

ISSN 2707-7241
EISSN 2957-5702



Қазақстан Республикасы
Денсаулық сақтау министрлігі
«Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының
ғылыми-зерттеу институты»
шаруашылық жүргізу құқығындағы
республикалық мемлекеттік кәсіпорыны

Республиканское государственное предприятие
на праве хозяйственного ведения
«Научно-исследовательский институт проблем
биологической безопасности»
Министерство здравоохранения
Республики Казахстан

The Republican Government Enterprise
on the basis of economic control rights
«Research Institute for
Biological Safety Problems»
Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan

Ғылыми журнал
**БИОҚАУІПСІЗДІК
ЖӘНЕ БИОТЕХНОЛОГИЯ**

Научный журнал
**БИОБЕЗОПАСНОСТЬ
И БИОТЕХНОЛОГИЯ**

The scientific journal
**BIOSAFETY AND
BIOTECHNOLOGY**

2020 ЖЫЛДАН ШЫҒА БАСТАҒАН
ИЗДАЕТСЯ С 2020 ГОДА
PUBLISHED SINCE 2020

2022 • 12

Бас редакторы
б.ғ.д., профессор, ҚР ЖҒА академигі **К.Д. Закарья**

Редакция алқасы:

Абдураимов Е.О. в.ғ.д., проф. (Қазақстан),
бас ред. орынбасары, *h-index: WoS – 5, Scopus – 4*
Биологиялық қауіпсіздік және биологиялық қорғау
Faez Awad, PhD (Ливия), *h-index: Scopus – 3*
Орынбаев М.Б. в.ғ.к., проф., ҚР ҰҒА корр.-мүшесі
(Қазақстан), *h-index: WoS – 7, Scopus – 8*
**Эпидемиология эпизоотология, микробиология,
вирусология, иммунология, микология**
Еспембетов Б.А., в.ғ.д., проф. (Қазақстан),
h-index: WoS – 6, Scopus – 6
Жүгүнісов Қ.Д., PhD (Қазақстан),
h-index: WoS – 3, Scopus – 4
Нұрғазиев Р.З., в.ғ.д., проф. (Қырғызстан),
h-index: Scopus – 4
Ветеринариялық биотехнология
Risatti G., PhD, проф. (АҚШ),
h-index: WoS – 27, Scopus – 27
Қошеметов Ж.Қ., б.ғ.д., проф. (Қазақстан),
h-index: WoS – 2, Scopus – 3
Медициналық биотехнология
Olivier G., PhD, (Франция), *h-index: WoS – 3, Scopus – 3*
Айқымбаев А.М., м.ғ.д., проф. (Қазақстан),
h-index: WoS – 7, Scopus – 5
Червякова О.В., б.ғ.к., проф. (Қазақстан),
h-index: WoS – 4, Scopus – 5
Стукова М.А., м.ғ.к. (Ресей), *h-index: WoS – 9, Scopus – 11*
Фитопатология және өсімдіктер биотехнологиясы
Рсалиев А.С., а-ш.ғ.к., проф. (Қазақстан),
h-index: WoS – 4, Scopus – 5
Гультяева Е.И., б.ғ.д., доцент (Ресей),
h-index: WoS – 8, Scopus – 9
Молекулалық генетика
Айтназаров Р.Б., б.ғ.к., (Ресей),
h-index: WoS – 6, Scopus – 6
Сұлтанқұлова К.Т., б.ғ.к., проф. (Қазақстан),
h-index: WoS – 7, Scopus – 7

Корректор: **Әмірханова Н.Т.**, б.ғ.к. (Қазақстан),
h-index: Scopus – 1

Ғылыми журнал «Биоқауіпсіздік және Биотехнология»
ISSN 2707-7241 **eISSN 2957-5702**

Құрылтайшы: ҚР ДСМ «Биологиялық қауіпсіздік
проблемаларының ғылыми-зерттеу институты»
Қазақстан Республикасының Ақпарат және қоғамдық
даму министрлігінің Ақпарат комитетінде 20.11.2019 ж.
№KZ33V00017380 куәлікпен тіркелген
Мерзімділігі: жылына 4 рет. Тиражы: 200 дана
Редакцияның мекен-жайы: 080409, Жамбыл облысы,
Қордай ауданы, Гвардейский қтк., Б. Момышұлы к-сі, 15.
тел. (726-36) 7-22-28
www: biosafety.kz, e-mail: unots@biosafety.kz

© Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының
ғылыми-зерттеу институты, 2022

Главный редактор

д.б.н., проф., академик АН РК **К.Д. Закарья**

Редакционная коллегия:

Абдураимов Е.О., д.в.н., проф. (Казахстан),

заместитель гл. ред., *h-index: WoS – 5, Scopus – 4*

Биологическая безопасность и биологическая защита

Faez Awad, PhD (Ливия), *h-index: Scopus – 3*

Орынбаев М.Б., к.в.н., проф., член корр.-НАН РК

(Казахстан), *h-index: WoS – 7, Scopus – 8*

Эпидемиология эпизоотология, микробиология,

вирусология, иммунология, микология

Еспембетов Б.А., д.в.н., проф. (Казахстан),

h-index: WoS – 6, Scopus – 6

Жугунусов К.Д., PhD (Казахстан),

h-index: WoS – 3, Scopus – 4

Нургазиев Р.З., д.в.н., проф. (Кыргызстан),

h-index: Scopus – 4

Ветеринарная биотехнология

Risatti G., PhD, проф. (США),

h-index: WoS – 27, Scopus – 27

Кошметов Ж.К., д.б.н., проф. (Казахстан),

h-index: WoS – 2, Scopus – 3

Медицинская биотехнология

Olivier G., PhD, (Франция), *h-index: WoS – 3, Scopus – 3*

Айкимбаев А.М., д.м.н., проф. (Казахстан),

h-index: WoS – 7, Scopus – 5

Червякова О.В., к. б. н., проф. (Казахстан),

h-index: WoS – 4, Scopus – 5

Стукова М.А., к.м.н. (Россия),

h-index: WoS – 9, Scopus – 11

Фитопатология и биотехнология растений

Рсалиев А.С., к.с.-х. н., проф. (Казахстан),

h-index: WoS – 4, Scopus – 5

Гультяева Е.И., д.б.н., доцент (Россия),

h-index: WoS – 8, Scopus – 9

Молекулярная генетика

Айтназаров Р.Б., к.б.н. (Россия),

h-index: WoS – 6, Scopus – 6

Султанкулова К.Т., к.б.н., проф. (Казахстан),

h-index: WoS – 7, Scopus – 7

Корректор: **Амирханова Н.Т.**, к.б.н. (Казахстан),

h-index: Scopus – 1

Научный журнал «Биобезопасность и Биотехнология»

ISSN 2707-7241

eISSN 2957-5702

Учредитель: «Научно-исследовательский институт

проблем биологической безопасности» МЗ РК

Зарегистрирован в Комитете информации

Министерства информации и общественного

развития Республики Казахстан свидетельством

№KZ33V00017380 от 20.11.2019 г.

Периодичность: 4 раза в год. Тираж: 200 экз.

Адрес редакции: 080409, Жамбылская область,

Кордайский район, пгт Гвардейский, ул. Б. Момышулы,

15. тел. (726-36) 7-22-28

www: biosafety.kz, e-mail: unots@biosafety.kz

© Научно-исследовательский институт проблем
биологической безопасности, 2022

Editor-in-chief

d.b.s., prof., academician of the Academy of Sciences
of the RK **K.D. Zakaria**

Editorial board:

Abduraimov E.O., d.v.s., prof. (Kazakhstan),

chief ed. deputy, *h-index: WoS – 5, Scopus – 4*

Biosafety and biological protection

Faez Awad, PhD (Libya), *h-index: Scopus – 3*

Orynbayev M.B., c.v.s., prof., corr.-member of the

NAS RK. (Kazakhstan), *h-index: WoS – 7, Scopus – 8*

Epidemiology epizootology, microbiology,

viology, immunology, mycology

Espembetov B.A. c.v.s., prof. (Kazakhstan),

h-index: WoS – 6, Scopus – 6

Zhugunusov K.D., PhD (Kazakhstan),

h-index: WoS – 3, Scopus – 4

Nurgaziev R.S., d.v.s., prof. (Kyrgyzstan),

h-index: Scopus – 4

Veterinary biotechnology

Risatti G., PhD, prof. (USA),

h-index: WoS – 27, Scopus – 27

Koshemetov Zh.K., d.b.s., prof. (Kazakhstan),

h-index: WoS – 2, Scopus – 3

Medical biotechnology

Olivier G., PhD, (France), *h-index: WoS – 3, Scopus – 3*

Aikimbayev A.M., d.m.s., prof. (Kazakhstan),

h-index: WoS – 7, Scopus – 5

Chervyakova O.V., c.b.s., prof. (Kazakhstan),

h-index: WoS – 4, Scopus – 5

Stukova M.A., c.m.s., (Russia),

h-index: WoS – 9, Scopus – 11

Phytopathology and plant biotechnology

Rsaliev A.S., c.a.-c.s., prof. (Kazakhstan),

h-index: WoS – 4, Scopus – 5

Gulyaeva E.I., d.b.s., prof. (Russia),

h-index: WoS – 8, Scopus – 9

Molecular genetics

Aitnazarov R.B., c.b.s., (Russia),

h-index: WoS – 6, Scopus – 6

Sultankulova K.T., c.b.s., prof. (Kazakhstan),

h-index: WoS – 7, Scopus – 7

Proofreader: **Amirkhanova N.T.**, c.b.s., (Kazakhstan),

h-index: Scopus – 1

Scientific journal “Biosafety and Biotechnology”

ISSN 2707-7241

eISSN 2957-5702

Founder: “Research Institute of biosafety problems”

of the Ministry of health of the RK

Registered with the Information Committee of the

Ministry of Information and public development of

the Republic of Kazakhstan with the Certificate

No. KZ33V00017380 dated 20.11.2019

Frequency: 4 times a year. Circulation: 200 copies

Address of the editorial office 080409,

Zhambyl region, Kordai district, Gvardeysky.

15 B. Momysuly str., tel. (726-36) 7-22-28

www: biosafety.kz, e-mail: unots@biosafety.kz

© Research institute of biosafety problems, 2022

МАЗМҰНЫ

Фокина Е.

СУБТРОПИКАЛЫҚ ҚҰРМА ЖЕМІСІ - АНТИОКСИДАНТТАРДЫҢ КӨЗІ 6

Кужебаева У.Ж., Бейшова И.С., Ульянов В.А., Ульянова Т.В.,
Ковальчук А.М., Гинятов Н.С., Сидарова А.Ж.

ІРІ ҚАРА МАЛДЫҢ ЛЕЙКОЗЫ КЕЗІНДЕ ПТР ЖҮРГІЗУГЕ АРНАЛҒАН
СПЕЦИФИКАЛЫҚ ПРАЙМЕРЛЕРДІ ТАҢДАУ 24

Мырзахметова Б.Ш., Бисенбаева К.Б., Каукарбаева М.Ж., Бурашев Е.Д., Кутумбетов Л.Б.

COVID-19 КОРОНАВИРУСТЫҚ АУРУЫНЫҢ SARS-CoV-2 ВИРУСЫНЫҢ
ОҢТҮСТІК-АФРИКАЛЫҚ ОМИКРОН НҰСҚАСЫНЫҢ ӨСІНДІЛІК ҚАСИЕТТЕРІ 36

Еспембетов Б.А., Сармыкова М.К., Самбетбаев А.А., Серікбай Е.Б.,
Сырым Н.С., Зинина Н.Н., Анарбекова А.М., Тилеуханов К.К.

АЛМАТЫ ОБЛЫСЫНДАҒЫ ЖЫЛҚЫЛАРДЫҢ САҚАУ ЭПИЗООТИЯЛЫҚ ЖАҒДАЙЫН ЗЕРТТЕУ 44

Молдагулова С.У., Калимолда Э.Ж., Садикалиева С.О., Токкарина Г.Б.,
Воронина Е.П., Еспембетов Б.А., Нурпейсова А.С., Касенов М.М., Шораева К.А.

ИММУНОБИОЛОГИЯЛЫҚ ПРЕПАРАТТАРДЫҢ СТЕРИЛЬДІЛІГІН АНЫҚТАУДЫҢ
МИКРОБИОЛОГИЯЛЫҚ ӘДІСТЕРІН БАҒАЛАУ 56

Феоктистова Н., Сульдина Е., Мاستиленко А., Ломакин А.

ASPERGILLUS FLAVUS-ті ПОЛИМЕРАЗДЫ ТІЗБЕКТІ РЕАКЦИЯ ӘДІСІМЕН ИНДИКАЦИЯЛАУ
ЖӘНЕ АНЫҚТАУ ҮШІН СЫНАҚ ЖҮЙЕСІН СЫНАҚТАН ӨТКІЗУ «НАҚТЫ УАҚЫТ» РЕЖИМІНДЕ 67

ЖУРНАЛДА ЖАРИЯЛАУ ҮШІН МАҚАЛАЛАРҒА ҚОЙЫЛАТЫН ТАЛАПТАР 74

СОДЕРЖАНИЕ

Фокина Е.

СУБТРОПИЧЕСКИЙ ФРУКТ ХУРМА – ИСТОЧНИК АНТИОКСИДАНТОВ 6

Кужебаева У.Ж., Бейшова И.С., Ульянов В.А., Ульянова Т.В.,
Ковальчук А.М., Гинятов Н.С., Сидарова А.Ж.

ПОДБОР СПЕЦИФИЧЕСКИХ ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР ПРИ ЛЕЙКОЗЕ
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА..... 24

Мырзахметова Б.Ш., Бисенбаева К.Б., Каукарбаева М.Ж., Бурашев Е.Д., Кутумбетов Л.Б.

КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ЮЖНО-АФРИКАНСКОГО ВАРИАНТА ОМИКРОН
ВИРУСА SARS-CoV-2 КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ COVID-19 36

Еспембетов Б.А., Сармыкова М.К., Самбетбаев А.А., Серікбай Е.Б.,
Сырым Н.С., Зинина Н.Н., Анарбекова А.М., Тилеуханов К.К.

ИЗУЧЕНИЕ ЭПИЗООТИЧЕСКОЙ СИТУАЦИИ МЫТА ЛОШАДЕЙ В АЛМАТИНСКОЙ ОБЛАСТИ 44

Молдагулова С.У., Калимолда Э.Ж., Садикалиева С.О., Токкарина Г.Б.,
Воронина Е.П., Еспембетов Б.А., Нурпейсова А.С., Касенов М.М., Шораева К.А.

ОЦЕНКА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТЕРИЛЬНОСТИ
ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ..... 56

Феоктистова Н., Сульдина Е., Мاستиленко А., Ломакин А.

АПРОБАЦИЯ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ИНДИКАЦИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ *ASPERGILLUS FLAVUS*
МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» 67

ТРЕБОВАНИЯ К АВТОРАМ ДЛЯ ПУБЛИКАЦИИ В ЖУРНАЛЕ..... 74

CONTENTS

Fokina Ye.

SUBTROPIC PERSIMMON FRUIT – A SOURCE OF ANTIOXIDANTS..... 6

*Kuzhebayeva U.Zh., Beishova I.S., Ulyanov V.A., Ulyanova T.V.,
Kovalchuk A.M., Ginayatov N.S., Sidarova A.Zh.*

SELECTION OF SPECIFIC PRIMERS FOR PCR IN BOVINE LEUKEMIA VIRUS 24

Myrzakhmetova B.Sh., Bisenbayeva K.B., Kaukarbayeva M.Sh., Burashev Ye.D., Kutumbetov L.B.

CULTURAL PROPERTIES OF THE SOUTH AFRICAN VARIANT OF OMICRON

VIRUS SARS-CoV-2 OF CORONAVIRUS INFECTION COVID-19..... 36

*Yessembetov B.A., Sarmykova M.K., Sambetbaev A.A., Serikbay E.B.,
Syrym N.S., Zinina N.N., Anarbekova A.M., Tileukhanov K.K.*

STUDY OF THE EPIZOOTIC SITUATION OF HORSE WASHING IN THE ALMATY REGION 44

*Moldagulova S.U., Kalimolda E.Zh., Sadikaliyeva S.O., Tokkarina G.B.,
Voronina E.P., Espembetov B.A., Nurpeisova A.S., Kasenov M.M., Shorayeva K.A.*

MICROBIOLOGICAL CONTROL OF WATER QUALITY FOR

THE PRODUCTION OF BIOLOGICAL PRODUCTS..... 56

Feoktistova N., Suldina E., Mastilenko A., Lomakin A.

APPROVAL OF THE TEST-SYSTEM FOR THE INDICATION AND IDENTIFICATION OF *ASPERGILLUS*

FLAVUS BY THE METHOD OF POLYMERASE CHAIN REACTION IN THE “REAL TIME” MODE..... 67

AUTHOR INSTRUCTIONS TO THE JOURNAL 74

СУБТРОПИЧЕСКИЙ ФРУКТ ХУРМА – ИСТОЧНИК АНТИОКСИДАНТОВ

Е. Фокина  *

Высшая школа биотехнологий и пищевых производств,
Институт биомедицинских систем и биотехнологий, Санкт-Петербургский
политехнический университет Петра Великого, г. Санкт-Петербург, Россия
elizabeth_fox@mail.ru

Аннотация: антиоксиданты – вещества, которые ингибируют окисление и способны нейтрализовать окислительное действие свободных радикалов. Антиоксиданты, полученные из рациона, в настоящее время все чаще исследуются на предмет их положительного воздействия на здоровье, включая их роль в профилактике различных заболеваний. В целом растительным антиоксидантам уделяется большое внимание, поскольку их можно употреблять в течение более длительных периодов времени без каких-либо побочных эффектов. Фрукты являются важным компонентом рациона человека и играют важную роль в поддержании здоровья. Это обусловлено наличием биоактивных компонентов, благотворно влияющих на физиологию человека. Ряд растений приобрел популярность как полезные пищевые объекты. Среди них можно выделить хурму (*Diospyros kaki* L.), плоды которой являются питательными и обладают сильной антиоксидантной активностью. В данном обзоре обобщены данные о видах хурмы, ее свойствах и способах использования.

Ключевые слова: хурма; антиоксиданты; биологически активные вещества

Введение

Фрукты являются важным компонентом рациона человека и играют важную роль в поддержании здоровья. Это обусловлено наличием биоактивных компонентов, благотворно влияющих на физиологию человека [1]. Ряд растений приобрел популярность как полезные пищевые объекты. Среди них можно выделить хурму (*Diospyros kaki* L.) и фейхоа (*Feijoa sellowiana* B.), плоды которых являются питательными и обладают сильной антиоксидантной активностью [2, 3].

Хурма – морозостойкое растение рода *Diospyros* семейства *Ebenaceae*. В мире выращивают более 400 видов хурмы [4]. Среди них большое значение имеют виды *Diospyros kaki*, *Diospyros virginiana*, *Diospyros oleifera* и *Diospyros lotus* [5]. Наиболее перспективным видом является *D. kaki* (хурма японская).

Антиоксиданты – вещества, которые ингибируют окисление и способны нейтрализовать окислительное действие свободных радикалов. Антиоксиданты, полученные из рациона, в настоящее время все чаще исследуются на предмет их положительного воздействия на здоровье, включая их роль в профилактике различных заболеваний. В целом растительным антиоксидантам уделяется большое внимание, поскольку их можно употреблять в течение более длительных периодов времени без каких-либо побочных эффектов.

Наиболее известные антиоксиданты растительного происхождения: аскорбиновая кислота (витамин С), токоферол (витамин Е), β -каротин (провитамин А) и ликопин. К ним также относят полифенолы: флавины и флавоноиды, танины, антоцианы.

Классификация антиоксидантов

Жизнедеятельность живых организмов сопровождается постоянными процессами окисления и восстановления. В нормальных условиях скорость и амплитуда образования оксидантов уравниваются скоростью их удаления. Нарушение баланса зачастую приводит к аккумуляции свободных радикалов, обладающих чрезвычайно высокой реакционной способностью, обуславливающей модификацию структуры липидов, белков и нуклеопротеидов, а также иных важных групп биологических молекул, что приводит впоследствии к окислительному стрессу.

Окислительный стресс – неконтролируемое производство радикальных форм кислорода – относительно новое понятие, широко используемое в медицине в последние три десятилетия. Он принимает активное участие в физиологии очень распространенных заболеваний, таких как диабет, гипертония, преэклампсия, атеросклероз, острая почечная недостаточность, болезни Альцгеймера и Паркинсона [6,7].

Для удаления избытка оксидантов и поддержания равновесия системы клетки синтезируют сами или поглощают извне антиоксиданты. Антиоксиданты – вещества, которые ингибируют окисление и могут нейтрализовать окислительное действие свободных радикалов.

Антиоксиданты присутствуют в клетках в низких концентрациях, задерживают, контролируют или предотвращают окислительные процессы [8].

Многочисленные исследования показывают, что антиоксиданты играют важную роль в поддержании здоровья человека, профилактике и лечении заболеваний благодаря их способности уменьшать окислительный стресс. Таким образом, измерение антиоксидантной активности/емкости пищевых продуктов и биологических образцов необходимо не только для обеспечения качества функциональных пищевых продуктов, но и, что более важно, для изучения эффективности пищевых антиоксидантов в профилактике и лечении заболеваний, связанных с окислительным стрессом [9].

По химической природе антиоксиданты представляют собой широкий класс соединений (рисунок 1). Согласно Ratnam et al. [10], антиоксиданты можно разделить на два класса, а именно ферментные антиоксиданты и неферментные антиоксиданты. Некоторые из этих антиоксидантов вырабатываются эндогенно, включая ферменты, низкомолекулярные молекулы и кофакторы ферментов. Основными эндогенными антиоксидантными ферментами являются супероксиддисмутаза (СОД), каталаза (КАТ) и глутатионпероксидаза (ГТП). СОД превращает анион супероксида в перекись водорода, которая является субстратом для КАТ и ГТП. Каталаза метаболизирует перекись водорода до воды и кислорода, а ГТП восстанавливает как пероксид водорода, так и органические гидропероксиды при взаимодействии с глутатионом [9].



Рисунок 1 – Классификация антиоксидантов [11]

Существуют различные методы для измерения активности антиоксидантов. Уровень антиоксидантной активности веществ измеряют с использованием различных химических реакций с использованием высокочувствительного автоматизированного оборудования. В качестве субстратов окисления применяют как модельные пищевые системы, так и химические соединения, биологические материалы, клеточные линии и живые ткани [12].

Хурма как источник антиоксидантов

Хурма – род субтропических и тропических листопадных или вечнозелёных деревьев и кустарников. Деревья могут доживать до пятисот лет. У многих видов плоды съедобны, некоторые тропические виды служат источником ценной древесины – эбенового дерева. Наиболее перспективным видом является *D. kaki* (хурма японская).

Плод хурмы ценится во многих странах за его органолептические характеристики, превосходные питательные качества, обусловленные, среди прочего, волокнами, витаминами и фенольными соединениями, а также благодаря его потенциалу для применения в различных отраслях промышленности [13-15]. Слово «*Diōspyros*» с греческого означает «пища богов», что свидетельствует о том, насколько высоко ценится этот плод [16,17].

Многие исследователи изучают влияние хурмы и ее соединений на здоровье [18-20], технологический прогресс [21-23] и влияние хранения на его качество и срок годности [24-27].

Ботаническое описание. Хурма (лат. *Diōspyros*) – двудомное или полигамное растение семейства Эбеновые (*Ebenaceae*), которое включает в себя 7 родов, охватывающих около 450 видов, распространённых в тропических и отчасти в субтропических областях, за исключением небольшого количества видов, встречающихся в Новом Свете [28].

Порядок эбеновых в филогенетической системе занимает особое место, выделяясь отдельной ветвью из покрытосеменных растений порядка *Rosales* [29, 30] (рисунок 2).

Для субтропического растениеводства России наиболее существенное значение имеют три вида: хурма кавказская, хурма виргинская и хурма восточная. Первые два служат как

подвой, а третий – в качестве продукции. Из трёх видов наиболее хорошо изучена хурма восточная.

Хурма кавказская (*Diospyros lotus* L.) – диплоид [31]. Распространена в Грузии, Азербайджане, Краснодарском крае, Дагестане, Крыму, Средней Азии, Армении. Растение листопадное с округлой, пирамидальной, раскидистой кроной, высотой 10–15 м. Форма кроны зависит от места произрастания растений [32].

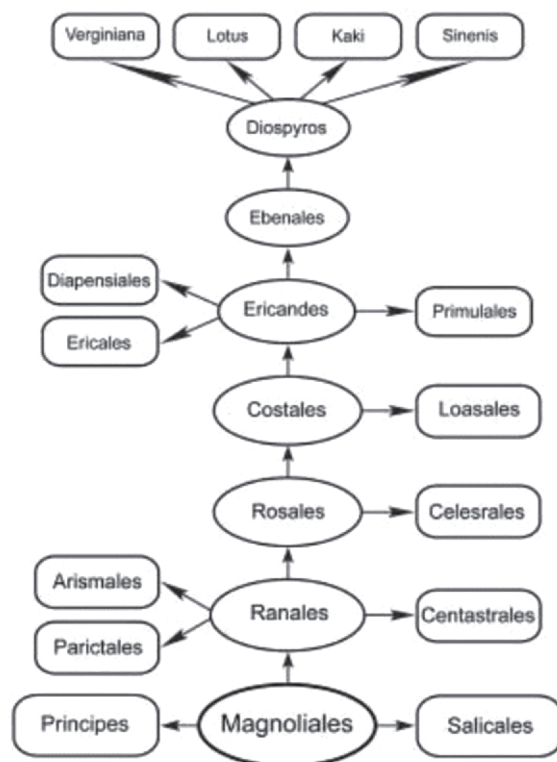


Рисунок 2 – Сокращённая схема филогенетической системы покрытосеменных растений (составлена автором по А.А. Гроссгейму и А.Л. Тахтаджану)

Листья продолговатые, реже широкояйцевидные, 12–14 см длины и 4–5 см ширины, с острой верхушкой и клиновидным основанием. У молодых деревьев и на ростовых побегах они покрупнее. Растение двудомное, но иногда встречаются однодомные (полигамные) деревья. Растения до 3–5-летнего возраста растут медленно, особенно в первые годы. В дальнейшем достигают высоты 7–12 и более метров. Рост побегов у хурмы в условиях субтропической зоны Краснодарского края начинается во второй декаде апреля, цветение происходит в конце мая – начале июня и длится 10–12 дней [32].

Плоды мелкие 2–3 см длиной, весом 4–6 г, сочные, представляют собой ягоды различной формы от округлой до конусовидной. Начало созревания плодов наступает в конце сентября. Вначале они бывают зеленоватыми, очень терпкими, затем по мере созревания становятся желто-оранжевыми. Терпкость исчезает при полной зрелости, в конце ноября [32].

Хурма кавказская является хорошим опылителем для культурных сортов хурмы. Особенно это заметно осенью, перед сбором урожая. Плоды на деревьях хурмы восточной, расположенных вокруг хурмы кавказской, отличаются темной окраской мякоти [33].

Хурма виргинская (*Diospyros virginiana* L.) – гексаплоид [31]. Растение листопадное, достигающее высоты 15–20 м. Крона различной формы от округлой до раскидистой. Однолетние побеги гладкие, многолетние же серые, со слегка растрескивающейся корой.

Листья простые, ланцетовидные или продолговатые, 8–15 см длиной и 3–8 см шириной, верхняя часть листа тёмно-зелёная, блестящая, нижняя – серовато-зеленая.

Деревья в основном двудомные. Мужские цветки мелкие и располагаются в трехцветковых соцветиях. Женские цветки крупные, одиночные. Окраска цветков зеленовато-желтая и чисто белая. Цветет хурма виргинская на 1–2 недели позже кавказской и восточной. Цветение начинается во второй декаде июня и длится до 20–26 июня [32].

Плоды в твёрдом виде очень терпкие, по размеру значительно мельче восточной хурмы, но в 3–4 раза крупнее кавказской. Они имеют форму от сплюсненной до продолговатой, по величине от 4 до 6 см в диаметре.

Плоды хурмы виргинской обладают приятным запахом, напоминающим аромат рома, вкусовые качества гораздо выше, чем у плодов хурмы восточной и кавказской.

Хурма восточная (*Diospyros kaki* L.) – гексаплоид [31], растение листопадное, достигающее 5–10 и более метров высоты с различными формами кроны (шаровидная, пирамидальная, раскидистая). Культура, как и все многолетние растения, имеет период покоя. В среднем он составляет 113 дней.

Хурма восточная – растение двудомное и полигамное (обоеполые). Одни сорта образуют исключительно только женские цветки, другие производят только мужские. У большинства полигамных сортов количество женских и мужских цветков неодинаково [32].

Морфология плода. Плоды хурмы шаровидные, цвет которых варьирует от красноватого до желтого в зависимости от содержания каротина, мякоть вязкая оранжево-красная и несколько шероховатая, в зависимости от содержания дубильных веществ. Мякоть, независимо от сорта, состоит в основном из слизи и пектина, что отвечает за ее характерный внешний вид (рисунок 3).



Рисунок 3 – Плод хурмы

Рост плода начинается с интенсивного деления клеток мезокарпия, за которым следует удлинение этих клеток и увеличение межклеточного пространства, что приводит к увеличению размера плода в конце развития. Кроме того, сорта демонстрируют различное накопление танина в вакуоли во время роста, что приводит к уникальным структурным размерам и терпкости каждого сорта. Средний вес этой ягоды колеблется от 120 до 180 г.

Плоды хурмы в первую очередь классифицируются в зависимости от их терпкости и опыления. Существует четыре типа: постоянное невяжущее опыление (PCNA), невяжущий вариант опыления (PVNA), вяжущий вариант опыления (PVA) и вяжущий вариант постоянного опыления (PCA). Сорта PCNA («Fuyu», «Hana Fuyu», «Jiro», «O», «Gosho») не обладают

терпкостью, независимо от наличия семян, из-за естественной потери терпкости по мере развития плодов на дереве. Этот вид плодов хурмы можно есть при сборе урожая, когда они хрустящие. Сорта PVNA («Amankaki», «Тиро», «Thiene») при правильном опылении и наличии достаточного количества семян не обладают вяжущими свойствами при сборе урожая. Плоды PVNA не употребляют в пищу, если мякоть светлая и без косточек (не опыленная и вяжущая). Сорта PVA («Aizumishirazu», «Giombo», «Rojo Brillante», «Tone Wase», «Triumph», «Rama Forte») обладают терпкостью и при опылении теряют терпкость только вокруг семян. Наконец, сорта PCA («Fuji», «Taubate», «Hachiya», «Pomelo», «Rubi») всегда обладают терпкостью, даже во время созревания плодов. Поскольку сорта PCNA естественным образом теряют терпкость в течение периода созревания, они считаются очень важными для коммерческого производства [17].

Созревание плода можно описать как последовательность физиологических, биохимических и структурных изменений плода. Физические и химические изменения влияют на вкусовое качество плодов, что приводит к съедобному состоянию [34]. У хурмы этот процесс созревания отмечен изменением цвета ткани [15], потеря текстуры [35], поверхностное обезвоживание [36], разложение углеводов и органических кислот и конденсация дубильных веществ [14].

Незрелая хурма имеет зеленый цвет. В процессе созревания хлорофилл постепенно разрушается, и плод становится более желтоватым. Благодаря наличию каротиноидов цвет спелых плодов близок к оранжевому, красновато-оранжевому или ярко-красному [14,37]. Подтверждая вышеизложенное, Qi et al. [38] наблюдали увеличение общего содержания каротиноидов в кожуре трех сортов хурмы («Huoguan», «Jinping» и «Heishi») на протяжении всего развития, а также постепенное снижение уровня хлорофилла. Многие каротиноиды синтезируются на разных стадиях развития, например, накопление ликопина наблюдалось примерно с середины периода полного созревания в кожуре сортов «Huoguan» и «Jinping». Такой результат был связан с колориметрическими индексами, указывающими на то, что этот повышенный показатель ликопина был ответственен за более красноватую окраску.

Снижение плотности мякоти наблюдается за счет изменения ее микроструктуры, преимущественно разрушения клеточных стенок и мембранных компонентов, деградации пектиновых структур, распада паренхимы. Кроме того, при деградации ослабевают клеточные связи, что приводит к увеличению межклеточных пространств. Различие между клеточной мембраной и стенкой также терялось в процессе созревания [35,38]. Кроме того, потеря клеточного тургора способствует обезвоживанию поверхности, что приводит к постепенной потере веса [36]. Tessmer et al. [37], изучая сорта «Fuyu», «Hana Fuyu», «Giombo» и «Rojo Brillante», наблюдали различные варианты деградации без корреляции между терпкостью и деградацией.

Изменение в содержание углеводов в процессе развития плодов отмечены увеличением количества сахаров в разных соотношениях сахарозы, фруктозы и глюкозы. Генетическая изменчивость плодов влияет на ферментативную активность, которая влияет на уровень деградации углеводов и приводит к различному содержанию сахара [14,19]. Например, Bubba et al. [38] изучали хурму сортов «Rojo Brillante» и «Kaki Tiro» и обнаружили, что содержание глюкозы и фруктозы увеличивалось на протяжении всего периода созревания, а количество сахарозы постепенно снижалось, что связано с большой ферментативной активностью фермента инвертазы.

Существуют различные варианты развития в отношении содержания сахара, такие как увеличение содержания сахарозы, из-за уменьшения большого количества сахаров, снижение содержания сахарозы с увеличением концентрации глюкозы и фруктозы и увеличение содержания сахарозы, в то время как глюкоза и фруктоза остаются примерно

на постоянном уровне [14,19]. Santos et al. [14] изучали химические компоненты двух сортов («Fuuy» и «Giombo») на протяжении всего созревания.

Изменения в содержании углеводов наблюдались преимущественно в средней и последней стадиях, тогда как органические кислоты, аминокислоты, полифенолы и холин изменялись в последние месяцы.

Другими соединениями, которые изменяются в процессе созревания, являются дубильные вещества. Когда они растворимы, они напрямую влияют на терпкость хурмы [14, 15]. Ikegami et al. [39] наблюдали, что на ранних стадиях развития плодов девять генов, связанных с синтезом дубильных веществ (по пути биосинтеза флавоноидов), экспрессируются на высоких уровнях как в типах PCNA, так и в типах PCA плодов хурмы. При созревании плоды типа PCNA снижают экспрессию этих генов, что приводит к прекращению накопления танина и естественной потере терпкости. С другой стороны, плоды PCA-типа сохраняли высокий уровень активности генов даже на поздних стадиях зрелости, сохраняя высокую концентрацию танина в плодах.

В другом исследовании Yonemori et al. [40] также указали на более низкое содержание танина в плодах типа PCNA. Они заметили, что развитие дубильных клеток прекращается на ранних стадиях развития у этого вида хурмы. Поскольку количество танина не увеличивается с ростом плода, его концентрация постепенно снижается за счет разбавления другими соединениями. Плоды, не относящиеся к типу PCNA (PVNA, PNA и PCA), вырабатывали свои танниновые клетки в течение более длительного периода, что приводило к их более высоким концентрациям в конце созревания, что приводило к вяжущим фруктам.

Химический состав и биологически активные вещества плода. Хурма является источником многих макро- и микроэлементов, обладающих большой биологической активностью. Можно выделить: углеводы, органические кислоты, фенольные соединения, каротиноиды и дубильные вещества в качестве основных питательных веществ, присутствующих во фруктах [14,25,26,41-43], что придает ему антиоксидантную, цитотоксическую и противодиабетическую активность [19]. Кроме того, химический состав хурмы важен не только для понимания этой биологической активности, но и для сенсорного восприятия плода [14].

Каждая структурная часть хурмы имеет определенный химический состав [41]. В зависимости от вида плода существуют разные пропорции мякоти, семян и чашечек. Grygorieva et. al. [44] сравнили различные виды хурмы в отношении доли этих растительных структур и обнаружили большие различия.

