eISSN 2957-5702

ҒЫЛЫМИ ЖУРНАЛ

БИОҚАУІПСІЗДІК ЖӘНЕ БИОТЕХНОЛОГИЯ

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

БИОБЕЗОПАСНОСТЬ И БИОТЕХНОЛОГИЯ



THE SCIENTIFIC JOURNAL

BIOSAFETY AND BIOTECHNOLOGY

www.biosafety.kz

2025 • 24



eISSN 2957-5702

2020 ЖЫЛДАН ШЫҒА БАСТАҒАН • ИЗДАЕТСЯ С 2020 ГОДА • PUBLISHED SINCE 2020

2025 • 24

Редакция алқасы:

Закарья К.Д., б.ғ.д., профессор (бас редактор) (Қазақстан)
Абдураимов Е.О., в.ғ.д., профессор (бас редактордың орынбасары) (Қазақстан)
Faez Awad, PhD (Ливия)
Орынбаев М.Б., в.ғ.к., профессор, академик (Қазақстан)
Айтназаров Р.Б., PhD (Ресей)
Сұлтанқұлова К.Т., б.ғ.к., профессор (Қазақстан)
Кутумбетов Л.Б., в.ғ.д., профессор (Қазақстан)
Ершебулов З.Д., PhD (Қазақстан)
Еспембетов Б.А., в.ғ.к., профессор (Қазақстан)
Жүгүнісов Қ.Д., PhD (Қазақстан)
Нұрғазиев Р.З., в.ғ.д., профессор (Қырғызстан)
Булатов Е.А., б.ғ.к., профессор (Қазақстан)
Risatti G., PhD, профессор (АҚШ)
Қошеметов Ж.Қ., б.ғ.д., профессор (Қазақстан)
Қасенов М.М., в.ғ.к., профессор (Қазақстан)
Скиба Ю.А., б.ғ.к. (Қазақстан)
Жапаркулова К.А., PhD (Қазақстан)
Абеуов Х.Б., в.ғ.к., профессор (Қазақстан)
Gorge O., PhD (Франция)
Червякова О.В., б.ғ.к., профессор (Қазақстан)
Стукова М.А., PhD (Ресей)
Наханов А.Қ., б.ғ.к. профессор (Қазақстан)
Рсалиев А.С., PhD, профессор (Қазақстан)
Туруспеков Е.К., б.ғ.к., профессор (Қазақстан)
Абугалиева С.И., б.ғ.д., профессор (Қазақстан)
Гультяева Е.И., б.ғ.д., доцент (Ресей)

Құрылтайшы: «Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты» ЖШС

Қазақстан Республикасының Ақпарат және қоғамдық даму министрлігінің Ақпарат комитетінде 20.11.2019 ж. **№KZ33V00017380** куәлікпен тіркелген Мерзімділігі: жылына 4 рет.

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: journal@biosafety.kz

© Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты, 2025

Редакционная коллегия:

Закарья К.Д., д.б.н., профессор (главный редактор) (Казахстан)
Абдураимов Е.О., д.в.н., профессор (заместитель главного редактора) (Казахстан)
Faez Awad, PhD (Ливия)
Орынбаев М.Б., к.в.н., профессор, академик (Казахстан)
Айтназаров Р.Б., PhD (Россия)
Султанкулова К.Т., к.б.н., профессор (Казахстан)
Кутумбетов Л.Б., д.в.н. профессор (Казахстан)
Ершебулов З.Д.,PhD (Казахстан)
Еспембетов Б.А., к.в.н., профессор (Казахстан)
Жугунисов К.Д., PhD (Казахстан)
Нургазиев Р.З., д.в.н., профессор (Кыргызстан)
Булатов Е.А., к.б.н**.,** профессор (Казахстан)
Risatti G., PhD, профессор (США)
Кошеметов Ж.К., д.б.н., профессор (Казахстан)
Касенов М.М., к.в.н., профессор (Казахстан)
Скиба Ю.А., к.б.н**.** (Казахстан)
Жапаркулова К.А., PhD (Казахстан)
Абеуов Х.Б., к.в.н., профессор (Казахстан)
Gorge O., PhD (Франция)
Червякова О.В., к.б.н., профессор Казахстан)
Стукова М.А., PhD (Россия)
Наханов А.К., к.б.н., профессор (Казахстан)
Рсалиев А.С., PhD, профессор (Казахстан)
Туруспеков Е.К., к.б.н., профессор (Казахстан)
Абугалиева С.И., д.б.н., профессор (Казахстан)
Гультяева Е.И., д.б.н., доцент (Россия)

Учредитель: ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности»

Зарегистрирован в Комитете информации Министерства информации и общественного развития Республики Казахстан свидетельством **№KZ33V00017380** от 20.11.2019 г.
Периодичность: 4 раза в год.

Адрес редакции 080409, Жамбылская область, Кордайский район, пгт. Гвардейский, Ул. Б. Момышулы, 15. тел. (726-36) 7-22-28 *www: biosafety.kz*, E-mail: journal@biosafety.kz

© Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности, 2025

Editorial board:

Zakarya K.D., D.B.Sci., Prof, (editor-in-chief) (Kazakhstan)
Abduraimov Ye.O., D.V.Sci., Prof (deputy chief editor) (Kazakhstan)
Faez Awad, PhD, (Libya)
Orynbayev M.B., PhD, Prof, Academician (Kazakhstan)
Aitnazarov R.B., PhD (Russia)
Sultankulova K.T., PhD, Prof (Kazakhstan)
Kutumbetov L.B., D.V.Sci., Prof (Kazakhstan)
Yershebulov Z.D., PhD (Kazakhstan
Yespembetov B.A., PhD , Prof (Kazakhstan)
Zhugunissov K.D., PhD (Kazakhstan)
Nurgaziev R.Z., D.V.Sci., Prof (Kyrgyzstan)
Bulatov Y. A., PhD, Prof (Kazakhstan)
Risatti G., PhD, Prof (USA)
Koshemetov Zh.K., D.B.Sci., Prof (Kazakhstan)
Kassenov M.M., PhD , Prof (Kazakhstan)
Skiba Y.A., PhD ,(Kazakhstan)
Zhaparkulova K.A., PhD ,(Kazakhstan)
Abeuov Kh.B., PhD , Prof (Kazakhstan)
Gorge O., PhD (France)
Chervyakova O.V., PhD, Prof (Kazakhstan)
Stukova M.A., PhD (Russia)
Nakhanov A.K., PhD, Prof (Kazakhstan)
Rsaliev A.S., PhD, Prof (Kazakhstan)
Turuspekov Ye.K., PhD, Prof (Kazakhstan)
Abugalieva S.I., D.B.Sci., Prof (Kazakhstan)
Gultyaeva E.I., D.B.Sci., As.Prof (Russia)

Founder: LLP «Research Institute for Biological Safety Problems» Registered with the Information Committee of the Ministry of Information and Public Development of the RK with the Certificate **№KZ33V00017380** dated 20.11.2019

Frequency: 4 times a year.

Address of the editorial office 080409, Zhambyl region, Kordai district, Gvardeysky. 15 B. Momyshuly str., Tel. (726-36) 7-22-28 *www: biosafety.kz,*
E-mail: journal@biosafety.kz

© Research institute of biosafety problems, 2025

МАЗМҰНЫ

Майлыбаева А.М., Акмырзаев Н. Ж., Сагимбаева А.М., Мырзахметов Е.Т., Рыскельдинова Ш.Ж., Копеев С.К., Яманова Е.С., Сидихов Р.Б., Бурашев Е.Д., Асанжанова Н.Н. 4
ҚҰС ТҰМАУЫНЫҢ A/CYGNUS CYGNUS/KARAKOL LAKE/01/2024 ИЗОЛЯТЫНЫҢ ПАТОГЕНДІГІНІҢ ИНТРАВЕНОЗДЫҚ ИНДЕКСІН ЗЕРТТЕУ

Бурашев Е.Д., Кожабергенов Н.С., Әубәкір Н.А., Омарова З.Д.,Тулендибаев А.Б., Ермекбай Т.Т., Аргимбаева Т.У., Д.Ә. Әлібекова Д.Ә. 11
ҚҰС ТҰМАУЫ МЕН НЬЮКАСЛ АУРУЫН БАЛАУҒА АРНАЛҒА МУЛЬТИПЛЕКСТІ REAL-TIME ПТР ТЕСТ-ЖҮЙЕСІН ӘЗІРЛЕУ БАРЫСЫНДА ПРАЙМЕРЛЕР МЕН ЗОНДТАРДЫҢ ЕРЕКШЕЛІГІН АНЫҚТАУ

Еспембетов Б.А., Алпысбаева С.Е., Сармыкова М.К., Керимбаев А.А., Әбдімұхтар А.Р., Серікбай Е.Б., Шораева К.А., Асанжанова Н.Н., Сырым Н.Н., Шестаков А.Г., Толеухан А.Т., Анарбекова А.М., Мауленбаева М.М., Ержігіт Б.Б., Абдықалық А.Ә. 23
ВАКЦИНАЛЫҚ ПРЕПАРАТТЫҢ ҚОСАЛҚЫ КОМПОНЕНТТЕРІНІҢ ЗЕРТХАНАЛЫҚ АҚ ТЫШҚАНДАРДАҒЫ ТӨЗІМДІЛІГІ

Есимбекова Н.Б., Шериаздан Г.Қ., Кераматдинова А.М., Дуйсенбаев Б.Д., Мырзахан С.М., Кубыр С.С., Курмантай А.М., Ершебулов З.Д. 29
СТЕРИЛЬДІ ПРЕПАРАТТАРДЫ ӨНДІРУ КЕЗІНДЕГІ ТАЗА ҮЙ-ЖАЙЛАРДЫҢ МИКРОБИОЛОГИЯЛЫҚ МОНИТОРИНГІ

Ильгекбаева Г.Д., Отарбаев Б.К., Курман С., Занилабдин М.З., Жолдас У., Кадеев А.М., ВалиеваБ.А. 34
RHODOCOCCUS EQUI ШТАММЫНЫҢ PVAPA ПЛАЗМИДІН ЕШКІГЕ ЖҰҚТЫРҒАННАН КЕЙІНГІ ГЕМАТОЛОГИЯЛЫҚ КӨРСЕТКІШТЕР

Молдагулова С.У., Ұланқызы А., Джекебеков К.К., Наханова Г.Дж., Жақыпбек А.С., Өмуртай Ә.Д., Байсейт Т.И., Сырым Н.С., Еспембетов Б.А., Шораева К.А. 44
ESKAPE ПАТОГЕНДЕРІНЕ ҚАРСЫ ПРЕПАРАТТАРДЫҢ ЭКСПЕРИМЕНТТІК СЕРИАЛАРЫНЫҢ САПАСЫН БАҚЫЛАУ

АВТОРЛАР ТУРАЛЫ МӘЛІМЕТ 55

ЖУРНАЛДА ЖАРИЯЛАУ ҮШІН МАҚАЛАЛАРҒА ҚОЙЫЛАТЫН ТАЛАПТАР 58

СОДЕРЖАНИЕ

Майлыбаева А.М., Акмырзаев Н. Ж., Сагимбаева А.М., Мырзахметов Е.Т., Рыскельдинова Ш.Ж., Копеев С.К., Яманова Е.С., Сидихов Р.Б., Бурашев Е.Д., Асанжанова Н.Н. 4
ИЗУЧЕНИЕ ИНТРАВЕНОЗНОГО ИНДЕКСА ПАТОГЕННОСТИ ИЗОЛЯТА A/CYGNUS CYGNUS/KARAKOL LAKE/01/2024 ГРИППА ПТИЦ

Бурашев Е.Д., Кожабергенов Н.С., Әубәкір Н.А., Омарова З.Д., Тулендибаев А.Б., Ермекбай Т.Т., Аргимбаева Т.У., Д.Ә. Әлібекова Д.Ә. 11
ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ ПРАЙМЕРОВ И ЗОНДОВ ПРИ РАЗРАБОТКЕ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ РЕАЛ-ТАЙМ ПЦР ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ГРИППА ПТИЦ И БОЛЕЗНИ НЬЮКАСЛА.

Еспембетов Б.А., Алпысбаева С.Е., Сармыкова М.К., Керимбаев А.А., Әбдімұхтар А.Р., Серікбай Е.Б., Шораева К.А., Асанжанова Н.Н., Сырым Н.Н., Шестаков А.Г., Толеухан А.Т., Анарбекова А.М., Мауленбаева М.М., Ержігіт Б.Б., Абдықалық А.Ә. 23
ПЕРЕНОСИМОСТЬ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ ВАКЦИННОГО ПРЕПАРАТА У ЛАБОРАТОРНЫХ БЕЛЫХ БЕСПОРОДНЫХ МЫШЕЙ

Есимбекова Н.Б., Шериаздан Г.Қ., Кераматдинова А.М., Дуйсенбаев Б.Д., Мырзахан С.М.,ьКубыр С.С., Курмантай А.М., Ершебулов З.Д. 29
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ЧИСТЫХ ПОМЕЩЕНИЙ ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ СТЕРИЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Ильгекбаева Г.Д., Отарбаев Б.К., Курман С., Занилабдин М.З., Жолдас У., Кадеев А.М., ВалиеваБ.А. 34
ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПОСЛЕ ИНФИЦИРОВАНИЯ КОЗ ПЛАЗМИДОЙ PVAPA ШТАММА RHODOCOCCUS EQUI

Молдагулова С.У., Ұланқызы А., Джекебеков К.К., Наханова Г.Дж., Жақыпбек А.С., Өмуртай Ә.Д., Байсейт Т.И., Сырым Н.С., Еспембетов Б.А., Шораева К.А. 44
КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ СЕРИЙ ПРЕПАРАТА ПРОТИВ ПАТОГЕНОВ ESKAPE

ДАННЫЕ ОБ АВТОРАХ 55

ТРЕБОВАНИЯ К НАУЧНЫМ СТАТЬЯМ ДЛЯ ПУБЛИКАЦИИ В ЖУРНАЛЕ 58

CONTENTS

Mailybayeva A.M., Akmyrzayev N.Zh., Sagimbayeva A.M., Myrzakhmetov Y.T., Ryskeldinova Sh.Zh., Kopeyev S. K., Yamanova Y.S., Sidikhov R.B., Burashev Y.D., Asanzhanova N.N. 4
STUDY OF THE INTRAVENOUS PATHOGENICITY INDEX OF THE AVIAN INFLUENZA VIRUS ISOLATE A/CYGNUS CYGNUS/KARAKOL LAKE/01/2024

Burashev Ye.D., Kozhabergenov N.S., Aubakir N.A., Omarova Z.D., Tulendibayev A.B., Yermekbai T., Argimbaeva T.U., Alibekova D.A. 11
DETERMINATION OF PRIMER AND PROBE SPECIFICITY IN THE DEVELOPMENT OF A MULTIPLEX REAL-TIME PCR TEST SYSTEM FOR THE DIAGNOSIS OF AVIAN INFLUENZA AND NEWCASTLE DISEASE

Yespembetov B., Alpysbayeva S. Sarmykova M., Kerimbayev A., Abdimukhtar A., Serikbay Ye., Shorayeva K., Asanzhanova N., Syrym N., Shestakov A., Toleukhan A., Anarbekova A., Maulenbayeva M., Yerzhigit B., Abdykalyk A. 23
TOLERABILITY OF EXCIPIENTS OF A VACCINE FORMULATION IN OUTBRED WHITE LABORATORY MICE

Yesimbekova N.B., Sheriazdan G.K., Keramatdinova A.M., Duisenbayev B.D., Myrzakhan S.M., Kubyr S.S., Kurmantai A.M., Ershebulov Z.D. 29
MICROBIOLOGICAL MONITORING OF CLEANROOMS IN THE PRODUCTION OF STERILE PRODUCTS

Ilgekbayeva G.D., Otarbayev B.K., Zanilabdin M.Z., Kurman S., Zholdas U., Kadeyev A.M., Valieva B.A. 34
HEMATOLOGICAL PARAMETERS AFTER INFECTION OF GOATS WITH THE RHODOCOCCUS EQUI PVAPA PLASMID

Moldagulova S.U., Ulankyzy A., Jekebekov K.K., Nakhanova G.ZH., Zhakypbek A.S., Omurtay A.D., Baiseit T.I., Syrym N.S., Yespembetov B.A., Shorayeva K.A. 44
QUALITY CONTROL OF EXPERIMENTAL BATCHES OF THE PREPARATION AGAINST ESKAPE PATHOGENS

AUTHORS' INFORMATION 55

AUTHOR INSTRUCTIONS TO THE JOURNAL 58

МРНТИ 68.35.31 DOI: 10.58318/2957-5702-2025-24-4-10
Оригинальная статья

ИЗУЧЕНИЕ ИНТРАВЕНОЗНОГО ИНДЕКСА ПАТОГЕННОСТИ ИЗОЛЯТА *A/CYGNUS CYGNUS/KARAKOL LAKE/01/2024* ГРИППА ПТИЦ

Майлыбаева А.М.*, Акмырзаев Н. Ж., Сагимбаева А.М., Мырзахметов Е.Т., Рыскельдинова Ш.Ж., Копеев С.К., Яманова Е.С., Сидихов Р.Б., Бурашев Е.Д., Асанжанова Н.Н.

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

Аннотация. В работе представлены результаты комплексного исследования биологических свойств изолята высокопатогенного вируса гриппа птиц *A/Cygnus cygnus/Karakol lake/01/2024 (H5N1)*, выделенного в Мангистауской области Республики Казахстан при вспышке в 2023-2024 гг. Проведена оценка его патогенности на 6-недельных СПФ-цыплятах, а также репродуктивной активности в развивающихся куриных эмбрионах. Показано, что вирус обладает высокой вирулентностью, вызывает 100% гибель заражённых эмбрионов в течение 48 часов и характеризуется максимальным значением интравенозного индекса патогенности (ИВИП = 3,6). Полученные данные подтверждают принадлежность изолята к высокопатогенным вариантам H5N1.

Ключевые слова: грипп птиц, H5N1, ИВИП, патогенность, вирус.

Введение

Высокопатогенный грипп птиц (ВПГП) – это острая, чрезвычайно контагиозная вирусная инфекция, поражающая широкий спектр домашних и диких видов птиц. Заболевание проявляется выраженным общим угнетением, снижением активности и аппетита, нарушениями координации, а также развитием характерных патологических изменений, включающих генерализованные отёки, множественные точечные и разлитые кровоизлияния, дистрофические и некротические процессы во внутренних органах. Нередко отмечаются поражения головного мозга и кожных покровов, что отражает системный характер инфекции [1-3].

Для высокопатогенной формы гриппа птиц характерна чрезвычайно высокая летальность. У молодняка показатель смертности может достигать 100%, причём гибель наступает в короткие сроки от начала клинических проявлений. Тяжесть течения заболевания обусловлена как высокой вирулентностью возбудителя, так и его способностью к быстрому распространению в восприимчивых популяциях птиц.

Возбудитель заболевания – РНК-содержащий вирус семейства *Orthomyxoviridae*, рода *Influenzavirus*, типа А, отличающийся сегментированным геномом и высоким уровнем генетической вариабельности. Эти особенности способствуют частым мутациям и реассортации генов, что, в свою очередь, приводит к появлению новых антигенных вариантов и увеличивает риск возникновения эпизоотий и угрозы межвидовой передачи [4].

