533452.

22. Mutti M., Corsini L. Robust approaches for the production of active ingredient and drug product for human phage therapy // Frontiers in Microbiology. — 2019. — Vol. 10. — Art. 2289.

23. Duyvejonck H., Merabishvili M., Briers Y., Vaneechoutte M., Pirnay J. P. Evaluation of the stability of bacteriophages in different solutions suitable for the production of magistral preparations in Belgium // Viruses. — 2021. — Vol. 13, No. 5. — P. 865. https://doi.org/10.3390/v13050865.

24. Liu C., Hong Q., Chang R. Y. K., Kwok P. C. L., Chan H.-K. Phage-antibiotic therapy as a promising strategy to combat multidrug-resistant infections and to enhance antimicrobial efficiency // Pharmaceutics. — 2022. — Vol. 14, No. 5. — P. 570. https://doi.org/10.3390/antibiotics11050570.

**References**

1. Santajit S., Indrawattana N. Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens // BioMed Research International. — 2016. — Vol. 2016. — Art. ID 2475067. https://doi.org/10.1155/2016/2475067.

2. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019. — Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC, 2019. — 148 p.

3. Kortright K. E., Chan B. K., Koff J. L., Turner P. E. Phage therapy: A renewed approach to combat antibiotic-resistant bacteria // Cell Host & Microbe. — 2019. — Vol. 25, No. 2. — P. 219–232.

4. Ragupathi N. K. D., Sethuvel D. P. M., Gopikrishnan M., Dwarakanathan H. T., Murugan D., Biswas I., Bakthavachalam Y. D. et al. Phage based therapy against biofilm producers in gram negative ESKAPE pathogens // Microbial Pathogenesis. — 2023. — Vol. 178. — Art. 106029. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023.106064.

5. Yspembetov B. A., Bulatov E. A., Sarmykova M. K., Serikbai E. B., Sambetbaev A. A. Isolation of bacteriophages against Streptococcus equi, the causative agent of equine strangles, and study of their biological properties // Izdenister Natigeler (Research Results). — 2021. — No. 2 (90). — P. 17–26. https://doi.org/10.37884/2-2021/2.

6. Yspembetov B. A., Sarmykova M. K., Nurtaeva S. B. Bacteriophage for the treatment of equine strangles // Gylym zhane Bilim (Science and Education). — 2023. — Vol. 2, No. 2. — P. 11–21. https://doi.org/10.52578/2305-9397-2023-2-2-11-21.

7. Yspembetov B. A., Syrym N. S., Isabekov S. S. Analysis of the circulation of opportunistic microflora and the effectiveness of disinfection measures using the preparation "Polifag" at the slaughter station of LLP "Kordai-Invest" // Izdenister Natigeler (Research Results). — 2023. — No. 1 (89). — P. 13–22. https://doi.org/10.37884/3-2022/02.

8. Iskakova Zh. Zh., Akhmetova G. Zh., Turumtaeva L. S., Iskakova A. S. Bacteriophages in the treatment and prevention of infections caused by antibiotic-resistant microorganisms // Bulletin of the Kazakh National Medical University named after S. D. Asfendiyarov. — 2022. — No. 4 (88). — P. 63–68.

9. State Pharmacopoeia of the Republic of Kazakhstan. National Center for Expertise of Medicines, Medical Devices and Medical Equipment. — [Electronic resource]. — Available at: https://www.ndda.kz.

10. Decision of the EEC Council dated 04.07.2023 No. 77 "On amendments to the Rules for conducting studies of biological medicinal products of the EAEU". — P. 149.