Соотношение массы семян к общей массе плодов колебалось от 3 до 26%, чашечки от 2 до 4 %, доля мякоти от 70 до 95 %. Виды хурмы с наибольшим количеством мякоти представляют большую экономическую ценность [44].

Семена богаты жирными кислотами, из которых наиболее важными являются пальмитиновая, олеиновая и линолевая кислоты, составляющие от 70,4% до 78,3% от общего количества липидов [44].

Кожица защищает внутреннюю мякоть и является важным источником пищевых волокон (40,35 г на 100 г – 1 хурма), витамин С, фенольные соединения (особенно кофейные, п-кумаровая, феруловая и галловая кислоты), каротиноиды и проантоцианидины, способствующие хорошей антиоксидантной способности. Среди основных каротиноидных соединений в кожуре хурмы в порядке убывания находятся: β-криптоксантин, α-каротин, зеаксантин, лютеин, ликопин и β-каротин [45,46]. Кроме того, в кожуре содержится больше некоторых минералов, чем в мякоти, таких как калий, магний, марганец, медь и цинк [15].

Мякоть также является источником витаминов, таких как аскорбиновая кислота и витамин А, минералов, таких как кальций и железо, а также фенольных соединений (феруловая, п-кумаровая и галловая кислоты) и каротиноиды (п-криптоксантин, ликопин, каротин, зеаксантин и лютеин) [42].

Благодаря этим характеристикам этот фрукт обладает значительной антиоксидантной активностью [25].

Послеуборочная обработка плодов хурмы для улучшения органолептических характеристик

Для улучшения органолептических характеристик (снижение терпкости мякоти плода, улучшение внешнего вида, возможность длительного хранения) проводят различную обработку плодов хурмы.

Hernández-Carrión et al [25] исследовали влияние высокого гидростатического давления и пастеризации хурмы 'Rojo Brillante'. Они проанализировали, как влияет экстракция каротиноидов и растворимых дубильных веществ, помимо наблюдения за влиянием на антиоксидантную способность. Среди результатов этого исследования они обнаружили улучшение экстрагируемости при обработке с высоким гидростатическим эффектом, что увеличивает наблюдаемое содержание каротиноидов. Обе обработки уменьшали содержание растворимого танина в образце из-за вероятной нерастворимости этого соединения, уменьшая терпкость фруктов. Кроме того, ни одна из обработок не повлияла на содержание клетчатки. Только пастеризация значительно снизила антиоксидантную активность, возможно, из-за большего снижения растворимых дубильных веществ и деградации других антиоксидантных соединений, вызванной термической обработкой.

Vázquez-Gutiérrez, Hernando, и Quiles [24] обрабатывали кубики хурмы 'Rojo Brillante' высоким гидростатическим давлением и хранили их в холодильнике при температуре 4°C. Они обнаружили структурную деградацию пищевого матрикса и последующее изменение растворимости, местоположения и доступности дубильных веществ. Чем выше воздействие на образец этих обработок и условий хранения, тем больше структурные изменения, осаждение танина и экстракция биологически активных соединений, что приводит к снижению терпкости фруктов.

Sapper et al. [34] установили, что хранение хурмы сорта «Rojo Brillante» с использованием покрытий на основе маниокового крахмала, геллановой камеди с низким содержанием ацила и добавлением противогрибкового соединения в качестве упаковки в дополнение к контролируемым условиям температуры и относительной влажности (25°C и 65% соответственно) на защищало плоды от обезвоживания, и не препятствовало потере твердости плодов в течение периода хранения.

Широко используемый процесс, направленный на удаление терпкости сортов хурмы с вяжущими свойствами, представляет собой обработку для перевода в нерастворимую форму. Существует несколько методов снижения содержания танинов, например, применение паров этилена или этилового спирта и воздействие на фрукты бескислородной среды или высоких концентраций CO₂. Помимо этих процессов терпкость снижает уже сам процесс естественного созревания [26]. Считали, что механизмы, участвующие в снижении уровня танина в плодах как во время созревания на деревьях, так и в атмосфере, богатой этиленом, могут быть вызваны частичным разрывом клеточных стенок и мембран, что приводит к высвобождению пектина, целлюлозы и белков, которые, в свою очередь, будут реагировать с дубильными веществами, переводя их в нерастворимую форму. Когда плоды обрабатывают этиленом, они выделяют ацетальдегид, который способствует большему превращению растворимых дубильных веществ в нерастворимые, что делает плоды не вяжущими. Другой механизм, в котором используется атмосфера, богатая CO₂, сохраняет структуру клеточных стенок и более благоприятен для сохранения твердости уже зрелой хурмы. Это происходит из-за того, что танины, присутствующие в растительной ткани, образуют этиловые мостики, становясь нерастворимыми, большими и сенсорно инертными [46].

Persic, Jakopic, и Hudina [26] изучали влияние хранения с газообразным этиленом и CO_2 на содержание некоторых соединений, таких как фенолы и каротиноиды, в сортах хурмы «Kaki Tipo» и «Rojo Brillante». В обоих из них они обнаружили снижение общего содержания фенолов при обработке этиленом, тогда как при обработке CO_2 не привело к существенным изменениям. Каротиноиды увеличились во время обработки CO_2 и без обработки для «Rojo Brillante», тогда как «Kaki Tipo» показало снижение содержания каротиноидов во время обработки CO_2 и этиленом. Таким образом, содержание каротиноидов связано не только с применяемой обработкой, но и с изучаемым сортом. Другие результаты этой работы показывают, как органические кислоты приобретают более низкие значения, а профиль сахаров изменяется с обработкой и без нее.

В другом исследовании, посвященном оценке тех же сортов, Ancillotti et al. [47] наблюдали, что обработка этиленом привела к снижению содержания полифенолов на 40%, а для «Rojo Brillante» – обработка CO_2 уменьшила 86,3% этих соединений. Novillo et al. [48] также обнаружили значительную потерю растворимых полифенолов, помимо снижения общей антиоксидантной способности. Кроме того, авторы также наблюдали различия в составе каротиноидов и сахаров у сортов хурмы после обработки CO_2 .

Можно заметить, что эти методы могут способствовать изменению не только дубильной структуры, но и других компонентов плода [48]. Это важно, поскольку обработка для устранения терпкости необходима, чтобы сделать возможным коммерциализацию фруктов. Тем не менее, следует учитывать влияние в других аспектах, таких как пищевая ценность конечного продукта.

Применение хурмы

Наблюдая за вышеупомянутыми работами, становятся очевидными различия в составе и свойствах хурмы. Эти данные подчеркивают важность изучения каждого сорта и понимания их особенностей, даже если они относятся к одному и тому же виду. Указание используемого сорта и стадии его созревания дает важную информацию, поскольку способствует более широкому изучению плодов хурмы. Это делает процессы более осуществимыми и позволяет разрабатывать новые способы использования этого природного источника.

Послеуборочные методы хранения и транспортировки являются проблемами, которые необходимо решить при выращивании хурмы, в последние годы были опубликованы некоторые исследования, в которых предлагается охлаждение, облучение [49], и новые формы упаковки [50], среди прочих факторов. Стоит отметить, что еще одна стратегия по расширению использования и сокращение отходов хурмы заключается в переработке фруктов, что способствует диверсификации овощных продуктов в межсезонье и добавлению стоимости в производственную цепочку [42,51]. Следует отметить, что, кроме этого аспекта, еще одним положительным моментом в разработке различных продуктов из хурмы является высокое содержание в ней биоактивных соединений, о чем говорилось ранее, что позволяет создавать новые функциональные продукты питания [42,52].

Основные продукты хурмы, о которых сообщается в литературе, включают сок [53], уксус [51,54], вино [52,55-57], сушеные фрукты, чипсы [25], мороженое [58], сливочные конфеты [59], и джем [60]. Важно подчеркнуть, что в большинстве этих разработанных продуктов образуются остатки, поскольку они обычно используют в качестве сырья только мякоть и отбрасывают другие структуры плода, такие как кожура, плодоножка и семена.

Помимо разработки новых продуктов на основе хурмы, также возможно извлечение специфических соединений, содержащихся в плоде этого фрукта, для получения новых пищевых ингредиентов [42]. Milani et al. [61] подтверждена антиоксидантная активность гидроэтанольных экстрактов «Quioto» и «Rama Forte» в курином мясе, подвергнутом

измельчению, добавлению NaCl и термообработке. Они заметили, что экстракты обоих сортов можно использовать для консервирования этого продукта, поскольку они обладают высокой антиоксидантной активностью и не приводят к заметным изменениям органолептических характеристик [61].

Еще одно применение отходов, которое используется в основном в азиатских странах, – это извлечение масла из семян хурмы для использования в перерабатывающей промышленности и соединений из чашечки для использования в фармацевтической промышленности [44].

Существуют бесчисленные возможности технологических и биотехнологических разработок с использованием хурмы в качестве сырья, что позволяет использовать все части плода.

Заключение

Антиоксиданты играют важную роль в поддержании здоровья человека, профилактике и лечении заболеваний благодаря их способности уменьшать окислительный стресс. Таким образом, поиск новых источников антиоксидантов, разработка методов увеличения их биодоступности является актуальным направлением исследований.

Определение антиоксидантной активности/емкости пищевых продуктов и биологических образцов необходимо как для обеспечения качества функциональных пищевых продуктов, так и для изучения эффективности пищевых антиоксидантов в профилактике и лечении заболеваний, связанных с окислительным стрессом.

Субтропический фрукт хурма богат биоактивными веществами, проявляющие антиоксидантную активность. Плод является источником каротиноидов, флаваноидов и других биоактивных соединений перспективных для применения в пищевой, медицинский промышленности.

Конфликт интересов: Автор не имеет конфликта интересов.

Литература

- 1 Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2004. – Vol. 79. – P. 727-747.
- 2 Jung S.T., Park Y.S., Zachwieja Z., Foltz M., Barton H., Piotrowicz J. et al. Some essential phytochemicals and the antioxidant potential in fresh and dried persimmon // *Int. J. Food Sci. Nutr.* – 2005. – Vol. 56. – P. 105-113.
- 3 Montoro P., Serrelli G., Gil K.A., D'Urso G., Kowalczyk A., Tuberoso C.I.G. Evaluation of bioactive compounds and antioxidant capacity of edible feijoa (*Acca sellowiana* (O. Berg) Burret) flower extracts // *J. Food Sci. Technol.* – 2020. – Vol. 57(6). – P. 2051-2060. doi: 10.1007/s13197-020-04239-2. PMID: 32431331
- 4 Butt M.S., Sultan M.T., Aziz M., Naz A., Ahmed W., Kumar N., Imran M. Persimmon (*Diospyros kaki*) fruit: hidden phytochemicals and health claims // *EXCLI J.* – 2015. – Vol. 14. – P. 542-561. doi: 10.17179/excli2015-159. PMID: 27047315.
- 5 Bibi N., Khattak A.B., Mehmood Z. Quality improvement and shelf life extension of persimmon fruit *Diospyros kaki* // *J. Food Eng.* – 2007. – Vol. 79. – P. 1359-1363.
- 6 Rodrigo R. *Oxidative Stress and Antioxidants: Their Role in Human Diseases*; Nova. – New York, USA. – 2009. – P. 9-10.
- 7 Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews.* – 2002. – Vol. 82. – P. 47-95.
- 8 Shahidi F., Zhong Y. Measurement of antioxidant activity. *J. Funct. – Foods*, 2015. – Vol. 18. – P. 757-781.

- 9 Munteanu I.G., Apetrei C. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – Vol. 22. – 3380 p. <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>
- 10 Ratnam K.V., Ankola D.D., Bahrdwai J.K.V., Sahana D.K. and Kavar M.N.V. A review: Role of antioxidant in prophylaxis and therapy. A pharmaceutical prospective // *Journal of Controlled Release.* – 2006. – Vol. 11. – P. 189-207.
- 11 Carocho M., Ferreira I.C. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives // *Food Chem Toxicol.* – 2013. – Vol. 51. – P. 15-25. doi: 10.1016/j.fct.2012.09.021
- 12 Milczarek R.R., Woods R.D., LaFond S.I., Breksa A.P., Preece J.E., Smith J.L., Sedej I., Olsen C. W., Vilches A.M. Synthesis of Descriptive Sensory Attributes and Hedonic Rankings of Dried Persimmon (*Diospyros Kaki* Sp.) // *Food Sci. Nutr.* – 2018. – Vol. 6(1). – P.124-136. doi:10.1002/fsn3.537.
- 13 Milczarek R.R., Woods R.D., LaFond S.I., Breksa A.P., Preece J.E., Smith J.L., Sedej I., Olsen C. W., Vilches A.M. Synthesis of Descriptive Sensory Attributes and Hedonic Rankings of Dried Persimmon (*Diospyros Kaki* Sp.) // *Food Sci. Nutr.* – 2018. – Vol.6(1). – P. 124-136.
- 14 Santos A.D.D.C., Fonseca F.A., Dutra L.M., Santos M.F.C., Menezes L.R.A., Campos F.R., Nagata N., Ayub R., Barison A. 1H HR-MAS NMR-based Metabolomics Study of Different Persimmon Cultivars (*Diospyros Kaki*) during Fruit Development // *Food Chem.* – 2018. – Vol. 239. – P. 511-519. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.06.133.
- 15 Kluge R.A., Tessmer M.A. Caqui – *Diospyros Kaki*; Exotic Fruits // University of São Paulo/ESALQ: São Paulo. – 2018. – P.113-119.
- 16 Llácer G., Badenes M.L. Persimmon Production and Market. First Mediterranean symposium on persimmon. – 2002. – P. 9-21.
- 17 Matheus J.R.V., Andrade C.J., Miyahira R.F., Fai A.E.C. Persimmon (*Diospyros Kaki* L.): Chemical Properties, Bioactive Compounds and Potential Use in the Development of New Products: A Review // *Food Reviews International.* – 2020. DOI: 10.1080/87559129.2020.1733597
- 18 George A.P., Redpath S. Health and Medicinal Benefits of Persimmon Fruit: A Review // *Adv. Hort. Sci.* – 2008. – Vol.22(4). – P.244-249.
- 19 Giordani E., Doucette S., Nin S., Del Bubba M. Selected Primary and Secondary Metabolites in Fresh Persimmon (*Diospyros Kaki* Thunb.): A Review of Analytical Methods and Current Knowledge of Fruit Composition and Health Benefits // *Food Res. Int.* – 2011. – Vol.44. – P.1752-1767. DOI: 10.1016/j.foodres.2011.01.036.
- 20 Butt M.S., Sultan M.T., Aziz M., Naz A., Ahmed W., Kumar N., Imran M. Persimmon (*Diospyros Kaki*) Fruit: Hidden Phytochemicals and Health Claims // *Excli J.* – 2015. – Vol.14(5). – P. 42-561. doi: 10.17179/excli2015-159
- 21 Ramachandraiah K., Gnoc N.T.B., Chin K.B. Biosynthesis of Silver Nanoparticles from Persimmon Byproducts and Incorporation in Biodegradable Sodium Alginate Thin Film // *J. Food Sci.* – 2017. – Vol.82(10). – P. 2329-2336. doi: 10.1111/1750-3841.13865
- 22 Ban Q., Han Y., He Y., Jin M., Han S., Suo J., Rao J.P. Functional Characterization of Persimmon β -galactosidase Gene DkGAL1 in Tomato Reveals Cell Wall Modification Related to Fruit Ripening and Radicle Elongation // *Plant Sci.* – 2018. – Vol.274. – P. 109-120. doi: 10.1016/j.plantsci.2018.05.014.
- 23 Conesa C., Laguarda-Miró N., Fito P., Seguí L. Evaluation of Persimmon (*Diospyros Kaki* Thunb. Cv. Rojo Brillante) Industrial Residue as a Source for Value Added Products // *Waste Biomass Valorization.* – 2019. – Vol.1. – P.1-12. doi: 10.1007/s12649-019-00621-0.
- 24 Vázquez-Gutiérrez J.L., Hernando I., Quiles A. Changes in Tannin Solubility and Microstructure of High Hydrostatic Pressure-treated Persimmon Cubes during Storage at 4°C // *Eur. Food Res. Technol.* – 2013. – Vol.237. – P.9-17. doi: 10.1007/s00217-013-2010-1.
- 25 Hernández-Carrión M., Vázquez-Gutiérrez J.L., Hernando I., Quiles A. Impact of High Hydrostatic Pressure and Pasteurization on the Structure and the Extractability of Bioactive Compounds of Persimmon “Rojo Brillante” // *J. Food Sci.* – 2014. – Vol.79(1). – P. 32-38. doi: 10.1111/1750-3841.12321
- 26 Persic M., Jakopic J., Hudina M. The Effect of Post-harvest Technologies on Selected Metabolites in Persimmon (*Diospyros Kaki* Thunb.) // *Fruit. J. Sci. Food Agric.* – 2018. – Vol.99(2). – P. 854-860. doi: 10.1002/jsfa.9255.

- 27 Гроссгейм А.А. Флора Кавказа [Текст] / А.А. Гроссгейм. Т.VII. Л.: Наука. – 1967. – С. 151-152.
- 28 Тахтаджян А.Л. Происхождение и расселение цветочных растений [Текст] / А.Л. Тахтаджян. Л.: Наука. – 1970. – 144 с.
- 29 Соловьева Л.В. Цитологическое исследование некоторых видов и сортов хурмы [Текст] / Л.В. Соловьева, М.Д. Омаров // Труды МГУ. – №6. – 1986. – С.19-21.
- 30 Omarov M.D. Morphological and biological characteristics of persimmon species // Subtropical and decorative gardening. – 2009. – No 42-2. – P.347-355.
- 31 Омаров М.Д. Хурма восточная в субтропиках России [Текст] / М.Д. Омаров. – Сочи, 2000. – 98 с.
- 32 Chitarra M.I.F., Chitarra A.B. Pós-colheita De Frutos E Hortalças: Fisiologia E Manuseio// ESAL/ FAEPE: Lavras. – 2005.
- 33 Salvador A., Arnal L., Besada C., Larrea L., Quiles A., Pérez-Munuera I. Physiological and Structural Changes during Ripening and Deastringency Treatment of Persimmon Fruit Cv. 'Rojo Brillante'. Postharvest// Biol. Technol. – 2007. – Vol.46. – P.181-188. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2007.05.003.
- 34 Sapper M., Palou L., Pérez-Gago M.B., Chiralt A. Antifungal Starch-gellan Edible Coatings with Thyme Essential Oil for the Postharvest Preservation of Apple and Persimmon // Coatings. – 2019. – Vol.9(5). – 333 p. DOI: 10.3390/coatings9050333
- 35 Zhao D., Zhou C., Tao J. Carotenoid Accumulation and Carotenogenic Genes Expression during Two Types of Persimmon Fruit (Diospyros Kaki L.) Development // Plant Mol. Biol. Rep. – 2011. – Vol.29(3). – P.646-654. DOI: 10.1007/s11105-010-0272-3.
- 36 Qi Y., Liu X., Zhang Q., Wu H., Yan D., Liu Y., Zhu X., Ren X., Yang Y. Carotenoid Accumulation and Gene Expression in Fruit Skins of Three Differently Colored Persimmon Cultivars during Fruit Growth and Ripening // Sci. Hortic. – 2019. – Vol.248. – P.282-290. DOI: 10.1016/j.scienta.2018.12.042
- 37 Tessmer M.A., Besada C., Hernando I., Appezzato-da-Glória B., Quiles A., Salvador A. Microstructural Changes while Persimmon Fruits Mature and Ripen. Comparison between Astringent and Non-astringent Cultivars. Postharvest // Biol. Technol. – 2016. – Vol.120. – P. 52-60. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2016.05.014.
- 38 Bubba M.D., Giordani E., Pippucci L., Cincinelli A., Checchini L., Galvan P. Changes in Tannins, Ascorbic Acid and Sugar Contents in Astringent Persimmons during On-tree Growth and Ripening and in Response to Different Postharvest Treatments // J. Food Compos. Anal. – 2009. – Vol.22. – P. 668-677. DOI: 10.1016/j.jfca.2009.02.015.
- 39 Ikegami A., Yonemori K., Kitajima A., Sato A., Yamada M. Expression of Genes Involved in Proanthocyanidin Biosynthesis during Fruit Development in a Chinese Pollinationconstant, Non-astringent (PCNA) Persimmon, 'luo Tian Tian Shi'// J. Am. Soc. Hortic. Sci. – 2005. – Vol.130(6). – P. 830-835. DOI: 10.21273/JASHS.130.6.830
- 40 Yonemori K., Ikegami A., Kanzaki S., Sugiura A. Unique Features of Tannin Cells in Fruit of Pollination Constant Non-astringent Persimmons // Acta Hortic. – 2003. – Vol.601. – P.31-35. DOI:10.17660/ActaHortic.2003.601.3.
- 41 Veberic R., Jurhar J., Mikulic-Petkovsek M., Stampar F., Schmitzer V. Comparative Study of Primary and Secondary Metabolites in 11 Cultivars of Persimmon Fruit (Diospyros Kaki L.)// Food Chem. – 2010. – Vol.119. – P. 477-483. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.06.044
- 42 Yaqub S., Farooq U., Shafi A., Akram K., Murtaza M.A., Kausar T., Siddique F. Chemistry and Functionality of Bioactive Compounds Present in Persimmon // J. Chem. – 2016. – P. 1-13. DOI: 10.1155/2016/3424025
- 43 Sentandreu E., Cerdán-Calero M., Navarro J.L. Metabolite Profiling of Pigments from Acid-hydrolysed Persimmon (Diospyros Kaki) Extracts by HPLC-DAD/ESI-MSn Analysis // J. Food Compos. Anal. – 2015. – Vol.38. – P. 55-61. DOI: 10.1016/j.jfca.2014.10.010.
- 44 Grygorieva O., Brindza J., Vietoris V., Kucelová L., Tóth D., Abraham V., Hricová M. Morphological and Organoleptic Fruit Properties of Various Persimmon Species (Diospyros Spp.)// Potravinárstvo. – 2011. – Vol.5(3). – P. 11-19. DOI: 10.5219/150.
- 45 Vieites R.L., Picanco N.F.M., Daiuto E.R. Gamma Radiation in the Conservation of 'Giombo' Persimmon, without Adstringency Stored under Refrigeration// Rev. Bras. Frutic. – 2012. – Vol.34(3). – P. 719-726. DOI: 10.1590/s0100-29452012000300010

- 46 Ashok P.K., Upadhyaya K. Tannins are Astringent // J. Pharmacogn. Phytochem. – 2012. – Vol.1. – P. 45-50.
- 47 Ancillotti C., Caprini C., Scordo C., Renai L., Giordani E., Orlandini S., Furlanetto S., Bubba M.D. Phenolic Compounds in Rojo Brillante and Kaki Tipo Persimmons at Commercial Harvest and in Response to CO₂ and Ethylene Treatments for Astringency Removal// LWT- Food Sci. Technol. – 2019. – Vol.100. – P. 99-105. DOI: 10.1016/j.lwt.2018.10.031
- 48 Novillo P., Besada C., Tian L., Bermejo A., Salvador A. Nutritional Composition of Ten Persimmon Cultivars in the “Ready-to-eat Crisp” Stage. Effect of Deastringency Treatment// Food Nutr. Sci. – 2015. – Vol.6(14). – P. 1296-1306. DOI: 10.4236/fns.2015.614135.
- 49 Vieites R.L., Picanco N.F.M., Daiuto E.R. Gamma Radiation in the Conservation of ‘Giombo’ Persimmon, without Adstringency Stored under Refrigeration // Rev. Bras. Frutic. – 2012. – Vol.34(3). – P. 719-726. DOI: 10.1590/s0100-29452012000300010
- 50 Martineli M., Rezende C.M., Fonseca M.J.O., Soares A.G., Deliza R. Packagings for the Transportation of Persimmon and Their Effects on Sensory Characteristics // Pesquisa Agropecuária Bras. – 2019. – Vol.54. e00082. DOI: 10.1590/s1678-3921.pab2019.v54.00082
- 51 Hidalgo C., Mateo E., Mas A., Torija M.J. Identification of Yeast and Acetic Acid Bacteria Isolated from the Fermentation and Acetification of Persimmon (Diospyros Kaki) // Food Microbiol. – 2012. – Vol.30. – P. 98-104. DOI: 10.1016/j.fm.2011.12.017
- 52 Zhu W., Zhu B., Li Y., Zhang Y., Zhang B., Fan J. Acidic Electrolyzed Water Efficiently Improves the Flavor of Persimmon (Diospyros Kaki L. Cv. Mopan) Wine // Food Chem. – 2016. – Vol.197. – P.141-149. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.10.106
- 53 Lee J.H., Lee Y.B., Seo W.D., Kang S.T., Lim J.W., Cho K.M. Comparative Studies of Antioxidant Activities and Nutritional Constituents of Persimmon Juice (Diospyros Kaki L. Cv. Gapjubaekmok) // Prev. Nutr. Food Sci. – 2012. – Vol.17(2). – P.141-151. DOI: 10.3746/pnf.2012.17.2.141
- 54 Ubeda C., Hidalgo C., Torija M.J., Mas A., Troncoso A.M., Morales M.L. Evaluation of Antioxidant Activity and Total Phenols Index in Persimmon Vinegars Produced by Different Processes // LWT- Food Sci. Technol. – 2011. – Vol.44(7). – P. 1591-1596. DOI: 10.1016/j.lwt.2011.03.001.
- 55 Zhu J.C., Niu Y.W., Feng T., Liu S.J., Cheng H.X., Xu N., Yu H.Y., Xiao Z.B. Evaluation of the Formation of Volatiles and Sensory Characteristics of Persimmon (Diospyros Kaki L. F.) Fruit Wines Using Different Commercial Yeast Strains of Saccharomyces Cerevisiae // Nat. Prod. Res. – 2014. – Vol.28. – P. 1887-1893. DOI: 10.1080/14786419.2014.955492
- 56 Liu M., Yang K., Qi Y., Fan M., Wei X. Physicochemical Characteristics and Antioxidant Activity of Persimmon Wine by Technology of Pectinase Addition and Different Pre-macerations // J. Food Process. Preserv. – 2018. – Vol.42(2). – P. 1-9. DOI: 10.1111/jfpp.13452.
- 57 Da-Hye K., Sae-Byuk L., Jun-Young J., Heui-Dong P. Development of Air-blast Dried non-Saccharomyces Yeast Starter for Improving Quality of Korean Persimmon Wine and Apple Cider // Int. J. Food Microbiol. – 2019. – Vol.290. – P.193-204. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.10.002.
- 58 Karaman S., Toker O.S., Yüksel F., Çam M., Kayacier A., Dogan M. Physicochemical, Bioactive, and Sensory Properties of Persimmon-based Ice Cream: Technique for Order Preference by Similarity to Ideal Solution to Determine Optimum Concentration // J. Dairy Sci. – 2014. – Vol.97(1). – P. 97-110. DOI: 10.3168/jds.2013-7111
- 59 Bolzan A.B., Pereira E.A. Elaboração E Caracterização De Doce Cremoso De Caqui Com Adição De Sementes Da Araucária [Elaboration and Characterization of Creamy Persimmon Sweet with the Addition of Araucaria Seeds] // Braz. J. Food Technol. – 2017. – Vol.20, e2016061. DOI: 10.1590/1981-6723.6116
- 60 Querido A.F., Silva C., Pelegrine D., Alves G.L. Persimmon Pulp and Jelly: Chemical Characterization and Rheological Behavior // Brazilian J. Appl. Technol. Agric. Sci. – 2013. – Vol.6(2). – P. 97-103. DOI: 10.5777/paet.v6i2.2229.
- 61 Milani L.I.G., Terra N.N., Fries L.L.M., Rezer A.P.S., Ferreira S.F., Cichoski A.J., Ferreira C.R. Oxidação Lipídica, Características Sensoriais E Cor Da Carne De Frango Adicionada De Extratos De Caqui (Diospyros Kaki L.) E Submetida a Tratamento Térmico [Lipid Oxidation, Sensory Characteristics and Color of Chicken Meat Added with Persimmon Extracts (Diospyros Kaki L.) And Heat Treated] // Braz. J. Food Technol. – 2010. – Vol.13(4). – P.242-250. DOI: 10.4260/BJFT2010130400033

References

- 1 Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2004. – Vol. 79. – P. 727-747.
- 2 Jung S.T., Park Y.S., Zachwieja Z., Foltz M., Barton H., Piotrowicz J. et al. Some essential phytochemicals and the antioxidant potential in fresh and dried persimmon // *Int. J. Food Sci. Nutr.* – 2005. – Vol. 56. – P. 105-113.
- 3 Montoro P., Serreli G., Gil K.A., D'Urso G., Kowalczyk A., Tuberoso C.I.G. Evaluation of bioactive compounds and antioxidant capacity of edible feijoa (*Acca sellowiana* (O. Berg) Burret) flower extracts // *J. Food Sci. Technol.* – 2020. – Vol. 57(6). – P. 2051-2060. doi: 10.1007/s13197-020-04239-2. PMID: 32431331
- 4 Butt M.S., Sultan M.T., Aziz M., Naz A., Ahmed W., Kumar N., Imran M. Persimmon (*Diospyros kaki*) fruit: hidden phytochemicals and health claims // *EXCLI J.* – 2015. – Vol. 14. – P. 542-561. doi: 10.17179/excli2015-159. PMID: 27047315.
- 5 Bibi N., Khattak A.B., Mehmood Z. Quality improvement and shelf life extension of persimmon fruit *Diospyros kaki* // *J. Food Eng.* – 2007. – Vol. 79. – P. 1359-1363.
- 6 Rodrigo R. Oxidative Stress and Antioxidants: Their Role in Human Diseases; Nova. – New York, USA. – 2009. – P. 9-10.
- 7 Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews.* – 2002. – Vol. 82. – P. 47-95.
- 8 Shahidi F., Zhong Y. Measurement of antioxidant activity. *J. Funct. – Foods*, 2015. – Vol. 18. – P. 757-781.
- 9 Munteanu I.G., Apetrei C. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – Vol. 22. – 3380 p. <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>
- 10 Ratnam K.V., Ankola D.D., Bahrdwai J.K.V., Sahana D.K. and Kavar M.N.V. A review: Role of antioxidant in prophylaxis and therapy. A pharmaceutical prospective // *Journal of Controlled Release.* – 2006. – Vol. 11. – P. 189-207.
- 11 Carocho M., Ferreira I.C. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives // *Food Chem Toxicol.* – 2013. – Vol. 51. – P. 15-25. doi: 10.1016/j.fct.2012.09.021
- 12 Milczarek R.R., Woods R.D., LaFond S.I., Breksa A.P., Preece J.E., Smith J.L., Sedej I., Olsen C.W., Vilches A.M. Synthesis of Descriptive Sensory Attributes and Hedonic Rankings of Dried Persimmon (*Diospyros Kaki* Sp.) // *Food Sci. Nutr.* – 2018. – Vol. 6(1). – P. 124-136. doi:10.1002/fsn3.537\
- 13 Milczarek R.R., Woods R.D., LaFond S.I., Breksa A.P., Preece J.E., Smith J.L., Sedej I., Olsen C. W., Vilches A.M. Synthesis of Descriptive Sensory Attributes and Hedonic Rankings of Dried Persimmon (*Diospyros Kaki* Sp.) // *Food Sci. Nutr.* – 2018. – Vol. 6(1). – P. 124-136.
- 14 Santos A.D.D.C., Fonseca F.A., Dutra L.M., Santos M.F.C., Menezes L.R.A., Campos F.R., Nagata N., Ayub R., Barison A. 1H HR-MAS NMR-based Metabolomics Study of Different Persimmon Cultivars (*Diospyros Kaki*) during Fruit Development // *Food Chem.* – 2018. – Vol. 239. – P. 511-519. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.06.133.
- 15 Kluge R.A., Tessmer M.A. Caqui – *Diospyros Kaki*; Exotic Fruits // University of São Paulo/ESALQ: São Paulo. – 2018. – P.113-119.
- 16 Llácer G., Badenes M.L. Persimmon Production and Market. First Mediterranean symposium on persimmon. – 2002. – P. 9-21.
- 17 Matheus J.R.V., Andrade C.J., Miyahira R.F., Fai A.E.C. Persimmon (*Diospyros Kaki* L.): Chemical Properties, Bioactive Compounds and Potential Use in the Development of New Products: A Review // *Food Reviews International.* – 2020. DOI: 10.1080/87559129.2020.1733597
- 18 George A.P., Redpath S. Health and Medicinal Benefits of Persimmon Fruit: A Review // *Adv. Hort. Sci.* – 2008. – Vol. 22(4). – P. 244-249.
- 19 Giordani E., Doucette S., Nin S., Del Bubba M. Selected Primary and Secondary Metabolites in Fresh Persimmon (*Diospyros Kaki* Thunb.): A Review of Analytical Methods and Current Knowledge of Fruit Composition and Health Benefits // *Food Res. Int.* – 2011. – Vol. 44. – P. 1752-1767. DOI: 10.1016/j.foodres.2011.01.036.