В период с 2005 по 2007 годы вспышки ВПГП A/H5N1 приобрели чётко выраженный трансконтинентальный характер, стремительно распространившись из Юго-Восточной Азии практически на всю территорию Евразийского континента, а также затронув ряд стран Африки. Расширение географии эпизоотий и появление вспышек ВПГП A/H5N1 в государствах, расположенных на трёх различных континентах, сопровождались появлением новых вирусных вариантов. Предполагаемые мутационные изменения в геноме H5N1 способствовали усложнению эпизоотической ситуации, усиливая вирулентность и адаптационный потенциал вируса [5]. В этот же период на территории Казахстана была зарегистрирована неблагополучная эпизоотическая ситуация: вспышки гриппа птиц были выявлены в семи регионах страны, что свидетельствовало о широком распространении инфекции и её значительном эпизоотическом значении.

Вспышки ВПГП H5N1 среди сельскохозяйственной птицы привели к значительным экономическим потерям в мировой птицеводческой отрасли вследствие массового падежа и вынужденного

уничтожения поголовья. Дополнительно, спорадические случаи передачи вируса человеку, зарегистрированные в ряде стран, подчёркивают значимый потенциальный риск для общественного здравоохранения. С 2003 года в 23 государствах было задокументировано 889 случаев заболевания людей вирусом A/H5N1, обусловленных циркуляцией различных штаммов ВПГП A/H5N1 [6].



Рисунок 1 - Пути миграции диких птиц

Территория Казахстана пересекается несколькими ключевыми миграционными маршрутами перелётных птиц, что создаёт благоприятные условия для переноса вирусов гриппа (рисунок 1) [7]. Эти пути соединяют регионы Юго-Восточной Азии с европейскими и североафриканскими территориями, обеспечивая двустороннее распространение возбудителя между континентами [8].

В 2023–2024 годах на озере Каракол, расположенном на побережье Каспийского моря, была зарегистрирована массовая гибель лебедей. Для установления причин происходящего и оценки эпизоотического риска группа учёных НИИПББ провела выездные исследования с последующим отбором проб от павших особей. Полученные образцы были подвергнуты лабораторному анализу, включающему молекулярно-генетическую идентификацию вируса и последующий филогенетический анализ, которые подтвердили присутствие ВПГП A/H5N1 [9].

Согласно данным Министерства сельского хозяйства Республики Казахстан, с начала 2024 года в очагах инфекции было вынужденно уничтожено свыше 310 тысяч голов птицы. Специалисты отмечают, что вспышки связаны с циркуляцией вируса H5N1, который относится к числу наиболее опасных патогенов для домашних и диких птиц и представляет потенциальную угрозу для человека. По информации Всемирной организации здравоохранения животных (ВОЗЖ), вирус H5N1 продолжает вызывать эпизоотии среди птиц по всему миру, а отдельные случаи заболевания у людей, в том числе с летальными исходами, зарегистрированы в странах Азии, Европы и недавно – в США.

Целью данной работы явилось всестороннее исследование биологических свойств штамма (изолята) вируса гриппа птиц *A/Cygnus cygnus/Karakol lake/01/2024* (H5N1), выделенного на территории Мангыстауской области в 2023–2024 годах. В рамках работы предусматривалось определение его патогенности на цыплятах, оценка репродуктивных свойств в куриных эмбрионах. Полученные данные позволяют охарактеризовать эпизоотический потенциал изолята, установить его таксономическое положение среди циркулирующих штаммов H5N1.

Материалы и методы

Вирус. Изолят вируса гриппа *A/Cygnus cygnus/Karakol lake/01/2024* (H5N1) из лаборатории Коллекции микроорганизмов.

Лабораторные животные. ИВИП определяли на 6-недельных цыплятах, серонегативных к гриппу птиц.

Выделение вируса. Вирусовыделение осуществляли в соответствии с методическими рекомендациями ВОЗЖ, используя 9-11 – суточные развивающие куриные эмбрионы (РКЭ). Для заражения готовили 10% суспензию органов больной птицы (лёгкие, трахея, носоглоточные и клоачные смывы), которую вводили в аллантоисную полость в объёме 0,2 мл на эмбрион. Всего инокулировали 10 эмбрионов, при этом в качестве контроля использовали 5 незаражённых РКЭ. Эмбрионы, погибшие спустя 48 часов инкубации и позднее, отбирали для сбора аллантоисной жидкости (АЖ) и проведения последующих лабораторных исследований.

Изолят вируса гриппа *A/Cygnus cygnus/Karakol lake/01/2024* (H5N1) был размножен в 9-11 сут. куриных эмбрионах. ИВИП определялся в соответствии с рекомендациями ВОЗЖ. Для этого выбрали 6-недельные цыплята, свободные от специфических патогенов (СПФ), ранее не вакцинированные против каких-либо подтипов вируса гриппа. Десяти цыплятам внутривенно в вену крыла вводили 0,1 мл инокулята, содержащего разведение 1:10 (стерильным ФБР) аллантоисной жидкости, полученной из 9-11 сут. РКЭ с титром ГА > 1/16 ГАЕ. Контрольным цыплятам вводили только 1Х ФБР (рисунок 2).

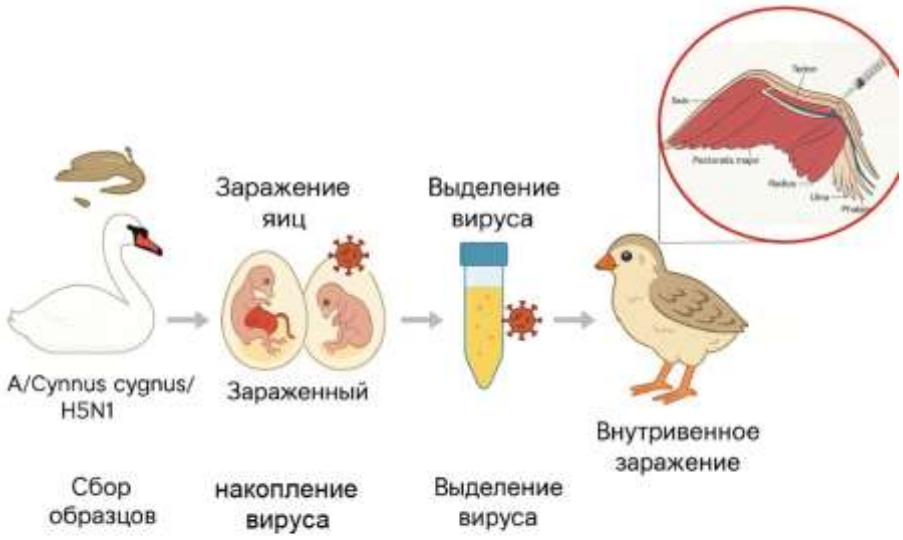


Рисунок 2 – Выделение вируса и интравенозные заражение

Зараженные цыплята проверяются на наличие клинических симптомов (выделения из глаз и носа, кашель, хрипы и одышка, отеки в области головы, шеи, груди и гортани, носовых пазух, вялость, снижение аппетита, паралич, дискоординация движений, запрокидывание головы, вращательные движения головой с потряхиванием, искривление шеи, отсутствие реакции на внешние раздражители, отказ от корма и воды, угнетенное состояние, синусит, истечение из носовых отверстий, конъюнктивит, помутнение роговицы и слепота, порезы крыльев или ног, цвет выделения – серозные или гнойные, депрессия, слабость, диарея, цианоз неоперенной кожи, цианоз гребней). Оценка проходит по бальной шкале. 0 – нет клиники, 1 – если наблюдается один из следующих признаков, 2 – если наблюдается более одного из признаков, 3 – погибшие. Погибшие птицы получали коэффициент 3 ежедневно, вплоть до десятого дня опыта. Интравенозный индекс патогенности вычисляли по формуле:

$$ПРІ = \frac{\sum_{i=1}^{10}(Б_i \times 1 + NБ_i \times 2 + П_i \times 3)}{10 \times N}$$

Bi — число больных в день i;
NBi — число тяжелобольных в день i;
Pi — число павших на день i;
N — общее число птиц в эксперименте.

По результатам определения индекса интравенозной патогенности вирус ГП будет отнесен к высокопатогенному (ИВИП>1,2) или низкопатогенному (ИВИП <1,2) по ВОЗЖ [10].

Результаты

Патологические материалы трахея, лёгкие, носоглоточные и клоачные смывы, полученные от лебедя шипуна для размножения вирус изолята вводили на 11-суточным СПФ- куриным эмбрионам. Спустя 48 часов инкубации отмечена 100% гибель всех зараженных эмбрионов, что свидетельствует о высокой вирулентности исследуемого материала. При последующем вскрытии эмбрионов выявлялись многочисленные геморрагические изменения, наиболее выраженные в области головы,

что является характерным патологическим признаком поражения высокопатогенными вирусами гриппа птиц.

Аллантоисная жидкость первого пассажа, показала гемагглютинирующую активность на уровне от 1:64 до 1:256 в реакции гемагглютинации.

Далее наработанный вируссодержащий материал, вводили цыплятам, уже в первые сутки после 6 часов внутривенного введения вируссодержащего материала у всех птиц наблюдались выраженные признаки угнетения, снижение активности, отказ от корма, водянистая диарея, что характерно для тяжелого поражения высокопатогенными вирусами гриппа птиц.



Рисунок 3 - Динамика клинического балла у цыплят при определении ИВИП.

В ходе исследования была оценена динамика клинических признаков у цыплят опытной и контрольной групп в течение 10 дней после внутривенного заражения вирусом *A/Cygnus cygnus/Karakol lake/01/2024* (H5N1).

У контрольной группы на всех временных точках (6, 12, 18, 24 и 30 часов) средний клинический балл оставался равным 0, что свидетельствует об отсутствии каких-либо клинических изменений и подтверждает специфичность наблюдаемых эффектов у заражённых животных. У опытной группы отмечалось последовательное нарастание клинических проявлений заболевания. Уже через 6 часов после заражения средний клинический балл составлял 1, что отражает появление первых признаков угнетения и снижения активности у птиц. К 12 часам показатель увеличился до 2, свидетельствуя об усилении клинических симптомов. На 18-м часе средний балл оставался на уровне 2, наблюдалось дальнейшее ухудшение состояния птиц, что указывает на стабильно тяжёлое состояние заражённых цыплят. Через 24 часа – средний клинический балл достиг максимального значения 3, все цыплята опытной группы погибли. Данный результат свидетельствует о крайне высокой вирулентности исследуемого изолята и его способности вызывать стремительно прогрессирующее заболевание с летальным исходом в течение 24 часов. На основании полученных данных, согласно методике расчёта, был определён интравенозный индекс патогенности, который составил 3,6, что соответствует максимально возможному уровню вирулентности для высокопатогенных вирусов гриппа птиц.

Изолят *A/Cygnus cygnus/Karakol lake/01/2024* (H5N1) органично вписывается в современную эпизоотическую картину высокопатогенного гриппа птиц, демонстрируя высокую вирулентность и значительное сходство по биологическим и генетическим характеристикам с актуальными зарубежными штаммами, циркулирующими в Евразийском регионе. Полученные результаты подчёркивают важность использования именно таких актуальных региональных изолятов при разработке современных вакцин, обладающих максимальной филогенетической и антигенной релевантностью.

Обсуждение

Согласно критериям, принятым в Европейском союзе и отражённым в руководствах ВОЗЖ, степень патогенности вирусов гриппа птиц оценивают по внутривенному патогенному индексу на

СПФ-цыплятах, способности вируса реплицироваться в культурах клеток без добавления трипсина, а также по первичной структуре сайта расщепления гемагглютинина.

Изучение генетических [9] и биологических свойств изолята *A/Cygnus cygnus/Karakol lake/01/2024* (H5N1) показал его близкое филогенетическое родство с рядом высокопатогенных штаммов, циркулирующих в последние годы в Евразийском регионе [11]. Согласно данным секвенирования, современные варианты вируса H5N1 относятся преимущественно к кладу 2.3.4.4b, который стал доминирующим в Европе, Центральной и Южной Азии, а также на Ближнем Востоке [12]. Представители этого клада характеризуются высокой экологической пластичностью, способностью эффективно распространяться среди диких водоплавающих птиц и вызывать тяжёлые эпизоотии на птицеводческих фабриках.

Широкая циркуляция вирусов H5N1 среди диких птиц свидетельствует о высокой вероятности того, что эти вирусы будут продолжать наносить ущерб промышленному птицеводству и представлять угрозу для здоровья населения. В связи с этим настоятельно рекомендуется, чтобы страны, относящиеся к зонам высокого риска, проводили вакцинацию домашней птицы с целью защиты её от высокопатогенного птичьего гриппа H5.

Учитывая продолжающуюся широкую циркуляцию вирусов H5N1 среди диких водоплавающих птиц и высокую вероятность их заноса в домашние популяции, разработка и применение вакцин на основе современных местных штаммов, включая изолят *A/Cygnus cygnus/Karakol lake/01/2024*, является чрезвычайно актуальным и научно обоснованным подходом. Использование такой вакцины позволит повысить эффективность иммунной защиты, снизить риск эпизоотических вспышек и обеспечить надёжную защиту птицеводческих хозяйств, особенно в странах, относящихся к зонам повышенного риска.

Заключение

Таким образом, полученные результаты демонстрируют выраженную и стремительно нарастающую динамику клинического ухудшения в опытной группе, тогда как птицы контрольной группы оставались полностью клинически здоровыми на протяжении всего периода наблюдения. Значение ИВИП = 3,6 подтверждает крайне высокую патогенность изолята *A/Cygnus cygnus/Karakol lake/01/2024* (H5N1) и согласуется с характеристиками высокопатогенных вирусов гриппа птиц (ВПГП).

Финансирование: Данная работа выполнена в рамках НТП O.1307 «Совершенствование мер обеспечения биологической безопасности в Казахстане: противодействие опасным и особо опасным инфекциям» (ИРН BR218004/0223)

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. В.Н Сюрин, А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьев, Н.В. Фомина. Вирусные болезни животных // М.: ВНИИТиБП, 1998. С. 233–238.

2. Alexander D.J. Orthomyxovirus infections // Virus Infections of Birds — Amsterdam etc., 1993. P. 287–316.

3. Highly pathogenic avian influenza // O.I.E. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, adopted 2005.

4. Александр D.J Обзор эпидемиологии птичьего гриппа. Вакцина. 2007;25:5637–5644. doi: 10.1016/j.vaccine.2006.10.051.

5. Ж.К Кыдырбаев, К.К. Табынов, Б.М. Хайруллин. Высокопатогенный грипп птиц: распостранение в Казахстане и разработка средств специфической профилактики // Алматы, 2015. С. 26-27.

6. World Health Organization Cumulative Number of Confirmed Human Cases for Avian Influenza A(H5N1) Reported to WHO, 2003–2024, 3 May 2024. [accessed on 3 May 2024]. Availableonline: https://www.who.int/publications/m/item/cumulative-number-of-confirmed-human-cases-for-avian-influenza-a(h5n1)-reported-to-who--2003-2024-3-may-2024.

7. Е.О. Абдураимов, А.С. Рсалиев, К.Д. Закарья и др. // Атлас вирусных болезней животных (блютанг, болезнь Ньюкасла, грипп птиц, ящур, оспа овец, оспа коров, ринопневмония лошадей, грипп лошадей, инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота, лейкоз крупного рогатого скота, вирусная диарея крупного рогатого скота, коронавирусная инфекция крупного рогатого скота) Монография. - Астана, 2025. - С. 54. ISBN 978-601-12-4747-4

8. Sobolev I., Gadzhiev A., Sharshov K., Ohlopkova O., Stolbunova K., Fadeev A., et al. Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N1) Virus-Induced Mass Death of Wild Birds, Caspian Sea, Russia, 2022. Emerg. Infect. Dis. 2023;29:2528–2532. doi: 10.3201/eid2912.230330.

9. Sultankulova K.T, Argimbayeva T.U, Aubakir N.A, Bopi A, Omarova Z.D, Melisbek A.M, et al. Reassortants of the Highly Pathogenic Influenza Virus A/H5N1 Causing Mass Swan Mortality in Kazakhstan from 2023 to 2024. Animals (Basel). 2024 Nov 8;14(22):3211. doi: 10.3390/ani14223211. PMID: 39595266; PMCID: PMC11591535.

10. WOAH Terrestrial Manual 2021/ Chapter 3.3.4. – Avian influenza (including infection with high pathogenicity avian influenza viruses).

11. Lewis N.S, Banyard A.C, Whittard E, Karibayev T, Al Kafagi T, Chvala I, et al. Emergence and spread of novel H5N8, H5N5 and H5N1 clade 2.3.4.4 highly pathogenic avian influenza in 2020. Emerg Microbes Infect. 2021 Dec;10(1):148-151. doi: 10.1080/22221751.2021.1872355. PMID: 33400615; PMCID: PMC7832535.

12. Swayne D.E.; Suarez D.L. Highly pathogenic avian influenza. Scientific & Technical Review. 2000/08/1; 19(2):463-482.doi: http://dx.doi.org/10.20506/rst.19.2.1230.

References

1. Syurin V.N, Samuilenko A.Ya, Solovyev B.V, Fomina N.V. Viral diseases of animals. Moscow: VNIITiBP; 1998. pp. 233–238.

2. Alexander DJ. Orthomyxovirus infections. In: Virus Infections of Birds. Amsterdam: Elsevier; 1993. pp. 287–316.

3. World Organisation for Animal Health (OIE). Highly pathogenic avian influenza. In: Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines; 2005.

4. Alexander D.J. Overview of avian influenza epidemiology. Vaccine. 2007;25:5637–5644. doi:10.1016/j.vaccine.2006.10.051.

5. Kydyrbayev Zh.K, Tabynov K.K, Khairullin B.M. Highly pathogenic avian influenza: spread in Kazakhstan and development of specific preventive measures. Almaty; 2015. pp. 26–27.

6. World Health Organization. Cumulative number of confirmed human cases for avian influenza A (H5N1) reported to WHO, 2003–2024. Updated 3 May 2024. Available from: https://www.who.int/publications/m/item/cumulative-number-of-confirmed-human-cases-for-avian-influenza-a(h5n1)-reported-to-who--2003-2024-3-may-2024

7. Abduraimov EO, Rsaliyev AS, Zakarya KD, et al. Atlas of viral diseases of animals (bluetongue, Newcastle disease, avian influenza, foot-and-mouth disease, sheep pox, cowpox, equine rhinopneumonitis, equine influenza, infectious bovine rhinotracheitis, bovine leukemia, bovine viral diarrhea, bovine coronavirus infection) – Astana, 2025. - p.54. ISBN 978-601-12-4747-4

8. Sobolev I, Gadzhiev A, Sharshov K, Ohlopkova O, Stolbunova K, Fadeev A, et al. Highly pathogenic avian influenza A(H5N1) virus–induced mass mortality of wild birds, Caspian Sea, Russia, 2022. Emerg Infect Dis. 2023;29:2528–2532. doi:10.3201/eid2912.230330.

9. Sultankulova K.T, Argimbayeva T.U, Aubakir N.A, Bopi A, Omarova Z.D, Melisbek A.M, et al. Reassortants of the highly pathogenic influenza virus A/H5N1 causing mass swan mortality in Kazakhstan from 2023 to 2024. Animals (Basel). 2024;14(22):3211.doi:10.3390/ani14223211.