11. ISO 10705-4:2001. Water quality — Detection and enumeration of bacteriophages — Part 4: Enumeration of bacteriophages infecting Bacteroides fragilis. — Updated version confirmed in 2024

12. Good Manufacturing Practice (GMP) — Good Manufacturing Practice Standards for Therapeutic Products, Including Bacteriophages.
13. SK-ESKAPE-PR-23. Quality specification of the ESKAPE bacteriophage against pathogens. — Internal regulatory document of the Research Institute of Biological Safety Problems LLP.
14. GOST 18321-73. Statistical Quality Control. Methods of Random Sampling of Unit Products. — Interstate Standard.
15. GOST 34100.3.1–2017 (ISO/IEC Guide 98-3:2008). Measurement Uncertainty. Part 3. Guide to the Expression of Measurement Uncertainty (GUM). Supplement 1. — Moscow: Standartinform, 2017.
16. El-Sagheer R. M., Mahmoud M. A. W., Mansour M. M. M., Aboshady M. S. On the comparison between the reliability of units produced by different production lines // 2022. — [Electronic resource].
17. Bochkareva S. S. Construction of bacteriophage preparations and clinical and immunological aspects of phage therapy and phage prophylaxis of medical care-related infections: dissertation. Moscow, 2022. — 274 p.
18. Pirnay J.-P., Verbeken G., Ceyssens P.-J., Huys I., De Vos D., Ameloot C., Fauconnier A. The magistral phage // Viruses. — 2018. — Vol. 10, No. 2. — Art. 64. — DOI: https://doi.org/10.3390/v10020064
19. Pogozhova M. P., Gaevskaya N. E., Vodop'yanov A. S., Pisanov R. V., Anoprienko A. O. Romanova L. V., Tyurina A. V. Biologicheskie svoystva i geneticheskaya kharakteristika eksperimental'nykh diagnosticheskikh bakteriofagov Vibrio cholerae [Biological properties and genetic characterization of experimental diagnostic bacteriophages Vibrio cholerae] // Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii. — 2021. — Vol. 98, No. 3. — P. 290–297. — DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-39
20. Abduljaba M. H., Salih T. S. Antimicrobial activity of ten local actinobacterial strains against ESKAPE, Bacillus subtilis and Pseudomonas baetica pathogens // South Asian Journal of Research in Microbiology. — 2022. — Vol. 10, No. 4. — P. 1–9. DOI:10.9734/sajrm/2022/v13i4253.
21. Rice L. B. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE // The Journal of Infectious Diseases. — 2008. — Vol. 197, No. 8. — P. 1079–1081. https://doi.org/10.1086/533452.
22. Mutti M., Corsini L. Robust approaches for the production of active ingredient and drug product for human phage therapy // Frontiers in Microbiology. — 2019. — Vol. 10. — Art. 2289.
23. Duyvejonck H., Merabishvili M., Briers Y., Vaneechoutte M., Pirnay J. P. Evaluation of the stability of bacteriophages in different solutions suitable for the production of magistral preparations in Belgium // Viruses. — 2021. — Vol. 13, No. 5. — P. 865. https://doi.org/10.3390/v13050865.
24. Liu C., Hong Q., Chang R. Y. K., Kwok P. C. L., Chan H.-K. Phage-antibiotic therapy as a promising strategy to combat multidrug-resistant infections and to enhance antimicrobial efficiency // Pharmaceutics. — 2022. — Vol. 14, No. 5. — P. 570. https://doi.org/10.3390/antibiotics11050570.

## ESKAPE ПАТОГЕНДЕРІНЕ ҚАРСЫ ПРЕПАРАТТАРДЫҢ ЭКСПЕРИМЕНТТІК СЕРИАЛАРЫНЫҢ САПАСЫН БАҚЫЛАУ

**Молдагулова С.Ұ., Ұланқызы А., Джекебеков К.К., Наханова Г.Ж., Жақыпбек А.С., Өмуртай Ә.Д., Байсейт Т.И., Сырым Н.С., Еспембетов Б.А., Шораева К.А.***
«Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты» ЖШС, «QazBioPharm» ұлттық холдингі, Гвардейский, Қазақстан Республикасы
* k.shorayeva@biosafety.kz.