- 20 Butt M.S., Sultan M.T., Aziz M., Naz A., Ahmed W., Kumar N., Imran M. Persimmon (Diospyros Kaki) Fruit: Hidden Phytochemicals and Health Claims // *Excli J.* – 2015. – Vol.14(5). – P. 42-561. doi: 10.17179/excli2015-159
- 21 Ramachandraiah K., Gnoc N.T.B., Chin K.B. Biosynthesis of Silver Nanoparticles from Persimmon Byproducts and Incorporation in Biodegradable Sodium Alginate Thin Film // *J. Food Sci.* – 2017. – Vol.82(10). – P. 2329-2336. doi: 10.1111/1750-3841.13865
- 22 Ban Q., Han Y., He Y., Jin M., Han S., Suo J., Rao J.P. Functional Characterization of Persimmon β -galactosidase Gene DkGAL1 in Tomato Reveals Cell Wall Modification Related to Fruit Ripening and Radicle Elongation // *Plant Sci.* – 2018. – Vol.274. – P. 109-120. doi: 10.1016/j.plantsci.2018.05.014.
- 23 Conesa C., Laguarda-Miró N., Fito P., Seguí L. Evaluation of Persimmon (Diospyros Kaki Thunb. Cv. Rojo Brillante) Industrial Residue as a Source for Value Added Products // *Waste Biomass Valorization.* – 2019. – Vol.1. – P.1-12. doi: 10.1007/s12649-019-00621-0.
- 24 Vázquez-Gutiérrez J.L., Hernando I., Quiles A. Changes in Tannin Solubility and Microstructure of High Hydrostatic Pressure-treated Persimmon Cubes during Storage at 4°C // *Eur. Food Res. Technol.* – 2013. – Vol.237. – P.9-17. doi: 10.1007/s00217-013-2010-1.
- 25 Hernández-Carrión M., Vázquez-Gutiérrez J.L., Hernando I., Quiles A. Impact of High Hydrostatic Pressure and Pasteurization on the Structure and the Extractability of Bioactive Compounds of Persimmon “Rojo Brillante”// *J. Food Sci.* – 2014. – Vol.79(1). – P.32-38. doi: 10.1111/1750-3841.12321
- 26 Persic M., Jakopic J., Hudina M. The Effect of Post-harvest Technologies on Selected Metabolites in Persimmon (Diospyros Kaki Thunb.)// *Fruit. J. Sci. Food Agric.* – 2018. – Vol.99(2). – P.854-860. doi: 10.1002/jsfa.9255.
- 27 Grossgejm A.A. Flora Kavkaza [Tekst] / A.A. Grossgejm. T.VII. L.:Nauka. – 1967. – C. 151-152.
- 28 Tahtadzhyan A.L. Proiskhozhdenie i rasselenie cvetochnyh rastenij [Tekst] / A.L. Tahtadzhyan. L.: Nauka. – 1970. – 144 s.
- 29 Solov'eva L.V. Citologicheskoe issledovanie nekotoryh vidov i sortov hurmy [Tekst] / L.V. Solov'eva, M.D. Omarov // *Trudy MGU.* – №6. – 1986. – S. 19-21.
- 30 Omarov M.D. Morphological and biological characteristics of persimmon species // *Subtropical and decorative gardening.* – 2009. – No 42-2. – P. 347-355.
- 31 Omarov M.D. Hurma vostochnaya v subtropikah Rossii [Tekst] / M.D. Omarov. – Sochi, 2000. – 98 s. Chitarra M.I.F., Chitarra A.B. Pós-colheita De Frutos E Hortalças: Fisiologia E Manuseio// *ESAL/FAEPE: Lavras.* – 2005.
- 32 Salvador A., Arnal L., Besada C., Larrea L., Quiles A., Pérez-Munuera I. Physiological and Structural Changes during Ripening and Deastringency Treatment of Persimmon Fruit Cv. ‘Rojo Brillante’. Postharvest// *Biol. Technol.* – 2007. – Vol.46. – P.181-188. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2007.05.003.
- 33 Sapper M., Palou L., Pérez-Gago M.B., Chiralt A. Antifungal Starch-gellan Edible Coatings with Thyme Essential Oil for the Postharvest Preservation of Apple and Persimmon // *Coatings.* – 2019. – Vol.9(5). – 333 p. DOI: 10.3390/coatings9050333
- 34 Zhao D., Zhou C., Tao J. Carotenoid Accumulation and Carotenogenic Genes Expression during Two Types of Persimmon Fruit (Diospyros Kaki L.) Development // *Plant Mol. Biol. Rep.* – 2011. – Vol.29(3). – P. 646-654. DOI: 10.1007/s11105-010-0272-3.
- 35 Qi Y., Liu X., Zhang Q., Wu H., Yan D., Liu Y., Zhu X., Ren X., Yang Y. Carotenoid Accumulation and Gene Expression in Fruit Skins of Three Differently Colored Persimmon Cultivars during Fruit Growth and Ripening // *Sci. Hortic.* – 2019. – Vol.248. – P. 282-290. DOI: 10.1016/j.scienta.2018.12.042
- 36 Tessmer M.A., Besada C., Hernando I., Appezzato-da-Glória B., Quiles A., Salvador A. Microstructural Changes while Persimmon Fruits Mature and Ripen. Comparison between Astringent and Non-astringent Cultivars. Postharvest // *Biol. Technol.* – 2016. – Vol.120. – P. 52-60. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2016.05.014.
- 37 Bubba M.D., Giordani E., Pippucci L., Cincinelli A., Checchini L., Galvan P. Changes in Tannins, Ascorbic Acid and Sugar Contents in Astringent Persimmons during On-tree Growth and Ripening and in Response to Different Postharvest Treatments // *J. Food Compost. Anal.* – 2009. – Vol.22. – P. 668-677. DOI: 10.1016/j.jfca.2009.02.015.

- 38 Ikegami A., Yonemori K., Kitajima A., Sato A., Yamada M. Expression of Genes Involved in Proanthocyanidin Biosynthesis during Fruit Development in a Chinese Pollinationconstant, Nonstringent (PCNA) Persimmon, 'luo Tian Tian Shi'// J. Am. Soc. Hortic. Sci. – 2005. – Vol.130(6). – P. 830-835. DOI: 10.21273/JASHS.130.6.830
- 39 Yonemori K., Ikegami A., Kanzaki S., Sugiura A. Unique Features of Tannin Cells in Fruit of Pollination Constant Non-astringent Persimmons // Acta Hortic. – 2003. – Vol.601. – P. 31-35. DOI:10.17660/ActaHortic.2003.601.3.
- 40 Veberic R., Jurhar J., Mikulic-Petkovsek M., Stampar F., Schmitzer V. Comparative Study of Primary and Secondary Metabolites in 11 Cultivars of Persimmon Fruit (Diospyros Kaki L.)// Food Chem. – 2010. – Vol.119. – P. 477-483. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.06.044
- 41 Yaqub S., Farooq U., Shafi A., Akram K., Murtaza M.A., Kausar T., Siddique F. Chemistry and Functionality of Bioactive Compounds Present in Persimmon // J. Chem. – 2016. – P. 1-13. DOI: 10.1155/2016/3424025
- 42 Sentandreu E., Cerdán-Calero M., Navarro J.L. Metabolite Profiling of Pigments from Acid-hydrolysed Persimmon (Diospyros Kaki) Extracts by HPLC-DAD/ESI-MSn Analysis // J. Food Compos. Anal. – 2015. – Vol.38. – P. 55-61. DOI: 10.1016/j.jfca.2014.10.010.
- 43 Grygorieva O., Brindza J., Vietoris V., Kucelová L., Tóth D., Abraham V., Hricová M. Morphological and Organoleptic Fruit Properties of Various Persimmon Species (Diospyros Spp.)// Potravinárstvo. – 2011. – Vol.5(3). – P. 11-19. DOI: 10.5219/150.
- 44 Vieites R.L., Picanco N.F.M., Daiuto E.R. Gamma Radiation in the Conservation of 'Giombo' Persimmon, without Adstringency Stored under Refrigeration// Rev. Bras. Frutic. – 2012. – Vol.34(3). – P. 719-726. DOI: 10.1590/s0100-29452012000300010
- 45 Ashok P.K., Upadhyaya K. Tannins are Astringent // J. Pharmacogn. Phytochem. – 2012. – Vol.1. – P. 45-50.
- 46 Ancillotti C., Caprini C., Scordo C., Renai L., Giordani E., Orlandini S., Furlanetto S., Bubba M.D. Phenolic Compounds in Rojo Brillante and Kaki Tipo Persimmons at Commercial Harvest and in Response to CO₂ and Ethylene Treatments for Astringency Removal// LWT- Food Sci. Technol. – 2019. – Vol.100. – P. 99-105. DOI: 10.1016/j.lwt.2018.10.031
- 47 Novillo P., Besada C., Tian L., Bermejo A., Salvador A. Nutritional Composition of Ten Persimmon Cultivars in the "Ready-to-eat Crisp" Stage. Effect of Deastringency Treatment// Food Nutr. Sci. – 2015. – Vol.6(14). – P.1296-1306. DOI: 10.4236/fns.2015.614135.
- 48 Vieites R.L., Picanco N.F.M., Daiuto E.R. Gamma Radiation in the Conservation of 'Giombo' Persimmon, without Adstringency Stored under Refrigeration // Rev. Bras. Frutic. – 2012. – Vol.34(3). – P. 719-726. DOI: 10.1590/s0100-29452012000300010
- 49 Martineli M., Rezende C.M., Fonseca M.J.O., Soares A.G., Deliza R. Packagings for the Transportation of Persimmon and Their Effects on Sensory Characteristics // Pesquisa Agropecuária Bras. – 2019. – Vol.54. e00082. DOI: 10.1590/s1678-3921.pab2019.v54.00082
- 50 Hidalgo C., Mateo E., Mas A., Torija M.J. Identification of Yeast and Acetic Acid Bacteria Isolated from the Fermentation and Acetification of Persimmon (Diospyros Kaki) // Food Microbiol. – 2012. – Vol.30. – P. 98-104. DOI: 10.1016/j.fm.2011.12.017
- 51 Zhu W., Zhu B., Li Y., Zhang Y., Zhang B., Fan J. Acidic Electrolyzed Water Efficiently Improves the Flavor of Persimmon (Diospyros Kaki L. Cv. Mopan) Wine // Food Chem. – 2016. – Vol.197. – P. 141-149. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.10.106
- 52 Lee J.H., Lee Y.B., Seo W.D., Kang S.T., Lim J.W., Cho K.M. Comparative Studies of Antioxidant Activities and Nutritional Constituents of Persimmon Juice (Diospyros Kaki L. Cv. Gapjubaekmok) // Prev. Nutr. Food Sci. – 2012. – Vol.17(2). – P. 141-151. DOI: 10.3746/pnf.2012.17.2.141
- 53 Ubeda C., Hidalgo C., Torija M.J., Mas A., Troncoso A.M., Morales M.L. Evaluation of Antioxidant Activity and Total Phenols Index in Persimmon Vinegars Produced by Different Processes // LWT- Food Sci. Technol. – 2011. – Vol.44(7). – P. 1591-1596. DOI: 10.1016/j.lwt.2011.03.001.
- 54 Zhu J.C., Niu Y.W., Feng T., Liu S.J., Cheng H.X., Xu N., Yu H.Y., Xiao Z.B. Evaluation of the Formation of Volatiles and Sensory Characteristics of Persimmon (Diospyros Kaki L. F.) Fruit Wines Using Different Commercial Yeast Strains of Saccharomyces Cerevisiae // Nat. Prod. Res. – 2014. – Vol.28. – P. 1887-1893. DOI: 10.1080/14786419.2014.955492

- 55 Liu M., Yang K., Qi Y., Fan M., Wei X. Physicochemical Characteristics and Antioxidant Activity of Persimmon Wine by Technology of Pectinase Addition and Different Pre-macerations // J. Food Process. Preserv. – 2018. – Vol.42(2). – P. 1-9. DOI: 10.1111/jfpp.13452.
- 56 Da-Hye K., Sae-Byuk L., Jun-Young J., Heui-Dong P. Development of Air-blast Dried non-Saccharomyces Yeast Starter for Improving Quality of Korean Persimmon Wine and Apple Cider // Int. J. Food Microbiol. – 2019. – Vol.290. – P. 193-204. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.10.002.
- 57 Karaman S., Toker O.S., Yüksel F., Çam M., Kayacier A., Dogan M. Physicochemical, Bioactive, and Sensory Properties of Persimmon-based Ice Cream: Technique for Order Preference by Similarity to Ideal Solution to Determine Optimum Concentration // J. Dairy Sci. – 2014. – Vol.97(1). – P. 97-110. DOI: 10.3168/jds.2013-7111
- 58 Bolzan A.B., Pereira E.A. Elaboração E Caracterização De Doce Cremoso De Caqui Com Adição De Sementes Da Araucária [Elaboration and Characterization of Creamy Persimmon Sweet with the Addition of Araucaria Seeds] // Braz. J. Food Technol. – 2017. – Vol.20, e2016061. DOI: 10.1590/1981-6723.6116
- 59 Querido A.F., Silva C., Pelegri D., Alves G.L. Persimmon Pulp and Jelly: Chemical Characterization and Rheological Behavior // Brazilian J. Appl. Technol. Agric. Sci. – 2013. – Vol.6(2). – P. 97-103. DOI: 10.5777/paet.v6i2.2229.
- 60 Milani L.I.G., Terra N.N., Fries L.L.M., Rezer A.P.S., Ferreira S.F., Cichoski A.J., Ferreira C.R. Oxidação Lipídica, Características Sensoriais E Cor Da Carne De Frango Adicionada De Extratos De Caqui (Diospyros Kaki L.) E Submetida a Tratamento Térmico [Lipid Oxidation, Sensory Characteristics and Color of Chicken Meat Added with Persimmon Extracts (Diospyros Kaki L.) And Heat Treated] // Braz. J. Food Technol. – 2010. – Vol.13(4). – P. 242-250. DOI: 10.4260/BJFT2010130400033

СУБТРОПИКАЛЫҚ ҚҰРМА ЖЕМІСІ – АНТИОКСИДАНТТАРДЫҢ КӨЗІ

Е. Фокина  *

Биотехнология және тамақ өнеркәсібі жоғары мектебі,
Биомедициналық жүйелер және биотехнология институты, Ұлы Петрдің Санкт-Петербург
политехникалық университеті, Санкт-Петербург қ., Ресей
elizabeth_fox@mail.ru

Аннотация: антиоксиданттар-тотығуды тежейтін және бос радикалдардың тотығу әсерін бейтараптандыруға қабілетті заттар. Диетадан алынған антиоксиданттар қазіргі уақытта денсаулыққа пайдалы әсерлері, соның ішінде әртүрлі аурулардың алдын алудағы рөлі үшін көбірек зерттелуде. Жалпы, өсімдік антиоксиданттарына көп көңіл бөлінеді, өйткені оларды ұзақ уақыт бойы ешқандай жанама әсерлерсіз тұтынуға болады. Жемістер адам диетасының маңызды құрамдас бөлігі болып табылады және денсаулықты сақтауда маңызды рөл атқарады. Бұл адам физиологиясына пайдалы әсер ететін биоактивті компоненттердің болуына байланысты. Бірқатар өсімдіктер пайдалы тамақ өнімдері ретінде танымал болды. Олардың ішінде жемістері қоректік және күшті антиоксиданттық белсенділігі бар құрманы (*Diospyros kaki* L.) ажыратуға болады. Бұл шолуда құрма түрлері, оның қасиеттері және қолдану әдістері туралы мәліметтер жинақталған.

Түйін сөздер: құрма; антиоксиданттар; биологиялық белсенді заттар

SUBTROPIC PERSIMMON FRUIT – A SOURCE OF ANTIOXIDANTS

Ye. Fokina  *

Higher School of Biotechnology and Food Production,
Institute of Biomedical Systems and Biotechnology,
Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, Russia
elizabeth_fox@mail.ru

Abstract: antioxidants are substances that inhibit oxidation and are able to neutralize the oxidative effect of free radicals. Dietary-derived antioxidants are now increasingly being researched for their positive health effects, including their role in the prevention of various diseases. In general, plant antioxidants receive a lot of attention as they can be consumed for longer periods of time without any side effects. Fruits are an important component of the human diet and play an important role in maintaining health. This is due to the presence of bioactive components that have a beneficial effect on human physiology. A number of plants have gained popularity as useful food items. Among them, persimmon (*Diospyros kaki* L.) can be distinguished, the fruits of which are nutritious and have strong antioxidant activity. This review summarizes data on the types of persimmon, its properties and methods of use.

Keywords: persimmon; antioxidants; biologically active substances

МРНТИ 68.41.05, 34.25.01, 68.41.41, 68.41.53 doi: 10.58318/2957-5702-2022-12-24-35

ПОДБОР СПЕЦИФИЧЕСКИХ ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР ПРИ ЛЕЙКОЗЕ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

У.Ж. Кужебаева *, И.С. Бейшова , В.А. Ульянов ,
 Т.В. Ульянова , А.М. Ковальчук , Н.С. Гинятов , А.Ж. Сидарова 

НАО «Западно-Казахстанский аграрно-технический университет имени Жангир хана»,
 Казахстан, Уральск
 usya_999@mail.ru

Аннотация: метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) широко применяется для решения различных задач. ПЦР широко применяется для детекции патогенов бактериальной и вирусной природы. Праймеры являются очень важным компонентом ПЦР, поскольку специфичность амплификации зависит в первую очередь от них. Они необходимы для работы фермента и являются специфичными к фрагменту интереса. По итогам отбора нуклеотидных последовательностей генома или отдельных фрагментов РНК вируса из международной базы данных на сайте NCBI, было выявлено большое количество последовательностей для вируса лейкоза крупного рогатого скота, которые хранятся в банках генов и ежедневно пополняющихся новыми данными. Конструирование праймеров с соблюдением необходимых параметров проводится с помощью различных компьютерных программ, основными из которых являются MUSCLE, UGENE V.36.0, Primer-BLAST, Oligo Analyzer и другие. Сконструированные праймеры затем синтезировали на синтезаторе олигонуклеотидов Expedite 8909, согласно инструкции прилагаемой к прибору. В результате проведенных опытов нами были подобраны и синтезированы специфические синтетические олигонуклеотиды *env (g51) _1* и *env (g51) _2*, для постановки ПЦР при лейкозе крупного рогатого скота.

Ключевые слова: вирус лейкоза крупного рогатого скота, праймер, ген, нуклеотиды, полимеразная цепная реакция

Введение

Вирус лейкоза крупного рогатого скота – РНК содержащий онкогенный вирус, вызывающий злокачественное лимфопролиферативное заболевание животных. В соответствии с классификацией Международного Комитета Таксономии Вирусов (ICTV), относится к семейству *Retroviridae* (2 подсемейства, 7 родов), подсемейству *Orthoretrovirinae*, роду *Deltaretrovirus*, к которому также относятся и Т-лимфотропные вирусы приматов (PTLV) – человека и обезьян (HTLV и STLV) [1]. Стоит отметить, что за последнее время увеличилось количество исследований, о возможности рассмотрения данного заболевания как зоонозной инфекции, так существуют сведения о способности вируса BLV инициировать рак груди и легких, а также дополнительных типов рака человека [2-4]. Таким образом, эти данные свидетельствуют о том, что инфицированный вирусом лейкоза скот, может представлять вероятный риск для здоровья человека.

По данным эпизоотологических исследований в настоящее время лейкоз крупного рогатого скота регистрируется в Северной и Южной Америке, некоторых странах Азии и Ближнего Востока, а также в Восточной и Центральной Европе [5], в Казахстане за 2015-2019 гг. уровень инфицированности лейкозом составил 5,7% [6].

Стоит отметить, что лейкоз ликвидирован более чем в 20 странах, где применялись традиционные методы тестирования на наличие антител, при выявление инфицированных животных забивали. На сегодня во многих странах, где уровень инфицированности приближается к 50% традиционные методы экономически нецелесообразны [7].

Высокая заболеваемость крупного рогатого скота лейкозом связана с тем, что недостаточно полно проводится работа по ликвидации и оздоровлению хозяйств по этому заболеванию, положительно реагирующие животные остаются в стадах, что приводит к перезаражению остального поголовья [8].

Известно, что почти у 70% инфицированных животных заболевание протекает бессимптомно, алейкемическая стадия. Однако уже через несколько лет бессимптомного периода у 25-30% животных инфицированных вирусом лейкоза прогрессирует стойкий лимфоцитоз, характеризующийся поликлональной экспрессией неопластической популяции лимфоцитов CD5+ В-лимфоцитов, а у 1-5% развивается В-клеточная лимфома [9]. Все же до сих пор неизвестен механизм, способный обеспечить защиту от энзоотического лейкоза для инфицированных вирусом коров.

До настоящего времени основными и единственными методами борьбы с BLV является выбраковка больных и изоляция инфицированных коров. Поэтому первостепенное значение имеет своевременная и точная диагностика инфекции, вызванной BLV. Диагностические исследования на лейкоз проводят в основном серологическими (РИД, ИФА) молекулярно-биологическим (ПЦР) и гематологическим методами. Достоинством молекулярно-биологического метода (ПЦР) является, что в результате определен вирусоспецифический фрагмент выделенной нуклеиновой кислоты амплифицируется до количества достаточного для его визуального определения. С помощью ПЦР удастся обнаруживать даже деградированную нуклеиновую кислоту, присутствующую в следовых количествах. ПЦР как метод диагностики лейкоза крупного рогатого скота возможно применять уже с 15-дневного возраста [10].

Возбудитель заболевания РНК содержащий вирус лейкоза крупного рогатого скота, который относится к семейству *Retroviridae*. Строение, молекулярный состав и геном возбудителя достаточно подробно изучены авторами [11]. Липопротеиновая наружная оболочка вириона покрыта гликопротеидными пепломерами, которая скрывает экосаэдрический нуклеокапсид. Нуклеокапсид включает в себе две идентичные молекулы вирусной РНК, представленные ферментом ревертазой и фрагментами клеточной РНК [12].

Длина полной последовательности вируса лейкоза крупного рогатого скота 8714 п.н. [13]. Следует отметить, что концы интегрированного провируса лейкоза крупного рогатого скота, также как у многих ретровирусов, представляют собой последовательности, называемые длинными концевыми повторами (LTR long terminal repeat). На сегодняшний день идентифицированы 7 альтернативно сплайсированных РНК, а также 8 открытых рамок считывания, такие как gag, prt, pol, env, tax, rex, RIII, GIV [14].

Основным признаком семейства *Retroviridae* является то, что геном вируса может существовать в двух формах, таких как геномной одноцепочечной РНК или в виде провирусной ДНК, синтезированной на геномной РНК как на матрице [15]. Полноразмерная молекула РНК транскрибируется из интегрированного провируса, и выполняет две главные функции, такие как формирование вирионной РНК и мРНК для синтеза продуктов генов gag, pol, env [16].

Для постановки ПЦР важное значение имеет удачный выбор праймера, который может привести к появлению неспецифического продукта амплификации из-за образования «праймерного димера». Праймерный димер представляет собой побочный продукт амплификации в виде двунитевого фрагмента, возникающего за счет отжига праймеров с их последующей достройкой [17, 18]. Специфичность праймера крайне важна. В том случае,

если их специфичность недостаточна, то вероятней всего в пробирке с реакционной смесью будут происходить нежелательные процессы, такие как синтез неспецифической ДНК. При проведении электрофореза неспецифическая ДНК выявляется в виде тяжелых или легких дополнительных полос, иногда шмеров, в виде сплошных мазков в агарозном геле. Также часть праймеров и дНТФ может расходоваться на синтез неспецифической ДНК, что приводит к значительной потере чувствительности [19].

В целях подбора специфических праймеров особое значение имеет выбранный ген. Ген *env*, кодирующий оболочку BLV, транскрибируется как 5,1 кДа мРНК, с последующей трансляцией белка-предшественника $pr72^{env}$ [20-22], белки которого транспортируются в комплексе Гольджи, где расщепляется на два гликолизированных белка оболочки: трансмембранный *gp30* и внеклеточный *gp51*.

Трансмембранный *gp30*, является слабоимунногенным, а внеклеточный *gp51* вызывает высокую экспрессию специфических антител у инфицированных животных. Моноклональные антитела к *gp51*, взаимодействуют с эпитопами (F, G и H) на молекуле белка, определяющими инфекционность вируса. Данный факт позволяет предположить, что в отсутствии эпитопов F, G и H, происходит потеря инфекционности.

По данным авторов, при анализе ДНК, экстрагированной из клеток моноцитов крови животных, ПЦР-методом с использованием праймеров для *env* гена удается выявить больше положительных случаев, чем при использовании праймера для других генов [23]. Вместе с тем в других исследованиях указывается, что праймеры к *env* гену обеспечивают большую специфичность анализа, чем на другие гены [24].

Целью данной статьи является подбор праймеров и синтезирование специфических олигонуклеотидов для отработки условий постановки ОТ-ПЦР, используемые для диагностики лейкоза крупного рогатого скота.

Материалы и методы

Для подбора и синтеза праймеров нами был выбран ген *env*. Ген *env* имеет длину 1545 п.н. (4821 п.н. – 6368 п.н.), кодирует зрелый поверхностный гликопротеид *gp51* и прикрепленный к нему дисульфидной связью трансмембранный белок *gp30*. Отличие антигенообразования на белок *env gp51* состоит в том, что антитела против *gp51* постоянно обнаруживаются в сыворотке у инфицированных животных с низкой провирусной нагрузкой в лейкемической и алейкемической стадии лейкозного процесса. При подборе праймеров для ПЦР нами был выбран короткий отрезок гена вблизи его 5'-конца с оптимальной длиной около 20 нуклеотидов. Нами были подобраны последовательности нуклеотидов, которые соответствуют предъявляемым требованиям к праймерам.

В международной базе данных на сайте NCBI нами был проведен анализ последовательностей генома вируса лейкоза крупного рогатого скота. Для подбора специфических праймеров был выбран ген *env*, кодирующий гликопротеид оболочки вируса. Следует отметить, что ген *env* содержит конформационные и линейные эпитопы. У вирусов изолированных в разных географических регионах структура и состав этих эпитопов различен. Поиск нуклеотидных последовательностей сегментов лейкоза крупного рогатого скота проведен в международной базе данных GenBank. Выравнивание проводили с использованием программы MUSCLE, входящей в пакет программ UGENE v.36.0. Специфические олигонуклеотидные праймеры, используемые для обнаружения ВЛКРС с помощью ОТ-ПЦР, подбирали с помощью программы Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Проверку проводили с использованием программы OligoAnalyzer (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>). При выборе синтетических олигонуклеотидов придерживались следующих требований: длина праймеров 16-25 нуклеотидов; содержание GC-пар – 50-60%; разница в температуре отжига обоих праймеров – не более 6°C; праймеры

не должны быть само- и взаимно-комплементарными; нуклеотиды 3'-конца праймера должны быть строго комплементарны матрице. Компьютерно-моделированные последовательности праймеров в дальнейшем синтезировали на синтезаторе олигонуклеотидов Expedite 8909, Applied Biosystems. Синтез ДНК проводили согласно протоколам, прилагаемым к прибору. Полученные олигонуклеотиды элюировали с колонок концентрированным раствором аммиака и выпаривали в вакуумном испарителе CentriVar Concentrator, LABCONCO. Преципитат праймеров растворяли в ТЕ буфере и переосаждали этанолом. Полученные таким образом синтезированные праймеры использовали для отработки постановки ОТ-ПЦР.

Для проверки синтезированных праймеров нами было выделено РНК, с использованием набора QIAamp® Viral RNA Mini Kit в соответствии с наставлением по применению данного набора. ОТ-ПЦР проводили в объеме реакционной смеси 25 мкл. Реакционная смесь состояла из Enzyme Mix – 0,5 мкл (10 пМ); 5хПЦР-буфер – 5 мкл; специфические праймеры (10 пМ) по 0,5 мкл; смесь dNTP (10 пМ) – 0,5 мкл; РНК – 3 мкл; деонизированная вода – 15 мкл. Для электрофореза использовали 2% раствор агарозы в ТАЕ-буфере. Документирование полученных результатов проводили при помощи гелем документальной системы MiniBIS Pro 16mm GELQUANT (DNR Bio Imaging Systems).

Результаты

В результате поиска нуклеотидных последовательностей ВЛКРС было получено 119 полных последовательностей генома для разных штаммов.

Следующим этапом проводили выравнивание полученных последовательностей с целью определения консервативных участков, подходящих для подбора праймеров. Выравнивание показало, что сходство между полными геномами вируса лейкоза крупного рогатого скота составляет от 86 до 99%. Результаты выравнивания представлены на рисунке 1.

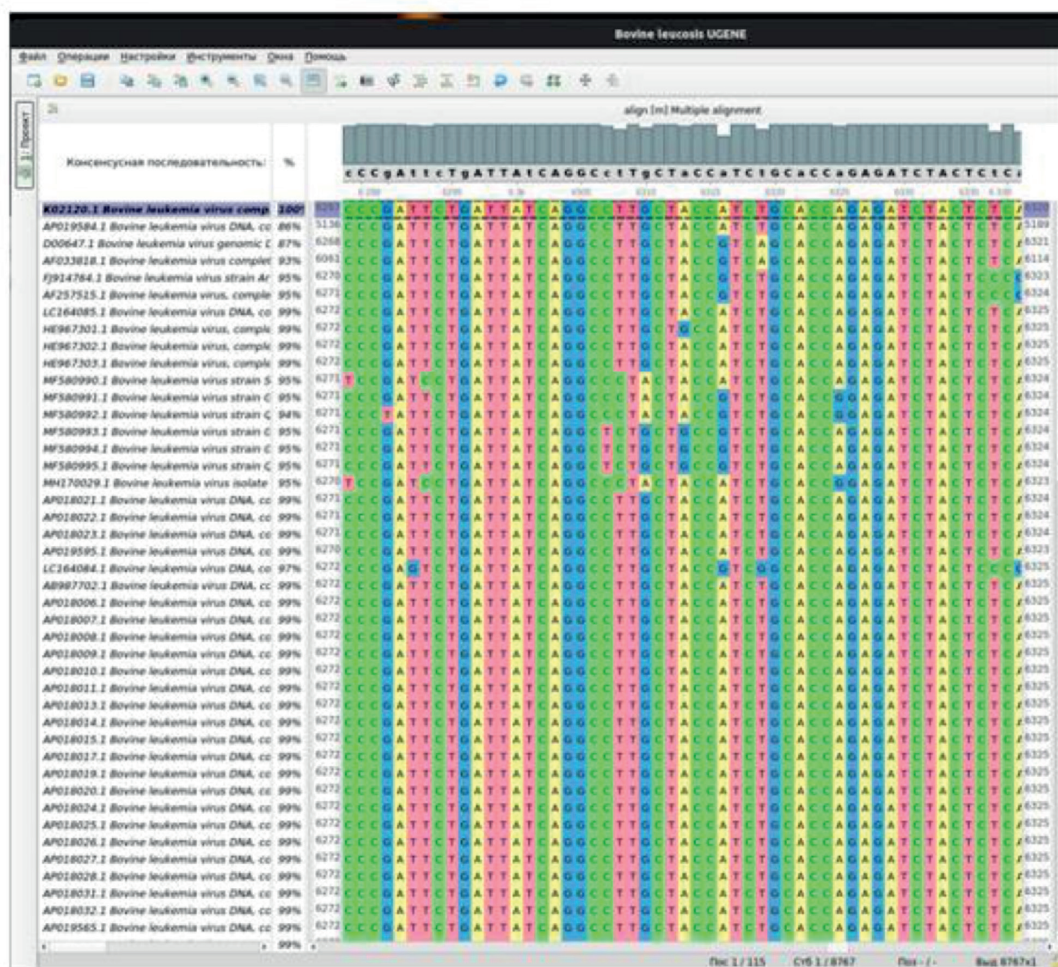


Рисунок 1 – Выравнивание нуклеотидных последовательностей полных геномов вируса лейкоза крупного рогатого скота с помощью программы UGENE 36.0

Для подбора праймеров были выбраны области, кодирующие ген *env*. В качестве референтной последовательности был использован геном с GenBank ID: K02120. В результате были подобраны 10 пар праймеров на ген *env* (таблица 1, рисунок 2).

Таблица 1 – Комбинации различных пар праймеров на геном вируса лейкоза крупного рогатого скота

№ п/п	Прямой праймер	Обратный праймер
1	ACTCTAACCTGGGAGATATGGG	GACGAGTTGACCCAGAAGATTT
2	CCTTCCCAGACTGTGCTATATG	GAGGAAGCCGTAGAGAGATTAAC
3	AACCCGACTTTCCCCAGTTG	GACCCAGAAGATTTGGGCGT
4	CAACCCGACTTTCCCCAGTT	CGGAGGAAGCCGTAGAGAGA
5	CATATGATTGCGAGCCCCGA	AACTGGGGAAAGTCGGGTTG
6	CCCTCTGTCAGATCATGGGC	TGACCCAGAAGATTTGGGCG
7	TATGATTGCGAGCCCCGATG	GGCCCATGATCTGACAGAGG
8	AGTGACTGGGTTCCTCTGT	GCCATCCTTGGGTGGTGTTA
9	CCTTATGTGGGGGCAGATCG	GCCCATGATCTGACAGAGGG
10	CCCGACTTTCCCCAGTTGAA	ACCCAGAAGATTTGGGCGTC

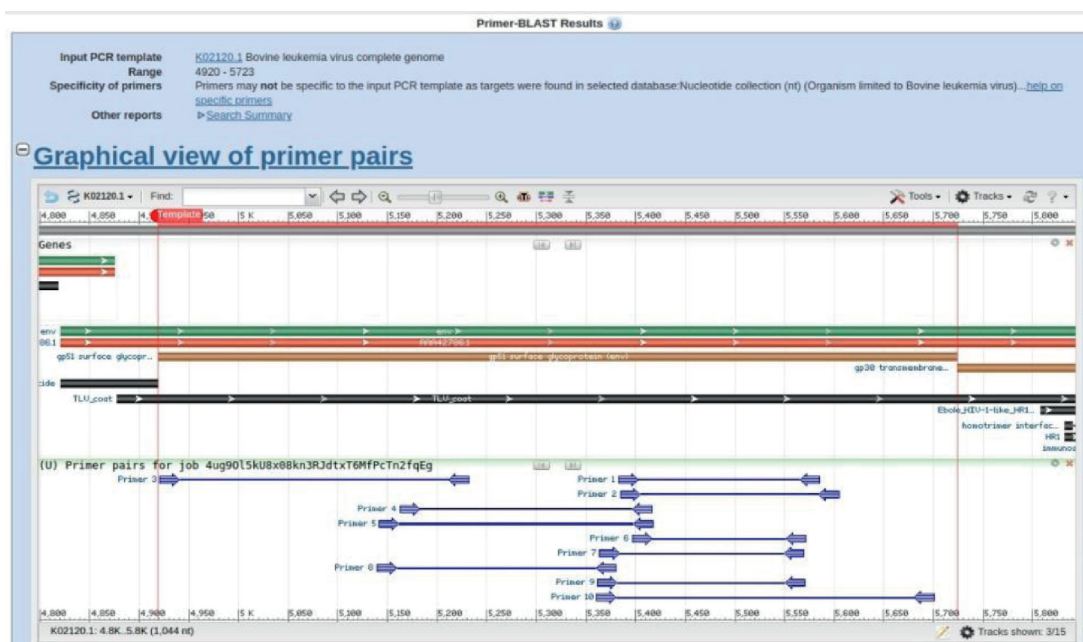


Рисунок 2 – Графическое представление подобранных пар праймеров к гену *env* на геноме

В данном случае также проводили предварительный отбор пула праймеров по основным критериям, предъявляемым для ПЦР. В первую очередь длина олигонуклеотида не должна была превышать 22 нуклеотида, имела допустимое процентное соотношение GC – оснований – 40-70%, температуру плавления и прогнозируемый размер ПЦР продукта, находящийся в пределах 150-400 п.н. Из пула конструированных праймеров на первом этапе для дальнейших исследований отобраны пять пар праймеров для разработки ПЦР.

В дальнейшей работе, проверяли термодинамические и структурные характеристики подобранных олигонуклеотидов. Праймеры не должны образовывать тугоплавких шпилек, гомо- и гетеродимеры. Праймеры не должны иметь ΔG меньше -6 kcal/mole. Проверку проводили с использованием программы OligoAnalyzer (<https://www.idtdna.com/calc/analizer>). Праймеры не должны иметь ΔG меньше -6 kcal/mole. На рисунке 3 приведен пример праймера, исключенного из дальнейшего анализа.

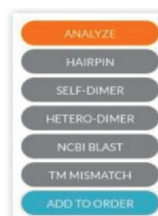
Homo-Dimer Analysis

The delta G is calculated by taking into account the longest stretch of complementary bases. These pairs of complementary bases are represented by a solid line. Dotted lines represent additional complementary bases for that dimer structure, but their presence does not impact calculated delta G values. Actual delta G values may vary based on presence of additional complementary bases. The Maximum Delta G value refers to the free energy of the oligo sequence binding to its perfect complement.

Dimer Sequence:
5'- AGGGCCATCATCCAGCTTTC -3'
Maximum Delta G: -40.77 kcal/mole

Delta G: -9.28 kcal/mole Base Pairs: 4
5' AGGGCCATCATCCAGCTTTC
: |||| :
3' CTTTCGACCTACTACCGGGA

Delta G: -6.34 kcal/mole Base Pairs: 4
5' AGGGCCATCATCCAGCTTTC
: |||| :
3' CTTTCGACCTACTACCGGGA



№12
2022

Рисунок 3 – Проверка праймеров на образование димеров

Как видно из приведенных на рисунке 3 данных, в ходе проверки подобранных нами праймеров были обнаружены праймеры с показателями само-димеров ΔG которых составляет -9.28 и -6.34, такие димеры могут затруднить проведение реакции ОТ-ПЦР, соответственно их мы исключали.

Следующим этапом проверяли специфичность подобранных праймеров с использованием программы BLAST, праймеры должны быть 100% специфичны с геномом ВЛКРС. Пример такого анализа представлен на рисунке 4.