10. World Organisation for Animal Health (WOAH). Terrestrial Manual 2021: Chapter 3.3.4 – Avian influenza (including infection with high pathogenicity avian influenza viruses).

11. Lewis N.S, Banyard A.C, Whittard E, Karibayev T, Al Kafagi T, Chvala I, et al. Emergence and spread of novel H5N8, H5N5 and H5N1 clade 2.3.4.4 highly pathogenic avian influenza in 2020. Emerg Microbes Infect. 2021;10(1):148–151. doi:10.1080/22221751.2021.1872355.

12. Swayne D.E, Suarez D.L. Highly pathogenic avian influenza. Rev Sci Tech. 2000;19(2):463–482. doi:10.20506/rst.19.2.1230.

ҚҰС ТҰМАУЫНЫҢ *A/CYGNUS CYGNUS/KARAKOL LAKE/01/2024* ИЗОЛЯТЫНЫҢ ПАТОГЕНДІГІНІҢ ИНТРАВЕНОЗДЫҚ ИНДЕКСІН ЗЕРТТЕУ

Майлыбаева А.М.*, Акмырзаев Н. Ж., Сагимбаева А.М., Мырзахметов Е.Т., Рыскельдинова Ш.Ж., Копеев С.К., Яманова Е.С., Сидихов Р.Б., Бурашев Е.Д., Асанжанова Н.Н.

«Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты» ЖШС, «QazBioPharm» ұлттық холдингі, Гвардейский, Қазақстан Республикасы

*a.mailybayeva@biosafety.kz

Аннотация. Бұл жұмыста Қазақстан Республикасының Маңғыстау облысынан 2023–2024 жж. тіркелген індет ошағы кезінде бөлініп алынған жоғары патогенді құс тұмауы вирусының *A/Cygnus cygnus/Karakol lake/01/2024* (H5N1) изолятының биологиялық қасиеттерін кешенді зерттеу нәтижелері ұсынылған. Вирустың 6 апталық СПФ балапандардағы патогендігі және дамып келе жатқан тауық эмбриондарындағы репродуктивтік белсенділігі анықталды. Зерттеу нәтижелері вирустың жоғары вируленттігін, жұқтырылған эмбриондардың 48 сағат ішінде 100% өлімін тудыратынын және интравеноздық патогендік индексінің (ИВПИ = 3,6) максималды деңгеймен сипатталатынын көрсетті. Алынған деректер изоляттың H5N1-дің жоғары патогенді нұсқаларына жататынын растайды.

Түйін сөздер: құс тұмауы, H5N1, ИВПИ, патогендік, вирус.

STUDY OF THE INTRAVENOUS PATHOGENICITY INDEX OF THE AVIAN INFLUENZA VIRUS ISOLATE *A/CYGNUS CYGNUS/KARAKOL LAKE/01/2024*

Mailybayeva A.M.*, Akmyrzayev N.Zh., Sagimbayeva A.M., Myrzakhmetov Y.T., Ryskeldinova Sh.Zh., Kopeyev S. K., Yamanova Y.S., Sidikhov R.B., Burashev Y.D., Asanzhanova N.N.

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

*a.mailybayeva@biosafety.kz

Abstract. This study presents the results of a comprehensive investigation of the biological properties of the highly pathogenic avian influenza virus isolate *A/Cygnus cygnus/Karakol lake/01/2024* (H5N1), obtained during the 2023–2024 outbreak in the Mangystau region of the Republic of Kazakhstan. The pathogenicity of the isolate was evaluated in 6-week-old SPF chickens, along with its reproductive activity in developing chicken embryos. The virus demonstrated high virulence, causing 100% mortality of infected embryos within 48 hours and exhibiting a maximal intravenous pathogenicity index (IVPI = 3.6). These findings confirm that the isolate belongs to the highly pathogenic H5N1 variants.

Keywords: avian influenza, H5N1, IVPI, pathogenicity, virus.

МРНТИ 34.25.37 **DOI: 10.58318/2957-5702-2025-24-11-22**
Оригинальная статья

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ ПРАЙМЕРОВ И ЗОНДОВ ПРИ РАЗРАБОТКЕ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ РЕАЛ-ТАЙМ ПЦР ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ГРИППА ПТИЦ И БОЛЕЗНИ НЬЮКАСЛА.

Бурашев Е.Д.*, Кожабергенов Н.С., Әубәкір Н.А., Омарова З.Д., Тулендибаев А.Б., Ермекбай Т.Т., Аргимбаева Т.У., Д.Ә. Әлібекова Д.Ә.

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

Аннотация. В настоящей работе представлены результаты оценки специфичности праймеров и зондов, разработанных для мультиплексной Real-time ПЦР тест-системы, предназначенной для диагностики гриппа птиц и болезни Ньюкасла. Для проверки специфичности использовали РНК вирусов болезни Ньюкасла, гриппа птиц А типа и инфекционного бронхита кур. В качестве положительных контролей применялись сконструированные плазмидные ДНК с фрагментами генов M (вирус болезни Ньюкасла) и NP (вирус гриппа птиц), отрицательным контролем служила деионизированная вода. Оптимизированная программа амплификации включала этап обратной транскрипции, денатурации и 45 циклов ПЦР в реальном времени с регистрацией флуоресцентных сигналов.

Полученные результаты показали, что разработанные праймеры и зонды обеспечивают избирательное определение целевых геномных фрагментов вирусов при отсутствии перекрёстных реакций и ложноположительных сигналов. Дополнительно проведено сравнение с коммерческими наборами ПЦР-ГРИПП-А-ФАКТОР и ПЦР-НЬЮКАСЛА-ФАКТОР, результаты которого подтвердили достоверность и воспроизводимость данных, полученных с использованием разработанной системы.

Таким образом, разработанная тест-система характеризуется высокой специфичностью и может быть рекомендована для применения в ветеринарной диагностике.

Ключевые слова: тест-система, ПЦР Реал-Тайм, грипп птиц, болезнь Ньюкасла, чувствительность.

Введение

Птицеводство занимает значимое место в агропромышленном комплексе Республики Казахстан и является одной из наиболее динамично развивающихся отраслей сельского хозяйства. В стране функционирует более 60 крупных птицефабрик, которые полностью обеспечивают внутренний рынок яйцом, а производство мяса птицы превышает 179 тыс. тонн в год [1]. Высокие показатели отрасли обеспечивают продовольственную безопасность государства, однако интенсификация производства сопровождается ростом рисков возникновения и быстрого распространения инфекционных заболеваний.

Современные условия ведения птицеводства характеризуются уплотнением содержания птиц, нарушением санитарных разрывов между партиями, совместным содержанием поголовья разных возрастов. Подобные факторы ведут к накоплению вирусной и бактериальной микрофлоры на территории хозяйств и ослаблению иммунитета птиц, что повышает вероятность вспышек заболеваний [2]. Нарушение ветеринарно-санитарных правил, стрессовые воздействия и технологические сбои приводят к широкому спектру инфекций, среди которых наиболее опасными являются вирусные заболевания.

Наибольшую угрозу для птицеводства представляют грипп птиц (ГП) и болезнь Ньюкасла (БН). Эти высококонтагиозные вирусные инфекции характеризуются тяжёлым течением, высокой смертностью и значительными экономическими потерями. Кроме того, вирус гриппа птиц способен преодолевать межвидовой барьер и представлять угрозу здоровью человека [3–5]. Казахстан, расположенный на пересечении трансконтинентальных путей миграции перелётных птиц, является

зоной повышенного риска заноса инфекций. На территории страны обитает более 500 видов диких птиц, значительная часть которых мигрирует в весенне-осенний период через регионы республики [3]. Контакт диких и домашних птиц увеличивает вероятность распространения возбудителей, что делает контроль эпизоотической ситуации приоритетной задачей.

Международный опыт подтверждает актуальность мониторинга гриппа птиц и болезни Ньюкасла. Так, в 2016 году в странах Евросоюза зарегистрировано 196 случаев выявления вируса гриппа птиц у диких птиц и 88 вспышек среди домашних [6]. В Италии за период 2016–2017 гг. вспышки высокопатогенного гриппа птиц привели к уничтожению более 1,1 млн голов индейки и кур [7–10]. Подобные примеры свидетельствуют о высокой скорости распространения возбудителя и необходимости оперативной диагностики.

Учитывая вероятные эпизоотические риски, проведение молекулярно-эпидемиологического мониторинга ГП и БН в Казахстане является актуальной научной задачей [11,12]. Такой мониторинг должен включать сбор статистических данных, экологических характеристик зон риска, эпидемиологический надзор за птицеводческими хозяйствами и отображение информации на электронных картах. Подобный подход позволит выявлять очаги инфекции и разрабатывать меры профилактики.

Молекулярные методы диагностики, в частности полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ), являются наиболее чувствительными и специфичными для выявления вирусов гриппа и болезни Ньюкасла. Эти методы позволяют получать достоверные результаты за короткое время без необходимости культивирования возбудителя, что особенно важно при проведении мониторинга и постановке диагноза. ВОЗ и Международное эпизоотическое бюро рекомендуют ПЦР-РВ как стандартный метод лабораторной диагностики гриппа птиц [13].

Особое значение имеет разработка мультиплексных тест-систем, позволяющих одновременно выявлять несколько возбудителей в одной реакции. Такой подход сокращает время анализа, уменьшает финансовые затраты и снижает вероятность ошибок. Кроме того, мультиплексные системы незаменимы при ассоциированных инфекциях, когда у птиц встречаются сходные клинические признаки при заражении различными патогенами [10–15].

В настоящее время в Казахстане отсутствуют отечественные разработки тест-систем для диагностики ГП и БН. Лаборатории используют в основном российские ПЦР-наборы, что повышает зависимость от внешних поставок и снижает устойчивость ветеринарной диагностики в условиях эпизоотических рисков [14]. Разработка и внедрение отечественной мультиплексной тест-системы позволит не только удовлетворить внутренний спрос, но и станет значимым шагом в развитии биотехнологической промышленности страны.

Исследования, представленные в данной работе, проводятся на базе Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности (НИИПББ), который располагает современными лабораториями, квалифицированным персоналом и опытом в области молекулярной диагностики вирусных инфекций [15]. На базе института разработаны и оптимизированы специфические праймеры для диагностики вирусных болезней птиц, включая грипп птиц и болезнь Ньюкасла.

Таким образом, создание отечественной мультиплексной тест-системы ПЦР-РВ для одновременной диагностики гриппа птиц и болезни Ньюкасла является актуальной задачей, имеющей не только научное, но и стратегическое значение для Республики Казахстан. Настоящее исследование направлено на оценку специфичности разработанных праймеров и зондов, что является необходимым этапом для дальнейшей валидации и внедрения системы в ветеринарную практику.

Цель исследования: оценка специфичности разработанных наборов праймеров и зондов для мультиплексной Real-Time ПЦР тест-системы, предназначенной для дифференциальной диагностики гриппа птиц и болезни Ньюкасла.

Материалы и методы исследования

Материалы, реактивы и буферы

В работе использовали набор для выделения РНК QIAamp Viral RNA Mini Kit (250) (Qiagen), набор для ОТ-ПЦР SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, США, 100 реакций), ультрачистую дистиллированную воду, свободную от ДНК-азы и РНК-азы (Invitrogen), агарозу Ultra-Pure agarose (Invitrogen), 50×TAE-буфер (Thermo Scientific), 6× загрузочный краситель для геля, а также маркер ДНК 50 bp (DNA Ladder, Invitrogen).

Оборудование

Для выполнения исследований применяли спектрофотометр NanoDrop 2000 (NanoDrop Technologies), шкаф биологической безопасности II класса Esco Airstream, ПЦР-бокс (Esco), термоциклеры ProFlex™ PCR System (Applied Biosystems) и Rotor-Gene Q (Qiagen), аппарат для электрофореза (Фармация), микроволновую печь (Samsung), гель-документирующую систему (Bio-Rad), настольную центрифугу (20000 g, Eppendorf), автоматические дозаторы Eppendorf Research Plus, вортекс Vortex Genie 2 Shaker, а также программные пакеты MEGA 10, BLAST и DNASTAR Lasergene 17 для анализа нуклеотидных последовательностей.

Вирусы

В качестве объектов исследования использовали изоляты вирусов гриппа птиц А: «1102», «1105», «486/05», «489/13», «491/13», «492/15», «495/13», а также изоляты вируса болезни Ньюкасла: «485/11», «955/15», «Б-04», «2698», «4998». Все штаммы были получены из лаборатории «Коллекция микроорганизмов» НИИПББ.

Выравнивание последовательностей и подбор праймеров

Поиск нуклеотидных последовательностей для разработки специфичных олигонуклеотидных праймеров проводили в международной базе данных GenBank NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank). Множественное выравнивание выполняли с использованием MEGA 10, а проверку специфичности – с помощью программы BLAST.

Синтез праймеров и зондов

Синтез олигонуклеотидных праймеров и зондов осуществлялся на заказ в компании ДНК-Синтез (Россия).

Выделение РНК

Экстракцию РНК проводили с использованием набора QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) в условиях лаборатории BSL-3. Концентрацию и чистоту РНК оценивали спектрофотометрически на NanoDrop 2000.

Конструирование рекомбинантной ДНК-плазмиды

Для получения положительных контролей амплифицированные фрагменты генома вирусов клонировали в плазмидный вектор pGEM-T Easy Vector (Promega). Химическую трансформацию проводили в компетентные клетки Escherichia coli, отбор колоний выполняли методом сине-белой селекции. Полученные клоны выращивали в жидкой среде LB при 37 °C в течение 16 ч, после чего выделяли плазмиды методом щелочного лизиса.

Проведение ОТ-ПЦР и ОТ-ПЦР в реальном времени

ОТ-ПЦР выполняли на термоциклере ProFlex™ PCR System (Applied Biosystems). Реакции ОТ-ПЦР в реальном времени проводили на системе Rotor-Gene Q (Qiagen). Продукты амплификации выявляли с помощью электрофореза в 2% агарозном геле в буфере TAE с добавлением красителя SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen). Для оценки размеров фрагментов применяли маркер DNA Ladder (50 bp, Invitrogen).

Анализ результатов ОТ-ПЦР в реальном времени осуществляли с использованием программного обеспечения Rotor-Gene Q v1.8.187.5.

Статистическая обработка данных.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием программы Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США) и Microsoft Excel 2016. Для проверки достоверности различий применялся критерий Стьюдента (t-test). Различия считались статистически значимыми при уровне вероятности $p < 0,05$.

Результаты

Подбор праймеров и зондов для диагностики вирусов ВГА и БН

В исследованиях по подбору специфических праймеров и зондов изучались гены, кодирующие NP и M вируса гриппа А (ВГА) и M, P вируса болезни Ньюкасла (БН). Выбор этих генов обусловлен наличием уникальных последовательностей, позволяющих обеспечить специфичность диагностики. Поиск нуклеотидных последовательностей проводился в базе GenBank.

Для выравнивания было отобрано по 500 изолятов вирусов ВГА и БН из разных регионов мира. Множественное выравнивание выполнено с помощью программы Mega v.10. На основе анализа выделены уникальные участки генов.

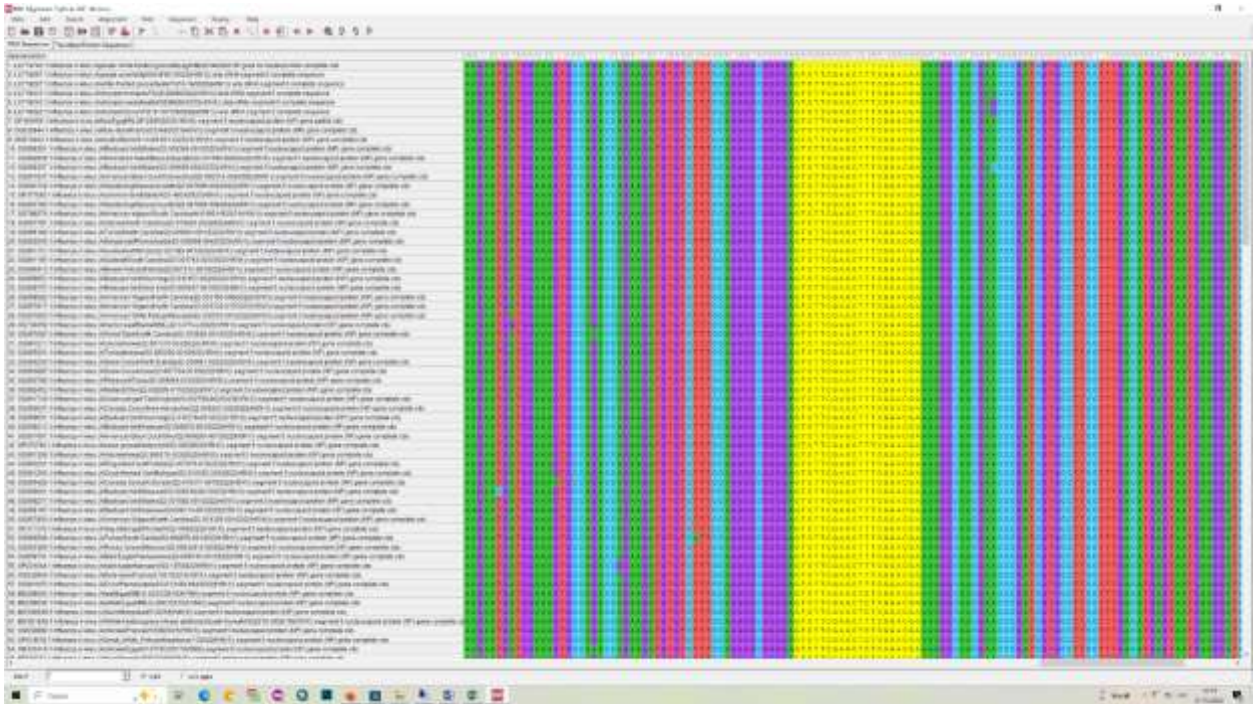


Рисунок 1- Фрагмент множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей гена NP вируса *гриппа А*

Далее представлено изображение множественного выравнивания M гена вируса болезни Ньюкасла с помощью программы Mega v.10.



Рисунок 2 – Фрагмент множественного выравнивания нуклеотидной последовательности M гена вируса болезни Ньюкасла

Подбор праймеров включал учет длины, температуры плавления, специфичности, комплементарности, содержания GC и вторичной структуры. Подбор проводился в CLC Workbench ver.12 (Qiagen). В таблице 1 представлены результаты праймеров и зондов.