**Аннотация.** Антибиотиктерге төзімділіктің жаһандық деңгейде артуы, әсіресе ESKAPE тобына жататын патогендердің (Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa және Enterobacter cloacae) кең таралуы, баламалы антимикробтық тәсілдерді әзірлеудің өзектілігін арттыруда. Осындай перспективалы бағыттардың бірі - бактериялық жасушаларды спецификалық лизиске ұшыратын бактериофагтарды қолдануға негізделген фаготерапия. Осы зерттеудің мақсаты Қазақстан Республикасы, «Биологиялық қауіпсіздік проблемалары ғылыми-зерттеу институты» ЖШС-де әзірленген «ESKAPE

патогендеріне қарсы бактериофаг» препаратының эксперименттік сериялардың сапа көрсеткіштерін бағалау болды. Зерттеу объектісі ретінде препараттың үш эксперименттік сериясы (№0011224, №0021224, №0031224) алынды, олар үшін сыртқы түрі, алынатын көлемі, сутегі иондарының концентрациясы (pH), стерильдігі және ESKAPE тобының тест-дақылдарына қатысты спецификалық белсенділігі СК-ESKAPE-ПР-23 талаптарына, Қазақстан Республикасының Мемлекеттік фармакопеясына және Еуразиялық экономикалық одақтың биологиялық дәрілік препараттарға қойылатын нормативтік талаптарына сәйкес бағаланды. Зерттеу нәтижелері барлық сериялардың белгіленген сапа талаптарына сәйкес келетінін, тұрақты физика-химиялық көрсеткіштерге, расталған стерильдікке және $10^{-7}$–$10^{-10}$ дейінгі сұйылтуларда сақталатын жоғары спецификалық белсенділікке ие екенін көрсетті. Алынған деректер зерттелген фагопрепараттың сапа талаптарына сәйкестігін, тұрақтылығы мен биологиялық тиімділігін растайды және антибиотиктерге төзімді ESKAPE патогендері тудыратын инфекциялардың алдын алу мен емдеуде қолданудың перспективалы екенін көрсетеді.

**Кілт сөздер:** бактериофаг, фаготериапия, ESKAPE, сапаны бақылау, стерилдік, спецификалық белсенділік.

## QUALITY CONTROL OF EXPERIMENTAL BATCHES OF THE PREPARATION AGAINST ESKAPE PATHOGENS

**Moldagulova S.U., Ulankyzy A., Jekebekov K.K., Nakhanova G.ZH., Zhakypbek A.S., Omurtay A.D., Baiseit T.I., Syrym N.S., Yespembetov B.A., Shorayeva K.A.***

LLP «Research Institute for Biological Safety Problems», National holding «QazBioPharm», Guardeyskiy, Republic of Kazakhstan

***** k.shorayeva@biosafety.kz.

**Annotation.** The global increase in antibiotic resistance, particularly among pathogens of the ESKAPE group (Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa, and Enterobacter cloacae), highlights the urgent need for alternative antimicrobial approaches. One promising strategy is phage therapy, which involves the use of bacteriophages capable of specifically lysing bacterial cells. The aim of this study was to evaluate the quality parameters of experimental batches of the preparation “Bacteriophage against ESKAPE pathogens,” developed at the Research Institute for Biological Safety Problems LLP, Republic of Kazakhstan. Three experimental batches of the preparation (No. 0011224, No. 0021224, No. 0031224) were examined for appearance, extractable volume, hydrogen ion concentration (pH), sterility, and specific activity against ESKAPE test cultures in accordance with SK-ESKAPE-PR-23 requirements, the State Pharmacopoeia of the Republic of Kazakhstan, and regulatory guidelines of the Eurasian Economic Union for biological medicinal products. The results demonstrated that all batches met the established quality requirements, showing stable physicochemical properties, confirmed sterility, and high specific activity maintained at dilutions up to $10^{-7}$–$10^{-10}$. These findings confirm the stability, quality, and biological efficacy of the investigated bacteriophage preparation and support its potential for further development and application in the prevention and treatment of infections caused by antibiotic-resistant ESKAPE pathogens.

**Keywords:** bacteriophage, phage therapy, ESKAPE, quality control, sterility, specific activity.