Description	Max Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Bovine leukemia virus BLV_B1.3.1 proviral DNA, complete genome	40.1	100%	0.54	100.00%	g11806500253HLC436098.1
Bovine leukemia virus BLV_B1.2M3 proviral DNA, complete genome	40.1	100%	0.54	100.00%	g11806500237HLC433846.1
Bovine leukemia virus DNA, complete sequence, strain: cvA3034	40.1	100%	0.54	100.00%	g116101016931AP019598.1
Bovine leukemia virus DNA, complete sequence, strain: cvA3032	40.1	100%	0.54	100.00%	g116101016731AP019596.1
Bovine leukemia virus DNA, complete sequence, strain: cvA3031	40.1	100%	0.54	100.00%	g116101016651AP019595.1
Bovine leukemia virus DNA, complete sequence, strain: cvA3030	40.1	100%	0.54	100.00%	g116101016551AP019594.1
Bovine leukemia virus DNA, complete sequence, strain: cvA3028	40.1	100%	0.54	100.00%	g116101016351AP019592.1
Bovine leukemia virus DNA, complete sequence, strain: cvA3027	40.1	100%	0.54	100.00%	g116101016251AP019591.1
Bovine leukemia virus DNA, complete sequence, strain: cvA3018	40.1	100%	0.54	100.00%	g116101015371AP019582.1
Bovine leukemia virus DNA, complete sequence, strain: cvA3015	40.1	100%	0.54	100.00%	g116101015071AP019579.1
Bovine leukemia virus DNA, complete sequence, strain: cvA3014	40.1	100%	0.54	100.00%	g116101014971AP019578.1
Bovine leukemia virus DNA, complete sequence, strain: cvA3011	40.1	100%	0.54	100.00%	g116101014671AP019575.1
Bovine leukemia virus DNA, complete sequence, strain: cvA3010	40.1	100%	0.54	100.00%	g116101014571AP019574.1
Bovine leukemia virus DNA, complete sequence, strain: cvA3009	40.1	100%	0.54	100.00%	g116101014471AP019573.1
Bovine leukemia virus DNA, complete sequence, strain: cvA3008	40.1	100%	0.54	100.00%	g116101014371AP019572.1
Bovine leukemia virus DNA, complete sequence, strain: cvA3007	40.1	100%	0.54	100.00%	g116101014271AP019571.1
Bovine leukemia virus DNA, complete sequence, strain: cvA3004	40.1	100%	0.54	100.00%	g116101013971AP019568.1
Bovine leukemia virus isolate 56F15, complete genome	40.1	100%	0.54	100.00%	g114461096951MH170028.1
Bovine leukemia virus strain QH2, complete genome	40.1	100%	0.54	100.00%	g113364730781MF580995.1
Bovine leukemia virus strain GS3, complete genome	40.1	100%	0.54	100.00%	g113364730771MF580994.1
Bovine leukemia virus DNA, complete sequence, strain: cvAN015	40.1	100%	0.54	100.00%	g11714445061AP018032.1
Bovine leukemia virus DNA, complete sequence, strain: cvAN014	40.1	100%	0.54	100.00%	g11714444941AP018031.1
Bovine leukemia virus DNA, complete sequence, strain: cvAN013	40.1	100%	0.54	100.00%	g11714444801AP018030.1
Bovine leukemia virus DNA, complete sequence, strain: cvAN011	40.1	100%	0.54	100.00%	g11714444631AP018029.1

Рисунок 4 – Проверка специфичности праймеров с помощью программы BLAST

Проведенные эксперименты по выбору пары праймеров показали, что оптимальными оказались праймеры *env(g51)_1F* и *env(g51)_1R*, *env(g51)_2F* и *env(g51)_2R*, позволяющие набирать ПЦР продукт соответственно размерами 206 п.н. и 340 п.н.

Автоматический синтез олигонуклеотидов осуществляли с помощью специальных приборов – ДНК-синтезаторов. Синтез праймера проводили поэтапным достраиванием нуклеотида, согласно его нуклеотидной последовательности.

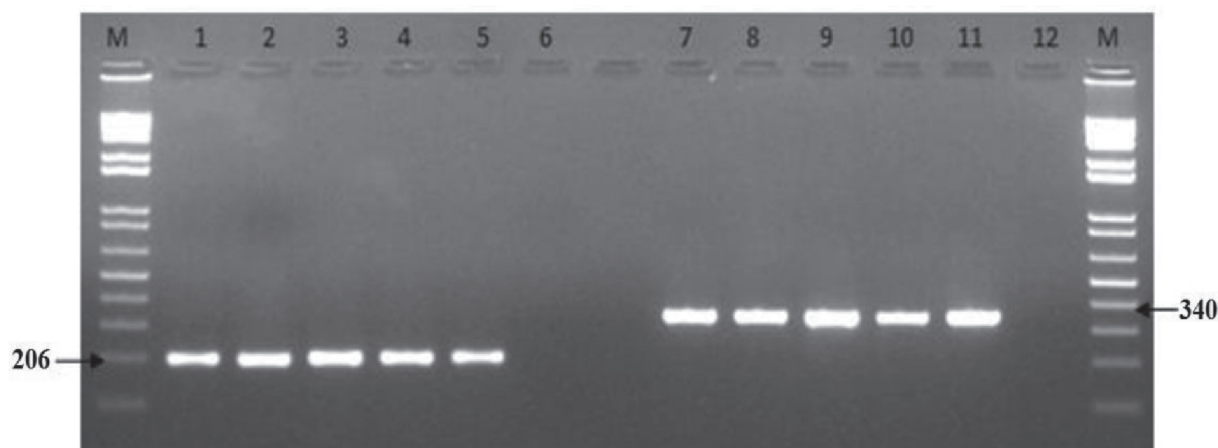
По результатам проведенного нами работы были подобраны следующие пары праймеров: *env(gp51)_1F* и *env(gp51)_1R*, *env(gp51)_2F* и *env(gp51)_2R*. В таблице 2 приведена характеристика специфических синтетических олигонуклеотидов для идентификации гена вируса лейкоза крупного рогатого скота.

Таблица 2 – Характеристика специфических олигонуклеотидов для постановки ОТ-ПЦР на ген *env(gp51)* вируса лейкоза крупного рогатого скота

Ген	Последовательность (5'→3')	Длина	Tm, °C	GC%	Размер продукта, п.н.
<i>env(g51)_1F</i>	CCCGACTTTCCCCAGTTGAA	20	59.89	55	206
<i>env(g51)_1R</i>	ACCCAGAAGATTTGGGCGTC	20	60.32	55	
<i>env(gp51)_2F</i>	CAACCCGACTTTCCCCAGTT	20	60.18	55	340
<i>env(gp51)_2R</i>	CGGAGGAAGCCGTAGAGAGA	20	60.46	60	

Следующим этапом было проведение проверки работы праймеров. Нарработку ПЦР продуктов проводили в амплификаторе Mastercycler ep Gradient S (Eppendorf, Германия) согласно режиму амплификации, подобранным нами в результате ряда экспериментов: 50°C – 30 мин, 95°C – 10 мин, 35 циклов, 94°C – 20 сек, 58°C – 20 сек, 72°C – 40 сек и 72°C – 7 мин, 4°C – хранение.

На рисунке 5 представлен электрофореграмма ПЦР, согласно которой размеры полученных ПЦР-продуктов соответствуют своим, выше указанным теоретическим размерам.



М – ДНК маркеры молекулярных весов;
1,7 – кДНК вируса концентрация праймера в РС 0,5 мкл;
2,8 – кДНК вируса концентрация праймера в РС 1,0 мкл;
3,9 – кДНК вируса концентрация праймера в РС 1,5 мкл;
4,10 – кДНК вируса концентрация праймера в РС 2,0 мкл;
5,11 – кДНК вируса концентрация праймера в РС 2,5 мкл;
6,12 – Отрицательный контроль

Рисунок 5 – Электрофореграмма продуктов амплификации ОТ-ПЦР с праймерами участка *env (g51)_1* и *env (g51)_2* кДНК лейкоза крупного рогатого скота

Таким образом, синтезированные нами праймеры отвечают всем общепринятым рекомендациям, которые используются при конструировании праймеров.

Заключение

Таким образом, в результате проведенных исследований проведен поиск полных нуклеотидных последовательностей гена *env*. Проведен сравнительный анализ и множественное выравнивание полных нуклеотидных последовательностей гена. И на основе анализа последовательностей гена вируса лейкоза крупного рогатого скота, с использованием программы «OligoAnalyzer», подобраны праймеры для специфического выявления вируса. Так же произведен синтез специфических праймеров в необходимом количестве на синтезаторе олигонуклеотидов, согласно протоколам производителя. В результате проведенной апробации подобранных праймеров, судя по качеству получившихся продуктов ПЦР, оба праймера рабочие.

Литература

- 1 ICTV International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Available online at: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy>
- 2 Buehring G.C., DeLaney A., Shen H. et. al. Bovine leukemia virus discovered in human blood // BMC Infect Dis. – 2019. – Vol. 19, Issue 1. – P. 297-1-297-10. doi: 10.1186/s12879-019-3891-9.
- 3 Khatami A., Pormohammad A., Farzi R. et. al. Bovine Leukemia virus (BLV) and risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis of case-control studies // Infect Agent Cancer. – 2020. – Vol.15. – P. 48-1-48-8. doi: 10.1186/s13027-020-00314-7.
- 4 Gillet M., Florins A., Boxus M. et. al. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human // Retrovirology. – 2007. – Vol. 4. – P. 18-1-18-32. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-4-18>
- 5 Polat M., Takeshima S.N., Aida Y. Epidemiology and genetic diversity of bovine leukemia virus // Virol J. – 2017. - Vol.14, Issue 1. – P. 209-1-209-16. doi: 10.1186/s12985-017-0876-4.
- 6 Sultanov A., Rola-Łuszczak M., Mamanova S. et al. Molecular Characterization of Bovine Leukemia Virus with the Evidence of a New Genotype Circulating in Cattle from Kazakhstan / Pathogens. – 2022. – Vol. 11, Issue 2. – P. 180-1-180-21. doi:10.3390/pathogens11020180
- 7 Bartlett P.C., Ruggiero VJ, Hutchinson H.C. et.al. Current Developments in the Epidemiology and Control of Enzootic Bovine Leukosis as Caused by Bovine Leukemia Virus // Pathogens. – 2020. – Vol. 9, Issue 12. – P. 1058-1-1058-13. doi: 10.3390/pathogens9121058.
- 8 Petropavlovsky M.V. Immuno-biological evaluation of individual genetic variants of bovine leukemia virus in the conditions of the Ural region / Collection: Digital agriculture - development strategy Proceedings of the International Scientific and Practical Conference (ISPC 2019). Ser. «Advances in Intelligent Systems Research». – 2019. – P. 372-377.
- 9 Hamada R., Metwally S., Polat M. et. al. Detection and Molecular Characterization of Bovine Leukemia Virus in Egyptian Dairy Cattle // Front Vet Sci. – 2020. – Vol. 7. – P. 608-1-608-13. doi: 10.3389/fvets.2020.00608
- 10 Петропавловский М.В., Безбородова Н.А., Романова А.С. и др. Опыт применения полимеразной цепной реакции при диагностике вируса лейкоза крупного рогатого скота и ее эффективность на разных этапах проведения оздоровительных мероприятий / Аграрный вестник Урала. – 2019. – №12(191). – С. 52-59.
- 11 Вангели С.В. Сравнительная ультраструктурная характеристика культур клеток, хронически инфицированных вирусом лейкоза крупного рогатого скота: дис... канд.вет.наук: 06.02.02 / Вангели Сергей Валерьевич. – Москва, 2015. – 114 с.
- 12 Kerkhofs P., Gatot S., Knapen K. Longterm protection against bovine leukaemia virus replication in cattle and sheep / J. Gen.Virol. – 2000. – Vol. 81. – P. 957-963.
- 13 Rossler H., Burkhardt H., Rosental S. Influence of different culture conditions on BLV expression in permanently infected PLK cell lines / Folia biol. (CSSR). – 1985. – Vol.31, Issue 4. – P. 273-283.
- 14 Schwartz I., Bensaid A., Polack B. In vivo leukocyte tropism of bovine leukemia virus in sheep and cattle / J. Virol. – 1994. – Vol. 68, Issue 7. – P.4589-4596.
- 15 Bruck C., Rensonnet N., Portetelle D. et.al. Biologically active epitopes of bovine leukemia virus glycoprotein gp51: their dependence on protein glycosylation and genetic variability // Virology. – 1984. – Vol. 136, Issue 1. – P. 20-31. doi: 10.1016/0042-6822(84)90244-7.
- 16 Sagata N., Yasunaga T., Tsuzuku-Kawamura J. et. al. Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: its evolutionary relationship to other retroviruses // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1985. – Vol. 82, Issue 3. – P. 677-681. doi: 10.1073/pnas.82.3.677.
- 17 Dieffenbach C., Dveksler G. PCR Primer: A Laboratory Manual / Cold Spring Harbor Laboratory Pr., – P. 2003-520.
- 18 Barlett J., Stirling D. PCR Protocols // Methods in molecular biology. – 2003. – Vol.226. – 556 p.
- 19 Охупкина С.С., Акишев А.Г., Дегтярев С.Х. Полимеразно-цепная реакция (ПЦР) и ее применение / Библиотека научных трудов СибЭнзим. – 2014. <http://sciencerrussian.sibenzyme.com/papers/popularabout/using-pcr>
- 20 Derse D., Diniak A.J., Casey J.W. et.al. Nucleotide sequence and structure of integrated bovine leukemia virus long terminal repeats / Virology. – 1985. – Vol. 141. – P. 162-166.

- 21 Derse D., Casey J.W. Two elements in the bovine leukemia virus long terminal repeat that regulate gene expression / Science. – 1986. – Vol. 231. – P. 1437-1440.
- 22 Гильманов Х.Х. Генотипирование крупного рогатого скота по генам, определяющим устойчивость к лейкозу, и геноидентификация его этиологического агента: дис... канд.биол.наук. / Гильманов Хамид Халимович. – Казань, 2019. – 163 с.
- 23 Martin D., Arjona A., Soto I. et.al. Comparative study of PCR as a direct assay and ELISA and AGID as indirect assays for the detection of bovine leukaemia virus / Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Publ. Health. – 2001. – Vol. 48. – P. 97-106.
- 24 Облап Р.В., Глазко В.И., Созинов А.А. Вирус бычьего лейкоза и диагностика инфицированных животных / Цитология и генетика. – 1997. – №31. – С. 41-43.

References

- 1 ICTV International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Available online at: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy>
- 2 Buehring G.C., DeLaney A., Shen H. et. al. Bovine leukemia virus discovered in human blood // BMC Infect Dis. – 2019. – Vol. 19, Issue 1. – P. 297-1-297-10. doi: 10.1186/s12879-019-3891-9.
- 3 Khatami A., Pormohammad A., Farzi R. et. al. Bovine Leukemia virus (BLV) and risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis of case-control studies // Infect Agent Cancer. – 2020. – Vol.15. – P. 48-1-48-8. doi: 10.1186/s13027-020-00314-7.
- 4 Gillet M., Florins A., Boxus M. et. al. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human // Retrovirology. – 2007. – Vol. 4. – P. 18-1-18-32. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-4-18>
- 5 Polat M., Takeshima S.N., Aida Y. Epidemiology and genetic diversity of bovine leukemia virus // Virol J. – 2017. – Vol.14, Issue 1. – P. 209-1-209-16. doi: 10.1186/s12985-017-0876-4.
- 6 Sultanov A., Rola-Łuszczak M., Mamanova S. et al. Molecular Characterization of Bovine Leukemia Virus with the Evidence of a New Genotype Circulating in Cattle from Kazakhstan / Pathogens. – 2022. – Vol. 11, Issue 2. – P. 180-1-180-21. doi:10.3390/pathogens11020180
- 7 Bartlett P.C., Ruggiero VJ, Hutchinson H.C. et.al. Current Developments in the Epidemiology and Control of Enzootic Bovine Leukosis as Caused by Bovine Leukemia Virus // Pathogens. – 2020. – Vol. 9, Issue 12. – P. 1058-1-1058-13. doi: 10.3390/pathogens9121058.
- 8 Petropavlovsky M.V. Immuno-biological evaluation of individual genetic variants of bovine leukemia virus in the conditions of the Ural region / Collection: Digital agriculture - development strategy Proceedings of the International Scientific and Practical Conference (ISPC 2019). Ser. «Advances in Intelligent Systems Research». – 2019. – P. 372-377.
- 9 Hamada R., Metwally S., Polat M. et. al. Detection and Molecular Characterization of Bovine Leukemia Virus in Egyptian Dairy Cattle // Front Vet Sci. – 2020. – Vol. 7. – P. 608-1-608-13. doi: 10.3389/fvets.2020.00608
- 10 Petropavlovskij M.V., Bezborodova N.A., Romanova A.S. i dr. Opyt primeneniya polimeraznoj cepnoj reakcii pri diagnostike virusa lejkoza krupnogo rogatogo skota i ee effektivnost' na raznyh etapah provedeniya ozdorovitel'nyh meropriyatij / Agrarnyj vestnik Urala. – 2019. – №12(191). – S. 52-59.
- 11 Vangeli S.V. Sravnitel'naya ul'trastrukturnaya harakteristika kul'tur kletok, hronicheski inficirovannyh virusom lejkoza krupnogo rogatogo skota: dis... kand.vet.nauk: 06.02.02 / Vangeli Sergej Valer'evich. – Moskva, 2015. – 114 s.
- 12 Kerkhofs P., Gatot S., Knapen K. Longterm protection against bovine leukaemia virus replication in cattle and sheep / J. Gen.Virol. – 2000. – Vol. 81. – P. 957-963.
- 13 Rossler H., Burkhardt H., Rosental S. Influence of different culture conditions on BLV expression in permanently infected PLK cell lines / Folia biol. (CSSR). – 1985. – Vol.31, Issue 4. – P. 273-283.
- 14 Schwartz I., Bensaid A., Polack B. In vivo leukocyte tropism of bovine leukemia virus in sheep and cattle / J. Virol. – 1994. – Vol. 68, Issue 7. – P.4589-4596.
- 15 Bruck C., Rensonnet N., Portetelle D. et.al. Biologically active epitopes of bovine leukemia virus glycoprotein gp51: their dependence on protein glycosylation and genetic variability // Virology. – 1984. – Vol. 136, Issue 1. – P. 20-31. doi: 10.1016/0042-6822(84)90244-7.

- 16 Sagata N., Yasunaga T., Tsuzuku-Kawamura J. et. al. Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: its evolutionary relationship to other retroviruses // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1985. – Vol. 82, Issue 3. – P. 677-681. doi: 10.1073/pnas.82.3.677.
- 17 Dieffenbach C., Dveksler G. PCR Primer: A Laboratory Manual / Cold Spring Harbor Laboratory Pr., – P. 2003-520.
- 18 Barlett J., Stirling D. PCR Protocols // Methods in molecular biology. – 2003. – Vol.226. – 556 p.
- 19 Ohapkina S.S., Akishev A.G., Degtyarev S.H. Polimerazno-cepная reakciya (PCR) i ee primeneniye / Biblioteka nauchnykh trudov SibEnzim. – 2014. <http://sciencerrussian.sibenzyme.com/papers/popularabout/using-pcr>
- 20 Derse D., Diniak A.J., Casey J.W. et.al. Nucleotide sequence and structure of integrated bovine leukemia virus long terminal repeats / Virology. – 1985. –Vol. 141. – P. 162-166.
- 21 Derse D., Casey J.W. Two elements in the bovine leukemia virus long terminal repeat that regulate gene expression / Science. – 1986. –Vol. 231. – P. 1437-1440.
- 22 Gil'manov H.H. Genotipirovaniye krupnogo rogatogo skota po genam, opredelyayushchim ustojchivost' k lejkozu, i genoidentifikaciya ego etiologicheskogo agenta: dis... kand.biol.nauk. / Gil'manov Hamid Halimovich. – Kazan', 2019. – 163 s.
- 23 Martin D., Arjona A., Soto I. et.al. Comparative study of PCR as a direct assay and ELISA and AGID as indirect assays for the detection of bovine leukaemia virus / Vet. Med . B. Infect. Dis. Vet. Publ Health. – 2001. – Vol. 48. – P. 97-106.
- 24 Oblap P.V., Glazko V.I., Sozinov A.A. Virus bych'ego lejkoza i diagnostika inficirovannykh zhivotnykh / Citologiya i genetika. – 1997. – №31. – S. 41-43.

ІРІ ҚАРА МАЛДЫҢ ЛЕЙКОЗЫ КЕЗІНДЕ ПТР ЖҮРГІЗУГЕ АРНАЛҒАН СПЕЦИФИКАЛЫҚ ПРАЙМЕРЛЕРДІ ТАҢДАУ

У.Ж. Кужебаева *, И.С. Бейшова , В.А. Ульянов ,
Т.В. Ульянова , А.М. Ковальчук , Н.С. Гинаятов , А.Ж. Сидарова 

«Жәңгір хан атындағы Батыс Қазақстан аграрлық-техникалық университеті» КеАҚ-ң,
Қазақстан, Орал
usya_999@mail.ru

Аннотация: полимеразды тізбекті реакция (ПТР) әдісі әртүрлі мәселелерді шешу үшін кеңінен қолданылады. ПТР бактериялық және вирустық сипаттағы патогендерді анықтау үшін кеңінен қолданылады. Праймерлер ПТР-дің өте маңызды құрамдас бөлігі болып табылады, өйткені күшейту ерекшелігі бірінші кезекте оларға байланысты. Олар ферменттің жұмыс істеуі үшін қажет және спецификалық фрагментіне тән. NCBI веб-сайтындағы халықаралық дерекқордан геномның нуклеотидтік тізбегін немесе вирустың жеке РНҚ фрагменттерін іріктеу нәтижелері бойынша ген банктерінде сақталатын және күн сайын жаңа деректермен толықтырылатын ірі қара малдың лейкоз вирусына арналған көптеген тізбектер анықталды. Қажетті параметрлерді сақтай отырып, праймерлерді жобалау әртүрлі компьютерлік бағдарламалардың көмегімен жүзеге асырылады, олардың негізгілері MUSCLE, UGENE V. 36.0, Primer-BLAST, Oligo Analyzer және басқалары. Содан кейін құрастырылған праймерлер құралмен бірге берілген нұсқауларға сәйкес Expedite 8909 олигонуклеотид синтезаторында синтезделді. Жүргізілген тәжірибелер нәтижесінде біз ірі қара малдың лейкозына ПТР қою үшін *env (g51)_1* және *env (g51)_2* арнайы синтетикалық олигонуклеотидтерін таңдап, синтездедік.

Түйін сөздер: ірі қара малдың лейкозы; праймер; ген; нуклеотидтер; полимеразды тізбекті реакция

SELECTION OF SPECIFIC PRIMERS FOR PCR IN BOVINE LEUKEMIA VIRUS

U.Zh. Kuzhebayeva *, I.S. Beishova , V.A. Ulyanov ,
T.V. Ulyanova , A.M. Kovalchuk , N.S. Ginayatov , A.Zh. Sidarova 

NCJSC «Zhangir Khan Agrarian Technical University», Kazakhstan, Ural
usya_999@mail.ru

Abstract: the polymerase chain reaction (PCR) method is widely used to solve various problems. PCR is widely used for the detection of bacterial and viral pathogens. Primers are a very important component of PCR, since the specificity of amplification depends primarily on them. They are necessary for the enzyme to work and are specific to the fragment of interest. Based on the results of the selection of nucleotide sequences of the genome or individual fragments of the virus RNA from the international database on the NCBI website, a large number of sequences for the bovine leukemia virus were identified, which are stored in gene banks and updated daily with new data. The construction of primers in compliance with the necessary parameters is carried out using various computer programs, the main of which are MUSCLE, UGENE V.36.0, Primer-BLAST, Oligo Analyzer and others. The designed primers were then synthesized on the Expedite 8909 oligonucleotide synthesizer, according to the instructions attached to the device. As a result of our experiments, we selected and synthesized specific synthetic oligonucleotides *env (g51)_1* and *env (g51)_2*, for setting up PCR for bovine leukemia.

Keywords: bovine leukemia virus: primer; gene; nucleotides; polymerase chain reaction

КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ЮЖНО-АФРИКАНСКОГО ВАРИАНТА ОМИКРОН ВИРУСА SARS-COV-2 КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ COVID-19

Б.Ш. Мырзахметова , К.Б. Бисенбаева , М.Ж. Каукарбаева ,
Е.Д. Бурашев , Л.Б. Кутумбетов 

Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности,
пгт Гвардейский
balzhan.msh@mail.ru

Аннотация: в настоящей работе представлены данные по изучению культуральных свойств генетического варианта Омикрон вируса SARS-CoV-2 коронавирусной инфекции COVID-19. Наиболее перmissive биологическими системами для репродукции данного варианта вируса являются культуры клеток Vero, PK-15, СПЭВ, MA-104, MARC-145. Оптимальными условиями культивирования генетического варианта Омикрон вируса SARS-CoV-2 в изучаемых клеточных линиях оказались следующие параметры: посевная концентрация клеток 200 тыс/см³, множественность заражения – 0,01 ТЦД_{50/кл}, срок культивирования вируса – 2 сут, площадь поражения клеточного монослоя перед сбором вируса – 75-80%, биологическая активность вируса в пределах от 4,14±0,31 до 6,66±0,22 lg ТЦД₅₀/см³.

Ключевые слова: вирус SARS-CoV-2; коронавирусная инфекция COVID-19; омикрон; культура клеток; мутация; контагиозность; пандемия

Введение

Коронавирусная инфекция COVID-19 - эта инфекционная болезнь, вызываемая новым вирусом из семейства Coronaviridae, появившаяся в конце декабря 2019 года в КНР, а в марте 2020 года получившая пандемическое распространение, охватив на тот момент более 180 стран, с момента официального объявления по сегодняшний день распространилась в 209 странах мира, поразив 620 млн. человек по всему миру, и привела к смерти 6,55 млн. человек [1]. Болезнь отличается высокой контагиозностью, в результате которой она приняла такой эпидемический статус, в связи с чем в январе 2020 года ВОЗ объявила данную болезнь – пандемией [2].

С увеличением численности населения на земном шаре и на фоне развития социально-экономических, экологических факторов вероятность биологической угрозы для человечества и животных в виде инфекционных болезней постоянно возрастает.

Как показывает практика пандемии, возбудитель коронавирусной инфекции COVID-19 обладает высокой мутагенностью [3-5]. За прошедший период после начала пандемии возбудитель болезни претерпел множество генетических изменений, которые повлекли за собой и фенотипические изменения в его свойствах, таких как патогенность и контагиозность [6,7]. Однако все эти изменения не вышли за «красную черту», благодаря чему поствакцинальный и постинфекционный иммунитет, сформированный на имеющиеся варианты вируса, остается действенным, т. е. еще способен защитить от развития данной болезни.

В ноябре 2021 года в странах Южной Африки появился новый генетический вариант вируса SARS-CoV-2, получившее обозначение по классификации PANGO – B.1.1.529 [8,9].

В конце ноября ВОЗ классифицировала данный генетический вариант как VOC, то есть вариант вируса, вызывающий беспокойство и присвоила код Omicron (B.1.1.529+BA) [10]. Особенностью этого варианта вируса является способность быстро распространяться от больного к здоровому человеку при невысокой тяжести вызываемого заболевания, за исключением людей с уязвимым иммунитетом [11]. Штамм SARS-CoV-2 B.1.1.529 является потомком (представителем линии поколений) B.1.1. [12]. Он характеризуется большим количеством мутаций в спайковом (S) белке, где их более 30: A67V, Δ69-70, T95I, G142D/Δ143-145, Δ211/L212I, ins214EPE, G339D, S371L, S373P, S375F, K417N, N440K, G446S, S477N, T478K, E484A, Q493K, G496S, Q498R, N501Y, Y505H, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K и L981F, а также мутацией ORF1b:T2163I, ранее известной по дельта-субварианту AY, широко распространённому в Европе [13,14].

Целью данной работы являлось изучение культуральных свойств вируса SARS-CoV-2 генетического варианта Омикрон и степени его накопления в пермиссивных клеточных системах культивирования.

Материалы и методы

Вирус выделяли из клинических образцов (мазки-смазвы слизистой оболочки носовой полости) с вероятным содержанием варианта «Омикрон» южно-африканского происхождения, собранных от больных пациентов из разных областей РК.

Для выделения вируса использовали культуру клеток Vero, приготовленную монослоем в матрасах (25 см²) путем выращивания в питательной среде DMEM с добавлением 10% фетальной сыворотки крови крупного рогатого скота.

На монослой культуры клеток Vero, наносили суспензию смывов слизистой оболочки носовой полости больных в объеме 0,5 мл и выдерживали в течение 60 минут при температуре 37°C. Затем инокулят удаляли, монослой промывали три раза с неполной питательной средой DMEM и вносили поддерживающую среду с 2% фетальной сывороткой крови крупного рогатого скота и продолжали культивирование в условиях CO₂-инкубатора при температуре 37 °C с содержанием в воздухе 5% CO₂ и 95% относительной влажности с ежедневной микроскопией. Наличие вируса устанавливали по цитопатогенному действию в культуре клеток. Титр вируса определяли титрованием в аналогичной культуре клеток, приготовленной в 96-луночных планшетах. Титр рассчитывали по Риду и Менча [15]. Выделенный вирус идентифицировали в реакции нейтрализации с использованием сыворотки крови, полученной на Уханьский вариант вируса SARS-CoV-2 путем иммунизации интактных сирийских хомячков.

Для получения новой генерации вируса культуру клеток с выраженным ЦПД замораживали, затем размораживали и полученным культуральным вирусом заражали свежую культуру клеток.

Для определения чувствительности различных культур клеток вирусом, выделенным в культуре клеток Vero, в одинаковой дозе заражали параллельно разные виды культур клеток. Затем микроскопией устанавливали развитие ЦПД, а титрованием – уровень накопления вируса в каждой использованной культуре клеток. Чувствительность каждого вида культуры клеток оценивали в трех последовательных пассажах.

Результаты

Ежедневная микроскопия культуры клеток, инфицированной клиническими образцами, показала, что на вторые сутки после заражения появились некоторые изменения морфологии отдельных клеток в монослое. Выраженное цитопатическое действие (ЦПД) вируса проявлялось на 2 сутки культивирования в виде округления клеток, резко преломляющих свет, а в следующие два дня количество таких клеток резко увеличивалось, и они массово

отторгались от поверхности адгезии и без разрушения, сохраняя свою целостность, плавали в культуральной суспензии в виде шариков. Полное разрушение монослоя посредством отслоения пораженных клеток наступало на 2-3 сутки после появления признаков цитопатологии.

В последующих пассажах характер ЦПД оставался таким же, как и на первом пассаже при выделении. Титр вируса 3-го пассажа в культуре клеток Vero составил $10^{6,66}$ ТЦД_{50/см³}.

В реакции нейтрализации выделенный изолят вируса полностью нейтрализовался с помощью сыворотки крови, содержащей специфические антитела на вирус SARS-CoV-2, а исследование генома показало, что возбудитель относится к варианту «Омикрон».

Для изучения спектра цитопатогенности выделенного генетического варианта Омикрон вируса SARS-CoV-2 были использованы 9 различных культур клеток перевиваемого происхождения, на которых вирус параллельно пассировали трехкратно при одинаковой множественности заражения и условий инкубирования. Для заражения исследуемых культур клеток был использован вирус третьего пассажа в культуре клеток Vero. О чувствительности культур клеток судили по скорости и интенсивности ЦПД, а также титру вируса, накапливаемого в процессе культивирования. Результаты оценки пермиссивности культур клеток к варианту Омикрон вируса SARS-CoV-2 приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Пермиссивность перевиваемых культур клеток к генетическому варианту Омикрон вируса SARS-CoV-2

Наименование культуры клеток	Критерии оценки пермиссивности культур клеток к вирусу				
	Пассажный уровень вируса	Время появления ЦПД вируса, ч	Срок культивирования вируса, сут	Площадь поражения клеточного монослоя перед сбором вируса, %	Титр вируса в культуре клеток Vero, lg ТЦД _{50/см³} (X±m)
Vero	1	36-48	5	60-70	4.14±0.31
	2	36-48	4	60-70	5.27±0.22
	3	36-48	4	75-80	6.66±0.22
СПЭВ	1	46-48	5	60-70	4.72±0.08
	2	46-48	4	60-70	4.91±0.16
	3	46-48	3	75-80	5.08±0.08
РК-15	1	48-50	5	60-70	4.65±0.22
	2	48-50	4	60-70	4.86±0.08
	3	48-50	3	75-80	5.13±0.16
MARC-145	1	46-48	5	60-70	4.17±0.22
	2	46-48	4	70-80	4.22±0.08
	3	46-48	3	80-90	4.60±0.25
МА-104	1	46-48	4	60-70	4.33±0.22
	2	46-48	4	70-80	4.70±0.08
	3	46-48	3	80-90	4.55±0.14
МДСК	1	120-144	7	10-20	0.77±0.08
	2	120-144	6	10-20	0.51±0.16
	3	120-144	6	10-20	0.79±0.16
RK-13	1	120-144	7	10-20	0.68±0.08
	2	120-144	6	10-20	0.57±0.08
	3	120-140	6	50-60	0.71±0.08
ВНК-21	1	-	7	-	0.52±0.08
	2	-	6	-	0.65±0.14
	3	-	6	-	0.38±0.08
CRFK	1	48-50	6	10-15	0.05±0.08
	2	48-50	6	10-15	0.00
	3	-	6	-	0.00

Примечание: «-» – результат отрицательный

Как видно из данных таблицы 1, из 9 видов испытанных культур клеток наиболее чувствительными к вирусу SARS-CoV-2 генетического варианта Омикрон оказались культуры клеток Vero, PK-15, СПЭВ, МА-104, MARC-145, в которых цитопатогенное действие вируса проявлялось через 36-48 ч и на 3-5 сут оно развивалось по всему монослою, поражая до 75-80 % клеток. Титр вируса в этих культурах клеток был сравнительно высок и колебался в пределах $4,14-6,66 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. Адаптация вируса в культуре клеток Vero происходила более быстрее, чем в других клеточных линиях. Культуры клеток МДСК, RK-13, ВНК-21, CRFK оказались менее или полностью не чувствительными к испытываемому варианту вируса, так как культивирование его в этих культурах клеток сопровождалось слабозаметным цитопатогенным действием или отсутствием его и приводило к постепенному снижению его активности (от $0,05 \pm 0,08$ до $0,79 \pm 0,16$), при проведении дополнительных пассажей.

Обсуждение

Согласно результатам генетического анализа, проводимого постоянно разными исследователями, вирус SARS-CoV-2 в процессе своего эпидемического распространения подвержен частой мутации [16,17]. В результате такой изменчивости появились такие эпидемически актуальные варианты, как Альфа, Бета, Дельта, Омикрон, которые отличались от исходного варианта сравнительно большей патогенностью или контагиозностью. По не уточненным данным ряда исследователей от варианта к варианту вирус также подвергается дрейфу по антигенности. В результате чего иммунитет, сформированный на иммунизацию вакциной или заражение предыдущим эпидемическим вариантом вируса, становится уязвимым для новых вариантов возбудителя [18]. В таком случае возникает необходимость усовершенствования существующих или разработка новых вакцин, эффективных против заболевания, вызываемого мутантными вариантами возбудителя. В связи с чем технологии репродукции и установление свойств новых вариантов вируса остаются актуальными в прикладных вирусологических исследованиях.

Если, в собственных исследованиях ранее были определены биологические свойства, в том числе культуральные, у предыдущих вариантов (Альфа, Бета, Ета, Дельта) вируса SARS-CoV-2, то в данной работе проведены исследования по оценке культуральных свойств варианта Омикрон, который особо отличается от предыдущих своей высокой контагиозностью и, вероятно, сравнительно меньшей антигенной близостью.