Таблица 1 - Параметры разработанных праймеров и зондов для болезни Ньюкасла и грипп птиц тип А

Наименование вируса	Наименование праймера или зонда	Последовательность 5' - 3'	Tm	GC%	Размер продукта п.о.
Болезнь Ньюкасла	NDV_M _F	AGARGRAAARATAAGRAGACTC	53-60	27-45	227
	NDV_M_probe	ROX-ATA GCA AAT GCY TCY CCY CAR GT-BHQ-2	59-67	39-57	
	NDV_M_R	GTR CCD GCY TGA ATG ATG A	53-60	42-58	
	NDV_P _F	GARCACAGYATATCATGGAC	54-58	40-50	160
	NDV_P_probe	ROX-TCAGCTGGTGYAAYCCYTC-BHQ-2	55-62	47-63	
	NDV_P_R	CCT CCA TCA TRG ACA TCA T	53-55	42-47	
	NDV_NP _F	ATTGCTGTTAGYGAGGAYGC	56-60	45-55	485
	NDV_NP_probe	ROX-ATGACTGCRTAYGAGACRGC-BHQ-2	56-63	45-60	
	NDV_NP_R	AGT TGR ATT GYA CTY CTG CA	52-58	35-50	
Грипп птиц тип А	AIV_M_F	CTC ATG GAR TGG CTA AAG AC	56-58	45-50	79
	AIV_M_probe	FAM-ACC RAT CYT GTC ACC TYT GAC- BHQ-1	57-63	43-57	
	AIV_M_R	ACG GTG AGC GTR AAN ACR AA	54-60	40-55	
	AIV_NP _F	GTC TTC GAG CTY TCR GAC GA	58-63	50-60	100
	AIV_NP_probe	FAM-ATC GTG CCT TCC TTT GAC ATG A- BHQ-1	60	45	
	AIV_NP_R	TAY TCC TCT GCA YTG TCY CC	56-63	45-60	
	AIV_NP2 _F	CACCTGATGATCTGGCATTC	58	50	319
	AIV_NP2_probe	FAM-AAT GAT GCC ACA TAY CAG AGR AC-BHQ-1	59-63	39-48	
	AIV_NP2_R	TGR TCC ATC ATT GCT CTT TG	54-56	40-45	

Все праймеры и зонды проверены на специфичность с помощью BLAST. Для дальнейшего синтеза отобраны олигонуклеотиды с 100% специфичностью.

Определение специфичности наборов праймеров и зондов

Разработанные праймеры и зонды проверялись на РНК вирусов ВГА, БН и ИБК. Положительные контроли – рекомбинантные плазмиды с вставками фрагментов генов, отрицательные – деионизированная вода.

Таблица 2 - Программа для ОТ-ПЦР РВ анализа

Шаг	Температура	Время		Количество циклов
1	50 ^{0}C	30 мин		1
2	95^{0}C	15 мин		1
3	94 ^{0}C	15 сек		45
	55 ^{0}C	25 с	Детекция сигнала FAM Детекция сигнала ROX	

Результаты ОТ-ПЦР в реальном времени показали (рисунок), что разработанные наборы праймеров и зондов работают специфично с РНК вируса болезни Ньюкасла и гриппа птиц А типа. Количественные учитывались по каналу *Cycling A.Green.*

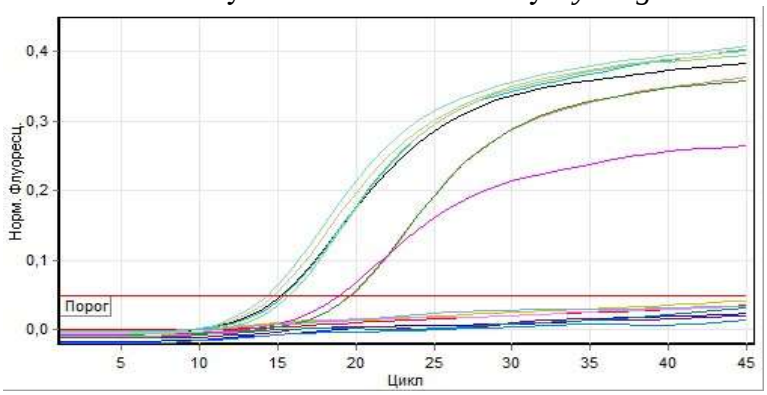


Рисунок 3 – Определение специфичности праймеров и зондов на ВГА

Результаты специфичности на грипп птиц типа А представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Результаты ОТ-ПЦР РВ анализа по каналу Green

№	Имя	Тип	CT
1	БН «331/14»	Образец	
2	БН «481/15»	Образец	
3	БН «485/11»	Образец	
4	БН «955/15»	Образец	
5	БН «Б-04»	Образец	
6	БН «2698»	Образец	
7	БН «4998»	Образец	
8	ПК БН	Образец	
9	ВГА «1102»	Образец	19,76
10	ВГА «1105»	Образец	19,70
11	ВГА «486/05»	Образец	19,00
12	ВГА «489/13»	Образец	15,26
13	ВГА «491/13»	Образец	15,42
14	ВГА «492/15»	Образец	14,76
15	ВГА «495/13»	Образец	15,75
16	ПК ВГА	Образец	14,32
17	ИБК «Винтерфильд»	Образец	
18	ИБП «Кентукки»	Образец	
19		Отрицательный контроль	

Количественные учитывались по каналу *Cycling A.Orange*

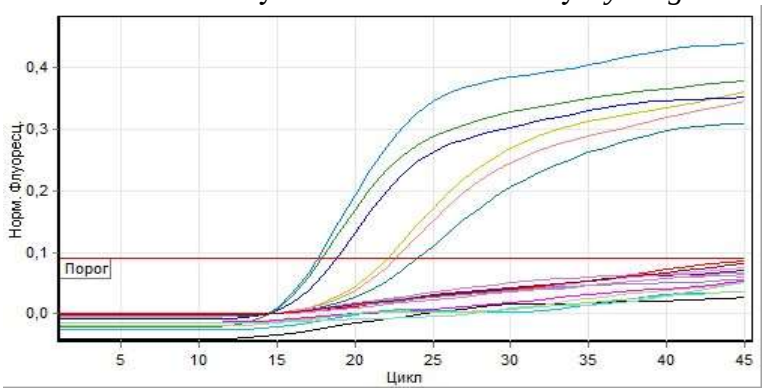


Рисунок 4 – Результаты ОТ-ПЦР РВ анализа с набором ПЦР-ГРИПП-А-ФАКТОР

Таблица 4 – Количественные данные ОТ-ПЦР РВ анализа с набором ПЦР-ГРИПП-А-ФАКТОР

№	Имя	Тип	CT
1	БН «331/14»	Образец	22,04
2	БН «481/15»	Образец	18,83
3	БН «485/11»	Образец	
4	БН «955/15»	Образец	
5	БН «Б-04»	Образец	17,64
6	БН «2698»	Образец	24,00
7	БН «4998»	Образец	22,58
8	ПК БН	Образец	17,88
9	ВГА «1102»	Образец	
10	ВГА «1105»	Образец	
11	ВГА «486/05»	Образец	
12	ВГА «489/13»	Образец	
13	ВГА «491/13»	Образец	
14	ВГА «492/15»	Образец	
15	ВГА «495/13»	Образец	
16	ПК ВГА	Образец	
17	ИБК «Винтерфильд»	Образец	
18	ИБП «Кентукки»	Образец	
19		Отрицательный контроль	

Результаты исследований показали, что разработанные наборы праймеров и зондов для диагностики вирусов ГП и БН работают специфично. Не сработали 2 пробы БН «485/11», «955/15». Для определения достоверности и валидности полученных результатов разработанной мультиплексной тест-системой, пробы РНК вирусов ВГА и БН проверены коммерческими наборами ПЦР-ГРИПП-А-ФАКТОР (кат. № R10515-VET) и ПЦР-НЬЮКАСЛА-ФАКТОР (кат. № R15418-VET).

При постановке ОТ-ПЦР РВ набором ПЦР-ГРИПП-А-ФАКТОР получены следующие результаты (см. рисунок 5).

Количественные учитывались по каналу *Cycling A.Orange.*

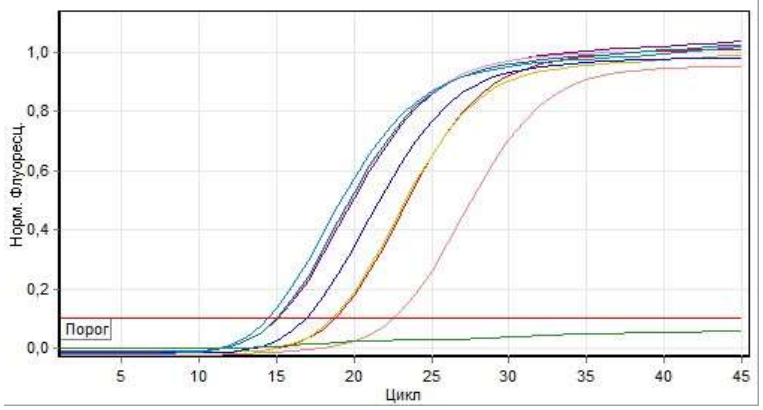


Рисунок 5 – Результаты ОТ-ПЦР РВ анализа с набором ПЦР-ГРИПП-А-ФАКТОР

По результатам исследований, представленных как на рисунке 5, так и таблице 5 с использованием набора ПЦР-ГРИПП-А-ФАКТОР была подтверждена специфичность работы разработанной тест-системы.

Таблица 5 – Количественные данные ОТ-ПЦР РВ анализа с набором ПЦР-ГРИПП-А-ФАКТОР

№	**Имя**	**Тип**	**CT**
1	ВГА «1102»	Образец	18,78
2	ВГА «1105»	Образец	18,62
3	ВГА «486/05»	Образец	16,88
4	ВГА «489/13»	Образец	15,10
5	ВГА «491/13»	Образец	15,02
6	ВГА «492/15»	Образец	14,46
7	ВГА «495/13»	Образец	14,98
8		Положительный контроль	22,53
9		Отрицательный. контроль	

Полученные результаты подтверждают, что все ранее исследованные пробы положительны на ВГА, и по чувствительности сопоставимы с разработанной тест-системой.

Далее при постановке ОТ-ПЦР РВ набором ПЦР-НЬЮКАСЛА-ФАКТОР проверены пробы РНК вируса БН, где получены следующие результаты (см. рисунок 6).

Количественные учитывались по каналу *Cycling A.Yellow.*

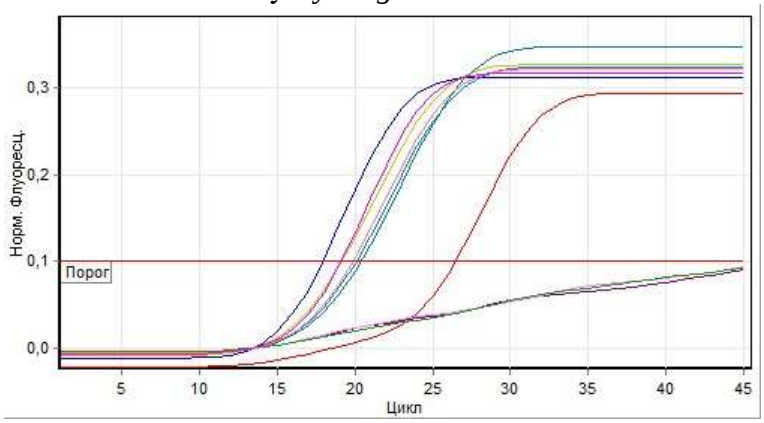


Рисунок 6 – Результаты ОТ-ПЦР РВ анализа с набором ПЦР-НЬЮКАСЛА-ФАКТОР

Таблица 6 – Количественные данные ОТ-ПЦР РВ анализа с набором ПЦР-НЬЮКАСЛА-ФАКТОР

№	Имя	Тип	CT
1	БН «331/14»	Образец	19,16
2	БН «481/15»	Образец	17,94
3	БН «485/11»	Образец	
4	БН «955/15»	Образец	
5	БН «Б-04»	Образец	20,09
6	БН «2698»	Образец	20,39
7	БН «4998»	Образец	19,89
8		Отрицательный. контроль	
9		Положительный контроль	19,14

Результаты ОТ-ПЦР РВ набором ПЦР-НЬЮКАСЛА-ФАКТОР показывают, что пробы БН «485/11» и «955/15» также работают отрицательно. Таким образом, мы получили аналогичные результаты коммерческими наборами, что доказывает достоверность полученных данных при использовании разработанной мультиплексной тест-системы.

Обсуждение

Проведённые исследования показали высокую специфичность разработанных праймеров и зондов для выявления РНК вирусов болезни Ньюкасла (БН) и гриппа птиц А (ВГА). Использование сконструированных плазмидных ДНК в качестве положительных контролей позволило точно оценить эффективность амплификации, а отрицательный контроль (деионизированная вода) подтвердил отсутствие неспецифической амплификации, что свидетельствует о надежности методики.

Результаты ОТ-ПЦР в реальном времени продемонстрировали, что все образцы ВГА давали характерные значения Ct в диапазоне 14,46–19,76, что отражает достаточную чувствительность разработанных праймеров и зондов. В свою очередь, пробы БН «485/11» и «955/15» не показали положительный результат, что может быть обусловлено низким титром вируса или деградацией РНК в данных образцах. Достоверность этих наблюдений подтверждена аналогичными результатами, полученными с использованием коммерческих наборов ПЦР-ГРИПП-А-ФАКТОР и ПЦР-НЬЮКАСЛА-ФАКТОР, что подчеркивает валидность разработанной мультиплексной тест-системы.

Стоит отметить, что мультиплексная система позволяет одновременно детектировать несколько вирусов в одном образце, что значительно ускоряет диагностику и снижает затраты на реактивы и время проведения анализа. Параллельное использование каналов FAM и ROX обеспечило надежное разделение сигналов, а подбор температурно-временного профиля ПЦР позволил минимизировать возможность неспецифических амплификаций и образования димеров праймеров.

Данные по Ct значениям также позволяют оценить репликационную активность вирусов в исследованных образцах. Более низкие значения Ct у образцов ВГА («492/15», «495/13») указывают на более высокую концентрацию вирусной РНК, что может быть связано с высокой вирулентностью или более свежими образцами. В отличие от этого, отрицательные реакции у некоторых образцов БН свидетельствуют о необходимости дополнительной оптимизации этапа выделения РНК для слабовирусных образцов или применения дополнительных контрольных маркеров для оценки целостности РНК.

Таким образом, разработанные праймеры и зонды показали высокую специфичность при амплификации целевых вирусов, сопоставимую чувствительность с коммерческими тест-системами и возможность использования в мультиплексном формате для одновременного выявления различных патогенов.

Выводы из данного исследования подчеркивают практическую ценность разработанной тест-системы для лабораторной диагностики вирусов гриппа птиц А и болезни Ньюкасла, а также её

потенциал для использования в эпизоотическом контроле и мониторинге вспышек заболеваний.

Заключение

Разработанная мультиплексная тест-система для диагностики вирусов гриппа птиц А и болезни Ньюкасла продемонстрировала высокую специфичность и сопоставимую с коммерческими наборами чувствительность. Подобранные праймеры и зонды показали стабильные результаты при амплификации целевых вирусов, а отрицательные реакции контрольных образцов подтвердили отсутствие неспецифической амплификации.

Использование мультиплексного формата позволяет одновременно детектировать несколько вирусов, что ускоряет процесс диагностики и снижает затраты на реактивы. Система также обладает потенциалом для применения в лабораторном контроле эпизоотий и мониторинге вспышек заболеваний среди птиц.

Таким образом, предложенная тест-система является надежным и эффективным инструментом для быстрой и точной идентификации возбудителей гриппа птиц А и болезни Ньюкасла.

Благодарности: Авторы выражают благодарность Ширинбекову М.Ж. и Мелисбеку А.М. за содействие в проведении научно-исследовательских работ.

Финансирование: Данная работа выполнена в рамках проекта грантового финансирования ИРН AP19676553 «Эпидемиологический мониторинг и разработка современных средств диагностики особо опасных вирусных болезней птиц».

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Казахстанская сельскохозяйственная газета *Аграрий Казахстана*. Птицеводство Казахстана: состояние и проблемы развития [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://abkaz.kz/pticevodstvo-kazaxstana-sostoyanie-i-problemy-razvitiya/ (дата обращения: 25.11.2020).

2. Богоявленский А. П., Березин В. Э. Вирусные инфекции в промышленном птицеводстве и проблемы их диагностики // Биотехнология. – Секция 2.

3. Усиление подготовленности и укрепление способности к ответным действиям в случае высокопатогенного птичьего гриппа (и других зоонозных заболеваний, появляющихся заново или повторно) в странах Восточной Европы и Центральной Азии: материалы совещания, Стамбул, 29 июня – 1 июля 2009 г. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.fao.org/docs/eims/upload/267122/ak698r00.pdf

4. Горбунова А. С., Пысина Т. В. Грипп животных. – М., 1973.

5. Сюрин В. Н., Осидзе Н. Г. Грипп птиц // Малоизвестные заразные болезни животных. – М., 1973.

6. Adlhoch C., Gossner C., Koch G., Brown I., Bouwstra R., Verdonck F. et al. Comparing introduction to Europe of highly pathogenic avian influenza viruses A(H5N8) in 2014 and A(H5N1) in 2005 // Euro Surveill. – 2014. – Vol. 19, № 50. – P. 20996.

7. *Control of Communicable Diseases Manual*. – 20th Edition. – Washington DC: APHA Press, 2015. – ISBN 978-0-87553-018-5.

8. Li Q. et al. Epidemiology of Human Infections with Avian Influenza A(H7N9) Virus in China // New England Journal of Medicine. – 2014. – Vol. 370. – P. 520–532.

9. Fotina T. I. The role of the microbial monitoring in the prevention of poultry // Proceedings of XXV World Poultry Congress. – China, 2016. – P. 250–251.

10. Jhung M. A., Nelson D. I., Centers for Disease C., Prevention. Outbreaks of avian influenza A (H5N2), (H5N8), and (H5N1) among birds – United States, December 2014 – January 2015 // MMWR Morb Mortal Wkly Rep. – 2015. – Vol. 64, № 4. – P. 111.

11. World Organisation for Animal Health (OIE). Update on highly pathogenic avian influenza in animals (type H5 and H7), 2015–2016 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/update-on-avian-influenza/2015/

12. Geraci J. R., St. Aubin D. J., Barker I. K., Webster R. G., Hinshaw V. S., Bean W. J. et al. Mass mortality of harbor seals: pneumonia associated with influenza A virus // Science. – 1982. – Vol. 215. – P. 1129–1131.

13. CDC. Seasonal Influenza (Flu) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.cdc.gov/flu/

14. Lin Y. P., Shaw M., Gregory V., Cameron K., Lim W., Klimov A. et al. Avian-to-human transmission of H9N2 subtype influenza A viruses: Relationship between H9N2 and H5N1 human isolates // PNAS. – 2000. – Vol. 97, № 17. – P. 9654–9658.

15. Ito T., Gorman O. T., Kawaoka Y., Bean W. J., Webster R. G. Evolutionary analysis of the influenza A virus M gene with comparison of the M1 and M2 proteins // Journal of Virology. – 1991. – Vol. 65, № 10. – P. 5491–5498.

References

1. Kazakhstanskaya sel'skokhozyaystvennaya gazeta Agrariy Kazakhstana. Ptitsevodstvo Kazakhstana: sostoyanie i problemy razvitiya [Elektronnyy resurs]. – Rezhim dostupa: http://abkaz.kz/pticevodstvo-kazaxstana-sostoyanie-i-problemy-razvitiya/ (data obrashcheniya: 25.11.2020).

2. Bogoyavlenskiy A. P., Berezin V. E. Virusnye infektsii v promyshlennom ptitsevodstve i problemy ikh diagnostiki // Biotekhnologiya. – Sektsiya 2.

3. Usilenie podgotovlennosti i ukreplenie sposobnosti k otvetnym deystviyam v sluchaye vysokopatogennogo ptichego grippa (i drugikh zoonoznykh zabolevaniy, poyavlyayushchikhsya zanovo ili povtorno) v stranakh Vostochnoy Yevropy i Tsentral'noy Azii: materialy soveshchaniya, Stambul, 29 iyunya – 1 iyulya 2009 g. [Elektronnyy resurs]. – Rezhim dostupa: http://www.fao.org/docs/eims/upload/267122/ak698r00.pdf

4. Gorbunova A. S., Pysina T. V. Gripp zhivotnykh. – M., 1973.

5. Syurin V. N., Osidze N. G. Gripp ptits // Maloizvestnye zaraznye bolezni zhivotnykh. – M., 1973.

6. Adlhoch C., Gossner C., Koch G., Brown I., Bouwstra R., Verdonck F. et al. Comparing introduction to Europe of highly pathogenic avian influenza viruses A(H5N8) in 2014 and A(H5N1) in 2005 // Euro Surveill. – 2014. – Vol. 19, № 50. – P. 20996.

7. Control of Communicable Diseases Manual. – 20th Edition. – Washington DC: APHA Press, 2015. – ISBN 978-0-87553-018-5.

8. Li Q. et al. Epidemiology of Human Infections with Avian Influenza A(H7N9) Virus in China // New England Journal of Medicine. – 2014. – Vol. 370. – P. 520–532.

9. Fotina T. I. The role of the microbial monitoring in the prevention of poultry // Proceedings of XXV World Poultry Congress. – China, 2016. – P. 250–251.

10. Jhung M. A., Nelson D. I., Centers for Disease C., Prevention. Outbreaks of avian influenza A (H5N2), (H5N8), and (H5N1) among birds – United States, December 2014 – January 2015 // MMWR Morb Mortal Wkly Rep. – 2015. – Vol. 64, № 4. – P. 111.

11. World Organisation for Animal Health (OIE). Update on highly pathogenic avian influenza in animals (type H5 and H7), 2015–2016 [Elektronnyy resurs]. – Rezhim dostupa: http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/update-on-avian-influenza/2015/

12. Geraci J. R., St. Aubin D. J., Barker I. K., Webster R. G., Hinshaw V. S., Bean W. J. et al. Mass mortality of harbor seals: pneumonia associated with influenza A virus // Science. – 1982. – Vol. 215. – P. 1129–1131.

13. CDC. Seasonal Influenza (Flu) [Elektronnyy resurs]. – Rezhim dostupa: http://www.cdc.gov/flu/

14. Lin Y. P., Shaw M., Gregory V., Cameron K., Lim W., Klimov A. et al. Avian-to-human transmission of H9N2 subtype influenza A viruses: Relationship between H9N2 and H5N1 human isolates // PNAS. – 2000. – Vol. 97, № 17. – P. 9654–9658.

15. Ito T., Gorman O. T., Kawaoka Y., Bean W. J., Webster R. G. Evolutionary analysis of the influenza A virus M gene with comparison of the M1 and M2 proteins // Journal of Virology. – 1991. – Vol. 65, № 10. – P. 5491–5498.

ҚҰС ТҰМАУЫ МЕН НЬЮКАСЛ АУРУЫН БАЛАУҒА АРНАЛҒА МУЛЬТИПЛЕКСТІ REAL-TIME ПТР ТЕСТ-ЖҮЙЕСІН ӘЗІРЛЕУ БАРЫСЫНДА ПРАЙМЕРЛЕР МЕН ЗОНДТАРДЫҢ ЕРЕКШЕЛІГІН АНЫҚТАУ

Бурашев Е.Д.*, Кожабергенов Н.С., Әубәкір Н.А., Омарова З.Д., Тулендибаев А.Б., Ермекбай Т.Т., Аргимбаева Т.У., Д.Ә. Әлібекова Д.Ә.
«Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты» ЖШС,
«QazBioPharm» ұлттық холдингі, Гвардейский, Қазақстан Республикасы
*y.burashev@biosafety.kz

Аннотация. Бұл жұмыста құс тұмауы мен Ньюкасл ауруын диагностикалауға арналған мультиплексті Real-time ПТР тест-жүйесі үшін әзірленген праймерлер мен зондтардың спецификалық қасиеттерін бағалау нәтижелері ұсынылған. Спецификалықты тексеру үшін Ньюкасл ауруы вирусының, А типті құс тұмауы вирусының және тауықтардың инфекциялық бронхит вирусының РНҚ үлгілері пайдаланылды. Оң бақылау ретінде М (Ньюкасл ауруы вирусы) және NP (құс тұмауы вирусы) гендерінің фрагменттері бар плазмидті ДНҚ қолданылды, ал теріс бақылау ретінде деионизацияланған су пайдаланылды. Оптимизацияланған амплификация бағдарламасы кері транскрипция кезеңін, денатурацияны және флуоресценттік сигналдарды тіркеумен 45 циклдік нақты уақыттағы ПТР-ды қамтыды.

Алынған нәтижелер әзірленген праймерлер мен зондтардың мақсатты геномдық фрагменттерді сенімді түрде анықтайтынын және айқаспалы реакциялар мен жалған оң сигналдардың болмауын көрсетті. Қосымша түрде ПЦР-ГРИПП-А-ФАКТОР және ПЦР-НЬЮКАСЛ-ФАКТОР коммерциялық жиынтықтарымен салыстыру жүргізіліп, алынған мәліметтердің сенімділігі мен қайталанушылығы расталды.

Осылайша, әзірленген тест-жүйе жоғары спецификалыққа ие және ветеринариялық диагностикада қолдануға ұсынылады.

Негізгі сөздер: тест-жүйе, Real-time ПТР, құс тұмауы, Ньюкасл ауруы, сезімталдық.

DETERMINATION OF PRIMER AND PROBE SPECIFICITY IN THE DEVELOPMENT OF A MULTIPLEX REAL-TIME PCR TEST SYSTEM FOR THE DIAGNOSIS OF AVIAN INFLUENZA AND NEWCASTLE DISEASE

Burashev Ye. D*., Kozhabergenov N. S., Aubakir N. A., Omarova Z. D., Tulendibayev A. B., Yermekbai T., Argimbaeva T. U., Alibekova D. A.

LLP «Research Institute for Biological Safety Problems», National holding «QazBioPharm»,
Guardeyskiy, Republic of Kazakhstan
*y.burashev@biosafety.kz

Abstract. This study presents the results of evaluating the specificity of primers and probes developed for a multiplex real-time PCR test system designed for the detection of avian influenza and Newcastle disease. To assess specificity, RNA samples from Newcastle disease virus, avian influenza virus type A, and infectious bronchitis virus of chickens were used. As positive controls, plasmid DNAs containing fragments of the M gene (Newcastle disease virus) and NP gene (avian influenza virus) were employed, while deionized water served as a negative control. The optimized amplification program included a reverse transcription step, denaturation, and 45 cycles of real-time PCR with registration of fluorescent signals.

The results demonstrated that the developed primers and probes provided selective detection of the target genomic fragments of viruses without cross-reactions or false-positive signals. Additionally, a comparison with commercial kits PCR-GRIPP-A-FACTOR and PCR-NEWCASTLE-FACTOR confirmed the reliability and reproducibility of the obtained data.

Therefore, the developed test system is characterized by high specificity and can be recommended for practical use in veterinary diagnostics.

Keywords: test system, Real-time PCR, avian influenza, Newcastle disease, sensitivity.

МРНТИ 76.31.29 **DOI: 10.58318/2957-5702-2025-24-23-28**
Original Article

TOLERABILITY OF EXCIPIENTS OF A VACCINE FORMULATION IN OUTBRED WHITE LABORATORY MICE

Yespembetov B.[1], Alpysbayeva S.[1*] Sarmykova M.[1], Kerimbayev A.[1], Abdimukhtar A.[1], Serikbay Ye.[1], Shorayeva K.[1], Asanzhanova N.[1], Syrym N.[1], Shestakov A.[2], Toleukhan A.[1], Anarbekova A.[1], Maulenbayeva M.[1], Yerzhigit B.[1], Abdykalyk A.[1],

[1]LLP «Research Institute for Biological Safety Problems», National holding «QazBioPharm», Guardeyskiy, Republic of Kazakhstan;
*s.alpysbaeva@biosafety.kz
[2] Ulyanovsk State Agrarian University named after P.A. Stolypin, Ulyanovsk, Russia

Abstract. The present study evaluated the local and systemic tolerability of vaccine formulation components in the absence of antigen following intranasal and sublingual administration in outbred white laboratory mice. The investigated substances included excipients of the vaccine formulation mannitol and gelatin at various concentrations as well as phosphate-buffered saline and water for injection, which are used as technological components during the development of vaccine candidates. The control group consisted of intact animals.

Tolerability was assessed over a 10-day observation period based on clinical condition, body weight dynamics, and key blood biochemical parameters. All tested substances demonstrated good tolerability: no clinically significant local or systemic reactions were observed, and the evaluated biochemical parameters remained within reference ranges. Based on the overall assessment, mannitol at a concentration of 5% and gelatin at 0.5% were identified as optimal.

The obtained results indicate the safety of the investigated excipients and technological components and confirm their suitability for use at the preclinical stage of development of vector-based anti-brucellosis vaccine candidates utilizing an influenza virus platform.

Keywords:vaccine; vaccine formulation; excipients; gelatin; mannitol; tolerability; mice

Introduction

Excipients of vaccine formulations, including stabilizers, carriers, and buffering systems, play a critical role in ensuring the safety, stability, and reproducibility of vaccine products. The protein stabilizer gelatin is widely used to enhance the resistance of viral particles to temperature fluctuations and lyophilization processes. However, in certain cases, it has been associated with adverse reactions, necessitating a thorough evaluation of its tolerability [1,2]. Mannitol is commonly employed as a stabilizer and cryoprotectant, while phosphate-buffered saline (PBS) serves as a buffering medium that maintains physiological pH and osmolarity within the vaccine formulation [2].

Although data are available regarding the safety of these substances following parenteral administration, the literature lacks systematic evidence concerning their local and systemic tolerability after mucosal administration (intranasal and sublingual routes), particularly when administered in the absence of an antigenic component. This represents a significant knowledge gap, as the impact of excipient and technological components of vaccine formulations on the host organism following mucosal delivery remains insufficiently characterized. Such limitations hinder the scientific justification of their use at early stages of preclinical research.

This issue is especially relevant in the context of developing vector-based vaccines utilizing influenza virus platforms, for which mucosal routes of administration are considered promising in terms of inducing local immune responses. The practical importance of assessing excipient tolerability lies in enabling their safe incorporation into vaccine formulations for vector-based anti-brucellosis vaccine candidates derived from influenza virus platforms. Moreover, such evaluation reduces the risk of confounding interpretations of reactogenicity and immunogenicity data attributed to the vector constructs themselves during preclinical investigations [3,4].

The aim of the present study was to evaluate the local and systemic tolerability of vaccine excipients (gelatin and mannitol), as well as the buffering medium and technological solvent, following intranasal and sublingual administration in outbred white laboratory mice, based on body weight gain, clinical observations, and blood biochemical parameters.

Materials and Methods

A total of 110 outbred white laboratory mice aged 6-8 weeks were used in the study and allocated into 11 groups of 10 animals each. The study was conducted as a controlled preclinical experiment, with animals randomly assigned to experimental and control groups. The control group consisted of intact animals that did not receive any administration.

The tested substances included excipients of the vaccine formulation mannitol (3%, 5%, and 7%) and gelatin (0.3%, 0.5%, and 0.7%) as well as phosphate-buffered saline (PBS; 0.01 M, pH 7.2-7.4) and water for injection, which was used as a technological solvent in the preparation of vaccine candidates. The substances were administered once via the sublingual and intranasal routes. Animals were monitored for 10 days following administration.

The following parameters were assessed: body weight gain (Day 0 and Day 10), local tolerability, and systemic clinical signs (including activity, appetite, and general condition), evaluated using a semi-quantitative scoring scale (0-3 points). In addition, key biochemical blood parameters were measured, including alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) activity, total bilirubin, glucose, and total protein levels. Blood samples were collected from the tail vein on Day 10 of the experiment.

Statistical analysis was performed using descriptive statistical methods. Results are presented as mean ± standard deviation (M ± SD). Intergroup comparisons were conducted using parametric or nonparametric tests depending on data distribution. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. Reference values were derived from the intact control group within the present study.

Results

All investigated components of the vaccine formulation including mannitol, gelatin, phosphate buffered saline, and water for injection demonstrated good tolerability in outbred white laboratory mice following both sublingual and intranasal administration. The obtained results are presented in Tables 1-4.

Following sublingual administration, physiological body weight gain was observed in all groups. No local reactions at the mucosal site or systemic clinical manifestations were detected.

After intranasal administration, mild transient local reactions characterized by slight mucosal hyperemia were observed in the groups receiving gelatin, whereas the remaining components were well tolerated without signs of irritation or systemic effects.

Biochemical blood parameters including alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, total bilirubin, glucose, and total protein remained within the reference values obtained from intact control animals in all groups. These findings indicate the absence of hepatic dysfunction or disturbances in general metabolic status.

Formal statistical comparisons between groups were not performed, as the objective of the study was descriptive evaluation of tolerability. The limited sample size and the nature of the data did not allow the application of parametric statistical methods.

Analytical conclusion. Based on the overall assessment of clinical observations, body weight dynamics, and biochemical parameters, mannitol at a concentration of 5% and gelatin at 0.5 %were identified as optimal for further investigations. The mild local reactions observed after intranasal administration of gelatin were not clinically significant and did not affect the overall tolerability profile.

Table 1- Body weight, weight gain, and tolerability following sublingual administration

Component	Concentration (%)	Number of animals	Body weight Day 0 g mean ± SD	Body weight Day 10 g mean ± SD	Weight gain g mean ± SD	Weight gain % mean ± SD	Local tolerability score	Systemic clinical score
Mannitol	3	10	20,3 ± 0,2	21,8 ± 0,3	1,5 ± 0,3	7,4 ± 1,5	0	0
Mannitol	5	10	20,4 ± 0,2	22,1 ± 0,2	1,7 ± 0,3	8,3 ± 1,6	0	0
Mannitol	7	10	20,5 ± 0,2	22,3 ± 0,3	1,8 ± 0,3	8,8 ± 1,7	0	0
Gelatin	0,3	10	19,2 ± 0,2	21,6 ± 0,3	2,4 ± 0,4	12,5 ± 2,1	0	0

Gelatin	0,5	10	19,3 ± 0,2	21,9 ± 0,3	2,6 ± 0,4	13,5 ± 2,4	0	0
Gelatin	0,7	10	19,1 ± 0,2	21,8 ± 0,4	2,7 ± 0,5	14,1 ± 2,7	0	0
Phosphate buffered saline 0.01 M pH 7.2 -7.4	-	10	19,2 ± 0,1	20,9 ± 0,2	1,7 ± 0,2	8,9 ± 5,5	0	0
Water for injection	-	10	18,4 ± 0,3	20,1 ± 0,4	1,7 ± 0,6	9,5 ± 3,2	0	0
Control	-	10	19,2 ± 0,7	21,9 ± 0,3	2,7 ± 0,6	14,0 ± 3,8	-	0
A score of 0 indicates absence of local reactions including hyperemia, edema, or mucosal erosion and absence of systemic clinical manifestations including depression, reduced appetite, or behavioral changes. Scores from 1-3 indicate increasing severity of the reaction.								

Table 1 presents body weight dynamics, weight gain, and tolerability indicators of different concentrations of mannitol and gelatin, as well as phosphate buffered saline and water for injection, following sublingual administration. In all experimental groups, physiological body weight gain was observed throughout the 10 day observation period.

Local reactions at the level of the oral mucosa were absent or minimal, and no systemic clinical manifestations were recorded.

These findings indicate good local mucosal and systemic tolerability of all tested substances at the selected concentrations and route of administration.

Table 2- Body weight, weight gain, and tolerability following intranasal administration

Component	Concentration (%)	Number of animals	Body weight Day 0 g mean ± SD	Body weight Day 10 g mean ± SD	Weight gain g mean ± SD	Weight gain % mean ± SD	Local tolerability score	Systemic clinical score
Mannitol	3	10	20,4 ± 0,2	22,0 ± 0,3	1,6 ± 0,3	7,9 ± 1,5	0	0
Mannitol	5	10	20,5 ± 0,2	22,1 ± 0,3	1,6 ± 0,3	7,9 ± 1,5	0	0
Mannitol	7	10	20,6 ± 0,3	22,2 ± 0,3	1,6 ± 0,3	7,8 ± 1,6	0	0
Gelatin	0,3	10	19,2 ± 0,1	21,8 ± 0,7	2,6 ± 0,7	13,7 ± 3,7	1	0
Gelatin	0,5	10	19,2 ± 0,1	21,9 ± 0,6	2,7 ± 0,6	14,0 ± 3,5	1	0
Gelatin	0,7	10	19,3 ± 0,2	22,0 ± 0,7	2,7 ± 0,7	14,0 ± 3,6	1	0
Phosphate buffered saline 0.01 M pH 7.2-7.4	-	10	19,3 ± 0,1	21,9 ± 0,2	2,6 ± 0,2	13,6 ± 0,9	0	0
Water for injection	-	10	21,3 ± 0,2	22,5 ± 0,3	1,2 ± 0,3	5,8 ± 1,6	0	0
Control	-	10	19,2 ± 0,7	21,9 ± 0,3	2,7 ± 0,7	14,0 ± 3,8	-	0
A score of 0 indicates absence of local reactions including hyperemia, edema, or mucosal erosion and absence of systemic clinical manifestations including depression, reduced appetite, or behavioral changes. Scores from 1-3 indicate increasing severity of the reaction.								

Table 2 presents body weight dynamics, weight gain, and tolerability indicators of the investigated substances following intranasal administration. In all experimental groups, physiological body weight gain was observed throughout the 10 day observation period.

Mild local reactions at the level of the nasal mucosa were recorded only in individual animals in the groups receiving gelatin and were transient in nature. No systemic clinical manifestations were observed in any of the groups.

These findings indicate good local mucosal and systemic tolerability of the investigated components and technological media following intranasal administration.

Table 3- Biochemical blood parameters following sublingual administration

Component	Concentration (%)	Number of animals	ALT (U/L) M±SD	AST (U/L) M±SD	Total bilirubin (mg/dL) M±SD	Glucose (mmol/L) M±SD	Total protein (g/L) M±SD
Mannitol	3	10	45 ± 3	85 ± 5	0,12 ± 0,01	15,2 ± 1,0	52 ± 2
Mannitol	5	10	46 ± 4	87 ± 4	0,13 ± 0,02	15,5 ± 0,9	53 ± 2
Mannitol	7	10	47 ± 4	88 ± 6	0,12 ± 0,02	15,3 ± 1,1	52 ± 3
Gelatin	0,3	10	48 ± 3	90 ± 5	0,13 ± 0,01	15,6 ± 1,2	54 ± 2
Gelatin	0,5	10	46 ± 4	88 ± 5	0,12 ± 0,01	15,4 ± 1,0	53 ± 2
Gelatin	0,7	10	47 ± 5	89 ± 6	0,13 ± 0,02	15,5 ± 1,1	53 ± 3
Phosphate buffered saline 0.01 M pH 7.2-7.4	-	10	46 ± 3	87 ± 4	0,12 ± 0,01	15,4 ± 0,9	53 ± 2
Water for injection	-	10	45 ± 3	85 ± 5	0,12 ± 0,01	15,3 ± 1,0	52 ± 2
Control	-	10	46 ± 4	86 ± 5	0,12 ± 0,01	15,5 ± 1,0	53 ± 2

Table 3 presents the biochemical blood parameters of laboratory mice following sublingual administration of all investigated substances. The values of alanine aminotransferase activity, aspartate aminotransferase activity, total bilirubin, glucose, and total protein in all experimental groups remained within the reference ranges typical for laboratory mice.These findings indicate the absence of impaired liver function or disturbances in general metabolism and confirm good systemic tolerability of the investigated excipients, buffering medium, and technological solvent following sublingual administration.