Результаты выделения исследуемого варианта вируса показали, что этот вариант вируса SARS-CoV-2, также, как и предыдущие обладает сравнительно активной цитопатогенностью в культурах клеток, происходящих из органов обезьян и свиньи. Вариант вируса в этих культурах клеток вызывает цитопатогенное действие в течение первых 36-48 ч в виде набухания, округления и десквамации клеток, приводящих разрыву монослоя и последующей полной его деструкции. В результате последовательного пассирования и применения разных технологических режимов культивирования установлено, что для получения вирусной массы со сравнительно высоким титром необходимо использовать:

- чувствительную монослойную культуру клеток 24-36 ч культивирования, приготовленной при концентрации посевных клеток 200 тыс.кл/мл;
- множественность инфицирования культуры клеток от $0,01 \text{ ТЦД}_{50}/\text{кл}$;
- температура культивирования 37°C ;
- продолжительность культивирования 2-3 суток;
- кондиция цитопатологии на момент приостановления репродукции вируса от 80%.

Использование перечисленного технологического режима позволяет получать культуральную вирусную массу с титром инфекционности от $10^{6,0} \text{ ТЦД}_{50}$ уже после адаптационных 2-3 пассажей. Указанная высокая биологическая активность позволяет использовать изолят нового варианта вируса в качестве специфической основы инактивированных

вакцин. А возможность получения активной вирусной массы на первоначальных пассажах позволяет оперативно включать новый мутантный вирус в технологию изготовления вакцины вслед за его выделением *in vitro* и обеспечить высокую противоэпидемическую эффективность препарата.

Заключение

При изучении культуральных свойств генетического варианта Омикрон вируса SARS-CoV-2 установлено, что пермиссивными биологическими системами для его репродукции являются культуры клеток Vero, PK-15, СПЭВ, МА-104, MARC-145. Культуры клеток МДСК, RK-13, ВНК-21, CRFK оказались не пермиссивными или менее пермиссивными для репродукции варианта Омикрон вируса SARS-CoV-2. Продуктивными условиями культивирования генетического варианта Омикрон вируса SARS-CoV-2 в изучаемых клеточных линиях являлись следующие параметры: посевная концентрация клеток 200 тыс/см³, множественность заражения – 0,01 ТЦД_{50/кл}, срок культивирования вируса – 2 сут, площадь поражения клеточного монослоя перед сбором вируса – 75-80%, биологическая активность вируса в пределах от 4,14±0,31 до 6,66±0,22 lg ТЦД₅₀/см³.

Таким образом, в Республике Казахстан от больного человека выделен *in vitro* вирус SARS-CoV-2 южно-африканского варианта «Омикрон» (BA-1.1.529) коронавирусной инфекции COVID-19, который обладает цитопатогенностью в культуре клеток Vero, PK-15, СПЭВ, МА-104, MARC-145, накапливающийся в титре до 10^{6,66} ТЦД_{50/см}³ на третьем пассаже.

Выделенный изолят вируса будет использован для молекулярно-генетической паспортизации и депонирования в Коллекции микроорганизмов и применяться для разработки средств лабораторной диагностики и специфической профилактики болезни.

Финансирование: Работа выполнена в рамках научно-технической программы «Разработка вакцины против коронавирусной инфекции COVID-19» на 2020-2022 годы, при финансовой поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

- 1 COVID-19 Dashboard by the Center for Systems Science and Engineering (CSSE) at Johns Hopkins University (JHU) (англ.). ArcGIS. Johns Hopkins University. -URL: <https://coronavirus.jhu.edu/map.html> (Дата обращения: 2022-11-17).
- 2 COVID-19 Coronavirus pandemic. <https://www.worldometers.info/coronavirus> (Дата обращения: 2022-11-17).
- 3 Pachetti M., Marini B., Benedetti F., Giudici F., Mauro E., Storici P., Masciovecchio C., Angeletti S. et al. Emerging SARS-CoV-2 mutation hot spots include a novel RNA-dependent-RNA polymerase variant. J Transl Med. – 2020. – Vol.18 (1). – 179 p. doi: 10.1186/s12967-020-02344-6.
- 4 Zhang L., Jackson C.B., Mou H. SARS-CoV-2 spike-protein D614G mutation increases virion spike density and infectivity. Nat Commun. – 2020. – Vol.11 (1). – 6013 p.
- 5 Намазова-Баранова Л.С., Садеки Н., Эфендиева К.Е. Новые данные по эволюции пандемии COVID-19: обзор литературы. Педиатрическая фармакология. – 2021. – Vol. 18. – P. 314-9. doi: 10.15690/pf.v18i4.2299.
- 6 Huang C., Wang Y., Li X., Ren L., Zhao J., Hu Y., Zhang L., Fan G., Xu J., Gu X., Cheng Z., Yu T., Xia J., Wei Y., Wu W., Xie X., Yin W., Li H., Liu M., Xiao Y., Gao H., Guo L., Xie J. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China // The Lancet. – 2020. – Vol. 395. – № 10223. – P. 467-506.
- 7 Jin Y., Yang H., Ji W. et al. Virology, Epidemiology, Pathogenesis, and Control of COVID-19. Viruses. – 2020. – Vol.12(4). – 372 p. doi:10.3390/v12040372.

- 8 Relative Variant Genome Frequency per Region. <https://www.gisaid.org/hcov19-variants>. WHO. COVID-19 vaccine tracker and landscape [Электронный ресурс]. – 2022. (дата обращения 17.11.2022). <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>
- 9 Классификация варианта Омикрон (B.1.1.529) как варианта вируса SARS-CoV-2, вызывающего обеспокоенность. [https://www.who.int/ru/news/item/classification-of-omicron-\(b.1.1.529\)-sars-cov-2-variant-of-concern](https://www.who.int/ru/news/item/classification-of-omicron-(b.1.1.529)-sars-cov-2-variant-of-concern).
- 10 Forchette L.A. Comprehensive Review of COVID-19 Virology, Vaccines, Variants, and Therapeutics / L. Forchette, W. Sebastian, T. Liu // *Curr Med Sci.* – 2021. – Vol. 41, – № 6. – P. 1037-1051. doi: 10.1007/s11596-021-2395-1.
- 11 Torjesen I. COVID-19: Omicron may be more transmissible than other variants and partly resistant to existing vaccines, scientists fear. *BMJ.* – 2021. – Vol. 375. – 2943 p. doi:10.1136/bmj.n2943.
- 12 Nyberg T., Ferguson N.M., Nash S.G. et al. Comparative analysis of the risks of hospitalisation and death associated with SARS-CoV-2 omicron (B.1.1.529) and delta (B.1.617.2) variants in England: a cohort study. *Lancet.* – 2022. – Vol.399. – P. 1303-12. doi:10.1016/S0140-6736(22)00462-7.
- 13 Araf Y., Akter F., Tang Y.D. et al. Omicron variant of SARS-CoV-2: Genomics, transmissibility, and responses to current COVID-19 vaccines. *J Med Virol.* – 2022. – Vol.94(5). – P.1825-32. doi:10.1002/jmv.27588.
- 14 Reed L.J., Muench Simple H. A. Method Of Estimating Fifty Per Cent Endpoints12 // *American Journal of Epidemiology.* – 1938. – Vol. 27. – P. 493-497. [https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408\(1938\)](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408(1938)).
- 15 Новикова И.А. Генетическая характеристика вируса SARS-CoV-2 / И. А. Новикова // *Живые и биокосные системы.* – 2021. – № 35. – 4 с. doi: 10.18522/2308-9709-2021-35-4
- 16 Kapteleva V.V., Bukharina A.Y., Shipulina O.Y., Korneenko E.V., Saenko S.S., Lukyanov A.V. et al. Case report: change of dominant strain during dual SARS-CoV-2 infection. *BMC Infect. Dis.* – 2021. – Vol.21(1). – 959 p.
- 17 Fu Y., Zhao J., Wei X., Han P., Yang L., Ren T., Zhan S., Li L. Effectiveness and Cost-Effectiveness of Inactivated Vaccine to Address COVID-19 Pandemic in China: Evidence From Randomized Control Trials and Real-World Studies. // *Front Public Health.* – 2022. – №10. – 917732 p. doi: 10.3389/fpubh.2022.917732. PMID: 35928479; PMCID: PMC9343737.

References

- 1 COVID-19 Dashboard by the Center for Systems Science and Engineering (CSSE) at Johns Hopkins University (JHU) (angl.). ArcGIS. Johns Hopkins University. -URL: <https://coronavirus.jhu.edu/map.html> (Data obrashcheniya: 2022-11-17).
- 2 COVID-19 Coronavirus pandemic. <https://www.worldometers.info/coronavirus> (Data obrashcheniya: 2022-11-17).
- 3 Pchetti M., Marini B., Benedetti F., Giudici F., Mauro E., Storici P., Masciovecchio C., Angeletti S. et al. Emerging SARS-CoV-2 mutation hot spots include a novel RNA-dependent-RNA polymerase variant. *J Transl Med.* – 2020. – Vol.18 (1). – 179 p. doi: 10.1186/s12967-020-02344-6.
- 4 Zhang L., Jackson C.B., Mou H. SARS-CoV-2 spike-protein D614G mutation increases virion spike density and infectivity. *Nat Commun.* – 2020. – Vol.11 (1). – 6013 p.
- 5 Namazova-Baranova L.S., Sadeki N., Efendieva K. E. Novye dannye po evolyucii pandemii COVID-19: obzor literatury. *Pediatricheskaya farmakologiya.* – 2021. – Vol.18. – P. 314-9. doi:10.15690/pf.v18i4.2299.
- 6 Huang C., Wang Y., Li X., Ren L., Zhao J., Hu Y., Zhang L., Fan G., Xu J., Gu X., Cheng Z., Yu T., Xia J., Wei Y., Wu W., Xie X., Yin W., Li H., Liu M., Xiao Y., Gao H., Guo L., Xie J. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China // *The Lancet.* – 2020. – Vol. 395. – №10223. – P. 467-506.
- 7 Jin Y., Yang H., Ji W. et al. Virology, Epidemiology, Pathogenesis, and Control of COVID-19. *Viruses.* – 2020. – Vol.12(4). – 372 s. doi:10.3390/v12040372.
- 8 Relative Variant Genome Frequency per Region. <https://www.gisaid.org/hcov19-variants>. WHO. COVID-19 vaccine tracker and landscape [Elektronnyj resurs]. – 2022. (data obrashcheniya

- 17.11.2022). <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>
- 9 Klassifikatsiya varianta Omikron (B.1.1.529) kak varianta virusa SARS-CoV-2, vyzyvayushchego obespekoyennost'. [https://www.who.int/ru/news/item/classification-of-omicron-\(b.1.1.529\)-sars-cov-2-variant-of-concern](https://www.who.int/ru/news/item/classification-of-omicron-(b.1.1.529)-sars-cov-2-variant-of-concern).
 - 10 Forchette L.A. Comprehensive Review of COVID-19 Virology, Vaccines, Variants, and Therapeutics / L. Forchette, W. Sebastian, T. Liu // Curr Med Sci. – 2021. – Vol. 41, – № 6. – P. 1037-1051. doi: 10.1007/s11596-021-2395-1.
 - 11 Torjesen I. COVID-9: Omicron may be more transmissible than other variants and partly resistant to existing vaccines, scientists fear. BMJ. – 2021. – Vol. 375. – 2943 s. doi:10.1136/bmj.n2943.
 - 12 Nyberg T., Ferguson N.M., Nash S.G. et al. Comparative analysis of the risks of hospitalisation and death associated with SARSCoV-2 omicron (B.1.1.529) and delta (B.1.617.2) variants in England: a cohort study. Lancet. – 2022. – Vol.399. – P. 1303-12. doi:10.1016/S0140-6736(22)00462-7.
 - 13 Araf Y., Akter F., Tang Y.D. et al. Omicron variant of SARS-CoV-2: Genomics, transmissibility, and responses to current COVID-19 vaccines. J Med Virol. – 2022. – Vol.94(5). – P. 1825-32. doi:10.1002/jmv.27588.
 - 14 Reed L.J., Muench Simple H. A. Method Of Estimating Fifty Per Cent Endpoints12 // American Journal of Epidemiology. – 1938. – Vol. 27. – P. 493-497. doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408(1938).
 - 15 Novikova I.A. Geneticheskaya harakteristika virusa SARS-CoV-2 / I.A. Novikova // ZHivye i biokosnye sistemy. – 2021. – № 35. – 4 s. doi: 10.18522/2308-9709-2021-35-4
 - 16 Kaptelova V.V., Bukharina A.Y., Shipulina O.Y., Korneenko E.V., Saenko S.S., Lukyanov A.V. et al. Case report: change of dominant strain during dual SARS-CoV-2 infection. BMC Infect. Dis. – 2021. – Vol.21(1). – 959 s.
 - 17 Fu Y., Zhao J., Wei X., Han P., Yang L., Ren T., Zhan S., Li L. Effectiveness and Cost-Effectiveness of Inactivated Vaccine to Address COVID-19 Pandemic in China: Evidence From Randomized Control Trials and Real-World Studies. // Front Public Health. – 2022. – №10. – 917732 p. doi: 10.3389/fpubh.2022.917732. PMID: 35928479; PMCID: PMC9343737.

COVID-19 КОРОНАВИРУСТЫҚ АУРУЫНЫҢ SARS-COV-2 ВИРУСЫНЫҢ ОҢТҮСТІК-АФРИКАЛЫҚ ОМИКРОН НҰСҚАСЫНЫҢ ӨСІНДІЛІК ҚАСИЕТТЕРІ

Б.Ш. Мырзахметова *, К.Б. Бисенбаева , М.Ж. Каукарбаева ,
Е.Д. Бурашев , Л.Б. Кутумбетов 

«Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты», Гвардейск қтк
balzhan.msh@mail.ru

№12
2022

Аннотация: бұл жұмыс COVID-19 коронавирустық инфекциясының SARS-CoV-2 вирусының Омикрон генетикалық нұсқасының өсінділік қасиеттерін зерттеу туралы мәліметтерді ұсынады. Бұл вирус нұсқасының көбеюіне ең ыңғайлы биологиялық жүйелер Vero, MA-104, MARC-145, PK-15 және SPEV жасуша өсінділері болып табылады. Зерттелінген жасуша линияларында SARS-CoV-2 вирусының Омикрон генетикалық нұсқасын өсірудің оңтайлы шарттары келесі параметрлер болып шықты: жасушалардың концентрациясы 200 мың/см³, инфекцияны жұқтыру мөлшері – 0,01 TCD_{50/клетка}, вирусты өсіру кезеңі – 2 күн, жасушаның зақымдану аймағы – 75-80%, вирустың биологиялық белсенділігі 4,14±0,31 және 6,66±0,22 lg TCD_{50/см³} аралығында.

Түйін сөздер: SARS-CoV-2 вирусы; COVID-19 коронавирустық ауруы; омикрон; жасуша өсіндісі; мутация; жұқпалылық; пандемия

CULTURAL PROPERTIES OF THE SOUTH AFRICAN VARIANT OF OMICRON VIRUS SARS-COV-2 OF CORONAVIRUS INFECTION COVID-19

B.Sh. Myrzakhmetova *, K.B. Bisenbayeva , M.Sh. Kaukarbayeva ,
Ye.D. Burashev , L.B. Kutumbetov 

«Research Institute of Biological Safety Problems», Guards
balzhan.msh@mail.ru

Abstract: this paper presents data on the study of the cultural properties of the genetic variant Omicron of the SARS-CoV-2 virus of the coronavirus infection COVID-19. The most permissive biological systems for the reproduction of this virus variant are Vero, MA-104, MARC-145, PK-15, and SPEV cell cultures. The productive conditions for cultivating the genetic variant Omicron of the SARS-CoV-2 virus in the studied cell lines turned out to be the following parameters: seeding concentration of cells 200 thousand/cm³, multiplicity of infection – 0.01 TCD_{50/cell}, virus cultivation period – 2 days, cell lesion area monolayer before collecting the virus – 75-80%, the biological activity of the virus in the range from 4.14±0.31 to 6.66±0.22 lg TCD_{50/cm}³.

Keywords: SARS-CoV-2 virus; coronavirus infection COVID-19; omicron; cell culture; mutation; contagiousness; pandemic

ИЗУЧЕНИЕ ЭПИЗООТИЧЕСКОЙ СИТУАЦИИ МЫТА ЛОШАДЕЙ В АЛМАТИНСКОЙ ОБЛАСТИ

Б.А. Еспембетов¹ , М.К. Сармыкова¹ , А.А. Самбетбаев² , Е.Б. Серікбай¹ ,
Н.С. Сырым¹ , Н.Н. Зинина¹ , А.М. Анарбекова¹ , К.К. Тилеуханов¹ 

¹ Научно-Исследовательский институт проблем биологической безопасности,
пгт. Гвардейский

² Казахский национальный аграрный исследовательский университет, г. Алматы
espembetov@mail.ru

Аннотация: в данной статье представлены результаты статистические данные на 1 июля, по сравнению с аналогичной датой прошлого года поголовье лошадей в целом выросло на 8,5%, составив на 1 июля 3372,5 тыс. голов. Однако за зимние месяцы (январь и февраль) поголовье лошадей в Казахстане снизилось на 1,3%. В абсолютных цифрах поголовье лошадей в январе уменьшилось на 20,2 тыс. голов, а в феврале еще на 16,6 тыс. голов. За последние годы в стране наблюдается рост заболеваемости мытом не только среди жеребят, но и среди взрослого поголовья.

С целью проведения эпизоотологического мониторинга мыта лошадей, согласно календарного плана проекта ИРН 08855635, с 2020-2022 годы были организованы научные экспедиционные выезды на территории Алматинской области республики с отбором проб патологического материала от больных животных.

В результате целенаправленной организации и проведения экспедиционных выездов проведен сбор необходимых эпизоотологических данных и осуществлен анализ проводимых ветеринарно-санитарных мероприятий. В результате выполнения данного этапа был проведен сбор образцов в общем количестве 112 проб биоматериала от больных мытом жеребят при посеве удалось выделить культуру микроба только в 3 случаях. Данное обстоятельство связано с тем, что видоизмененные формы мытного стрептококка вызывающие атипичные случаи заболевания очень трудно поддаются культивированию. По результатам исследования бактериальные изоляты идентифицированы как вид *Streptococcus equi*.

Ключевые слова: лошади; мыт; биологический материал; абсцесс; *Streptococcus equi*; изолят

Введение

Мыт лошадей – остро протекающая контагиозная болезнь лошадей, характеризующаяся лихорадкой, гнойно-катаральным воспалением слизистой оболочки носа и глотки с нагноением региональных лимфатических узлов. Заболевание проявляется спорадически, эпизоотически и имеет широкое распространение в нашей стране, поражает по преимуществу жеребят и молодых лошадей. К болезни восприимчивы однокопытные животные, особенно молодые лошади до 5 лет и жеребят.

Источником возбудителя инфекции служат больные лошади, выделяющие возбудителя с содержимым абсцессов лимфатических узлов, с носовыми истечениями, при кашле и фырканиях, что приводит к инфицированию корма, воды, предметов ухода и др. Источником возбудителя инфекции также могут быть переболевшие и здоровые лошади (носители). Носительство мытного стрептококка объясняет спонтанное возникновение болезни в

хозяйствах. О длительности носительства мытного стрептококка в течение 4-10 месяцев после клинического переболевания сообщали многие исследователи. Передача мытного стрептококка возможна воздушно-капельным, алиментарным, контактным путями, во время случки. Переносчиками и возбудителями мыта так же могут быть кровососущие насекомые. Жеребята могут заразиться мытными стрептококками и от матерей больных маститами мытной этиологии. Возможно внутриутробное заражение, в результате которого наблюдаются аборт кобыл.

Экономический ущерб, причиняемый этим заболеванием, складывается из отставания в росте и развитии больных животных, снижением упитанности и падежа молодняка лошадей, средств, расходуемых на лечение, и для организации хозяйственных мероприятий, направленных на борьбу с этим заболеванием [1-3].

Приведенные литературные данные об эпизоотической ситуации мыта свидетельствуют, что вопрос изучения эпизоотологии мыта лошадей является актуальным. При этом почти все авторы подчеркивают, зависимость заболевания мытом от природно-климатических условий, способов ведения коневодства, породного состава поголовья, влияния внешних факторов, условий содержания и кормления, которые способствуют понижению естественной резистентности организма и проявлению патогенного действия мытного стрептококка [4-6].

Возбудителем болезни является мытный стрептококк (*Streptococcus equi*), относящиеся серологической группе С, к роду *Streptococcus*. Микроб кокковидной формы, обнаруживается в гнойной жидкости, выделяющейся из носовых ходов либо в содержимом абсцессов подчелюстных и других лимфатических узлов. Мытный стрептококк неподвижен, спор не образует, хорошо окрашивается всеми анилиновыми красками, по Грамму окрашивается положительно. Диаметр каждого кокка в среднем колеблется от 0,4 до 1 мкм. Хорошо растет в аэробных и анаэробных условиях на искусственных питательных средах (МПМ, МПБ) с добавлением глюкозы и лошадиной сыворотки, на кровяном агаре образует fs – гемолиз [7].

Мыт лошадей остается все еще нерешенной проблемой ветеринарной практики. Хотя ветеринарная наука в разные годы разработала и предложила эффективный метод профилактики мыта лошадей инактивированной вакциной с иммуномодулятором. Заболеваемость так же растет. Однако имеется немало наблюдений вспышек мыта со сравнительно высокой летальностью – до 5%. Возможно этот показатель не отражает истинную эпизоотическую ситуацию. В Казахстане не уделялось должного внимания заболеванию мытом лошадей, хотя имеются легочные заболевания не выясненной этиологии [8-11].

Таким образом, в условиях глобального распространения антибиотикорезистентности для сокращения уровня стрептококковой инфекций в коневодстве возникает острая необходимость в поиске и разработке дополнительных средств борьбы с патогенными микроорганизмами. Такими дополнительными, а в ряде случаев единственными средствами являются антибактериальные препараты, созданные на основе литических бактериофагов. Использование на практике подобных препаратов позволит значительно сократить уровень возникновения стрептококковых инфекций среди поголовья лошадей.

В связи с вышеизложенным, проект «Получение бактериофага для терапии мыта лошадей» актуален в плане создания отечественного препарата для эффективного ингибирования *Str. equi*, что позволит в значительной степени решить проблему заноса и распространения мыта лошадей на территории Республики Казахстан.

Целью работы является изучение эпизоотической ситуации мыталосадей в Алматинской области.

Материалы и методы

Биологические материалы, в количестве 112 проб доставлены из коневодческих хозяйств сел: Дружба Енбекшиказахского района, Узынагаш и Актерек Жамбылского районов Алматинской области.

Объектом для исследований являлись пробы биологического материала в виде гноя, экссудата подчелюстных лимфоузлов, мазок ротовой и носовой полости, слизистой глаза от больного мытом жеребенка.

Гнойные носовые и ротовые истечения для исследования брали стерильными одноразовыми тампонами из транспортной системы “Fisher finest” вращательными движениями по нижнему носовому ходу, удаляли вдоль наружной стенки носа. После забора материала тампон помещали в стерильную одноразовую пробирку системы “Fisher finest” специальной транспортной средой.

Из не вскрывшихся абсцессов лимфоузлов гной брали стерильно при помощи шприца после обработки места прокола. В лабораторию гной доставляли в стерильной пробирке в не консервированном виде, если абсцессы уже вскрылись, то гной брали из вскрывшихся абсцессов ватным тампоном, увлажненным 25% водным раствором глицерина. Лимфоузлы для исследования доставляли как в свежем виде без консерванта. Для проведения ПЦР исследований на мыт от больных животных отбирали кровь в вакуумную пробирку, содержащую антикоагулянт K_2EDTA . Отобранные пробы доставляли в лабораторию в специальном термоконтейнере с охлаждающими элементами в течение 6 часов.

Бактериологические исследования патологического материала взятых от больных мытом лошадей, с целью изоляции стрептококков и их последующей идентификации, и дифференциации проводили согласно методикам, представленных в [12].

Мазки, приготовленные из патологического материала, а также из бульонных и агаровых культур окрашивали по Граму.

Выделение стрептококков производили посевом проб патологического материала на кровяном агаре, ГРМ-агаре и ГРМ-бульоне с добавлением в них 1%-ной глюкозы и 10%-ной стерильной сыворотки лошади (рН 7,4-7,6) [12].

Бактериальные изоляты были подтверждены как *Str. equi* с использованием ПЦР-анализа. Выделение бактериальной ДНК изучаемого изолята проводили с использованием коммерческого набора QIAGEN. Для амплификации выделенной ДНК использовали амплификатор Gene Amp PCR 9700 [12].

Результаты и обсуждение

В Казахстане, по данным на 1 июля, по сравнению с аналогичной датой прошлого года поголовье лошадей в целом выросло на 8,5%, составив на 1 июля 3372,5 тыс. голов. Об этом сообщает Комитет по статистике Миннацэкономики РК.

Основное поголовье лошадей (около 96%) сосредоточено в индивидуальных подворьях граждан и частных коневодческих фермах (рисунок 1).

По данным Комитета по статистике Министерства национальной экономики Республики Казахстан поголовье лошадей в республика составляет 2789100 голов. Визуальные данные по численности лошадей приведены на рисунке 1 и в таблице 1.

Поголовье лошадей в Казахстане 2020 г., тыс. голов

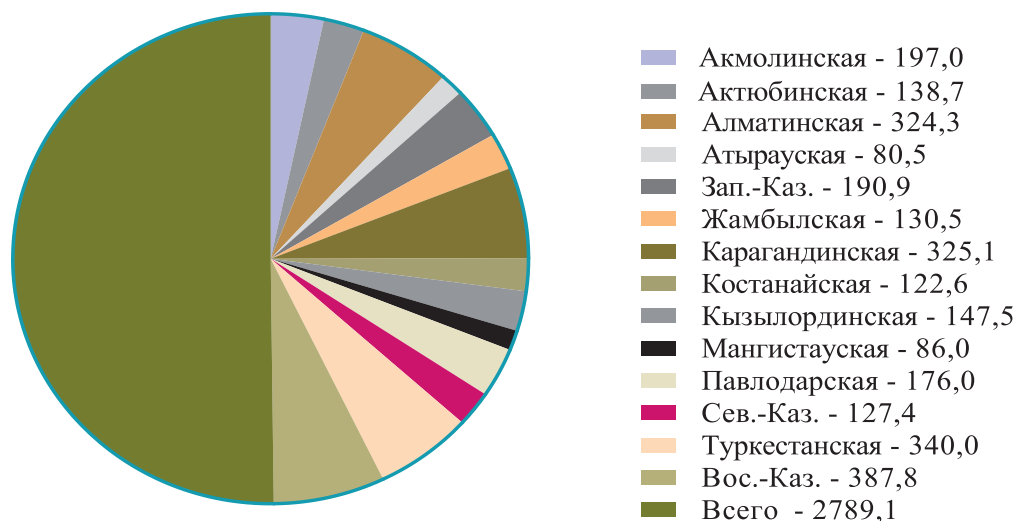


Рисунок 1 – Поголовье лошадей в Республике Казахстан

Таблица 1 – Динамика поголовья лошадей в Казахстане в январе-декабре 2020 года, тыс. голов.

Регионы Республики	1 января 2020 г.	1 июня 2020 г.	1 декабря 2020 г.	Разница за 1 год (+ -)
Акмолинская	187,3	198,1	197,0	9,7
Актюбинская	144,3	140,3	138,7	-5,6
Алматинская	326,4	322,1	324,3	-2,1
Атырауская	83,8	82,2	80,5	-3,3
Западно-Казахстанская	192,9	191,4	190,9	-2,0
Жамбылская	136,0	132,4	130,5	-5,5
Карагандинская	337,2	328,3	325,1	-12,1
Костанайская	122,9	122,6	122,6	-0,3
Кызылординская	148,3	146,7	147,5	-0,8
Мангистауская	74,3	86,3	86,0	11,7
Павлодарская	184,6	179,3	176,0	-8,6
Северо-Казахстанская	131,0	128,3	127,4	-3,6
Туркестанская	346,4	342,5	340,0	-6,4
Восточно-Казахстанская	394,5	390,4	387,8	-6,7
Всего по регионам	2825,9	2805,7	2789,1	-36,8

№12
2022

Как показано в рисунке и таблице 1, за зимние месяцы 2020 года, январь и февраль поголовье лошадей в Казахстане снизилось на 1,3%. В абсолютных цифрах поголовье лошадей в январе уменьшилось на 20,2 тыс. голов, а в феврале еще на 16,6 тыс. голов. По данным Комитета статистики РК на 1 марта было учтено 2789,1 тыс. голов, что меньше, чем на начало года на 36,8 тыс. голов. Поголовье лошадей увеличилось только в двух регионах Казахстана. Это Мангистауская область – 11,7 с 74,3 до 86 и Акмолинская область – на 9,7 с 187,3 до 197.

Более чем на 10 тыс. голов поголовье лошадей снизилось в Карагандинской области – на 12,1 тыс. голов с 337,2 до 325,1 тыс. голов. Свыше 8 тыс. голов убыль лошадей

в Павлодарской области – на 8,6 тыс. голов с 184,6 до 176 тыс. голов, в Восточно-Казахстанской области – на 6,7 тыс. голов с 394,5 до 387,8 тыс. голов, в Туркестанской области – на 6,4 тыс. голов с 346,4 до 340 тыс. голов и в Алматинской области – на 2,1 тыс. голов с 326,4 до 324,3 тыс. голов.

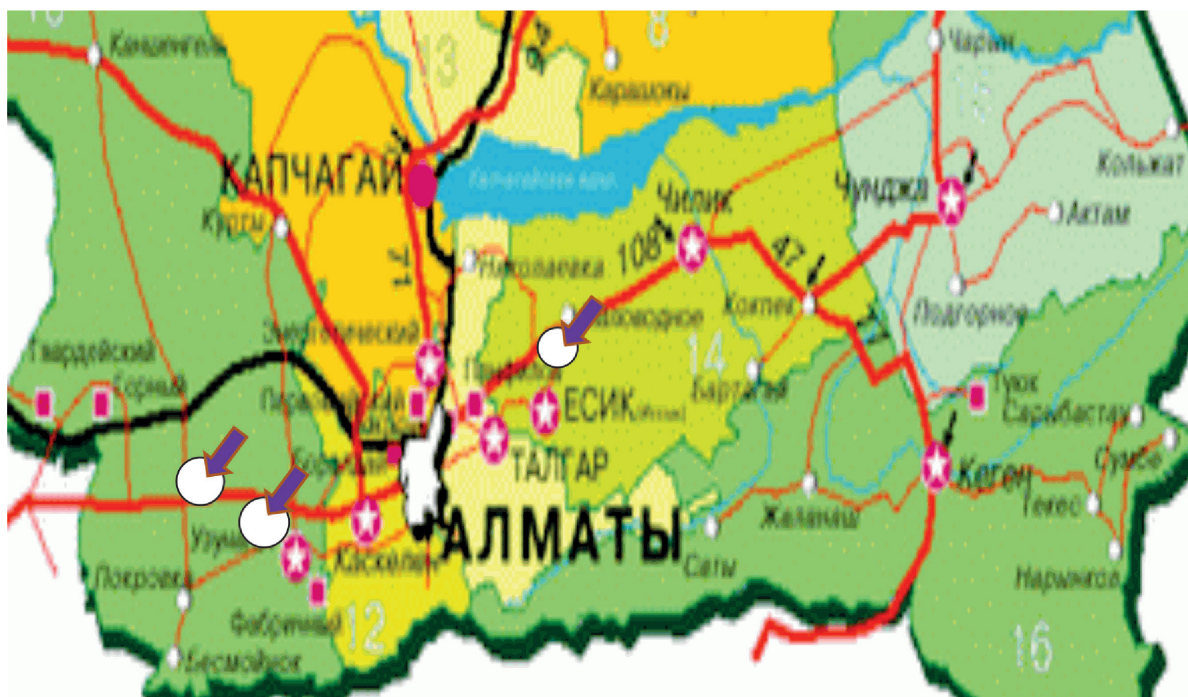
В республике в последние годы взят курс на увеличение поголовья лошадей. С этой целью выделяются большие инвестиции для приобретения племенного скота из стран ближнего и дальнего зарубежья. Для достижения данной цели отрицательное влияние оказывают инфекционные болезни, встречающиеся в республике. За последние годы в стране наблюдается рост заболеваемости мытом не только среди жеребят, но и среди взрослого поголовья.

В ходе эпизоотологического обследования коневодческих хозяйств Алматинской области установлено, что в условиях юго-востока республики мытом в основном болеет молодняк от 6-месячного возраста до 3-х лет, а в последнее время наблюдается болезнь и среди взрослых животных.

Во время вспышек мыта лошадей к/х «Нурлан-Д» Енбекшиказахского района, к/х «Заңғар» и ИП «Али» Жамбылского района Алматинской области выявлена сезонность заболевания, при этом пик приходился на ранне-зимний (ноябрь-декабрь) и весенний (март-апрель) периоды. Ранне-зимний пик заболевания связан с воздействием мощного стресс-фактора, как отъем молодняк от матерей и переход на более грубый корм, а весенний пик – с общим истощением организма жеребят, что было подтверждено биохимическими исследованиями крови животных (рисунок 2).

Заболевание мытом среди жеребят регистрировались в указанных коневодческих хозяйствах ежегодно в течение 3 лет (срок наблюдения), что указало на стационарность болезни.

В последние годы так же наблюдаются проявления мыта среди лошадей с атипичной клиникой среди молодняк, а иногда и у взрослых. При бактериологических исследованиях, выделяются культуры *Str.equi*, которые по культурально-морфологическим и биохимическим свойствам могут быть отнесены к атипичным штаммам *Str.equi*.



Примечание: - населенные пункты вспышек мыта лошадей

Рисунок 2 – Карта вспышек атипичной формы мыта лошадей в Алматинской области

В 2020 году в крестьянском хозяйстве к/х «Заңғар», зарегистрирована вспышка атипичной формы мыта лошадей, характеризующаяся высокой лихорадкой ($39-40^{\circ}\text{C}$), отказом от корма, слизистыми истечениями из носового отверстия. При этом характерного для мыта абсцесса в области подчелюстных лимфатических узлов не наблюдалось. Данный случай регистрации болезни мытом и по возрасту животных, а также и по месту локализации абсцесса является атипичным проявлением мыта лошадей. Заболевание наблюдалось среди жеребят, в возрасте до одного года через 2-4 месяца после отъема от матерей и молодняка от года до 3-х лет в зимне-весенний период (рисунки 3, 4).



Рисунок 3 – Клинически больной атипичной формой мыта жеребенок



Рисунок 4 – Клиника больной атипичной формой мыта лошади

Как видно из рисунка 3, клинически больной атипичной формой мыта жеребенок, с признаками лихорадки, в угнетенном состоянии, со слизистым истечением из носа и отмечается отказ от корма, а на рисунке 4 – выражена клиническая картина больной мытом кобылы в возрасте 5 лет со вскрывшимся абсцессом, из гноя которой выделен мытный стрептококк.

Лечение с применением дюранных антибиотиков широкого спектра действия (бициллина-5, гентамицин и нитокс) эффекта не дало, летальный исход наблюдали на 4-5 день (рисунок 5).



Рисунок 5 – Патологоанатомическая картина головы павшего жеребенка при «атипичной» форме мыта

Как видно из рисунка 5, патологоанатомическое вскрытие павших жеребят выявило не характерную для мыта картину. На разрезе головы, на уровне подчелюстного лимфатического узла отмечено отсутствие их увеличения.

Таким образом, при вспышке атипичной формы мыта лошадей в коневодческих хозяйствах Алматинской области выявлены следующие не характерные для данного заболевания детали: при наличии некоторых характерных клинических признаков, иногда отсутствует абсцесс; лечение с применением дюрантных антибиотиков широкого спектра действия не дает эффекта; летальный исход наблюдается на 4-5 день; на разрезе головы, на уровне подчелюстного лимфатического узла отмечается наличие круглых, заполненных воздухом, полых пузырьков; видоизмененные формы мытного стрептококка очень трудно поддаются культивированию; положительно окрашиваясь по Граму, располагаются в виде коротких цепочек из 2-4 кокков, вытянутых в поперечном направлении; у зараженных белых мышей гибель наступает в течение 5 дней.