Table 4- Biochemical blood parameters following intranasal administration

Component	Concentration (%)	Number of animals	ALT (U/L) M±SD	AST (U/L) M±SD	Total bilirubin (mg/dL) M±SD	Glucose (mmol/L) M±SD	Total protein (g/L) M±SD
Mannitol	3	10	46 ± 3	86 ± 5	0,13 ± 0,01	15,3 ± 1,0	52 ± 2
Mannitol	5	10	47 ± 4	88 ± 4	0,14 ± 0,01	15,6 ± 0,9	53 ± 2
Mannitol	7	10	48 ± 4	89 ± 6	0,13 ± 0,02	15,4 ± 1,1	52 ± 3
Gelatin	0,3	10	49 ± 3	91 ± 5	0,14 ± 0,01	15,7 ± 1,2	54 ± 2
Gelatin	0,5	10	47 ± 4	89 ± 5	0,13 ± 0,01	15,5 ± 1,0	53 ± 2
Gelatin	0,7	10	48 ± 5	90 ± 6	0,14 ± 0,02	15,6 ± 1,1	53 ± 3
Phosphate buffered saline 0.01 M pH 7.2-7.4	-	10	47 ± 3	88 ± 4	0,13 ± 0,01	15,5 ± 0,9	53 ± 2
Water for injection	-	10	46 ± 3	86 ± 5	0,13 ± 0,01	15,4 ± 1,0	52 ± 2
Control	-	10	47 ± 4	87 ± 5	0,13 ± 0,01	15,6 ± 1,0	53 ± 2

Table 4 presents the biochemical blood parameters of laboratory mice following intranasal administration of the investigated substances. In all experimental groups, the values of alanine aminotransferase activity, aspartate aminotransferase activity, total bilirubin, glucose, and total protein remained within the reference ranges typical for laboratory mice.

These findings indicate the absence of impaired liver function or disturbances in general metabolism and confirm good systemic tolerability of the investigated excipients, buffering medium, and technological solvent following intranasal administration.

Discussion

The results of the experiment demonstrate good local and systemic tolerability of the investigated components of the vaccine formulation including mannitol, gelatin, phosphate buffered saline, and water for injection following sublingual and intranasal administration in outbred white laboratory mice. Body weight gain remained within physiological limits, local reactions were minimal and transient, and no systemic clinical manifestations were observed. Biochemical blood parameters including alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, total bilirubin, glucose, and total protein corresponded to the control values of intact animals, indicating the absence of liver dysfunction or disturbances in general metabolism.

The mild local reactions observed after intranasal administration of gelatin are consistent with previously published studies [1-4], which describe the potential irritative activity of protein stabilizers following mucosal administration. The investigated components were administered once, the observation period lasted 10 days, and no morphological analysis of mucosal tissues was performed.

Despite these limitations, the findings confirm the safety of the investigated components and technological media at the stage of preclinical evaluation of vector vaccines based on an influenza virus platform.

Conclusion. The excipients of the vaccine formulation including mannitol and gelatin, as well as the buffering medium and technological solvent, demonstrate good local and systemic tolerability following sublingual and intranasal administration. Body weight gain remains within physiological limits, local reactions are minimal and transient, and systemic clinical manifestations are absent.

Based on the overall assessment, mannitol at a concentration of 5% and gelatin at 0.5% were identified as optimal for further investigations. The next stages of preclinical development include repeated administration, incorporation of the antigen component, and histological examination.

Funding. This study was supported by the Committee of Science of the Ministry of Science and Higher Education of the Republic of Kazakhstan under grant No. BR25293294 entitled Vaccine against brucellosis based on genomic technologies for the period 2024 to 2026.

Acknowledgements. The authors express their gratitude to the staff of the Laboratory for Prevention of Infectious Diseases for providing vaccine components and to the staff of the Laboratory for Technology and Biological Product Control for conducting the biochemical analyses. The study was carried out within the institutional research program of the Research Institute for Biological Safety Problems.

References

1. Gupta A., Eral H.B., Hatton T.A., Doyle P.S. Gelatin as vaccine stabilizer: a review // Biopolymers. - 2018. - Vol.109. - P. e23256.
2. Maa Y.F., Hsu C.C. Mannitol and other cryoprotectants in vaccine lyophilization // Journal of Pharmaceutical Sciences. - 2007. - Vol.96, No.5. - P.1212-1233.
3. Lee J.S., Nguyen M.T., Lee J.Y., Kim J.H., Kim S.H. Comparative evaluation of adjuvants in influenza vaccines // Frontiers in Immunology. - 2021. - Vol.12. - Article 645123.
4. Thigpen M.C., Mullen S., Stokes M., Tannenbaum S., Johnson D. Reference intervals for clinical chemistry in C57BL/6 mice // Journal of the American Association for Laboratory Animal Science. - 2019. - Vol.58, No.2. - P.123-130.

ВАКЦИНАЛЫҚ ПРЕПАРАТТЫҢ ҚОСАЛҚЫ КОМПОНЕНТТЕРІНІҢ ЗЕРТХАНАЛЫҚ АҚ ТЫШҚАНДАРДАҒЫ ТӨЗІМДІЛІГІ

Еспембетов Б.А.[1], Алпысбаева С.Е.[1], Сармыкова М.К. [1], Керимбаев А.А.[1], Әбдімұхтар А.Р.[1], Серікбай Е.Б.[1], Шораева К.А.[1], Асанжанова Н.Н.[1], Сырым Н.Н.[1], Шестаков А.Г.[2], Толеухан А.Т.[1], Анарбекова А.М.[1], Мауленбаева М.М.[1], Ержігіт Б.Б.[1], Абдықалық А.Ә.[1]

[1] «Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты» ЖШС, «QazBioPharm» ұлттық холдингі, Гвардейский, Қазақстан Республикасы

[2]П. А. Стотыпин атындағы Ульяновск мемлекеттік аграрлық университеті, Ульяновск қаласы, Ресей Федерациясы.

Аннотация. Бұл зерттеуде антигендік компонентсіз вакциналық композицияның құрамдас бөліктерінің интраназальды және сублингвальды енгізілуі кезінде зертханалық ақ тышқандарда

жергілікті және жүйелік төзімділігі бағаланды. Зерттеу нысандары ретінде вакциналық композицияның қосалқы компоненттері - әртүрлі концентрацияларда маннитол мен желатин, сондай-ақ вакциналық кандидаттарды әзірлеуде технологиялық компоненттер ретінде қолданылатын фосфатты-буферлі ерітінді және инъекциялық су пайдаланылды. Бақылау тобына интактты жануарлар енгізілді.

Төзімділігі 10 тәулік бойы жануарлардың клиникалық жағдайы, дене салмағының динамикасы және қанның негізгі биохимиялық көрсеткіштері бойынша бағаланды. Барлық зерттелген заттар жақсы тзімділік көрсетті: клиникалық мәні бар жергілікті немесе жүйелік жағымсыз реакциялар байқалмады, ал зерттелген биохимиялық көрсеткіштер референттік мәндер шегінде қалды. Параметрлердің жиынтық бағасы бойынша маннитолдың 5 % және желатиннің 0,5 % концентрациялары оңтайлы деп анықталды.Алынған нәтижелер зерттелген қосалқы және технологиялық компоненттердің қауіпсіздігін көрсетеді және оларды тұмау вирусы негізіндегі векторлық бруцеллезге қарсы вакциналар-кандидаттарының вакциналық композицияларын әзірлеудің доклиникалық кезеңінде қолдану мүмкіндігін негіздейді.

Түйінді сөздер: вакцина, вакциналық композиция, қосалқы компоненттер, желатин, маннитол, төзімділік, тышқандар.

ПЕРЕНОСИМОСТЬ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ ВАКЦИННОГО ПРЕПАРАТА У ЛАБОРАТОРНЫХ БЕЛЫХ БЕСПОРОДНЫХ МЫШЕЙ

Еспембетов Б.А.[1], Алпысбаева С.Е.[1], Сармыкова М.К. [1], Керимбаев А.А.[1], Әбдімұхтар А.Р.[1], Серікбай Е.Б.[1], Шораева К.А.[1], Асанжанова Н.Н.[1], Сырым Н.Н.[1], Шестаков А.Г.[2], Толеухан А.Т.[1], Анарбекова А.М.[1], Мауленбаева М.М.[1], Ержігіт Б.Б.[1], Абдықалық А.Ә.[1]

[1]ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», Национальный холдинг «QazBioPharm», Гвардейский, Республика Казахстан

[2]ФБГОУ «Ульяновский государственный аграрный университет имени П.А.Стотыпина», г. Ульяновск, Российская Федерация

Аннотация. В настоящем исследовании проведена оценка местной и системной переносимости компонентов вакцинной композиции в отсутствие антигенного компонента при их интраназальном и сублингвальном введении у белых беспородных лабораторных мышей. В качестве объектов исследования использовали вспомогательные компоненты вакцинной композиции - маннитол и желатин в различных концентрациях, а также фосфатно-буферный раствор и инъекционную воду, применяемые в качестве технологических компонентов при разработке вакцинных кандидатов. Контрольную группу составляли интактные животные.

Переносимость оценивали в течение 10 суток по показателям клинического состояния животных, динамики массы тела и основным биохимическим параметрам крови. Установлено, что все исследованные вещества характеризовались хорошей переносимостью: клинически значимые местные и системные реакции отсутствовали, а исследуемые биохимические показатели крови не выходили за пределы референтных значений. По совокупности оцениваемых параметров оптимальными были признаны маннитол в концентрации 5 % и желатин в концентрации 0,5 %.Полученные результаты свидетельствуют о безопасности исследованных вспомогательных и технологических компонентов и подтверждают возможность их применения на доклиническом этапе разработки вакцинных композиций векторных противобруцеллезных вакцин-кандидатов на основе вируса гриппа.

Ключевые слова: вакцина, вакцинная композиция, вспомогательные компоненты, желатин, маннитол, переносимость, мыши.

МРНТИ: 61.45.15, 62.13.00, 62.41.00 **DOI: 10.58318/2957-5702-2025-24-29-34**
Оригинальная статья

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ЧИСТЫХ ПОМЕЩЕНИЙ ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ СТЕРИЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Есимбекова Н.Б.*, Шериаздан Г.Қ., Кераматдинова А.М., Дуйсенбаев Б.Д., Мырзахан С.М., Кубыр С.С., Курмантай А.М., Ершебулов З.Д.

ТОО «OtarBioPharm», Гвардейский, Республика Казахстан
*nazym.esimbekova@mail.ru

Аннотация. В работе представлены результаты оценки микробиологического состояния чистых помещений при промышленном производстве вакцины против ящура в условиях асептического процесса. Исследования проводились в зонах классов А и В в период 2024-2025 гг. Проанализировано более 1800 проб воздуха, поверхностей оборудования и технологической одежды персонала. Микробная контаминация воздуха и производственных поверхностей не выявлена. В 1,9% проб, отобранных с одежды и перчаток персонала, обнаружены единичные микроорганизмы в пределах допустимых нормативных значений. Полученные данные свидетельствуют о стабильности асептических условий и контролируемости производственной среды.

Ключевые слова: чистые помещения, асептическое производство, стерильные препараты, производственная среда, контаминация, вакцина против ящура.

Введение

Обеспечение стерильности является критически важным требованием при производстве парентеральных лекарственных средств и иммунобиологических препаратов. Нарушение микробиологической чистоты производственной среды может привести к контаминации продукции, снижению её безопасности и потенциальным рискам для потребителя. В связи с этим контроль состояния чистых помещений рассматривается как один из ключевых элементов системы качества на фармацевтическом предприятии [1, 2].

Асептическое производство, при котором отсутствует этап терминальной стерилизации готового продукта, предъявляет особенно строгие требования к состоянию окружающей среды. В подобных процессах стерильность достигается не последующей обработкой продукции, а поддержанием контролируемых параметров производственной среды на всех стадиях технологического цикла [3, 4].

Источниками микробного загрязнения могут выступать воздух помещений, поверхности оборудования, материалы, а также персонал, присутствующий в чистых зонах. Наибольший вклад в формирование микробной нагрузки, согласно литературным данным, вносит человеческий фактор, поскольку микроорганизмы постоянно выделяются с поверхности кожи и одежды даже при соблюдении регламентированных санитарных процедур [5].

Международные стандарты надлежащей производственной практики (GMP) устанавливают обязательность регулярной оценки микробиологического состояния чистых помещений с целью подтверждения соответствия установленным классам чистоты и своевременного выявления возможных отклонений [6, 7]. Такой контроль позволяет оценивать эффективность санитарных мероприятий, корректность поведения персонала и стабильность асептического процесса.

В условиях промышленного выпуска вакцины против ящура, осуществляемого в зонах классов А и В, поддержание стабильных показателей чистоты производственной среды имеет принципиальное значение для обеспечения качества и безопасности готового препарата.

Материалы и методы

Исследование выполнялось в 2024-2025 гг. на производственном участке, функционирующем в соответствии с требованиями GMP. Контроль осуществлялся в чистых помещениях №101, №97 и №86, отнесённых к классам чистоты А и В и предназначенных для проведения асептических операций.

В программу наблюдений были включены следующие объекты: воздушная среда, контактные

поверхности технологического оборудования, элементы специальной одежды и перчатки операторов, а также упаковочные материалы. Общий объём выборки составил более 1800 проб.

Оценку состояния воздушной среды проводили методом пассивной седиментации с использованием чашек Петри, содержащих мясопептонный агар (для выявления бактериальной микрофлоры) и агар Сабуро (для обнаружения дрожжевых и плесневых грибов). Экспозицию чашек осуществляли в контрольных точках в течение установленного регламентом времени с последующей инкубацией при (37 ± 1) °C и (25 ± 1) °C соответственно.

Контроль поверхностей оборудования и элементов специальной одежды выполняли методом смывов стерильными тампонами, предварительно обработанными изотоническим раствором. Состояние перчаток оценивали методом контактных отпечатков на поверхности плотных питательных сред.

Испытания упаковочных материалов проводили в соответствии с фармакопейными требованиями к стерильности. Образцы инкубировали в течение 14 суток при температурных режимах, предусмотренных нормативной документацией.

Дополнительно осуществляли контроль аэрозольной чистоты воздуха с применением счётчика частиц, регистрируя концентрацию частиц различных размерных фракций для подтверждения соответствия заявленному классу чистоты.

После завершения инкубации выполняли подсчёт колониеобразующих единиц (КОЕ). Полученные значения сопоставляли с установленными предельными нормативами для помещений классов А и В.

Результаты

В ходе исследования проведена комплексная оценка микробиологического состояния чистых помещений классов А и В при промышленном производстве вакцины против ящура. Мониторинг охватывал воздушную среду, контактные поверхности технологического оборудования, санитарное состояние персонала, а также показатели аэрозольной чистоты.

Обобщённые нормативные и фактические показатели представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Нормативные и фактические показатели микробиологического мониторинга чистых помещений

Объект контроля	Метод контроля	Нормативное значение (класс А/В) *	Фактическое значение
Воздух	Седиментационный метод	≤ 1 КОЕ/чашку (А), ≤ 5 КОЕ/чашку (В)	0 КОЕ
Поверхности оборудования	Смывы	≤ 1 КОЕ/25 см² (А), ≤ 5 КОЕ/25 см² (В)	0 КОЕ
Перчатки персонала	Отпечатки	≤ 1 КОЕ/перчатку (А), ≤ 5 КОЕ/перчатку (В)	0-5 КОЕ
Технологическая одежда	Смывы	≤ 5 КОЕ/образец	0-5 КОЕ
*согласно требованиям GMP и международных стандартов чистых помещений			

Анализ результатов показал отсутствие микробного роста в пробах воздуха на протяжении всего исследуемого периода. Данный показатель свидетельствует о стабильности функционирования систем вентиляции и фильтрации, поддержании установленных перепадов давления и корректной организации воздушных потоков в чистых зонах.

Исследование смывов с технологического оборудования и рабочих поверхностей также не выявило микробной обсеменённости. Полученные данные подтверждают эффективность процедур очистки и дезинфекции, а также соблюдение регламентов санитарной подготовки производственных помещений.

При оценке санитарного состояния персонала проанализировано 216 образцов, отобранных с технологической одежды и перчаток. В 98,1% случаев микробный рост отсутствовал. В 1,9% проб зарегистрированы единичные колонии (3-5 КОЕ), что не превышало допустимые нормативные значения для соответствующих классов чистоты. Выявленные показатели носят единичный характер и отражают контролируемый уровень микробной нагрузки, связанной с человеческим фактором.

Контроль аэрозольной чистоты подтвердил соответствие концентрации механических частиц установленным требованиям для классов А и В, что дополнительно характеризует стабильность инженерных систем и эффективность функционирования чистых зон.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о соответствии фактических показателей микробиологического мониторинга установленным нормативным требованиям и подтверждают устойчивость санитарного состояния производственной среды при промышленном выпуске стерильной вакцины.

Обсуждение

Обеспечение микробиологической безопасности асептического производства должно рассматриваться не только как регистрация фактических показателей чистоты, но и как система управления критическими контрольными точками (ККТ), способными повлиять на стерильность продукции. В фармацевтическом и биотехнологическом производстве к таким точкам относятся процессы отбора проб, контроль качества питательных сред, функционирование стерилизующего оборудования, подготовка воздуха и воды, эффективность очистки и дезинфекции поверхностей, управление отходами, а также состояние здоровья и подготовка персонала [6-8].

Полученные в исследовании данные свидетельствуют о стабильности санитарного состояния производственной среды, что указывает на корректную организацию данных критических процессов. В частности, отсутствие микробного роста в воздушной среде и на поверхностях технологического оборудования подтверждает системность контроля инженерных коммуникаций и эффективность программ санитарной обработки помещений, что согласуется с данными о значении воздухообмена и фильтрации в чистых помещениях [9].

Существенное значение для достоверности микробиологических показателей имеет корректность отбора проб. Разработка статистически обоснованного плана отбора с учётом зон наибольшего риска (участки с высокой вероятностью контаминации, труднодоступные для дезинфекции поверхности, зоны интенсивной производственной активности) позволяет минимизировать вероятность ошибочных решений при оценке санитарного состояния [8]. В исследуемом производстве мониторинг охватывал ключевые асептические зоны классов А и В, что соответствует риск-ориентированному подходу, рекомендованному нормативными документами [6].

Отдельного внимания заслуживает контроль качества питательных сред. Проверка их ростовых свойств и стерильности является обязательным условием достоверности полученных результатов. В современных исследованиях также рассматриваются методы оптимизации питательных сред, включая многофакторный анализ, что подтверждает актуальность системного подхода к данной критической точке [10].

Наибольший эпидемиологический риск в чистых помещениях традиционно связан с персоналом. Организм человека является носителем разнообразной микробиоты, и даже при строгом соблюдении требований гигиены полностью исключить выделение микроорганизмов невозможно [1, 5]. Это подчёркивает необходимость регулярного обучения сотрудников и контроля соблюдения асептических процедур [4].

Таким образом, представленные результаты следует рассматривать как подтверждение функционирования комплексной системы контроля, включающей управление критическими точками, риск-ориентированный подход к мониторингу и постоянное совершенствование производственных процедур в соответствии с требованиями нормативных документов [4, 6, 11].

Заключение

Проведённое исследование подтвердило устойчивость санитарно-гигиенических параметров чистых помещений, используемых при промышленном производстве вакцины против ящура в асептических условиях. Полученные данные свидетельствуют о стабильности функционирования инженерных систем, корректности организации производственного процесса и достаточности действующих регламентов санитарного контроля.

Единичные случаи выявления микроорганизмов на элементах технологической одежды и перчатках персонала не сопровождались превышением нормативных значений и носили управляемый характер.

Результаты работы подтверждают эффективность реализованной системы микробиологического мониторинга как инструмента обеспечения качества и биологической безопасности стерильных иммунобиологических препаратов в условиях промышленного производства.

Финансирование: Работа выполнена без привлечения дополнительного внешнего финансирования в рамках плановой производственной деятельности отдела контроля качества.

Благодарности: Авторы выражают благодарность сотрудникам Производственного цеха, Отдела обеспечения качества и Научно-технического отдела за содействие при проведении контроля

технологического процесса производства.

Конфликт интересов: Авторы заявляют, что работа проведена в рамках профессиональной деятельности, и обстоятельства, способные повлиять на объективность представленных результатов, отсутствуют.

Литература

1. Кусниева А.Е., Азембаев А.А. Факторы, влияющие на производственные процессы производства лекарственных средств // Вестник КазНМУ. 2013. № 5 (3).

2. Бабаева Е.В., Орлова Д.А. Микробиологический контроль как инструмент обеспечения качества в производстве лекарственных средств // Современное состояние экономических систем: управление, развитие, безопасность: сб. науч. тр. IV Междунар. науч.-практ. конф. Тверь, 2023. Тверь: ТвГТУ, 2024. С. 154–159

3. Кулишкин М.Э. Риски, возникающие при работе в чистом помещении (гермозоне) // Вестник науки. 2022. № 1 (46). Т. 4.

4. ГОСТ Р ИСО 14644-2-2001. Чистые помещения и связанные с ними контролируемые среды. Часть 2. Требования к контролю и мониторингу. М.: Стандартинформ, 2001.

5. Гаврюшин С.О. Основы поведения персонала в чистых помещениях // Вестник науки. 2025. № 10 (91). Т. 1. С. 486–499.

6. Азембаев А.А. Основные критерии чистого помещения согласно требованиям стандарта GMP // Международный научно-исследовательский журнал. 2016. № 3 (45). DOI: 10.18454/IRJ.2016.45.010.

7. Богданова О.Ю., Черных Т.Ф., Буковская Ю.А. Аспекты микробиологического мониторинга производственной среды на фармацевтических и биотехнологических производствах // Формулы Фармации. 2024. Т. 6, № 2. С. 10–17.

8. Азембаев А.А., Тулегенова А.Р., Курманалиева А.Р. Создание чистых помещений на примере опытного производства научного центра // Вестник КазНМУ. 2013. № 3 (2).

9. Глухова И.В. Воздухообмен в чистых помещениях // Вестник науки и образования. 2018. № 12 (48).

10. Zhou T., Reji R., Kairon R.S., Chiam K.H. A review of algorithmic approaches for cell culture media optimization // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 2023. Vol. 11. 1195294. DOI: 10.3389/fbioe.2023.1195294.

11. Белых А.А., Василенко М.И. Микробиологический контроль в условиях производства лекарственных средств // Актуальные аспекты и перспективы развития современной биотехнологии: сб. докл. Всерос. науч. конф. Белгород, 2023. С. 26–29.

References

1. Kusnieva A.E., Azembaev A.A. (2013) Faktory, vliyayushchie na proizvodstvennye protsessy proizvodstva lekarstvennykh sredstv [Factors affecting production processes of medicinal products]. Vestnik KazNMU, no. 5 (3).

2. Babaeva E.V., Orlova D.A. (2023) Mikrobiologicheskii kontrol kak instrument obespecheniya kachestva v proizvodstve lekarstvennykh sredstv [Microbiological control as a tool for quality assurance in pharmaceutical manufacturing]. In: Sovremennoe sostoyanie ekonomicheskikh sistem: upravlenie, razvitie, bezopasnost: sbornik nauchnykh trudov IV Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii [Current state of economic systems: management, development, security: Proceedings of the IV International scientific and practical conference]. Tver: Tver State Technical University, 2024, pp. 154-159.

3. Kulishkin M.E. (2022) Riski, voznikayushchie pri rabote v chistom pomeshchenii (germozone) [Risks arising when working in a clean room (clean zone)]. Vestnik nauki, no. 1 (46), vol. 4.

4. GOST R ISO 14644-2-2001 (2001) Chistye pomeshcheniya i svyazannye s nimi kontroliruemye sredy. Chast 2. Trebovaniya k kontrolyu i monitoringu [Cleanrooms and associated controlled environments. Part 2. Requirements for testing and monitoring]. Moscow: Standartinform.

5. Gavryushin S.O. (2025) Osnovy povedeniya personala v chistykh pomeshcheniyakh [Fundamentals of personnel behavior in cleanrooms]. Vestnik nauki, no. 10 (91), vol. 1, pp. 486-499.

6. Azembaev A.A. (2016) Osnovnye kriterii chistogo pomeshcheniya soglasno trebovaniyam standarta GMP [Basic cleanroom criteria according to GMP requirements]. Mezhdunarodnyi nauchno-issledovatelskii zhurnal, no. 3 (45). DOI: 10.18454/IRJ.2016.45.010.

7. Bogdanova O.Yu., Chernykh T.F., Bukovskaya Yu.A. (2024) Aspekty mikrobiologicheskogo monitoringa proizvodstvennoi sredy na farmatsevticheskikh i biotekhnologicheskikh proizvodstvakh [Aspects of microbiological monitoring of the production environment in pharmaceutical and biotechnological manufacturing]. Formuly Farmatsii, vol. 6, no. 2, pp. 10-17.

8. Azembaev A.A., Tulegenova A.R., Kurmanalieva A.R. (2013) Sozdanie chistykh pomeshchenii na primere opytnogo proizvodstva nauchnogo tsentra [Creation of cleanrooms on the example of pilot production at a research center]. Vestnik KazNMU, no. 3 (2).

9. Glukhova I.V. (2018) Vozdukhoobmen v chistykh pomeshcheniyakh [Air exchange in cleanrooms]. Vestnik nauki i obrazovaniya, no. 12 (48).

10. Zhou T., Reji R., Kairon R.S., Chiam K.H. (2023) A review of algorithmic approaches for cell culture media optimization. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, vol. 11, 1195294. DOI: 10.3389/fbioe.2023.1195294.

11. Belykh A.A., Vasilenko M.I. (2023) Mikrobiologicheskii kontrol v usloviyakh proizvodstva lekarstvennykh sredstv [Microbiological control under pharmaceutical manufacturing conditions]. In: Aktualnye aspekty i perspektivy razvitiya sovremennoi biotekhnologii: sbornik dokladov Vserossiiskoi nauchnoi konferentsii [Current aspects and prospects for the development of modern biotechnology: Proceedings of the All-Russian scientific conference]. Belgorod, pp. 26-29.

СТЕРИЛЬДІ ПРЕПАРАТТАРДЫ ӨНДІРУ КЕЗІНДЕГІ ТАЗА ҮЙ-ЖАЙЛАРДЫҢ МИКРОБИОЛОГИЯЛЫҚ МОНИТОРИНГІ

Есимбекова Н.Б.*, Шериаздан Г.Қ., Кераматдинова А.М., Дуйсенбаев Б.Д., Мырзахан С.М., Кубыр С.С., Курмантай А.М., Ершебулов З.Д.
«OtarBioPharm» ЖШС, Гвардейский, Қазақстан Республикасы
*nazym.esimbekova@mail.ru

Аннотация. Жұмыста асептикалық процесс жағдайында аусылға қарсы вакцинаны өнеркәсіптік өндіру кезінде таза үй-жайлардың микробиологиялық жағдайын бағалау нәтижелері ұсынылған. Зерттеулер 2024–2025 жылдар аралығында А және В класты аймақтарда жүргізілді. Ауадан, жабдықтар беттерінен және персоналдың технологиялық киімдерінен алынған 1800-ден астам сынама талданды. Ауада және өндірістік беттерде микробтық контаминация анықталған жоқ. Персоналдың киімі мен қолғаптарынан алынған сынамалардың 1,9%-ында рұқсат етілген нормативтік шектерде жекелеген микроорганизмдер анықталды. Алынған деректер асептикалық жағдайлардың тұрақтылығын және өндірістік ортаның бақыланатындығын көрсетеді.

Түйінді сөздер: таза үй-жайлар, асептикалық өндіріс, стерильді препараттар, өндірістік орта, контаминация, аусылға қарсы вакцина.

MICROBIOLOGICAL MONITORING OF CLEANROOMS IN THE PRODUCTION OF STERILE PRODUCTS

Yesimbekova N.B., Sheriazdan G.K., Keramatdinova A.M., Duisenbayev B.D., Myrzakhan S.M., Kubyr S.S., Kurmantai A.M., Ershebulov Z.D.
LLP “OtarBioPharm”, Guardeyskiy, Republic of Kazakhstan
*nazym.esimbekova@mail.ru

Abstract. The study presents the results of microbiological assessment of cleanrooms during the industrial production of foot-and-mouth disease vaccine under aseptic processing conditions. The investigations were conducted in Grade A and B areas during 2024–2025. More than 1,800 samples of air, equipment surfaces, and personnel gowning were analyzed. No microbial contamination was detected in air or on production surfaces. In 1.9% of samples taken from personnel garments and gloves, single microorganisms were identified within acceptable regulatory limits. The obtained data indicate the stability of aseptic conditions and the controlled state of the production environment.

Keywords: cleanrooms, aseptic manufacturing, sterile products, production environment, contamination, foot-and-mouth disease vaccine.

МРНТИ 68.41.33 **DOI: 10.58318/2957-5702-2025-24-34-43**
Түпнұсқа мақала

RHODOCOCCUS EQUI ШТАММЫНЫҢ pVapA ПЛАЗМИДІН ЕШКІГЕ ЖҰҚТЫРҒАННАН КЕЙІНГІ ГЕМАТОЛОГИЯЛЫҚ КӨРСЕТКІШТЕР

Г.Д. Ильгекбаева*, Б.К. Отарбаев, С.Курман, М.З. Занилабдин, У. Жолдас, А.М. Кадеев, Б.А. Валиева

“Қазақ ұлттық аграрлық зерттеу университеті” КЕАҚ, Алматы қ., Қазақстан
*gulnaz66@mail.ru

Аннотация. Зерттеуде Заанен тұқымды 2–3 айлық ешкілерге вирулентті pVapA-оң *Rhodococcus equi* штаммдарын енгізгеннен кейінгі гематологиялық көрсеткіштердің уақыттық динамикасы бағаланды. 0–65 күн аралығында гемоглобин (Hb), эритроциттер (RBC), лейкоциттер (WBC), гематокрит (HCT), MCV, MCH, MCHC және RDW көрсеткіштері бақылау тобымен салыстырылып талданды. Жалпы алғанда, негізгі уақыт нүктелерінде топтар арасында тұрақты статистикалық мәнді айырмашылықтар анықталмады. Hb бойынша тек VapA-108 тобында 65-күні бақылаумен салыстырғанда төмендеу байқалды (p=0,033), алайда әр топтағы жануар санының аз болуы (n=3) бұл нәтижені сақтықпен түсіндіруді талап етеді. 95% сенімділік интервалдарының кеңдігі мен вариация коэффициенттерінің жоғары болуы жеке вариабельділіктің айқын екенін көрсетті. Алынған деректер ешкі моделінде pVapA-оң *R. equi* штаммдары айқын, тұрақты жүйелік гематологиялық ауытқулардан гөрі әлсіз және ауыспалы жауап туғызғанын көрсетеді.

Түйін сөздер: Rhodococcus equi, pVapA, лейкоциттер, эритроциттер, гемоглобин, қабыну реакциясы, ешкі моделі.

Кіріспе

Rhodococcus equi – факультативті жасушаішілік патоген; ол көбіне жас жануарларда, әсіресе құлындарда, іріңді-гранулематозды пневмония және жүйелік қабыну процестерімен сипатталатын инфекция туғызады [1, 2]. Қоздырғыштың вируленттілігі көп жағдайда плазмидамен кодталатын *virulence-associated proteins* (Vap) жүйесімен байланысты. Соның ішінде pVapA-плазмидасы бар штаммдар макрофаг ішінде сақталып, фаголизосомалық жетілуді бұзып, инфекциялық процестің ұзақ жүруіне ықпал етеді [3, 4].

Вирулентті pVapA-оң *R. equi* штаммдарының әсерін тәжірибелік модельде бағалау инфекцияға организмнің жүйелік жауабын уақыт бойынша сипаттауға мүмкіндік береді. Мұндай тәсіл жұқтырудан кейінгі ерте, аралық және кеш кезеңдердегі гематологиялық өзгерістерді бірізді түрде бақылауға, сондай-ақ қабыну белгілерінің айқындылығын бағалауға қолайлы.

Гематологиялық көрсеткіштер инфекциялық процестің жүйелік көрінісін сипаттайтын қолжетімді және ақпаратты маркерлер қатарына жатады [5]. Лейкоциттер деңгейінің өзгеруі қабыну белсенділігін жанама көрсетсе, Hb, RBC және HCT көрсеткіштері эритронның күйін бағалауға мүмкіндік береді. Ал MCV, MCH, MCHC және RDW эритроцит популяциясының құрылымдық ерекшеліктерін нақтылауға көмектеседі. Ешкі моделі физиологиялық бақылауға ыңғайлы болғандықтан, ол *R. equi* штаммдарының жүйелік әсерін бағалауда қолданбалы маңызға ие [6, 7].

Ешкі – ауыл шаруашылығында кең таралған, физиологиясы жақсы сипатталған және қан көрсеткіштері арқылы жүйелік жауапты мониторингілеуге қолайлы жануар моделі. Сонымен қатар, нақты жоспарланған уақыттық бақылау (longitudinal monitoring) инфекцияның ерте, аралық және кеш кезеңдерін салыстыруға мүмкіндік береді [8].

Осы зерттеудің мақсаты – вирулентті pVapA-оң *Rhodococcus equi* штаммдарымен эксперименттік жұқтырылған ешкілердегі гематологиялық көрсеткіштердің 0–65 күн аралығындағы динамикасын сипаттап, оны бақылау тобымен салыстыру.

Материалдар мен әдістер

Зерттеу дизайны және жануарлар. Экспериментке клиникалық сау, 2–3 айлық, Заанен тұқымды 12 ешкі алынды. Жануарлар стандартты азықтандыру және суару жағдайында ұсталып,

төрт топқа бөлінді: VapA-107 (*n*=3), VapA-108 (*n*=3), VapA-109 (*n*=3) және бақылау (*n*=3). Эксперименттік топтардың құрамы 1-кестеде берілген.

Кесте 1 – Эксперименттік дизайн және жануарларды топтау

Топ	Жеке сәйкестендіру нөмірі		Плазмид, доза
Бірінші	KZj200496314		VapA-10^7
	KZj200496372		VapA-10^7
	KZj200496388		VapA-10^7
Екінші	KZj200496381		VapA-10^8
	KZj200496383		VapA-10^8
	KZj200496390		VapA-10^8
Үшінші	KZj200496375		VapA-10^9
	KZj200496385		VapA-10^9
	KZj200496395		VapA-10^9
Төртінші	KZj200496310		Бақылау
	KZj200496366		Бақылау
	KZj200496380		Бақылау

Зерттелген штаммдар және өсіру жағдайы. Экспериментте вирулентті pVapA-оң *Rhodococcus equi* штаммдары (VapA-107, VapA-108, VapA-109) қолданылды. Штаммдар триптон-соялы агарда 37 °C температурада 24–48 сағат өсірілді. Өскіндердің морфологиясы макроскопиялық бағаланды, ал жағынды-препараттар Грам әдісімен боялып, грамоң коккобацилл/таяқша тәрізді морфологиясы расталды.

Жұқтырғыш езінді дайындау және жұқтыру. Бактериялық суспензия стерильді физиологиялық ерітіндіде дайындалып, микроорганизмдер саны бірізді сұйылтулар арқылы 10^7, 10^8 және 10^9 деңгейіне дейін жеткізілді. Әр эксперименттік топқа тиісті штаммның 7 мл суспензиясы мойын күре тамыры арқылы бір рет енгізілді. Бақылау тобы жұқтырылған жоқ.

Қан алу және үлгілерді дайындау. Қан үлгілері жұқтыруға дейін (0-күн) және жұқтырудан кейін 4, 7, 11, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 және 65-күндері алынды. Үлгілер EDTA-K2 вакуумдық түтікшелеріне жиналып, 2 сағат ішінде зертханаға жеткізілді.

Гематологиялық зерттеу аспабы және көрсеткіштер. Жалпы қан талдауы автоматтандырылған ветеринариялық гематологиялық анализаторда (*Mindray BC-2800Vet, Mindray, Қытай*) орындалды. Зерттеуде WBC, RBC, Hb, HCT, MCV, MCH, MCHC және RDW көрсеткіштері талданды. Барлық нәтижелер Mean±SD (*n*=3) түрінде беріліп, әр топ үшін 95% сенімділік интервалдары мен вариация коэффициенті есептелді.

Көрсеткіштер бірліктері мынадай түрде ұсынылды: Hb – г/л, RBC – $\times10^{12}$/л, WBC – $\times10^9$/л, HCT – %, MCV – fL, MCH – pg, MCHC – г/л, RDW – %.

Статистикалық талдау. Деректер әр топ үшін орташа мән ± стандарттық ауытқу түрінде берілді. Қосымша сипаттамалық көрсеткіштер ретінде вариация коэффициенті (CV, %) және 95% сенімділік интервалдары есептелді. Эксперименттік және бақылау топтары арасындағы айырмашылықтар уақыт нүктелері бойынша салыстырылып, $p<0,05$ деңгейі статистикалық мәнді деп қабылданды.

Этикалық аспект. Жануарларға жүргізілген барлық процедуралар биоқауіпсіздік талаптарын сақтай отырып орындалды және жануарларға қатыгездік жасамау қағидаларына сәйкес ұйымдастырылды. Бұл зерттеу бойынша мекемелік биоэтика комиссиясының хаттамасы (№3, 14.03.2025). Манипуляциялар кезінде жануардың стрессін азайту, асептика-антисептика талаптарын сақтау және қажет болған жағдайда ауырсынуды басу шаралары қарастырылды.