Исходя из вышеперечисленного, при всех дальнейших случаях вспышки мыта лошадей с аналогичной не характерной для данной нозологии клинической картиной называли «атипичной» формой мыта.

Согласно календарного плана, с 2020-2022 годы были организованы научные экспедиционные выезды по проведению эпизоотологического мониторинга мыта лошадей на территории Алматинской области республики с отбором проб от животных.

Для сбора образцов биоматериала от больных мытом жеребят для выделения бактериальных культур была организована и проведена служебная командировка в крестьянские хозяйства с. Дружба, Енбекшиказахского района, с. Узынагаш и с. Актерек, Жамбылского района Алматинской области, где отмечались вспышки мыта лошадей.

В ходе выполнения работ были собраны смывы из полости рта, носа и глаз, гнойный экссудат из подчелюстного лимфоузла от лошадей с признаками мыта для выделения из них бактериальных культур из выше указанных районов Алматинской области (рисунок 6).

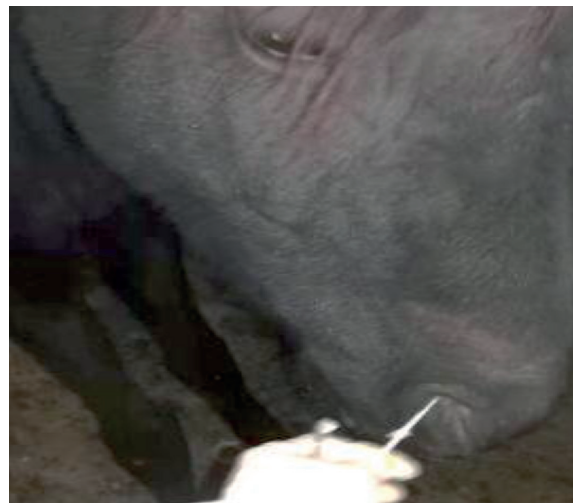


Рисунок 6 – Взятие биоматериала для бактериологического и молекулярно-биологического исследования

В условиях хозяйства были взяты из к/х «Нурлан-Д» от лошадей (цельная кровь – 18, сыворотка – 18, смывы с полости рта и носа – 36; пробы из раны – 3). Так же были взяты пробы из к/х «Зангар» в количестве 31 проб (смывы из полости рта, носа и глаз). В ИП «Али» от больных мытом лошадей было получено 6 проб (смывы из полости рта, носа и глаз, гнойный экссудат из подчелюстного лимфоузла, цельная кровь и сыворотка крови), рисунок 7.



Рисунок 7 – Взятие пробы крови

В результате выполнения данного этапа был проведен сбор образцов в общем количестве 112 проб биоматериала от больных мытом жеребят для выделения бактериальных культур, при посеве их на МПБ с 10% сыворотки крови лошади удалось выделить культуру микроба только в 3 случаях. Данное обстоятельство связано с тем, что видоизмененные формы мытного стрептококка вызывающие атипичные случаи заболевания очень трудно поддаются культивированию.

С целью подтверждения молекулярно-генетических свойств изолятов *Str. equi* провели ПЦР-анализ. Выделение бактериальной ДНК изучаемых изолятов проводили с использованием коммерческого набора QIAGEN. Для амплификации выделенной ДНК использовали амплификатор Gene Amp PCR 9700.

Реакцию амплификации проводили в 50 μ L, включающих 5 μ L 10 x ПЦР буфера (Qiagen, USA), 1 μ L 10 mM dNTP (NEB, USA), 0.5 μ L ДНК (100 ng/ μ L), по 1 μ L праймера seeH-F AGC ATG ATT CTA ACT TAA TTG AAG CCG (20 pmol/ μ L) и seeH-R TAG CAT GCT ATT AAA GTC TCC ATT GCC, и 0.25 μ L (1.25 Units) Taq DNA полимеразы (Qiagen, USA). Условия амплификации 95°C – 5 мин; 20 циклов: 95°C – 20 с, touchdown 60°C (-0,5) – 20 с, 72°C – 30 с; 20 циклов: 95°C – 20 с, 50°C – 20 с, 72°C – 30 с; 72°C – 7 минут. Результат анализа представлена в рисунке 8.

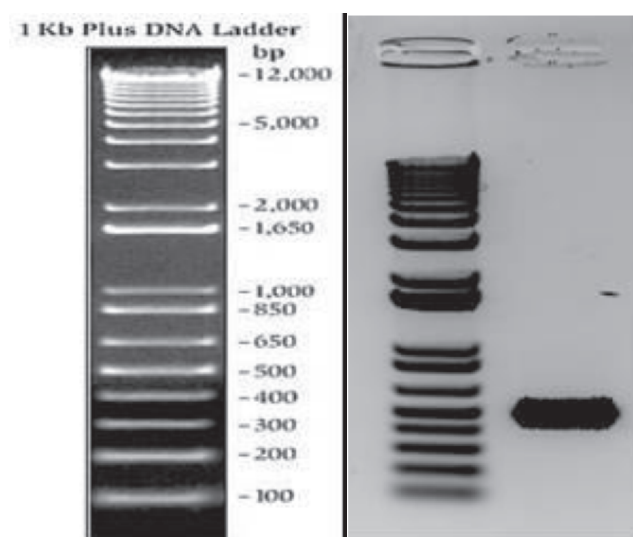


Рисунок 8 – Электрофоретический анализ продуктов ПЦР

При лабораторном мониторинге были использованы молекулярные методы диагностики – классической ПЦР на наличие *Str. equi*. Таким образом, по результатам исследования бактериальные изоляты идентифицированы как вид *Str. equi*.

В результате проведенного анализа распространения штаммов *Str. equi*, патогенных для лошадей в фермерских хозяйствах Алматинской области было установлено, что вспышки мыта лошадей периодически возникают в к/х «Нурлан-Д» Енбекшиказахского района и к/х «Заңғар», В ИП «Али» Жамбылского района Алматинской области выявлена сезонность заболевания – ранне-зимний (ноябрь-декабрь) и весенний (март-апрель) периоды.

При изучении эпизоотической ситуации по мыту лошади в Алматинской области, нами чаще встречались смешанные формы течения болезни мыта с пастереллезом, с сальмонеллезным абортom, а атипичные формы с дополнительными нехарактерными для мыта симптомами. При этом наблюдается стремительное учащение случаев проявления атипичной формы мыта лошадей. Открытие границ, перегруппировка скота, отсутствие четкого контроля за перемещением животных, появление большого количества антибактериальных средств, ухудшение экологической ситуации, снижение ветеринарного контроля за надлежащим применением антибиотиков приводят к появлению мутантных форм мытного стрептококка, вызывающих, в свою очередь, все большее расширение ареала распространения атипичных форм болезни в регионе.

Таким образом, Алматинская область имеет большую протяженность границы с Синзянь-Уйгурским Автономным Районом (СУАР) Китайской Народной Республикой (КНР) и с Кыргызской Республикой, что требует от ветеринарных специалистов оперативного и научного подхода ко всем проявлениям инфекции неясного генеза среди лошадей.

Заключение: В последнее время заболевание мыт в атипичной форме регистрируется в фермерских хозяйствах Алматинской области республики, что указывает на ненадежность ветеринарной защиты в отношении отдельных инфекционных болезней.

Вероятный прогноз возникновения распространения мыта лошадей будет зависеть от устранения ряда причин. Для этого нужно проводить:

- достоверную диагностику, поэтому необходимо использовать валидированные, не только чувствительные, но и высокоспецифичные тест-системы;
- мероприятия, направленные на ликвидацию источника инфекции, выявленных положительно реагирующих на мыт лошадей своевременно подвергать убою;
- мероприятия по разрыву эпизоотической цепи, звеньями которых являются: источник возбудителя инфекции, механизм передачи возбудителя инфекции, восприимчивое животное. Следует проводить дезинфекцию очагов инфекции с контролем качества;
- наладить строгую систему идентификации лошадей, провести полный охват поголовья диагностическими исследованиями;
- проводить систему общих организационно-хозяйственных и ветеринарно-санитарных мероприятий.

Финансирование. Эти исследования выполнялись в рамках грантового проекта ИРН АР 08855635 «Получение бактериофага для терапии мыта лошадей» 2020-2022 гг и финансировались Комитетом науки Министерства образования и науки Республики Казахстан.

Благодарности. Авторы выражают благодарность руководству и сотрудникам НИИПББ МЗ РК за оказанную помощь в проведении данных исследований.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

- 1 Сансызбаев А.Р. Мыт лошадей в Казахстане, (распространение, свойства возбудителя, разработка средств специфической профилактики и лечения). Автореф. Дис. д-ра вет.наук. – М., 1993. – 41 с.
- 2 Бижанов А.Б. Роль стрептококков группы С в инфекционной патологии лошадей / А.Б. Бижанов, А.Р. Сансызбаев, Ш.О. Токеев // Вестн. Сельхознауки Казахстана. – 1994. – №6. – С. 121-123.
- 3 Кайыпбай Б.Б. Лечение смешанного течения мыта и пастереллеза лошадей: автореф. ... канд. вет. наук. – Алматы, 2003. – 27 с.
- 4 Lindahl S. Streptococcus equi subsp. equi and Streptococcus equi subsp. Zooepidemicus. Doctoral Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. – U., 2013. – 75 с.
- 5 Джетыгенов Э.А. Эпизоотологические особенности мыта лошадей в Чуйской области // Вестник КНАУ им. К.И. Скрябина. – № 7. – 2016. – С.48-53.
- 6 Джетиенов Э.А., Бекташов А., Айтбаев А. Культурально-морфологические свойства изолятов возбудителя мыта лошадей // Вестник кыргызского национального аграрного университета им. К.И. Скрябина. – 2016. – №1. – С. 190-194.
- 7 Неустроев М.П., Эльбадова Е.И., Петрова С.Г. и др. Морфологические и культурально-биохимические свойства возбудителя мыта. Пграрная наука: вызовы и перспективы. Сб. Мат. Региональной научно-практической конференции. Якутск-Чебоксары. – 2018. – С.107-111.
- 8 Pusterla N., Kass P.H., Mapes S. et al. Surveillance programme for important equine infectious respiratory pathogens in the USA. Vet Rec, 2011. – Vol. 169. –12 p. <http://dx.doi.org/10.1136/vr.d2157>
- 9 Waller A.S. New perspectives for the diagnosis, control, treatment, and prevention of strangles in horses. Vet Clin North Am Equine Pract. – 2014. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2014.08.007>.
- 10 Newton J.R., Wood J.L.N., DeBrauwere M.N. et al. Detection and treatment of asymptomatic carriers of Streptococcus equi following strangles outbreaks in the UK. Equine Infectious Diseases VIII: Proceedings of the Eighth International Conference, Dubai, March 1998.
- 11 Newton J.R., Verheyen K., Talbot N.C. et al. Control of strangles outbreaks by isolation of guttural pouch carriers identified using PCR and culture of Streptococcus equi. Equine Vet J. – 2000. – Vol.32. – P. 515-526. <https://doi.org/10.2746/042516400777584721>
- 12 Скородумова Д.И. с соавт. «Микробиологическая диагностика бактериальных болезней животных // Справочник. – Москва. – 2005. – 653 с.

References

- 1 Sansyzbaev A.R. Myt loshadej v Kazahstane, (rasprostranenie, svojstva vozбудitelya, razrabotka sredstv specificheskoj profilaktiki i lecheniya). Avtoref. Dis. d-ra vet.nauk. – M., 1993. – 41 s.
- 2 Bizhanov A.B. Rol' streptokokkov gruppy S v infekcionnoj patologii loshadej / A.B. Bizhanov, A.R.Sansyzbaev, Sh.O. Tokeev // Vestn. Sel'hoznauki Kazahstana. – 1994. – №6. – S. 121-123.
- 3 Kajypbaj B.B. Lechenie smeshannogo techeniya myta i pasterelleza loshadej: avtoref. ... kand. vet. nauk. –Almaty, 2003. – 27 s.
- 4 Lindahl S. Streptococcus equi subsp. equi and Streptococcus equi subsp. Zooepidemicus. Doctoral Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. – U., 2013. –75 s.
- 5 Dzhetygenov E.A. Epizootologicheskie osobennosti myta loshadej v CHujskoj oblasti // Vestnik KNAU im. K.I. Skryabina. – № 7. – 2016. – S.48-53.
- 6 Dzhetygenov E.A., Bektashov A., Ajtbaev A. Kul'tural'no-morfologicheskie svojstva izolyatov vozбудitelya myta loshadej // Vestnik kyrgyzskogo nacional'nogo agrarnogo universiteta im. K.I. Skryabina. – 2016. – №1. – S. 190-194.
- 7 Neustroev M.P., El'byadova E.I., Petrova S.G. i dr. Morfologicheskie i kul'tural'no-biohimicheskie svojstva vozбудitelya myta. Pgrarnaya nauka: vyzovy i perspektivy. Sb. Mat. Regional'noj nauchno-prakticheskoy konferencii. YAKUTSK-CHeboksary. – 2018. – S.107-111.
- 8 Pusterla N., Kass P.H., Mapes S. et al. Surveillance programme for important equine infectious respiratory pathogens in the USA. Vet Rec, 2011. – Vol. 169. –12 p. <http://dx.doi.org/10.1136/vr.d2157>

- 9 Waller A.S. New perspectives for the diagnosis, control, treatment, and prevention of strangles in horses. Vet Clin North Am Equine Pract. – 2014. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2014.08.007>.
- 10 Newton J.R., Wood J.L.N., DeBrauwere M.N. et al. Detection and treatment of asymptomatic carriers of Streptococcus equi following strangles outbreaks in the UK. Equine Infectious Diseases VIII: Proceedings of the Eighth International Conference, Dubai, March 1998.
- 11 Newton J.R., Verheyen K., Talbot N.C. et al. Control of strangles outbreaks by isolation of guttural pouch carriers identified using PCR and culture of Streptococcus equi. Equine Vet J. – 2000. – Vol.32. – P. 515-526. <https://doi.org/10.2746/04251640077584721>
- 12 Skorodumova D.I. s soavt. «Mikrobiologicheskaya diagnostika bakterial'nyh boleznej zivotnyh // Spravochnik. – Moskva. – 2005. – 653 s.

АЛМАТЫ ОБЛЫСЫНДАҒЫ ЖЫЛҚЫЛАРДЫҢ САҚАУ ЭПИЗООТИЯЛЫҚ ЖАҒДАЙЫН ЗЕРТТЕУ

Б.А. Еспембетов¹ , М.К. Сармыкова¹ , А.А. Самбетбаев² , Е.Б. Серікбай¹ ,
Н.С. Сырым¹ , Н.Н. Зинина¹ , А.М. Анарбекова¹ , К.К. Тилеуханов¹ 

¹Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты, Гвардейский қтп.

² Қазақ ұлттық аграрлық зерттеу университеті, Алматы қ.

espembetov@mail.ru

Аннотация: бұл мақалада статистикалық мәліметтер ағымдағы жылдың 1 шілдесіндегі мәлімет бойынша, өткен жылдың сәйкес кезеңімен салыстырғанда жылқы басы жалпы 8,5% - ға өсіп, 1 шілдедегі жағдай бойынша 3372,5 мың басты құрады. Алайда, қыс айларында (қаңтар және ақпан) Қазақстанда жылқы саны 1,3% - ға төмендеді. Абсолюттік цифрларда жылқы басы қаңтарда 20,2 мың басқа, ал ақпанда тағы 16,6 мың басқа азайды. Соңғы жылдары елімізде тек құлындар арасында ғана емес, сонымен қатар ересек мал арасында да ауыр сырқаттанушылық байқалады.

Жылқы сақауы ауруына эпизоотологиялық мониторинг жүргізу мақсатында ЖТН 08855635 жобасының күнтізбелік жоспарына сәйкес 2020-2022 жылдары еліміздің Алматы облысының аумағында ауру жануарлардан патологиялық материал сынамаларын алу үшін ғылыми экспедициялық сапарлар ұйымдастырылды.

Экспедициялық сапарларды мақсатты ұйымдастыру және өткізу нәтижесінде қажетті эпизоотологиялық деректер жиналып, жүргізілетін ветеринариялық-санитариялық іс-шараларға талдау жүргізілді. Осы кезеңді орындау нәтижесінде 112 биоматериал сынамасының жалпы мөлшерінде егу кезінде сақаумен ауырған құлыннан алынған сынамалар жиналды, тек 3 сынамадан микробтың өсіндісі бөліп алынды. Бұл жағдай аурудың атипті жағдайларын тудыратын сақау стрептококктың өсіндісін бөліп алу қиынға соғады. Дегенмен зерттеу нәтижесінде бактериялық изолят Streptococcus equi түрі анықталған.

Түйін сөздер: жылқы сақауы; биологиялық материал; абсцесс; Streptococcus equi; изолят

STUDY OF THE EPIZOOTIC SITUATION OF HORSE WASHING IN THE ALMATY REGION

B.A. Yespembetov¹ , M.K. Sarmykova¹ , A.A. Sambetbaev² , E.B. Serikbay¹ ,
N.S. Syrym¹ , N.N. Zinina¹ , A.M. Anarbekova¹ , K.K. Tileukhanov¹ 

¹ Scientific Research Institute of Biological Safety Problems, Gvardeysky

² Kazakh National Agrarian Research University, Almaty

espembetov@mail.ru

Annotation: This article presents the results of statistical data as of July 1, compared with the same date last year, the number of horses as a whole increased by 8.5%, amounting to 3372.5 thousand heads as of July 1. However, during the winter months (January and February), the number of horses in Kazakhstan decreased by 1.3%. In absolute terms, the number of horses in January decreased by 20.2 thousand heads, and in February by another 16.6 thousand heads. In recent years, the country has seen an increase in the incidence of mytomy not only among foals, but also among adult livestock.

In order to conduct epizootological monitoring of washing of horses, according to the calendar plan of the project IRN 08855635, from 2020-2022 scientific expeditions were organized on the territory of the Almaty region of the republic with the sampling of pathological material from sick animals.

As a result of the purposeful organization and conduct of expedition trips, the necessary epidemiological data were collected and the analysis of ongoing veterinary and sanitary measures was carried out. As a result of this stage, samples were collected in a total of 112 samples of biomaterial from sick washed foals during sowing, it was possible to isolate the culture of the microbe only in 3 cases. This circumstance is due to the fact that the modified forms of mytaceous streptococcus causing atypical cases of the disease are very difficult to cultivate. According to the results of the study, bacterial isolates were identified as the species *Streptococcus equi*.

Keywords: horses; myt; biological material; abscess; *Streptococcus equi*; isolate

ОЦЕНКА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТЕРИЛЬНОСТИ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

С.У. Молдагулова ^{*}, Э.Ж. Калимолда , С.О. Садикалиева ,
Г.Б. Токкарина , Е.П. Воронина , Б.А. Еспембетов , А.С. Нурпейсова ,
М.М. Касенов , К.А. Шораева 

Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности, пгт Гвардейский
sabina_moldagulova@mail.ru

Аннотация: одним из основных критериев биологической безопасности иммунобиологических препаратов является их стерильность. В данной статье представлены результаты оценки двух методов – прямого посева и мембранной фильтрации. А также представлены результаты контроля стерильности инаktivированной вакцины против Covid-19 «QazCovid-in®», серии № 0400721, № 0410721, № 0420721. Оценка стерильности испытуемых образцов трех серий вакцины показала, что после инкубации питательная среда оставалась чистой как в образцах прямого посева, так и образцах мембранной фильтрации. Учет и оценка полученных данных исследований проведены в соответствии с Государственной Фармакопеей Республики Казахстан. Для оценки чувствительности двух методов определения стерильности, образцы иммунобиологических препаратов были экспериментально заражены культурами тест-штаммов *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* и *Clostridium sporogenes*. В результате определения стерильности на двух методах, мембранной фильтрации и прямого посева, образцы показали одинаковую чувствительность, при обнаружении дрожжей и анаэробных организмов во всех исследуемых концентрациях тест-штаммов (10, 1, 0,1 КОЕ/мл). А для обнаружения аэробных микроорганизмов метод мембранной фильтрации оказался более чувствительным по сравнению с методом прямого посева, доказательством являются положительные результаты во всех пробах тест-штаммов при мембранной фильтрации (3/3 во всех концентрациях) и отрицательные при постановке метода прямого посева (в концентрациях 1 и 0,1 КОЕ/мл). Таким образом, цель настоящего исследования заключалась в оценке этих двух методов, используемых для определения стерильности иммунобиологических препаратов.

Ключевые слова: иммунобиологический препарат; стерильность; метод прямого посева; метод мембранной фильтрации; контаминация

Введение

Основными требованиями, предъявляемыми к применяемым практически в любой области медицины биопрепаратам, к которым отнесены иммунобиологические препараты (ИП), является их безопасность и эффективность [1]. Учитывая, что значительная часть ИП предназначена для парентерального применения, определяющим критерием их микробиологической безопасности является в первую очередь – стерильность. Получение стерильного медицинского препарата не контаминированного посторонней микрофлорой является первостепенной задачей производства, позволяющей исключить

дополнительный риск при применении препаратов, вводимых людям. Подтверждением микробиологической безопасности препаратов, наряду с соответствием условий их производства требованиям надлежащих практик GMP является использование при оценке их качества точных, высокочувствительных и адекватных методов, обеспечивающих достоверные результаты исследований [2, 3].

Испытание готовых продуктов на стерильность необходимо рассматривать только как завершающий этап в серии контрольных мероприятий, гарантирующих их чистоту. Методика испытания на стерильность должна быть валидирована для каждого продукта [4].

Испытания на стерильность должны проводиться в тех же условиях, что и асептическое производство: при использовании ламинар-боксов с потоком воздуха класса А, расположенные в чистом помещении класса В. Подготовка воздуха, подаваемого в чистое помещение проводится с помощью HEPA-фильтров (HEPA - High Efficiency Particulate Absorption - высокоэффективная задержка частиц), которые служат для практически полной очистки воздуха даже от самых мельчайших частиц, вплоть до 0.1 мкм [5-7]. Использование изолирующих технологий GMP сокращает необходимость присутствия человека в производственных зонах, в результате чего значительно сокращается риск микробной контаминации продукции, производимой в асептических условиях [8].

Испытание на стерильность, описанные в Государственной Фармакопее Республики Казахстан (ГФ РК) включают методы прямого посева и мембранной фильтрации.

Мембранная фильтрация – это разделение веществ в растворах на полупроницаемых мембранах. Данный метод позволяет осуществить разделение дисперсных систем на составляющие – отделить более крупные и более мелкие частицы. Метод мембранной фильтрации используют во всех случаях, когда природа препарата и его физико-химические свойства позволяют фильтровать его через мембранные фильтры.

Метод прямого посева используется для испытания стерильности ИП, не обладающих антимикробным действием или антимикробное действие у которых можно устранить разведением или инаktivированием, а также для препаратов, испытание которых невозможно выполнить методом мембранной фильтрации.

Из двух методов, мембранная фильтрация наиболее предпочтительный и высокоэффективный метод при испытаниях, тогда как метод прямого посева является наиболее простым экспресс-методом, предназначенный для испытания ИП.

Целью настоящего исследования явилась оценка эффективности двух описанных в данной статье микробиологических методов (прямой посев и мембранная фильтрация) в контроле качества определение стерильности ИП, производимых в НИИПББ.

Материалы и методы

Вакцина

Испытуемыми образцами ИП являются серии инаktivированной вакцины против COVID-19 – «QazCovid-in®»: № 0400721, № 0410721, № 0420721 производимые в НИИПББ. Все использованные образцы были протестированы методом прямого посева и мембранной фильтрации в рамках контроля качества с отрицательными результатами [2].

Штаммы и приготовление разведений микроорганизмов

В работе были использованы дрожжи, аэробные, анаэробные и спорообразующие микроорганизмы (штаммы АТСС), предоставленные из коллекции микроорганизмов НИИПББ (таблица 1). Для приготовления десятичных разведений культур был использован 0,9 % физиологический раствор, и были выбраны следующие единицы: 10, 1 и 0,1 колониеобразующих единиц (КОЕ)/мл. Данные растворы использовались для оценки эффективности

питательных сред и для экспериментального испытания ИП, чтобы оценить чувствительность методов прямого посева и мембранной фильтрации. Подсчет количества КОЕ проводился в мясепептонном агаре (МПА) для тест-штаммов *C. sporogenes* и *St. aureus* и на Сабуро агар для тест-штамма *C. albicans* [2,9].

Методы определения стерильности

Испытание проводили в соответствии с методами, описанными в ГФ РК, т.1 ст. 2.6.1.

ИП, производимые в НИИПББ, тестируются методом прямого посева и методом мембранной фильтрации. Чувствительность двух методов определяется путем искусственного заражения ИП с использованием известных концентраций бактерий. ИП инокулируются 5 мл выросшими микроорганизмами *St. aureus*, *C. albicans* и *C. sporogenes* до конечных концентраций 0,1, 1 и 10 КОЕ/мл. Флаконы встряхивают вручную в течение 1 минуты до полной гомогенизации содержимого. Затем по 10 мл каждой пробы используют для оценки метода прямого посева и метода мембранной фильтрации. Прямой посев проводят, инокулируя 1 мл экспериментально контаминированной вакцины в пять флаконов со средой Сабуро и тиогликолевой средой. Метод мембранной фильтрации проводят путем фильтрации 10 мл контаминированной ИП, с помощью вакуумно-насосной системы Steritest™ (Pump System), заранее ИП солюбилизируют в Triton X-100 для улучшения фильтрации. Далее инокулированные питательные среды Сабуро и тиогликолевая инкубируются при температурах 20-25 °C и 30-35 °C, соответственно, для обнаружения грибов, дрожжей, аэробных и анаэробных бактерий. Среда инкубируют в течение 14 дней для выявления медленно растущих микроорганизмов, которые могут находиться в латентной стадии или ослаблены из-за экстремальных условий производственного процесса. Все образцы были эффективно отфильтрованы в вакуумно-насосной системе Steritest™ [2].

Оценка эффективности питательных сред

Для оценки качества питательных сред были инокулированы растворы по 0,1, 1 и 10 КОЕ/мл микроорганизмов *St. aureus* и *C. sporogenes* в тиогликолевую среду, а *C. albicans* в среду Сабуро. Наблюдение проводилось в течение 14 дней при температурах, указанных в таблице 1. Для проверки концентрации КОЕ микроорганизмов и для подтверждения ростовых свойств питательных сред были использованы те же разведения инокулянтов для посева в Сабуро агар и МПА, с дальнейшим инкубированием при 30-35 °C в течение 48 ч. Во всех анализах параллельно использованы отрицательные контроли, т.е. питательные среды инкубированы в тех же условиях, только без инокулята [2].

Таблица 1 – Список тест-штаммов, использованных при оценке прямой инокуляции и мембранной фильтрации

Наименование штаммов	Идентификатор штамма	Анаэробный/аэробный	Окрашивание по Граму	Температура инкубации (°C)
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC6538	аэробный	грамположительные кокки	30-35
<i>Clostridium sporogenes</i>	ATCC19404	анаэробный	грамположительные палочки	30-35
<i>Candida albicans</i>	ATCC10231	аэробный	дрожжи	20-25

Окраска по Граму

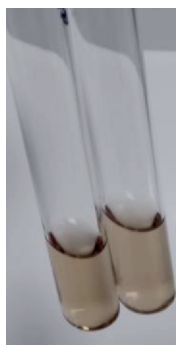
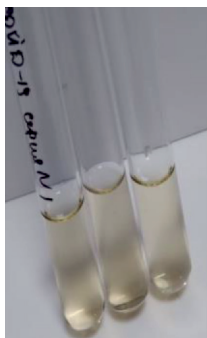
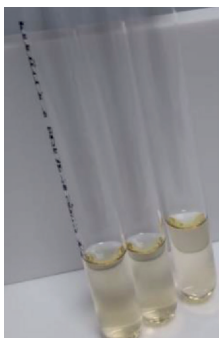
Для идентификации тест-штаммов необходимо нанести на обезжиренное предметное стекло в трех местах три капли воды и готовить три тонких мазка различных видом тест-штамм. По краям располагают контрольные мазки с заведомо известным отношением к окраске по Граму, а в центре мазок исследуемого тест-штамма. Мазки высушивают и фиксируют в пламени спиртовки. Для окрашивания мазков используют генцианвиолент. Мазок окрашивают в течении минуты, положив полоску фильтровальной бумаги пропитанной красителем и водой на стекло, затем бумажку с красителем удаляют, а на препарат наносят раствор Люголя и выдерживают минуту.

Важно четко соблюдать время обесцвечивания, так как при увеличении или уменьшении его продолжительности наблюдается обесцвечивание грамположительных бактерий. Препарат обрабатывают 96% спиртом, не промывая водой в течении 15-20 сек. После промывания водой предметное стекло, на его поверхность кладут полоску фильтровальной бумаги, пропитанной фуксином Пфайфер, смачивая ее водой и далее окрашивая в течении минуты. После удаления фильтровальной бумаги с красителем стекло промывают водой и осушают чистой фильтровальной бумагой, далее на стекло наносят каплю иммерсионной жидкости [10]. Результаты окрашивания по Граму проверяют микроскопированием.

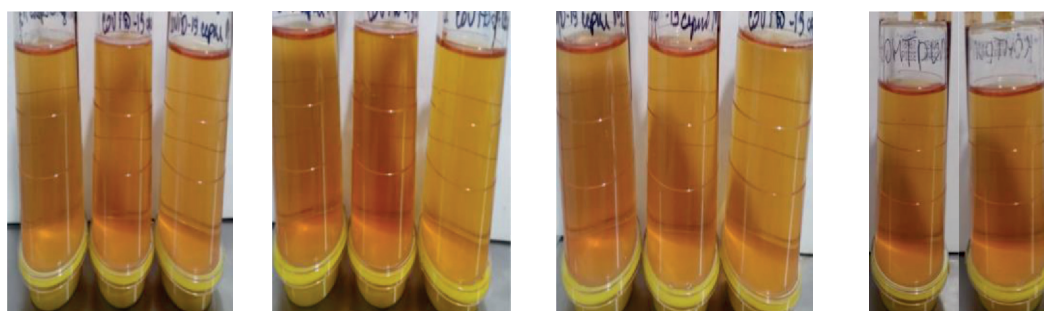
Результаты

В результате определили стерильность испытуемой вакцины QazCovid-in на питательных средах Сабуро и тиогликолевой среде с помощью методов прямого посева и мембранной фильтрации. Результаты испытания стерильности испытуемой вакцины QazCovid-in представлены ниже в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты испытания вакцины QazCovid-in на стерильность

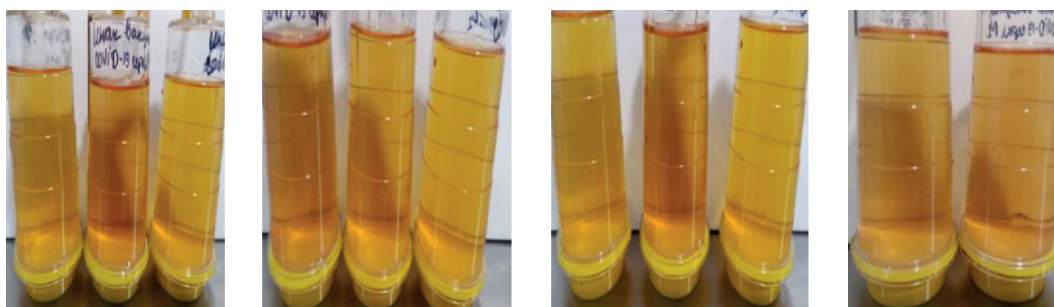
Методы	Инактивированной вакцины против Covid-19 «QazCovid-in®»			Отрицательный контроль
	№ 0400721	№ 0410721	№ 0420721	
Тиогликолевая среда				
				
Сабуро бульон				
Прямой посев				

Тиогликолевая среда



Сабуро бульон

Мембранная фильтрация



Из результатов, представленных в таблице 2 видно, что все питательные среды, инокулированные вакциной стерильные, так как наблюдается отсутствие каких-либо помутнений и изменений их цвета, которые соответствуют отрицательным контролям.

Далее, для оценки чувствительности двух методов определения стерильности, образцы ИП были экспериментально заражены культурами тест-штаммов *St. aureus*, *C. albicans* и *C. sporogenes* согласно протоколу, описанному выше. Визуальный осмотр проводился каждые два дня. Рост микроорганизмов наблюдался в тиогликолевой среде и среде Сабуро с образованием пленок, осадков, появлением мутности и других микроскопических изменений, результаты анализа на чувствительность (КОЕ/мл) при прямом посеве и мембранной фильтрации представлены ниже в таблице 3.

Таблица 3 – Результаты (КОЕ/мл) анализов на чувствительность при прямом посеве и мембранной фильтрации

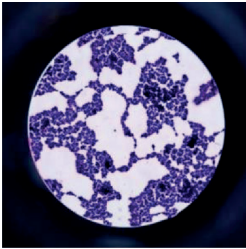
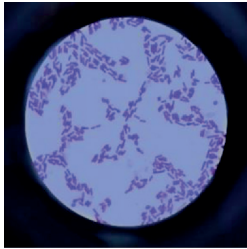
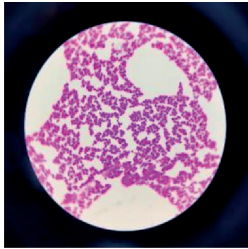
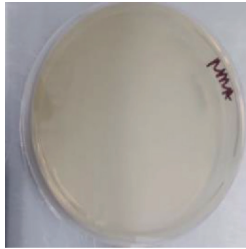
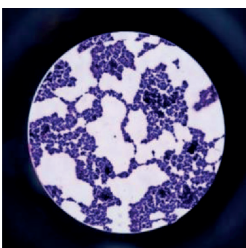
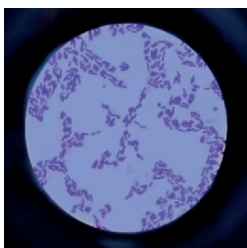
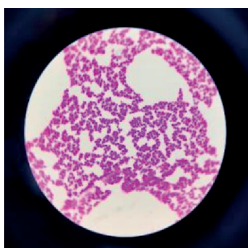
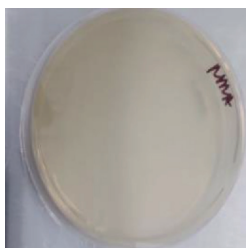
Методы	Среда	<i>Candida albicans</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Clostridium sporogenes</i>			Инактивированная вакцина «QazCovid-in®» серия			Отрицательный контроль
		10	1	0,1	10	1	0,1	10	1	0,1	0400721	0410721	0420721	
Прямой посев	Тиогликоль	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3	0/3	3/3	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/2
	Сабуро	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/2
Мембранная фильтрация	Тиогликоль	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/2
	Сабуро	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/2

В таблице 3 показаны результаты чувствительности двух методов определения стерильности с использованием тест-штаммов испытуемой вакцины и отрицательного контроля. Различные микробные разведения тестировались (в трех повторностях) при

прямом посеве. Повторы одного и того же разведения показали одинаковые результаты (положительный или отрицательный). Методы мембранной фильтрации и прямого посева показали одинаковую чувствительность при обнаружении дрожжей и анаэробных организмов во всех исследуемых концентрациях тест-штаммов (10, 1, 0,1 КОЕ/мл). А для обнаружения аэробных микроорганизмов метод мембранной фильтрации оказался более чувствительным по сравнению с методом прямого посева, доказательством чего являются положительные результаты во всех пробах тест-штаммов при мембранной фильтрации (3/3 во всех концентрациях) и отрицательные при постановке метода прямого посева (в концентрациях 1 и 0,1 КОЕ/мл). При этом отрицательный контроль показал отрицательный результат.

Помутненные среды тест-штаммов, инокулированные с образцами ИП далее были посеяны на твердые среды для их идентификации, результаты испытания представлены ниже в таблице 4.

Таблица 4 – Макро- и микроскопические характеристики тест-штаммов

Методы	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Clostridium sporogenes</i>	<i>Candida albicans</i>	Отрицательный контроль
Колония				
Микроскопия				

Полученные результаты из рисунка 4 показали, что рост бактерий в чашках Петри с МПА соответствует типичным для *C. sporogenes* (мелкие и средние плоские колонии с приподнятыми желто-серым центром и уплощенной периферией) бактериям. В то время как в чашках Петри с Сабуро агар для *C. albicans* наблюдались обычные дрожжевые культуры (гладкие, блестящие, бело-желтоватые культуры) и в МПА наблюдался рост бактерии *St. aureus* (круглые с ровными краями, золотистого цвета).

Колонии *C. sporogenes* на МПА имели типичную морфологию и цвет при окрашивании по Граму наблюдались плеоморфные и грамположительные колонии, *C. albicans* на Сабуро агар были крупные, образующие своеобразные пирамиды. А колонии *St. aureus* образовали грамположительные кокки.

Обсуждение

Как и любой другой продукт биологического происхождения, ИП производятся в асептических условиях и проверяются на стерильность на различных этапах производства. Поэтому оценка стерильности, а также асептика процессов, контроль окружающей среды и использование стерильного оборудования и реактивов обеспечивают соответствие

конечного продукта по требованиям ГФ РК [2]. Стерильность подразумевает отсутствие любых жизнеспособных микроорганизмов, способных представить опасность во время, после введения или при использовании продукта [11]. Уровень стерильности 10^{-6} обычно является приемлемым в процессах, принятых в фармацевтической промышленности. То есть, это означает менее одного жизнеспособного микроорганизма в одном миллионе произведенных единиц [12].

В данной статье представлены результаты контроля стерильности инактивированной вакцины против Covid-19 «QazCovid-in[®]», серии №0400721, №0410721, №0420721. Оценка стерильности испытуемых образцов трех серии ИП, показало, что после инкубации питательная среда оставалась чистой как в образцах прямого посева, так и образцах мембранной фильтрации.

Далее с целью имитации контаминации в процессе производства вакцины были инокулированы известными концентрациями микроорганизмов. Оценивали разведение микробных культур в концентрациях 10, 1 и 0,1 КОЕ/мл, как рекомендовано в литературе [13].

Также в данной статье представлены результаты методы мембранной фильтрации и прямого посева показали одинаковую чувствительность при обнаружении дрожжей и анаэробных организмов во всех исследуемых концентрациях тест-штаммов (10, 1, 0,1 КОЕ/мл). Что касается обнаружения аэробных микроорганизмов метод мембранной фильтрации оказалась более чувствительной по сравнению с методом прямого посева, доказательством чего положительные являются результаты во всех пробах тест-штаммов при мембранной фильтрации (3/3 во всех концентрациях) и отрицательные при постановке метода прямого посева (в концентрациях 1 и 0,1 КОЕ/мл). При этом отрицательный контроль показал отрицательный результат. Высокая чувствительность метода мембранной фильтрации объясняется тем, что микроорганизм отделяется от продукта во время инкубации (что не происходит при прямом посеве). В конечном итоге, такая сегрегация позволяет ослабленным патогенам восстанавливаться более эффективно [14].

Из литературных данных известно, что мембранная фильтрация имеет ряд преимуществ перед прямым посевом: уменьшает контаминацию при анализе, так как проводится в закрытом вакуумном насосе [3]; это позволяет анализировать больший объем образцов [15]; снижает вероятность ложноположительных результатов, поскольку из среды удаляется избыток вакцины, что в противном случае привело бы к увеличению мутности, влияющей на результаты [3]. Результаты полученных в данной статье также свидетельствуют аналогичные закономерности в сравнении двух методов определения стерильности.

Таким образом, данная работа показывает, что использование мембранной фильтрации для определения стерильности ИП, используемых для здравоохранения, является наиболее эффективным и точным по сравнению с методом прямого посева.

Заключение

На основе литературных данных, в статье подробно описаны правила и методы по определению стерильности иммунобиологических препаратов. В зависимости от времени и эффективности можно применять методы прямого посева, мембранной фильтрации для определения стерильности ИП.

В целом пригодность методов определения стерильности должны быть оценены для каждого продукта (ИП) с использованием конкретных контрольных микроорганизмов, которые представляют соответствующие экологические изоляты. В заключение следует отметить, что чувствительность метода мембранной фильтрации аналогична чувствительности метода прямого посева при выявлении грибов, дрожжей и анаэробных бактерий в ИП, хотя он более чувствителен для выявления аэробных микроорганизмов. В этом смысле

метод мембранной фильтрации является наиболее подходящим для определения стерильности ИП, определяя как грибковые, анаэробные, так и аэробные микроорганизмы.

Финансирование: Работа выполнена в рамках программы целевого финансирования, код №О.0927, регистрационный номер 67419/ПЦФ-МОН РК-ОТ-21 Комитетом науки Министерства науки и высшего образования и Республики Казахстан.

Благодарности: Авторы выражают благодарность лаборатории «Коллекция микроорганизмов» НИИПББ МЗ РК за предоставленные тест-штаммы АТСС и для проведения данного исследования, и лабораторию «Микробиологии» за совместное участие.

Конфликт интересов: Авторы не имеют потенциального конфликта интересов.

Литература

- 1 Суханова С.М., Бердникова З.Е., Захарова Н.Е., Меркулов В.А. Испытание на стерильность иммунобиологических лекарственных препаратов в России. История вопроса и современные требования // Профилактика, диагностика, лечение. – 2018. – Вып. 18 (часть 1). – С.5-15. <http://doi:10.30895/2221-996X-2018-18-1-5-15>
- 2 Государственная Фармакопеи Республики Казахстан. I изданной в 2008 г. – С.165-172.
- 3 Микробиологический контроль стерильности лекарственных средств [Электрон. ресурс]. URL: <http://www.gmpua.com/QC/Sterilitytesting>
- 4 Edward C.T., James P.A., Radha T. Sterility Assurance-Current and Future State // J. Pharm. Sci. Technol. – 2022. – Vol. 76:3. – P. 263-277. <http://doi:10.5731/pdajpst.2020.012526>
- 5 Производство стерильных лекарственных средств. Приложение №1 к Правилам надлежащей производственной практики (GMP) Евразийского экономического союза [Электрон. ресурс]. <https://pharmacopoeia.ru/pravila-nadlezhashhej-proizvodstvennoj-praktiki-evrazijskogo-ekonomicheskogo-soyuza>
- 6 Winkler D., Lukaszewicz V. Long-term analysis of sterility testing of immunobiological preparations // J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. – 1989. – Vol. 33:3. – P.317-322.
- 7 Parveen S., Kaur S., Wilson S.A., Kenney J.L., William M.M., Gupta R.K. Evaluation of growth based rapid microbiological methods for sterility testing of vaccines and other biological products // Vaccine. – 2011. – Vol.29:45. – P.2012-23. <http://doi:10.1016/j.vaccine.2011.08.055>
- 8 England M.R., Stock F., Gebo J.E., Frank K.M., Lau A.F. Comprehensive Evaluation of Compendial USP <71>, BacT/Alert Dual-T, and Bactec FX for Detection of Product Sterility Testing Contaminants // J.Clin.Microbiol. – 2019. – Vol. 57:2. – P.1548-18. <http://doi:10.1128/JCM.01548-18>
- 9 Shiota T. Microbiology // J.Am. Dent. Assoc. – 1956. – Vol. 52:4. – P. 409-11. <http://doi:10.14219/jada.archive.1956.007>
- 10 Moyes R.B., Reynolds J., Breakwell D.P. Differential staining of bacteria: gram stain // J.Curr. Protoc. Microbiol. – 2009. – Vol. 3:3. – 3 p. <http://doi:10.1002/9780471729259.mca03cs15>
- 11 Sanders E.R. Aseptic laboratory techniques: plating methods // J. Vis. Exp. – 2012. – Vol. 11:63. – P. 3064. <http://doi:10.3791/3064>
- 12 Cortés A., Sandino C., Arias J. Validación de la prueba de esterilidad para vacunas virales en vehículos oleoso y acuoso // Revista de la facultad de farmacia. – 2003. – Vol. 45:1. – P.55-59.
- 13 Mukherjee S., Sukdev M., Mahto R., Basu D., Javed R., Goel G., Bhattacharya S., Basu S., Chandy M. Importance and results of sterility testing of various products in a microbiology laboratory of eastern India // J. Me. Microbiol. – 2022. – Vol. 40:1. – P. 138-140. <http://doi:10.1016/j.ijmmb.2021.10.008>
- 14 Woedtke T., Крамер А. Limits of sterility guarantee // GMS Krankenhhyg Interdiszip. – 2008. – Vol. 3:3. – 19 p.
- 15 Seema P., Simleen K., Selwyn A., James L., William M., Rajesh K. Evaluation of growth based rapid microbiological methods for sterility testing of vaccines and other biological products // J.Vac. – 2011. – Vol. 29:45. – P. 8012-8023. 055 <http://doi:10.14219/jada.archive.1956.0070>

References

- 1 Suhanova S.M., Berdnikova Z.E., Zaharova N.E., Merkulov V.A. Ispytanie na steril'nost' immunobiologicheskikh lekarstvennykh preparatov v Rossii. Istoriya voprosa i sovremennye trebovaniya // Profilaktika, diagnostika, lechenie. – 2018. – Vyp.18 (chast' 1). – S. 5-15. <http://doi:10.30895/2221-996H-2018-18-1-5-15>
- 2 Gosudarstvennaya Farmakopei Respubliki Kazakhstan. I izdannoj v 2008 g. – S. 165-172.
- 3 Mikrobiologicheskij kontrol' steril'nosti lekarstvennykh sredstv [Elektron. resurs]. URL: <http://www.gmpua.com/QC/Sterilitytesting>
- 4 Edward C.T., James P.A., Radha T. Sterility Assurance-Current and Future State // J. Pharm. Sci. Technol. – 2022. – Vol.76:3. – P. 263-277. <http://doi:10.5731/pdajpst.2020.012526>
- 5 Proizvodstvo steril'nykh lekarstvennykh sredstv. Prilozhenie N 1 k Pravilam nadležhashchej proizvodstvennoj praktiki (GMP) Evrazijskogo ekonomicheskogo soyuza [Elektron. resurs]. <https://pharmacopoeia.ru/pravila-nadlezhashhej-proizvodstvennoj-praktiki-evrazijskogo-ekonomicheskogo-soyuza>
- 6 Winkler D., Lukaszewicz V. Long-term analysis of sterility testing of immunobiological preparations // J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. – 1989. – Vol. 33:3. – P.317-322.
- 7 Parveen S., Kaur S., Wilson S.A., Kenney J.L., William M.M., Gupta R.K. Evaluation of growth based rapid microbiological methods for sterility testing of vaccines and other biological products // Vaccine. – 2011. – Vol. 29:45. – P. 2012-23. <http://doi:10.1016/j.vaccine.2011.08.055>
- 8 England M.R., Stock F., Gebo J.E., Frank K.M., Lau A.F. Comprehensive Evaluation of Compendial USP <71>, BacT/Alert Dual-T, and Bactec FX for Detection of Product Sterility Testing Contaminants // J.Clin.Microbiol. – 2019. – Vol. 57:2. – P.1548-18. <http://doi:10.1128/JCM.01548-18>
- 9 Shiota T. Microbiology // J.Am. Dent. Assoc. – 1956. – Vol.52:4. – P. 409-11. <http://doi:10.14219/jada.archive.1956.007>
- 10 Moyes R.B., Reynolds J., Breakwell D.P. Differential staining of bacteria: gram stain // J.Curr. Protoc. Microbiol. – 2009. – Vol. 3:3. – 3 p. <http://doi:10.1002/9780471729259.mca03cs15>
- 11 Sanders E.R. Aseptic laboratory techniques: plating methods // J. Vis. Exp. – 2012. – Vol.11:63. – P. 3064. <http://doi:10.3791/3064>
- 12 Cortés A., Sandino C., Arias J. Validación de la prueba de esterilidad para vacunas virales en vehículos oleoso y acuoso // Revista de la facultad de farmacia. – 2003. – Vol. 45:1. – P.55-59.
- 13 Mukherjee S., Sukdev M., Mahto R., Basu D., Javed R., Goel G., Bhattacharya S., Basu S., Chandy M. Importance and results of sterility testing of various products in a microbiology laboratory of eastern India // J. Me. Microbiol. – 2022. – Vol. 40:1. – P. 138-140. <http://doi:10.1016/j.ijmmb.2021.10.008>
- 14 Woedtke T., Kpamep A. Limits of sterility guarantee // GMS Krankenhhyg Interdiszip. – 2008. – Vol. 3:3. – 19 p.
- 15 Seema P., Simleen K., Selwyn A., James L., William M., Rajesh K. Evaluation of growth based rapid microbiological methods for sterility testing of vaccines and other biological products // J. Vac. – 2011. – Vol. 29:45. – P. 8012-8023. 055 <http://doi:10.14219/jada.archive.1956.0070>

ИММУНОБИОЛОГИЯЛЫҚ ПРЕПАРАТТАРДЫҢ СТЕРИЛЬДІЛІГІН АНЫҚТАУДЫҢ МИКРОБИОЛОГИЯЛЫҚ ӘДІСТЕРІН БАҒАЛАУ

С.У. Молдагулова , Э.Ж. Калимолда , С.О. Садикалиева ,
Г.Б. Токкарина , Е.П. Воронина , Б.А. Еспембетов , А.С. Нурпейсова ,
М.М. Касенов , К.А. Шораева 

Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты, Гвардейск құқ
sabina_moldagulova@mail.ru

Аннотация: иммунобиологиялық препараттардың биологиялық қауіпсіздігінің негізгі критерийлерінің бірі – олардың стерильділігі. Бұл мақалада тікелей себу мен мембраналық сүзудің екі әдісін бағалау нәтижелері келтірілген. Сондай-ақ, Covid-19-ға қарсы инактивтелген вакцинаның «QazCovid-in®», № 0400721, № 0410721, №0420721 сериялы стерильділігін бақылау нәтижелері ұсынылды. Вакцинаның үш сериясының үлгілірі инкубациядан кейін қоректік орталарда тікелей себу әдісінде және мембраналық фильтрация әдісінде таза болғаны көрсетілген, сонымен қатар алынған зерттеу деректері Қазақстан Республикасының Мемлекеттік Фармакопеясына сәйкес болып табылды. Стерильділікті анықтаудың екі әдісінің сезімталдығын бағалау үшін иммунобиологиялық препараттардың үлгілері эксперименталды түрде *St. aureus*, *C. albicans* және *C. sporogenes* сынақ штаммыдарымен ластандырылған. Нәтижесінде, мембраналық сүзу және тікелей себу әдістері ашытқылар мен анаэробты организмдерді сынақ штаммдарының барлық зерттелетін концентрацияларында (10, 1, 0,1 CFU/мл) анықтаған кезде бірдей сезімталдықты көрсетті. Ал аэробты микроорганизмдерді анықтау үшін мембраналық сүзу әдісі мен тікелей себу әдісінен салыстырғанда анағұрлым сезімтал болып шықты, мұның дәлелі мембраналық сүзу кезіндегі сынақ штаммдарының барлық сынамаларында (барлық концентрацияларында 3/3) және тікелей себу әдісін қою кезінде теріс (1 және 0,1 КОЭ/мл концентрацияларда) нәтижелер болып табылады. Осылайша, осы зерттеудің мақсаты иммунобиологиялық препараттардың стерильділігін анықтау үшін қолданылатын осы екі әдісті бағалау болды: тікелей себу және мембраналық сүзу.

Түйінді сөздер: иммунобиологиялық препарат; стерильділік; тікелей себу әдісі; мембраналық фильтрация әдісі; ластану

MICROBIOLOGICAL CONTROL OF WATER QUALITY FOR THE PRODUCTION OF BIOLOGICAL PRODUCTS

S.U. Moldagulova , E.Zh. Kalimolda , S.O. Sadikaliyeva ,
G.B. Tokkarina , E.P. Voronina , B.A. Espembetov , A.S. Nurpeisova ,
M.M. Kasenov , K.A. Shorayeva 

Scientific Research Institute of Biological Safety Problems, Gvardeysky
sabina_moldagulova@mail.ru

Abstract: one of the main criteria for the biological safety of immunobiological preparations is their sterility. This article presents the results of the evaluation of two methods of direct seeding and membrane filtration. The results of sterility control of the inactivated vaccine

against Covid-19 «QazCovid-in®, series № 0400721, № 0410721, № 0420721 are also presented. Evaluation of the sterility of the tested samples of the three vaccine series showed that after incubation, the nutrient medium remained clean both in direct seeding samples and membrane filtration samples, as well as accounting and evaluation of the obtained research data in accordance with the State Pharmacopoeia of the Republic of Kazakhstan. To assess the sensitivity of two methods for determining sterility, samples of immunobiological preparations were experimentally infected with cultures of test strains of *St. aureus*, *C. albicans* and *C. sporogenes*. As a result, the methods of membrane filtration and direct seeding showed the same sensitivity when detecting yeast and anaerobic organisms in all studied concentrations of test strains (10, 1, 0.1 CFU/ml). And for the detection of aerobic microorganisms, the membrane filtration method turned out to be more sensitive compared to the direct seeding method, which is proved by positive results in all samples of test strains with membrane filtration (3/3 in all concentrations) and negative results when setting the direct seeding method (in concentrations of 1 and 0.1 CFU/ml). Thus, the purpose of this study was to evaluate these two methods used to determine the sterility of immunobiological preparations using two methods: direct seeding and membrane filtration.

Keywords: immunobiological preparation; sterility; direct seeding method; membrane filtration method, contamination

АПРОБАЦИЯ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ИНДИКАЦИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ *ASPERGILLUS FLAVUS* МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

Н.Феоктистова *, Е.Сульдина , А. Мاستиленко , А. Ломакин 

ФГБОУ ВО Ульяновский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина,
г. Ульяновск, Российская Федерация
feokna@yandex.ru

Аннотация: в статье представлены результаты исследований по апробации тест-систем для индикации и идентификации микроскопических грибов *Aspergillus flavus* методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени». Применяя программное обеспечение Multiple Sequence Alignment Viewer 1.22.1 и UGENA 44.0. Тест-система для *A. flavus* включает специфические праймеры: прямой праймер (f) 5'-3' GGGCCCGCAGCAAGAATAC, обратный праймер (r) 3'-5' ACGAGTTGTCACCTTCCCGAGA; флуоресцентный краситель: HEX, зонд - CGGTTTCGCTTTGGTCATCGT, гаситель BHQ2. Протокол постановки реакции: предварительная денатурация – 95°C - 5 минут (1 цикл); денатурация - 95°C - 5 сек, отжиг - 60°C - 15 сек (50 циклов). Зонд: AGCATAGGCTGATGCTCGTAGGC, флуоресцентный краситель – ROX, гаситель - BHQ-2. Чувствительность тест-системы составляет 1000 клеток. Установлена оптимальная концентрация праймеров равная 9 pM каждого праймера на реакцию. Оптимальная концентрация зонда - 0,4 pM. Полученные результаты свидетельствуют о том, что применение дихотомических ключей не позволяет максимально точно дифференцировать фитопатогенные грибы *A. flavus*. Новый подход к идентификации изолятов подтвердил принадлежность 15 выделенных штаммов к виду *A. flavus* из 20 выделенных из проб кукурузы с признаками, проявляющимися, как загнивание корней и увядание, и первично типированных как *Aspergillus* на основании изучения культурально-морфологических свойств. Исследование выполнено согласно тематическому плану-заданию Министерства сельского хозяйства Российской Федерации, регистрационный номер ЕГИСУ НИОКТР 122030200367-8.

Ключевые слова: *Aspergillus flavus*; тест-система; полимеразная цепная реакция; идентификация; кукуруза; индикация

№12
2022

Введение

В настоящее время проблема контаминации сельскохозяйственных растений (вегетативных форм и зерна) приобретает определенное хозяйственное значение. *A. flavus* является условно-патогенным микроорганизмом сельскохозяйственных культур, особенно масличных, таких как кукуруза, арахис и семена хлопка. *A. flavus* присутствует в почве в виде конидий или склероций и в тканях растений в виде мицелия. Его штаммы изолируют из проб, находящихся в широком диапазоне климатических зон, но чаще встречается между 16° и 35° широты в зонах с теплым климатом [1,2]. Микроскопический гриб *A. flavus* – продуцент микотоксина – афлатоксина В1. Проявление признаков глобального потепления, неудовлетворительное состояние промышленных зернохранилищ, не достаточно эффективная система мониторинга фитосанитарного состояния хранящегося зерна

делают актуальными исследования, направленные на разработку ускоренного и чувствительного метода для точной идентификации вышеуказанного возбудителя [3,4]. Исходя из вышеизложенного, цель настоящего исследования – апробация разработанной тест-системы для идентификации фитопатогенных грибов *A. flavus* на основе ПЦР-РВ.

Материалы и методы

Апробацию разработанной авторами тест-системы для индикации и идентификации *A. flavus* методом полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени» проводили на 21 штамме микроорганизмов: *A. flavus*, в том числе депонированный штамм (*Aspergillus flavus* VKM No. F-25) во ВКМ ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований» РАН (положительный контроль) и 20 полевых штаммах, выделенных из проб кукурузы (зерно, вегетативная масса), полученных из разных природно-географических зон Российской Федерации (пробы были получены из Краснодарского и Ставропольского краев, Ульяновской, Самарской, Воронежской, Ростовской, Белгородской, Курской, Орловской, Калининградской и Московской областей. Идентификацию полевых штаммов, выделенных от растений с признаками заболеваний, проводили анализируя культурально-физиологические признаки, используя определители В.И. Билай, Э.З. Коваль (1988) и др. [5-7].

Материалы: реакционная смесь Био Мастер HS-Taq ПЦР (2×), ламинарный бокс БМБ-ii-«Ламинар-с» – 12, центрифуга/вортекс для пробирок, центрифуга-встряхиватель медицинская серии СМ-50М, твердотельный термостат TDB-120, амплификатор детектирующий ДТ (ДНК-технология, Россия); система праймеров: прямой праймер (f) 5'-3' GGGCCCGCAGCAAGAATAC, обратный праймер (r) 3'-5' ACGAGTTGTCACCTTCCCGAGA; флуоресцентный краситель: HEX, зонд – CGGTTCGCTTTGGTCATCGT, гаситель BHQ2, лабораторная посуда.

Выделение нуклеиновых кислот из моноспоровых культур *A. flavus* осуществляли, применяя набора реагентов «ЛИРА+» (Вектор Бест, РФ) по алгоритму, рекомендованному производителем.

Результаты

Для разработки системы молекулярно-генетической идентификации методом ПЦР-РВ авторами был выбран участок генома *Aspergillus flavus* strain CA14 4,044,380..4,045,732 п.н.

На основании полученной последовательности ДНК указанного выше фрагмента гена нами были подобраны праймеры для проведения ПЦР. Их специфичность была проверена так же при помощи NCBI BLAST-primer. Был разработан и, впоследствии, оптимизирован алгоритм постановки реакции с применением интеркалирующего красителя SYBR Green: предварительная денатурация – 95°C – 5 минут (1 цикл), денатурация – 95°C – 5 сек, отжиг – 60°C – 15 сек (30 циклов). Эмпирически было установлено, что увеличение концентрации праймеров не влияет на эффективность реакции, поэтому в наших дальнейших исследованиях были использована концентрация 9 pM каждого праймера на реакцию.

Был произведён подбор зонда для определения чувствительности разработанной тест-системы. Это зонд CGGTTCGCTTTGGTCATCGT, в качестве флуоресцентного красителя был использован HEX, гасителя BHQ-2. После серии экспериментов была подобрана его оптимальная концентрация, которая составила 0,4 pM. Определены показатели цикла для постановки ПЦР-РВ с флуоресцентным красителем: предварительная денатурация – 95°C – 5 минут (1 цикл), денатурация – 95°C – 5 сек, отжиг – 60°C – 15 сек (50 циклов).

В результате изучения чувствительности разработанного протокола для индикации и идентификации *A. flavus* методом РВ-ПЦР с детекцией по каналу HEX, установлено, что она составляет 10³ клеток.

Апробация разработанной тест-системы для идентификации бактерий *A. flavus* методом ПЦР-РВ проводилась на двадцати полевых штаммах и референс-штамме *A. flavus* VKM No. F-25, который был использован в качестве положительного контроля. Результаты исследований представлены на рисунках 1-2.

Номер лунки	Идентификатор пробирки	Ct, Нех	Результат
A7	К+	25,0	+
B7	<i>Aspergillus</i> spp. 84		-
C7	<i>Aspergillus</i> spp. 85		-
D7	<i>Aspergillus</i> spp. 87	27,8	+
E7	<i>Aspergillus</i> spp. 88		-
F7	<i>Aspergillus</i> spp. 89	26,9	+
G7	<i>Aspergillus</i> spp. 90	24,3	+
H7	<i>Aspergillus</i> spp. 91	26,4	+
A8	<i>Aspergillus</i> spp. 93	31,4	+
B8	<i>Aspergillus</i> spp. 94	33,5	+
C8	<i>Aspergillus</i> spp. 95	34,7	+
D8	<i>Aspergillus</i> spp. 97		-
E8	<i>Aspergillus</i> spp. 99	32,1	+
F8	<i>Aspergillus</i> spp. 100	35,5	+
G8	<i>Aspergillus</i> spp. 101	36,8	+
H8	<i>Aspergillus</i> spp. 102	29,0	+
A9	<i>Aspergillus</i> spp. 103	28,1	+
B9	<i>Aspergillus</i> spp. 104	31,0	+
C9	<i>Aspergillus</i> spp. 105		-
D9	<i>Aspergillus</i> spp. 106	32,2	+
E9	<i>Aspergillus</i> spp. 107	25,9	+
F9	К-		-

Рисунок 1 – Апробация разработанной тест-системы для детекции *A. flavus* методом ПЦР-РВ

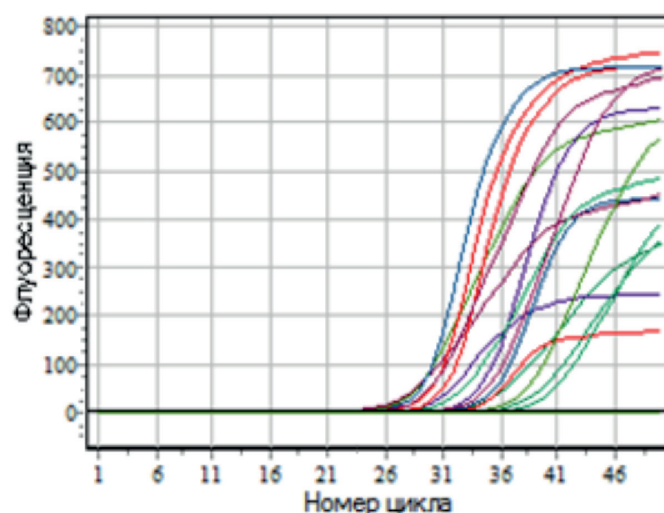


Рисунок 2 – Зависимость флуоресценции канала HEX от номера цикла

В ходе эксперимента нами было подтверждено, что из 20 выделенных проб кукурузы с признаками заболеваний штаммов микроскопических грибов, первично идентифицированных как *A. flavus*, только пятнадцать полевых штаммов относятся к данному виду на основании проведенных молекулярно-генетических исследований.

Обсуждение

Общеизвестно, что загрязнение сельскохозяйственных культур афлатоксинами остается серьезной проблемой во всем мире, характеризуется дополнительными угрозами для здоровья людей и животных. Все чаще регистрируются случаи, связанные с увеличением числа случаев аспергиллеза, вызванного *A. flavus* [1, 8]. В настоящее время для детекции и идентификации фитопатогенов применяют диагностические системы, основанные на двух методах иммуноферментном анализе (ИФА) и полимеразной цепной реакции (ПЦР). В Российской Федерации подавляющее большинство лабораторий, рутинно проводящих диагностику фитопатогенов, в качестве основного метода используют иммуно-ферментный метод (ИФА), уступающий методу ПЦР по чувствительности и специфичности [3]. С.М. Игнатьева с коллективом соавторов (2019) разработала мультиплексную ПЦР-тест-систему «HRM-Zygo-Asp» в режиме реального времени (РВ) с анализом кривых плавления ПЦР-продуктов высокого разрешения (НЕМ) для выявления и идентификации аспергиллов (только до рода) и мукоморлицетов [15]. Известно, что компанией ЗАО «ВЕКТОР-БЕСТ» производится и успешно применяется в медицинской практике коммерческая тест-система для иммуноферментной диагностики аспергиллеза «Аспергилл-IgG-ИФА-БЕСТ» [16]. Иностранскими компаниями также производятся тест-системы для идентификации фитопатогенов рода *Aspergillus* iQ-Check *Aspergillus* PCR Detection Kit (Bio-Rad), *A. flavus* Standard Kit (Primerdesign, Великобритания), MycoReal Kit *Aspergillus* (ingenetix GmbH, Austria), 2-Color *Aspergillus* qPCR Detection Kits (SPEX CertiPrep, LLC, США).

Заключение

Авторами был проведен направленный поиск микроскопических грибов *A. flavus*, участвующих в поражении кукурузы. Новый подход к тестированию изолятов подтвердил принадлежность 15 выделенных штаммов к виду *A. flavus* из 20 идентифицированных в составе микобиоты кукурузы с признаками, проявляющимися как загнивание корней и увядание. Авторами была использована оригинальная тест-система для детекции *A. flavus* методом ПЦР-РВ на основании использования специфичного участка *A. flavus* strain CA14 4,044,380..4,045,732 п.н, состоящая прямого праймера (f) 5'-3' GGGCCCCGAGCAAGAATAC, обратного праймера (r) 3'-5' ACGAGTTGTACCTTCCCGAGA, флуоресцентного красителя – HEX, зонда - CGGTTCGCTTTGGTCATCGT, гасителя - BHQ2, (оптимальная концентрация – 0,4 pM). Протокол постановки реакции включал предварительную денатурацию – 95°C - 5 минут (1 цикл), денатурацию - 95°C – 5 сек, отжиг – 60°C – 15 сек (50 циклов).

Финансирование: Исследование выполнено согласно тематическому плану-заданию Министерства сельского хозяйства Российской Федерации, регистрационный номер ЕГИСУ НИОКТР 122030200367-8.

Конфликт интересов: авторы не имеют конфликта интересов.

Литература

- 1 Amaike S., Keller N. P. *Aspergillus flavus* // Annual review of phytopathology. – 2011. – Vol. 49. – No. 1. – P. 107-133.
- 2 Gourama H., Bullerman L. B. *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: Aflatoxigenic fungi of concern in foods and feeds: A review // Journal of Food protection. – 1995. – Vol. 58. – No. 12. – P. 1395-1404.
- 3 Rudramurthy S. M. et al. Invasive aspergillosis by *Aspergillus flavus*: epidemiology, diagnosis, antifungal resistance, and management // Journal of Fungi. – 2019. – Vol. 5. – No. 3. – P. 55.
- 4 Cho H. J. et al. Regulation of Conidiogenesis in *Aspergillus flavus* // Cells. – 2022. – Vol. 11. – No. 18. – P. 2796.

- 5 Билай В.И., Коваль Э.З. Аспергиллы. – Киев: Наукова думка, 1988. – 204 с.
- 6 Билай В.И. Основы общей микологии. – Киев, Вища школа, 1980. – 360 с.
- 7 Рябинин И.А. Разработка ключа для видовой идентификации *Aspergillus spp.* – возбудителей заболеваний человека, циркулирующих в Северо-Западном округе России / И.А. Рябинин, С.С. Расулова // «Профилактическая медицина-2017»: сборник научных трудов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. 6–7 декабря 2017 года. Ч. 2. – СПб.: Изд-во СЗГМУ им. И.И. Мечникова, 2017. – 312 с.
- 8 Klich M.A. Identification of common *Aspergillus species*. – Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelculture, 2002. – 116 p.
- 9 Стахеев А.А. Молекулярно-генетические методы в исследовании таксономии и специфической идентификации токсинпродуцирующих грибов рода *Fusarium*: успехи и проблемы / А.А. Стахеев, Л.В. Самохвалова, Д.Ю. Рязанцев, С.К. Завриев // Сельскохозяйственная биология. – 2016. – Т. 51. – №3. – С. 275-284.
- 10 Игнатьева С.М. Апробация мультиплексной тест-системы «HRM-Zygo-Asp» на клиническом материале больных мукормикозами / С.М. Игнатьева, В.А. Спиридонова, Т.С. Богомолова, Ю.Л. Авдеенко, Ю.В. Борзова, С.Н. Хостелиди, О.В. Шадривова, М.О. Попова, Ю.А. Чудиновских, И.С. Зюзгин, О.С. Успенская, Н.В. Васильева // Проблемы медицинской микологии. – 2019. – Т. 21. – №4. – С. 36-42.

References

- 1 Amaike S., Keller N. P. *Aspergillus flavus* // Annual review of phytopathology. – 2011. – Vol. 49. – No. 1. – P. 107-133.
- 2 Gourama H., Bullerman L. B. *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: Aflatoxigenic fungi of concern in foods and feeds: A review // Journal of Food protection. – 1995. – Vol. 58. – No. 12. – P. 1395-1404.
- 3 Rudramurthy S. M. et al. Invasive aspergillosis by *Aspergillus flavus*: epidemiology, diagnosis, antifungal resistance, and management // Journal of Fungi. – 2019. – Vol. 5. – No. 3. – P. 55.
- 4 Cho H. J. et al. Regulation of Conidiogenesis in *Aspergillus flavus* // Cells. – 2022. – Vol. 11. – No. 18. – P. 2796.
- 5 Bilaj V.I., Koval' E.Z. Aspergilly. – Kiev: Naukova dumka, 1988. – 204 s.
- 6 Bilaj V.I. Osnovy obshchej mikologii. – Kiev, Vishcha shkola, 1980. – 360 s.
- 7 Ryabinin I.A. Razrabotka klyucha dlya vidovoj identifikacii *Aspergillus spp.* – vzbuditelej zabojevanij cheloveka, cirkuliruyushchih v Severo-Zapadnom okruge Rossii / I.A. Ryabinin, S.S. Rasulova // «Profilakticheskaya medicina-2017»: sbornik nauchnyh trudov Vserossijskoj nauchno-prakticheskoy konferencii s mezhdunarodnym uchastiem. 6–7 dekabrya 2017 goda. CH. 2. – SPb.: Izd-vo SZGMU im. I.I. Mechnikova, 2017. – 312 s.
- 8 Klich M.A. Identification of common *Aspergillus species*. – Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelculture, 2002. – 116 p.
- 9 Staheev A.A. Molekulyarno-geneticheskie metody v issledovanii taksonomii i specificheskoy identifikacii toksinprodutsiruyushchih gribov roda *Fusarium*: uspekhi i problemy / A.A. Staheev, L.V. Samohvalova, D.Yu. Ryazancev, S.K. Zavriev // Sel'skohozyajstvennaya biologiya. – 2016. – Т. 51. – №3. – С. 275-284.
- 10 Ignat'eva S.M. Aprobaciya mul'tipleksnoj test-sistemy «HRM-Zygo-Asp» na klinicheskom materiale bol'nyh mukormikozami / S.M. Ignat'eva, V.A. Spiridonova, T.S. Bogomolova, Yu.L. Avdeenko, Yu.V. Borzova, S.N. Hostelidi, O.V. Shadrivova, M.O. Popova, Yu.A. Chudinovskih, I.S. Zyuzgin, O.S. Uspenskaya, N.V. Vasil'eva // Problemy medicinskoj mikologii. – 2019. – Т. 21. – №4. – С. 36-42.

ASPERGILLUS FLAVUS-ТІ ПОЛИМЕРАЗДЫ ТІЗБЕКТІ РЕАКЦИЯ ӘДІСІМЕН ИНДИКАЦИЯЛАУ ЖӘНЕ АНЫҚТАУ ҮШІН СЫНАҚ ЖҮЙЕСІН СЫНАҚТАН ӨТКІЗУ «НАҚТЫ УАҚЫТ» РЕЖИМІНДЕ

Н. Феоктистова *, Е. Сульдина , А. Мاستиленко , А. Ломакин 

П.А. Столыпин атындағы Ульяновск мемлекеттік аграрлық университеті,
Федералды мемлекеттік бюджеттік жоғары білім беру мекемесі. Ульяновск қ., Ресей
Федерациясы
feokna@yandex.ru

Аннотация: мақалада *Aspergillus flavus* микроскопиялық саңырауқұлақтарын «нақты уақыт режимінде» анықтаумен полимеразды тізбекті реакция әдісімен индикациялау және анықтау үшін сынақ жүйесін сынақтан өткізу бойынша зерттеу нәтижелері келтірілген. Multiple Sequence Alignment Viewer 1.22.1 және ugena 44.0 бағдарламалық жасақтамасын қолдану. *A. flavus* сынақ жүйесіне арнайы праймерлер кіреді: тікелей праймер (f) 5'-3' GGGCCCGCAAGAATAC, кері праймер (r) 3'-5' ACGAGTTGTACCTTCCCGAGA; флуоресцентті бояу: HEX, зонд - CGGTTTCGCTTTGTCATCGT, bhq2 сөндіргіш. Реакция ХАТТАМАСЫ: алдын ала денатурация-95 0C - 5 минут (1 цикл); денатурация - 95 0C - 5 сек, күйдіру - 60 0C-15 сек (50 цикл). Зонд: AGCATAGGCTGATGCTCGTAGGC, флуоресцентті бояу – ROX, сөндіргіш-BHQ-2. Тест жүйесінің сезімталдығы-1000 жасуша. Праймерлердің оңтайлы концентрациясы бір реакцияға әр праймердің 9 pM-ге тең. Зондтың оңтайлы концентрациясы-0,4 pM. Нәтижелер дихотомиялық кілттерді қолдану *A. flavus* фитопатогенді саңырауқұлақтарын мүмкіндігінше дәл ажыратуға мүмкіндік бермейтінін көрсетеді. Изоляттарды сәйкестендірудің жаңа тәсілі 15 оқшауланған штаммның *A. flavus* түріне жататындығын растады, 20 жүгері сынамасынан оқшауланған, тамырдың ыдырауы және солуды ретінде көрінетін және мәдени-морфологиялық қасиеттерін зерттеу негізінде *Aspergillus* ретінде алғаш рет терілген. Зерттеу тақырыптық жоспарға сәйкес жүргізілді – Ресей Федерациясы Ауыл шаруашылығы министрлігінің тапсырмасы, ғылыми-зерттеу институтының тіркеу нөмірі 122030200367-8.

Түйін сөздер: *Aspergillus flavus*; сынақ жүйесі; полимеразды тізбекті реакция; сәйкестендіру; жүгері; көрсеткіш

APPROVAL OF THE TEST-SYSTEM FOR THE INDICATION AND IDENTIFICATION OF ASPERGILLUS FLAVUS BY THE METHOD OF POLYMERASE CHAIN REACTION IN THE “REAL TIME” MODE

N. Feoktistova *, E. Suldina , A. Mastilenko , A. Lomakin 

Ulyanovsk State Agrarian University named after P.A. Stolypin,
Ulyanovsk, Russian Federation
feokna@yandex.ru

Abstract: the article presents the results of studies on approbation of a test system for the indication and identification of microscopic fungi *Aspergillus flavus* by the polymerase chain reaction method with real-time detection. Using software Multiple Sequence Alignment Viewer 1.22.1 and UGENA 44.0. The test system for *A. flavus* includes specific primers: forward

primer (f) 5'-3' GGGCCCGCAGCAAGAATAC, reverse primer (r) 3'-5' ACGAGTTGTCACCTTCCCGAGA; fluorescent dye: HEX, probe - CGGTTCGCTTTGGTCATCGT, quencher BHQ2. Reaction protocol: preliminary denaturation - 95 °C - 5 minutes (1 cycle); denaturation - 95 °C - 5 sec, annealing - 60 °C - 15 sec (50 cycles). Probe: AGCATAGGCTGATGCTCGTAGGC, fluorescent dye - ROX, quencher - BHQ-2. The sensitivity of the test system is 1000 cells. The optimal concentration of primers was set equal to 9 pM of each primer per reaction. The optimal probe concentration is 0.4 pM. The results obtained indicate that the use of dichotomous keys does not allow the most accurate differentiation of phytopathogenic fungi *A. flavus*. A new approach to the identification of isolates confirmed the belonging of 15 isolated strains to the species *A. flavus* out of 20 isolated from corn samples with signs that manifest themselves as root rot and wilting, and initially typed as *Aspergillus* based on the study of cultural and morphological properties. The study was carried out according to the thematic plan-task of the Ministry of agriculture of the Russian Federation, the registration number of the INIS RTD 122030200367-8.

Keywords: *Aspergillus flavus*; test system, polymerase chain reaction; identification; corn; indication

ТРЕБОВАНИЯ К НАУЧНЫМ СТАТЬЯМ ДЛЯ ПУБЛИКАЦИИ В ЖУРНАЛЕ

Правила для авторов

Научный журнал «Биобезопасность и Биотехнология» принимает к публикации оригинальные исследовательские статьи, краткие сообщения и обзоры по следующим направлениям науки:

- Биологическая безопасность и биологическая защита
- Эпидемиология и эпизоотология, микробиология, вирусология, иммунология и микология.
- Ветеринарная биотехнология
- Медицинская биотехнология
- Фитопатология и биотехнология растений
- Молекулярная генетика

КАК ПОДГОТОВИТЬ СТАТЬЮ В ЖУРНАЛ

1. Требования к рукописям, направляемым в журнал

Текст должен быть набран в редакторе Microsoft Word, шрифт Times New Roman, размер 12, интервал одинарный, все поля 2 см, абзацный отступ 1 см. Все страницы и строки должны быть пронумерованы и иметь сквозную нумерацию. Выравнивание – по ширине (с автоматической расстановкой переносов).

Объем статей должен составлять 10-15 печатных страниц для оригинальных статей, 15-25 печатных страниц для обзоров, до 5 печатных страниц для кратких сообщений.

Авторы также должны представить каждое изображение в отдельном файле в оригинальном размере (не менее 300 dpi).

2. Язык статьи

К публикации в журнале принимаются рукописи из любых стран на казахском, русском и/или английском языках. Метаданные статьи (название статьи, Ф.И.О. авторов, официальное название учреждений авторов, адреса, резюме статьи, ключевые слова, информация для контакта с ответственным автором) должны быть представлены на трех языках.

Метаданные статьи на другом языке (если статья написана на казахском, то на русском языке или же наоборот) и на английском языке приводят в конце статьи после списка использованной литературы.

Для статей на казахском и русском языках пристатейный список литературы (References) должен быть дополнительно представлен в транслитерированном виде – см. пункт 4).

В случае, если авторы не предоставили метаданные статьи на языках, отличающихся от языка написания статьи или перевод некачественный, то редакция прибегает к услугам переводчика самостоятельно (право выбора переводчика остается за редакцией).

3. Титульный лист (метаданные статьи).

Титульный лист должен включать следующую информацию:

1) код МРНТИ (Международный рубрикатор научно-технической информации; определяется по ссылке <http://grnti.ru/>);

2) название статьи (лаконично и информативно. Заголовки часто используются в информационно-поисковых системах. По возможности избегайте сокращений и формул);

3) инициалы и фамилии авторов (пожалуйста, четко фамилии (имена) каждого автора и проверьте правильность написания всех имен);

4) организация и ее местонахождение для каждого автора (все аффилиации нумеруются надстрочной арабскими цифрами сразу после имени автора и перед соответствующим адресом; укажите адрес каждой организации, включая название населенного пункта и страны), и, если возможно, адрес электронной почты каждого автора. Если все авторы статьи работают в одном учреждении, указывать место работы каждого автора отдельно не нужно, достаточно указать учреждение один раз. Если у автора несколько мест работы, каждое обозначается отдельным цифровым индексом;

5) контактная информация (адрес электронной почты) автора для корреспонденции: (поставьте знак «*» сразу после индекса аффилиации автора для корреспонденции и перед контактной информацией). Если авторов для корреспонденции несколько, укажите инициалы рядом с каждым адресом;

6) при наличии указать для авторов ID номера ORCID с использованием гиперссылки в значке  ;

7) аннотация (один абзац не более 300 слов, при этом не менее 150 слов). В аннотации должны быть кратко изложены цель исследования, основные результаты и основные выводы. Аннотация часто представляется отдельно от статьи. В связи с этим следует избегать ссылок, нестандартных или необычных сокращений, но, если они необходимы, они должны быть определены при их первом упоминании в самом реферате. Аннотация должна быть объективным изложением статьи, не должна содержать результатов, не представленных и не обоснованных в основном тексте, и не должна преувеличивать основные выводы;

8) ключевые слова (5-10 слов или словосочетаний, должны отражать основное содержание статьи; определить предметную область исследования. Каждое ключевое слово отделяется точкой с запятой).

4. План построения оригинальных статей

Структура оригинальных статей должна соответствовать формату IMRAD (Introduction, Methods, Results, Discussion, Conclusion) и содержать разделы ВВЕДЕНИЕ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ, РЕЗУЛЬТАТЫ, ОБСУЖДЕНИЕ, ЗАКЛЮЧЕНИЕ. В конце статьи размещают информацию о финансовой поддержке работы, гранты, благодарности; указание на конфликт интересов; список цитированной литературы. Оригинальная статья оформляется в соответствии ШАБЛОНА, предложенного редколлегией журнала journal.biosafety.kz.

Во введении следует изложить текущее состояние области исследований и процитировать основные публикации, обосновать актуальность и значимость проводимых исследований. Необходимо кратко указать цель работы. Насколько это возможно, сделайте введение понятным для ученых, не занимающихся вашей конкретной областью исследований. Ссылки должны быть пронумерованы в порядке их появления и обозначены цифрой или цифрами в квадратных скобках, например, [1] или [2,3], или [4–6]. Дополнительные сведения о ссылках см. в конце документа.

Материалы и методы должны быть описаны достаточно подробно, чтобы другие могли воспроизвести и использовать опубликованные результаты. Новые методы и протоколы должны быть описаны подробно, в то время как хорошо зарекомендовавшие себя методы могут быть кратко описаны и надлежащим образом процитированы.

Исследования с участием животных или людей, а также другие исследования, требующие этического одобрения, должны указывать орган, предоставивший одобрение, и соответствующий кодекс этического одобрения.

Раздел «Результаты» должен содержать точное описание экспериментальных результатов, их интерпретацию, а также экспериментальные выводы, которые можно сделать. При необходимости этот раздел может быть разделен на подразделы.

В разделе «Обсуждение» авторы должны обсудить полученные результаты и то, как их можно интерпретировать с точки зрения предыдущих исследований и рабочих гипотез. В обсуждении можно привести возможные объяснения сходства и противоречий с другими аналогичными исследованиями. В максимально широком контексте следует обсудить выводы и их значение. Также в данном разделе могут быть выделены будущие направления исследований.

Раздел «Заключение» включает обобщение и подведение итогов работы на текущем этапе. Выводы должны быть точными и использоваться для обобщения результатов исследований в конкретных научных областях с описанием предложений или возможностей дальнейшей работы.

Финансирование: Укажите источник финансирования исследований (название финансирующей организации, номер гранта). Внимательно проверьте правильность приведенных данных и используйте стандартное написание названий финансирующих организаций.

Благодарности: В этом разделе вы можете отметить любую оказанную поддержку. Это может включать административную и техническую поддержку или предоставление материалов для экспериментов.

Конфликт интересов: Все авторы должны раскрывать информацию о любых финансовых и личных отношениях с другими людьми или организациями, которые могут ненадлежащим образом повлиять (предвзято) на их работу. Примеры потенциальных конфликтов интересов включают занятость, консультации, владение акциями, гонорары, платные экспертные заключения, патентные заявки/регистрации, а также гранты или другое финансирование. Если нет никаких конфликтов к опубликованию материалов в статье, указать, что авторы не имеют конфликта интересов.

В разделе «Литература» следует привести список цитированной литературы, оформленный согласно ГОСТ 7.1-2003 «Библиографическая запись. Библиографическое описание. Общие требования и правила составления» (требование к изданиям, входящих в перечень КОКСОН). Список литературы должен быть пронумерован в порядке упоминания в тексте (включая цитаты в таблицах и легендах). Включите цифровой идентификатор объекта (DOI) для всех ссылок, где они доступны. В тексте ссылки должны быть заключены в квадратные скобки [...] и поставлены перед знаками препинания; например [1], [1-3] или [1, 3].

Примеры оформления ссылок:

Статья в периодическом издании (журнале)

Aspden K., Passmore J.A., Tiedt F., Williamson A.L. Evaluation of lumpy skin disease virus, as capripoxvirus, as a replication-deficient vaccine vector // J. Gen. Virol. – 2003. – Vol. 84 (Pt 8). – P. 1985-1996. doi: ... (при наличии)

Гуненков В.В., Черняк В.П., Кузнецов Г.Д. Сухая живая вакцина против оспы овец из штамма С113/86 // Ветеринария. – 1993. – №11/12. – С. 23-24.

Книги

Зайцев В.Л. Морфогенез вируса оспы овец в культуре клеток / В.Л. Зайцев, Н.Т. Сандыбаев, К.Т. Султанкулова, В.Ю. Белоусов, О.В. Червякова, В.М. Строчков // Вирус оспы овец: молекулярно-биологические свойства и структура генома. – Алматы, 2011. – С.73-84. ISBN 978-601-278-599-9

Материалы конференций

Султанкулова К.Т. Токсико-биологическая оценка гриба *Histoplasma farciminosum* – возбудителя эпизоотического лимфангоита лошадей // Ветеринарные и зоотехнические вопросы коневодства: первая науч.-практ. конф. – Алматы, 2003. – С. 26-29

Сансызбай А.Р. Эпизоотическая ситуация лимфангита лошадей, вызванного *Histoplasma farciminosum*, в коневодческих хозяйствах Республики Казахстан // Современное состояние

и актуальные проблемы развития ветеринарной науки и практики: науч.-практ. конф. – Алматы, 2005. – С. 234-237.

Интернет-источники

Вспышка оспы овец на территории Российской Федерации в Ярославской области [Электрон.ресурс]. – URL: <http://www.fsvps.ru/fsvps/news/18142.html> (дата обращения 3 сентября 2016 г).

Далее приводится транслитерированный список использованных источников в разделе REFERENCES. При этом англоязычные источники дублируются из раздела ЛИТЕРАТУРА, казахскоязычные и русскоязычные ссылки должны быть приведены к латинскому алфавиту (латинице) и английскому переводу. Ссылка должна дополнительно содержать DOI (идентификатор цифрового объекта), если таковой имеется. Транслитерация осуществляется с использованием онлайн-платформы <http://translit-online.ru/>. Эта онлайн-платформа не транслитерирует отдельные буквы казахского алфавита. Авторы должны самостоятельно вносить исправления после транслитерации казахского текста.

Транслитерированный список литературы должен выглядеть в следующем виде для источников на кириллице: автор(-ы) (транслитерация) → (год в круглых скобках) → название статьи в транслитерированном варианте [перевод названия статьи на английский язык в квадратных скобках], название русскоязычного источника (транслитерация, либо английское название – если есть), выходные данные с обозначениями на английском языке.

Например: Gokhberg L., Kuznetsova T. (2011) Strategiya-2020: novye kontury rossiiskoi innovatsionnoi politiki [Strategy 2020: New Outlines of Innovation Policy]. *Foresight-Russia*, vol. 5, no 4, pp. 8–30.

5. Оформление обзоров и кратких сообщений

Обзорные статьи должны включать в себя введение, разделы обзора литературы и заключение. Файл шаблона также можно использовать для подготовки первой и заключительной частей обзорной рукописи. Основная часть может содержать разделы и подразделы. Обзоры публикуются по заказу редакции или по инициативе автора.

Краткое сообщение представляет краткий формат информации логически завершенного научного исследования в объеме до 5 страниц, включающее не более 2 рисунков/таблиц/графиков и до 10 ссылок.

6. Особенности оформления таблиц, рисунков

Таблицы должны быть созданы в формате таблицы Microsoft Word. Таблицы должны быть пронумерованы и в тексте должны быть ссылки на каждую таблицу. Заголовок таблицы расположен по центру над таблицей, пояснительные сноски (обозначенные строчными надстрочными буквами) расположены под таблицей. Таблицы не должны дублировать информацию, представленную в тексте.

Все рисунки (фотографии, диаграммы, графики и схемы) должны быть пронумерованы арабскими цифрами (1, 2, ...). Надписи и символы должны быть четко определены либо в подписи, либо в легенде, являющейся частью рисунка.

КАК ПОДАТЬ СТАТЬЮ НА РАССМОТРЕНИЕ

Рукопись статьи направляется в редакцию через форму на сайте журнала journal.biosafety.kz

Загружаемый в систему файл со статьей должен быть представлен в формате Microsoft Word (иметь расширение *.doc или *.docx). Сопроводительное письмо с оригинальными подписями должно быть представлено в формате PDF. Сопроводительное письмо должно

быть кратким с указанием соответствия рукописи тематике журнала. Сопроводительное письмо должно содержать утверждения, что ни рукопись, ни какие-либо части ее содержания в настоящее время не находятся на рассмотрении или опубликованы в другом журнале. Все авторы должны одобрить рукопись и согласиться с ее подачей в журнал.

Перед отправкой рукописи убедитесь, что:

- Рукопись проверена на орфографию и грамматику
- Все ссылки, упомянутые в списке литературы, цитируются в тексте, и наоборот
- Получено разрешение на использование материалов, защищенных авторским правом, из других источников (включая Интернет)
- Правила журнала, подробно описанные в этом руководстве, были изучены
- Убедитесь, что все ссылки на рисунки и таблицы в тексте соответствуют предоставленным файлам

7. К сведению авторов

К статье прилагаются:

- сопроводительное письмо (для сторонних организаций).
- сведения об авторах: фамилия, имя и отчество (полностью), ученая степень, должность, место работы, контактные телефоны, адрес для переписки (e-mail).

Решение о публикации принимается редакционной коллегией журнала после рецензирования, учитывая научную значимость и актуальность представленных материалов.

Вид рецензирования – двойное «слепое» рецензирование, то есть и автор, и рецензент остаются анонимными. Рукопись направляется на отзыв члену редколлегии и рецензенту; в спорных случаях по усмотрению редколлегии привлекаются дополнительные рецензенты; на основании экспертных заключений редколлегия определяет дальнейшую судьбу рукописи: принятие к публикации в представленном виде, необходимость доработки или отклонение. В случае необходимости рукопись направляется авторам на доработку по замечаниям рецензентов и редакторов, после чего она повторно рецензируется, и редколлегия вновь решает вопрос о приемлемости рукописи для публикации. Переработанная рукопись должна быть возвращена в редакцию в течение месяца после получения авторами отзывов; в противном случае рукопись рассматривается как вновь поступившая. Рукопись, получившая недостаточно высокие оценки при рецензировании, отклоняется как не соответствующая уровню или профилю публикаций журнала.

Авторы несут ответственность за достоверность и значимость научных результатов, а также актуальность научного содержания работ.

Направление статьи в редакцию означает, что авторы не передали аналогичный материал (в оригинале или в переводе на другие языки или с других языков) в другой журнал (ы), что этот материал не был ранее опубликован и не будет направлен в печать в другое издание или не принят в печать в другом журнале. Если в ходе работы над рукописью выяснится, что аналогичный материал (возможно, под другим названием и с другим порядком авторов) направлен в другой журнал, статья немедленно возвращается авторам, о происшедшем сообщается в журнал, принявший к рассмотрению этот материал, с рекомендацией отклонить статью за нарушение авторских прав редакции и издательства.

Наш адрес:

080409, Жамбылская область, Кордайский район, пгт. Гвардейский, ул. Момышулы 15
РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» МЗ РК
Учебный научно-образовательный центр (УНОЦ), тел. (726-36) 7-22-28.

E-mail: unots@biosafety.kz

Публикация в журнале для авторов **бесплатна**.

МРНТИ (<https://grnti.ru/>)

DOI.....

НАЗВАНИЕ

Имя Фамилия¹ , Имя Фамилия² , Имя Фамилия² ,*

¹ Место работы 1; e-mail автора

² Место работы 2; e-mail автора

* Автор корреспондент: e-mail (если авторов-корреспондентов несколько, добавьте инициалы авторов)

Аннотация: один абзац не более 300 слов, при этом не менее 150 слов. В аннотации должны быть кратко изложены цель исследования, основные результаты и основные выводы. Аннотация часто представляется отдельно от статьи. В связи с этим следует избегать ссылок, нестандартных или необычных сокращений, но, если они необходимы, они должны быть определены при их первом упоминании в самом реферате. Аннотация должна быть объективным изложением статьи, не должна содержать результатов, не представленных и не обоснованных в основном тексте, и не должна преувеличивать основные выводы.

Ключевые слова: ключевое слово 1; ключевое слово 2; ключевое слово 3 (5-10 слов или словосочетаний, должны отражать основное содержание статьи; определить предметную область исследования. Каждое ключевое слово отделяется точкой с запятой).

Как использовать данный шаблон

В шаблоне подробно описаны разделы, которые должны быть использованы рукописи. Обратите внимание, что у каждого раздела есть соответствующий стиль, который можно найти в меню «Стили» Word. Разделы, которые не являются обязательными, перечислены как таковые. Названия разделов даны для оригинальных статей. Обзорные статьи и другие типы статей имеют более гибкую структуру.

Удалите этот абзац и начните с раздела «Введение». По всем вопросам обращайтесь в редакцию журнала по адресу unots@biosafety.kz.

Введение

Во введении следует изложить текущее состояние области исследований и процитировать основные публикации, обосновать актуальность и значимость проводимых исследований. Необходимо кратко указать цель работы. Насколько это возможно, сделайте введение понятным для ученых, не занимающихся вашей конкретной областью исследований. Ссылки должны быть пронумерованы в порядке их появления и обозначены цифрой или цифрами в квадратных скобках, например, [1] или [2, 3], или [4–6].

Материалы и методы

Данный раздел должен быть описан достаточно подробно, чтобы другие могли воспроизвести и использовать опубликованные результаты. Новые методы и протоколы должны быть описаны подробно, в то время как хорошо зарекомендовавшие себя методы могут быть кратко описаны и надлежащим образом процитированы, например, [1] или [2, 3], или [4–6].

Исследования с участием животных или людей, а также другие исследования, требующие этического одобрения, должны указывать орган, предоставивший одобрение, и соответствующий кодекс этического одобрения.

При необходимости этот раздел может быть разделен на подразделы.

Подраздел

Результаты

Данный раздел должен содержать краткое и точное описание экспериментальных результатов, их интерпретацию, а также экспериментальные выводы, которые можно сделать. При необходимости этот раздел может быть разделен на подразделы.

Подраздел

Таблицы и рисунки

Таблицы и рисунки должны быть пронумерованы и в тексте на них должны быть ссылки. Например, Таблица 1, Рисунок 1 и т.п.

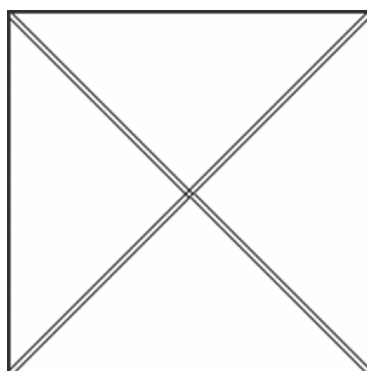
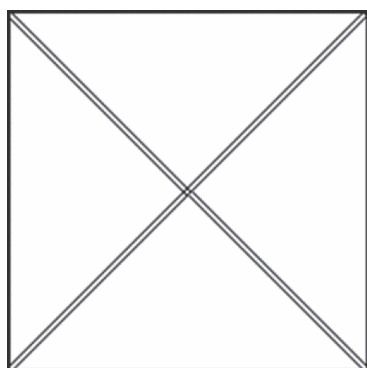


Рисунок 1 – Это рисунок. Схемы имеют такое же форматирование

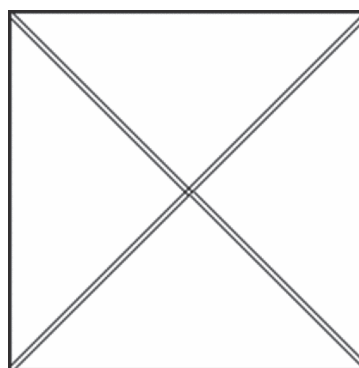
Таблица 1 – Это таблица. Таблицы следует размещать в основном тексте рядом с местом первого упоминания

Заголовок 1	Заголовок 2	Заголовок 3
вводные 1	данные	данные
вводные 2	данные	данные ¹
¹ Примечания к данным таблицы разместить под таблицей.		

Продолжить текст раздела (Рисунок 2).



(а)



(б)

Если имеется несколько панелей, они должны быть перечислены следующим образом:

- (а) описание того, что содержится в первой панели;
- (б) описание того, что содержится во второй панели

Рисунок 2 – Это рисунок. Рисунки следует размещать в основном тексте рядом с местом первого упоминания

Обсуждение

Авторы должны обсудить полученные результаты и то, как их можно интерпретировать с точки зрения предыдущих исследований и рабочих гипотез. В обсуждении можно привести возможные объяснения сходства и противоречий с другими аналогичными исследованиями. В максимально широком контексте следует обсудить выводы и их значение. Также в данном разделе могут быть выделены будущие направления исследований.

Заключение

Данный раздел включает обобщение и подведение итогов работы на текущем этапе. Выводы должны быть точными и использоваться для обобщения результатов исследований в конкретных научных областях с описанием предложений или возможностей дальнейшей работы.

Финансирование: Укажите источник финансирования исследований (название финансирующей организации, номер гранта). Внимательно проверьте правильность приведенных данных и используйте стандартное написание названий финансирующих организаций.

Благодарности: В этом разделе вы можете отметить любую оказанную поддержку. Это может включать административную и техническую поддержку или предоставление материалов для экспериментов.

Конфликт интересов: Все авторы должны раскрывать информацию о любых финансовых и личных отношениях с другими людьми или организациями, которые могут ненадлежащим образом повлиять (предвзято) на их работу. Примеры потенциальных конфликтов интересов включают занятость, консультации, владение акциями, гонорары, платные экспертные заключения, патентные заявки/регистрации, а также гранты или другое финансирование. Если нет никаких конфликтов к опубликованию материалов в статье, указать, что авторы не имеют конфликта интересов.

Литература

В данном разделе следует привести список цитированной литературы оформленный согласно ГОСТ 7.1-2003 «Библиографическая запись. Библиографическое описание. Общие требования и правила составления» (требование к изданиям, входящих в перечень КОКСОН). Список литературы должен быть пронумерован в порядке упоминания в тексте (включая цитаты в таблицах и легендах). Включите цифровой идентификатор объекта (DOI) для всех ссылок, где они доступны. В тексте ссылки должны быть заключены в квадратные скобки [...] и поставлены перед знаками препинания; например [1], [1–3] или [1,3].

- 1 Aspden K., Passmore J.A., Tiedt F., Williamson A.L. Evaluation of lumpy skin disease virus, a capripoxvirus, as a replication-deficient vaccine vector // J. Gen. Virol. – 2003. – Vol. 84 (Pt 8). – P. 1985-1996. doi:... (при наличии)
- 2 Гуненков В.В., Черняк В.П., Кузнецов Г.Д. Сухая живая вакцина против оспы овец из штамма C113/86 // Ветеринария. – 1993. – № 11/12. – С. 23-24.
- 3 Зайцев В.Л. Морфогенез вируса оспы овец в культуре клеток /В.Л. Зайцев, Н.Т. Сандыбаев, К.Т. Султанкулова, В.Ю. Белоусов, О.В. Червякова, В.М. Строчков // Вирус оспы овец: молекулярно-биологические свойства и структура генома. – Алматы, 2011. – С.73-84. ISBN 978-601-278-599-9
- 4 Султанкулова К.Т. Токсико-биологическая оценка гриба *Histoplasma farciminosum* – возбудителя эпизоотического лимфангоита лошадей // Ветеринарные и зоотехнические вопросы козоводства: первая науч.-практ. конф. - Алматы, 2003. – С. 26-29

- 5 Сансызбай А.Р. Эпизоотическая ситуация лимфангита лошадей, вызванного *Histoplasma farciminosum*, в коневодческих хозяйствах Республики Казахстан // Современное состояние и актуальные проблемы развития ветеринарной науки и практики: науч.-практ. конф. – Алматы, 2005. – С. 234-237.
- 6 Вспышка оспы овец на территории Российской Федерации в Ярославской области [Электрон. ресурс]. – URL: <http://www.fsvps.ru/fsvps/news/18142.html> (дата обращения 3 сентября 2016 г).

References

Далее приводится транслитерированный список использованных источников в разделе REFERENCES. При этом англоязычные источники дублируются из раздела ЛИТЕРАТУРА, казахскоязычные и русскоязычные ссылки должны быть приведены к латинскому алфавиту (латинице) и английскому переводу. Ссылка должна дополнительно содержать DOI (идентификатор цифрового объекта), если таковой имеется. Транслитерация осуществляется с использованием онлайн-платформы <http://translit-online.ru/>. Эта онлайн-платформа не транслитерирует отдельные буквы казахского алфавита. Авторы должны самостоятельно вносить исправления после транслитерации казахского текста.

Транслитерированный список литературы должен выглядеть в следующем виде для источников на кириллице: автор(-ы) (транслитерация) → (год в круглых скобках) → название статьи в транслитерированном варианте [перевод названия статьи на английский язык в квадратных скобках], название русскоязычного источника (транслитерация, либо английское название – если есть), выходные данные с обозначениями на английском языке.

Например:

- 1 Gokhberg L., Kuznetsova T. (2011) Strategiya-2020: novye kontury rossiiskoi innovatsionnoi politiki [Strategy 2020: New Outlines of Innovation Policy]. Foresight-Russia, vol. 5, no 4, pp. 8–30.

МАҚАЛА ТАҚЫРЫБЫ

Аты Тегі¹ , Аты Тегі² , Аты Тегі² , *

¹ Жұмыс орны 1; автор e-mail

² Жұмыс орны 2; автор e-mail

* Автор-корреспондент: e-mail (егер бірнеше автор-корреспондент болса, авторлардың инициалдарын қосыңыз)

Аннотация: бір абзац 300 сөзден аспайды, 150 сөзден кем емес. Аннотацияда зерттеу мақсаты, негізгі нәтижелер мен негізгі қорытындылар қысқаша көрсетілуі керек. Аннотация көбінесе мақаладан бөлек беріледі. Осыған байланысты сілтемелерден, стандартты емес немесе әдеттен тыс аббревиатуралардан аулақ болу керек, бірақ қажет болған жағдайда олар рефераттың өзінде бірінші рет айтылған кезде анықталуы керек. Аннотация мақаланың объективті баяндалуы болуы керек, негізгі мәтінде көрсетілмеген немесе дәлелденбеген нәтижелерді қамтымауы керек және негізгі қорытындыларды асыра көрсетпеуі керек.

Түйін сөздер: түйінсөз 1; түйінсөз 2; түйінсөз 3 (5-10 сөз немесе сөз тіркестері мақаланың негізгі мазмұнын көрсетуі керек; зерттеудің пәндік саласын анықтау. Әрбір түйінді сөз нүктелі үтірмен бөлінеді)

TITLE

Firstname Lastname¹ , Firstname Lastname² , Firstname Lastname² , *

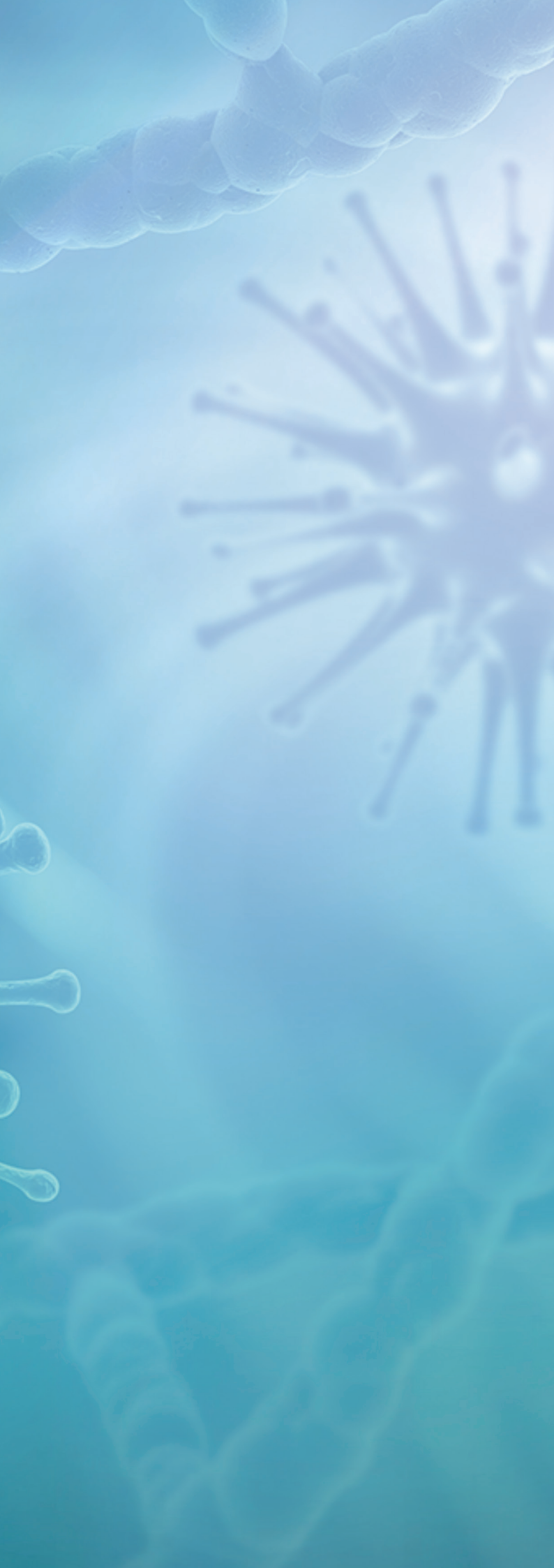
¹ Affiliation 1; author e-mail

² Affiliation 2; author e-mail

*Author correspondent: e-mail (if there are more than one correspondent authors, add the initials of the authors)

Abstract: one paragraph no more than 300 words, with no less than 150 words. The abstract should briefly describe the purpose of the study, the main results and main conclusions. The abstract is often presented separately from the article. In this regard, references, non-standard or unusual abbreviations should be avoided, but, if necessary, they should be identified at their first mention in the abstract itself. The abstract should be an objective presentation of the article, should not contain results that are not presented or substantiated in the main text, and should not exaggerate the main conclusions.

Keywords: keyword 1; keyword 2; keyword 3 (5-10 words or phrases should reflect the main content of the article; define the subject area of the study. Each keyword is separated by a semicolon).



Подписано в печать 30.12.2022 г.
Формат 60х84 1/8. Усл. п.л. 5,25.
Тираж 200 экз. Заказ № 45.
Отпечатано в ТОО «Шаңырақ-Медиа».
г. Астана, ул. Кокарал, 2/1, тел. 87077770066.
www.smedia.kz