Нәтижелер

Гемоглобин (Hb) көрсеткіші қанның оттегін тасымалдау әлеуетін сипаттайтын негізгі параметрлердің бірі болғандықтан, оның динамикасы RBC және HCT нәтижелерімен бірге кешенді түрде бағаланды (2-кесте). Бастапқы 0-күні VapA-10^7 тобында Hb деңгейі 105,67±16,04 г/л, ал бақылау тобында 100,67±4,73 г/л болды, яғни тәжірибе басталғанға дейін топтар арасында айқын алшақтық байқалмады. 7-күні VapA-10^7 тобында Hb 107,67±15,63 г/л деңгейінде сақталып, бақылау тобындағы 108,67±4,04 г/л көрсеткішіне өте жақын болды. Алайда 65-күні VapA-10^7 тобында Hb

93,00±16,64 г/л-ге дейін төмендеді, ал бақылау тобында бұл көрсеткіш 116,33±5,51 г/л болды.

Топаралық салыстыру нәтижесінде VapA-10^7 тобында 7 және 65-күндері статистикалық мәнді айырмашылық анықталмады (тиісінше p=0,923 және p=0,125). VapA-10^8 тобында 7-күні Hb төмендеуге бейім болғанымен, бұл айырмашылық шектік деңгейде қалып (p=0,083), 65-күні бақылау тобымен салыстырғанда статистикалық мәнді төмендеу тіркелді (p=0,033). VapA-10^9 тобында да 65-күні Hb төмендеу үрдісі байқалғанымен, ол статистикалық мәнге жеткен жоқ (p=0,064). Осылайша, Hb динамикасы бойынша барлық топтарда бірдей бағытталған әрі тұрақты өзгеріс байқалмады; тек VapA-10^8 тобында кеш кезеңде айқын төмендеу анықталды. Сонымен қатар сенімділік интервалдарының кеңдігі мен вариация коэффициенттерінің жоғары болуы жеке жануарлар арасындағы айырмашылықтардың елеулі екенін көрсетті.

Кесте 2 – Ешкі қанындағы гемоглобин (Hb) динамикасы

Күн, тәулік	VapA-10^7	VapA-10^8	VapA-10^9	Бақылау
0	105.67±16.04	98.00±6.00	107.00±8.19	100.67±4.73
4	110.00±12.49	102.00±9.54	120.50±9.19	110.00±5.20
7	107.67±15.63	99.33±5.51	106.00±14.53	108.67±4.04
11	107.00±14.53	95.67±7.09	105.67±11.50	107.33±3.51
14	102.00±10.00	95.33±7.77	106.00±11.53	102.00±2.00
21	111.67±9.24	102.67±9.29	109.67±11.02	106.67±7.23
28	102.33±15.57	95.00±4.36	104.33±15.04	104.00±3.46
35	114.67±16.44	110.67±5.51	112.33±10.79	115.67±10.50
42	104.33±18.50	103.33±5.86	106.33±16.26	113.67±5.77
49	104.33±16.86	103.00±3.00	108.67±13.05	114.67±9.07
56	110.67±21.94	111.33±2.52	105.50±7.78	118.33±6.03
65	93.00±16.64	99.67±0.58	101.33±8.08	116.33±5.51

Эритроциттер саны (RBC) эритрон жүйесінің жалпы күйін сипаттайтын маңызды көрсеткіш ретінде бағаланды (3-кесте). Бастапқы 0-күні VapA-10^7 тобында RBC 3,17±0,99×10^{12}/л, ал бақылау тобында 2,56±0,89×10^{12}/л болды. 7-күні VapA-10^7 тобында бұл көрсеткіш 3,27±0,97×10^{12}/л болып, бақылаудағы 2,75±0,67×10^{12}/л деңгейіне жақын сақталды. 65-күні VapA-10^7 тобында RBC 2,47±0,94×10^{12}/л-ге дейін төмендегенімен, бақылау тобында 2,72±0,84×10^{12}/л деңгейінде болды.

Welch t-тесті бойынша VapA-10^7 тобында 7 және 65-күндері бақылау тобымен салыстырғанда статистикалық мәнді айырмашылық байқалмады (p=0,492 және p=0,749). Сол сияқты VapA-10^8 және VapA-10^9 топтарында да 7 және 65-күндері барлық салыстыруларда p>0,05 болды. Бұл pVapA-оң штаммдармен эксперименттік жұқтыру эритроциттер санына айқын және тұрақты әсер етпегенін көрсетеді. Дегенмен кейбір топтарда уақыт соңына қарай төмендеу тенденциясының байқалуы инфекциялық процестің жекелеген жануарларда әлсіз ықпал етуі мүмкін екенін жоққа шығармайды.

Кесте 3 – Ешкі қанындағы эритроциттер (RBC) динамикасы

Күн, тәулік	VapA-10^7	VapA-10^8	VapA-10^9	Бақылау
0	3.17±0.99	2.44±0.41	3.30±1.07	2.56±0.89
4	3.31±0.92	2.48±0.53	3.67±0.74	2.88±0.82
7	3.27±0.97	2.46±0.49	3.16±1.09	2.75±0.67
11	3.47±0.66	2.41±0.39	3.11±0.87	2.97±0.83
14	3.27±0.83	2.34±0.26	3.24±1.05	2.63±0.55
21	3.23±0.82	2.42±0.33	2.91±0.65	2.89±1.04
28	2.87±0.56	2.25±0.46	2.82±0.93	2.54±0.57
35	3.46±1.06	2.74±0.33	3.09±0.80	2.89±0.34
42	2.99±0.86	2.61±0.14	2.96±0.98	2.94±0.86
49	3.10±1.12	2.53±0.43	3.08±1.00	2.81±0.36
56	3.12±1.12	2.81±0.29	2.62±0.39	3.12±0.92
65	2.47±0.94	2.22±0.27	2.49±0.60	2.72±0.84

Лейкоциттер (WBC) деңгейі жүйелік қабыну мен инфекциялық белсенділіктің жанама маркері

ретінде қарастырылды (4-кесте). 0-күні VapA-10^7 тобында WBC 8,94±1,73×10^9/л, ал бақылау тобында 9,60±0,57×10^9/л болды. 7-күні VapA-10^7 тобында WBC 8,76±2,06×10^9/л, бақылауда 9,25±1,67×10^9/л тіркелді. 65-күні VapA-10^7 тобында WBC 8,65±1,89×10^9/л болып, бақылау тобындағы 11,00±0,75×10^9/л көрсеткішінен төмен болды.

Топаралық салыстыру нәтижелері бойынша VapA-10^7 тобы үшін 7 және 65-күндері айырмашылық статистикалық мәнге жеткен жоқ (p=0,766 және p=0,152). VapA-10^8 және VapA-10^9 топтарында да негізгі уақыт нүктелерінде мәнді айырмашылық байқалмады (p>0,05). Сонымен бірге жекелеген кезеңдерде VapA-10^8 және VapA-10^9 топтарында жоғарырақ WBC мәндері тіркелгені байқалды, бірақ бұл өзгерістер тұрақты сипат алмады. Жалпы алғанда, алынған деректер айқын жүйелік лейкоцитозбен сипатталатын күшті қабыну синдромын емес, әлсіз немесе ауыспалы гематологиялық жауапты көрсетеді.

Кесте 4 – Ешкі қанындағы лейкоциттер (WBC) динамикасы

Күн, тәулік	VapA-10^7	VapA-10^8	VapA-10^9	Бақылау
0	8.94±1.73	11.02±1.09	12.38±1.26	9.60±0.57
4	9.74±1.81	11.37±1.79	11.81±0.18	9.18±2.17
7	8.76±2.06	11.68±3.95	10.93±0.62	9.25±1.67
11	8.57±2.70	9.49±2.23	10.43±0.78	8.62±1.17
14	7.64±2.70	11.33±2.03	11.19±0.87	8.64±0.99
21	8.43±3.34	10.65±1.55	10.80±0.66	9.32±1.59
28	8.97±1.16	11.16±2.27	11.49±0.90	9.19±1.43
35	9.42±2.65	14.70±1.80	11.02±0.80	10.82±2.06
42	10.34±4.46	12.70±1.14	11.90±0.73	10.97±2.09
49	8.30±1.73	9.94±0.24	10.87±0.68	11.89±1.74
56	8.88±1.37	10.44±1.79	10.85±0.54	11.14±1.70
65	8.65±1.89	10.91±0.71	11.69±0.95	11.00±0.75

Гематокрит (HCT) көрсеткіші эритроциттік массаның қан көлеміндегі үлесін сипаттайтындықтан, ол Hb және RBC нәтижелерімен бірге интерпретацияланды (5-кесте). 0-күні VapA-10^7 тобында HCT 12,13±4,15%, ал бақылау тобында 9,47±3,80% болды. 7-күні VapA-107 тобында HCT 12,50±4,06%, бақылауда 10,27±3,06% тіркелді. 65-күні VapA-10^7 тобында HCT 9,20±3,77%-ға дейін төмендесе, бақылауда 10,20±3,70% болды.

Welch t-тесті бойынша VapA-10^7 тобында 7 және 65-күндердегі айырмашылықтар статистикалық мәнді болмады (p=0,493 және p=0,759). VapA-10^8 және VapA-10^9 топтарында да осындай көрініс сақталып, барлық негізгі салыстыруларда p>0,05 болды. Демек, зерттелген модельде эритроцитарлық массаның айқын және тұрақты төмендеуі дәлелденген жоқ. HCT нәтижелерінің Hb және RBC көрсеткіштерімен үйлесуі жүйелік анемиялық үрдістің айқын қалыптаспағанын көрсетеді.

Кесте 5 – Ешкі қанындағы гематокрит (HCT) динамикасы

Күн, тәулік	VapA-10^7	VapA-10^8	VapA-10^9	Бақылау
0	105.67±16.04	98.00±6.00	107.00±8.19	100.67±4.73
4	110.00±12.49	102.00±9.54	120.50±9.19	110.00±5.20
7	107.67±15.63	99.33±5.51	106.00±14.53	108.67±4.04
11	107.00±14.53	95.67±7.09	105.67±11.50	107.33±3.51
14	102.00±10.00	95.33±7.77	106.00±11.53	102.00±2.00
21	111.67±9.24	102.67±9.29	109.67±11.02	106.67±7.23
28	102.33±15.57	95.00±4.36	104.33±15.04	104.00±3.46
35	114.67±16.44	110.67±5.51	112.33±10.79	115.67±10.50
42	104.33±18.50	103.33±5.86	106.33±16.26	113.67±5.77
49	104.33±16.86	103.00±3.00	108.67±13.05	114.67±9.07
56	110.67±21.94	111.33±2.52	105.50±7.78	118.33±6.03
65	93.00±16.64	99.67±0.58	101.33±8.08	116.33±5.51

Эритроциттің орташа көлемі (MCV) эритроциттердің морфометриялық ерекшелігін

сипаттайды және ықтимал микроцитоз немесе макроцитоз белгілерін бағалауға мүмкіндік береді (6-кесте). 0-күні VapA-10^7 тобында MCV 38,00±1,31 fL, ал бақылау тобында 36,37±2,69 fL болды. 7-күні VapA-10^7 тобында MCV 37,93±1,29 fL, бақылауда 36,90±2,35 fL тіркелді. 65-күні тиісінше 36,93±1,30 fL және 37,00±2,54 fL болды.

Барлық эксперименттік топтарда MCV көрсеткіші тар диапазонда сақталды. VapA-10^7, VapA-10^8 және VapA-10^9 топтарының бақылаумен салыстырғандағы 7 және 65-күндердегі барлық *p*-мәндері 0,05-тен жоғары болды. Бұл эритроциттердің орташа көлемінде айқын морфологиялық ығысу болмағанын және инфекциялық әсердің эритроцит өлшеміне жүйелі ықпал етпегенін көрсетеді.

Кесте 6 – Ешкі қанындағы эритроциттің орташа көлемінің (MCV) динамикасы

Күн, тәулік	VapA-10^7	VapA-10^8	VapA-10^9	Бақылау
0	38.00±1.31	36.53±1.05	37.80±1.83	36.37±2.69
4	38.07±1.32	36.50±1.15	38.85±1.48	36.87±2.31
7	37.93±1.29	36.33±1.38	37.70±1.90	36.90±2.35
11	38.53±1.05	36.43±1.10	38.00±1.60	37.20±2.19
14	37.93±1.00	36.17±0.83	37.90±1.90	36.73±1.95
21	38.00±1.23	36.30±0.85	37.47±1.45	37.13±2.27
28	37.60±0.89	36.10±1.15	37.27±1.80	36.43±1.93
35	38.43±1.40	36.77±0.90	37.67±1.63	37.37±1.53
42	37.70±1.35	36.80±0.61	37.47±1.75	37.17±2.17
49	37.80±1.35	36.60±0.90	37.47±1.85	36.97±1.70
56	38.27±1.53	37.03±0.58	36.85±0.78	37.47±2.50
65	36.93±1.30	35.87±0.65	36.80±1.37	37.00±2.54

Эритроциттегі гемоглобиннің орташа мөлшері (MCH) эритроциттің функционалдық сипаттамасын толықтыратын көрсеткіш ретінде бағаланды (7-кесте). VapA-10^7 тобында 0-күні MCH 34,90±8,00 pg, бақылау тобында 43,40±17,33 pg болды. 7-күні VapA-10^7 тобында бұл көрсеткіш 34,27±7,25 pg, ал бақылауда 41,13±10,13 pg құрады. 65-күні VapA-10^7 тобында 39,73±8,38 pg, бақылау тобында 46,30±17,53 pg тіркелді.

Топаралық салыстырулар бойынша VapA-10^7, VapA-10^8 және VapA-10^9 топтарының ешқайсысында 7 және 65-күндері статистикалық мәнді айырмашылық анықталған жоқ (p>0,05). Бұл MCH көрсеткішінің салыстырмалы тұрақтылығын және инфекциялық ықпалдың эритроциттегі гемоглобин мөлшеріне айқын әсер етпегенін көрсетеді.

Кесте 7 – Ешкі қанындағы эритроциттегі гемоглобиннің орташа мөлшерінің (MCH) динамикасы

Күн, тәулік	VapA-10^7	VapA-10^8	VapA-10^9	Бақылау
0	34.90±8.00	40.87±5.66	34.07±7.58	43.40±17.33
4	34.40±6.85	41.87±5.62	33.25±4.17	40.43±11.66
7	34.27±7.25	41.20±6.07	35.23±7.66	41.13±10.13
11	31.17±4.05	40.20±4.39	35.10±6.05	38.47±12.59
14	32.27±6.74	41.30±7.15	34.40±7.62	40.20±10.23
21	35.67±6.65	42.77±4.61	38.37±4.78	40.33±14.98
28	35.97±4.04	43.10±7.27	38.60±7.66	42.70±12.30
35	34.23±5.92	40.73±4.87	37.53±7.09	40.70±8.65
49	35.47±7.52	41.33±5.93	36.90±7.42	41.57±9.12
56	37.13±6.83	39.93±3.84	40.55±3.04	40.57±13.74
65	39.73±8.38	45.40±5.15	41.70±6.70	46.30±17.53
1503	35.77±5.20	39.77±3.91	37.27±6.19	41.57±14.95

Эритроциттегі гемоглобиннің орташа концентрациясы (MCHC) эритроциттердің гемоглобинмен қанығу дәрежесін сипаттайды (8-кесте). VapA-10^7 тобында 0-күні MCHC 92,37±23,93 г/л, ал бақылауда 122,03±59,04 г/л болды. 7-күні VapA-10^7 тобында 90,77±22,01 г/л,

бақылауда 112,93±36,00 г/л тіркелді. 65-күні VapA-10^7 тобында 10^8, 07±25,84 г/л, ал бақылау тобында 127,83±58,39 г/л анықталды.

Статистикалық талдау VapA-10^7, VapA-10^8 және VapA-10^9 топтарының ешқайсысында бақылаумен салыстырғанда мәнді айырмашылық болмағанын көрсетті (p>0,05). Осылайша, МСНС динамикасы эритроциттердің гемоглобинмен қанығу деңгейінде тұрақты патологиялық өзгерістер қалыптаспағанын көрсетті.

Кесте 8 – Ешкі қанындағы эритроциттегі гемоглобиннің орташа концентрациясының (МСНС) динамикасы

Күн, тәулік	VapA-10^7	VapA-10^8	VapA-10^9	Бақылау
0	92.37±23.93	112.13±18.64	90.90±24.13	122.03±59.04
4	90.73±20.54	115.10±18.86	85.90±14.00	111.40±40.01
7	90.77±22.01	114.07±20.55	94.27±25.16	112.93±36.00
11	81.10±12.13	110.63±15.50	93.03±19.86	105.07±41.43
14	85.33±19.49	114.53±22.32	91.57±24.83	110.67±34.72
21	94.23±20.03	117.97±15.14	102.90±16.89	110.50±48.52
28	95.90±12.29	119.93±23.92	104.33±25.82	118.77±41.27
35	89.63±18.24	110.97±15.54	100.37±23.41	109.63±28.22
42	94.33±18.22	108.20±12.28	100.17±20.89	113.73±48.50
49	94.50±23.05	113.20±19.01	99.20±24.61	113.37±30.69
56	97.70±21.94	108.00±12.04	110.20±10.47	110.27±45.76
65	108.07±25.84	126.67±16.80	113.83±22.25	127.83±58.39

Эритроциттердің таралу ені (RDW) эритроцит популяциясының көлемдік әркелкілігін сипаттайды және анизоцитоздың жанама маркері ретінде қарастырылды (9-кесте). 4-күні VapA-10^7 тобында RDW 27,95±1,34%, ал бақылау тобында 27,07±2,86% болды. 7-күні VapA-10^7 тобында RDW 28,40±1,47%, бақылауда 26,60±3,96% тіркелді. 65-күні VapA-10^7 тобында 27,95±0,49%, ал бақылауда 25,65±4,03% болды.

Топаралық салыстырулар бойынша VapA-10^7 және VapA-10^8 топтарында барлық негізгі кезеңдерде статистикалық мәнді айырмашылық байқалмады (p>0,05). VapA-10^9 тобы бойынша 65-күндегі есептеуде p=nan алынуы шағын іріктеме мен деректер вариациясының техникалық шектеуін көрсетеді. Жалпы алғанда, RDW нәтижелері эритроцит популяциясының көлемдік әркелкілігінде жүйелі өзгеріс болмағанын көрсетті.

Кесте 9 – Ешкі қанындағы эритроциттердің таралу енінің (RDW) динамикасы

Күн, тәулік	VapA-10^7	VapA-10^8	VapA-10^9	Бақылау
4.0	27.95±1.34	26.80±2.55	30.90±nan	27.07±2.86
7.0	28.40±1.47	26.70±1.80	28.20±2.17	26.60±3.96
11.0	29.07±1.43	26.05±1.20	28.40±1.85	27.20±2.74
14.0	28.30±1.23	26.37±0.99	29.25±1.34	26.45±3.32
21.0	28.57±1.72	25.30±nan	28.03±1.65	27.10±3.05
28.0	28.80±0.00	26.80±0.99	27.65±2.76	26.57±2.31
35.0	28.97±1.65	27.17±1.33	27.75±2.62	26.85±2.62
42.0	29.10±0.85	27.00±0.78	27.97±2.00	27.27±2.99
49.0	27.73±1.84	28.10±nan	27.85±2.62	27.00±2.09
56.0	29.95±0.78	27.95±1.06	26.50±nan	27.57±3.29
65.0	27.95±0.49	26.85±0.78	29.20±nan	25.65±4.03

Талқылау

Алынған нәтижелер вирулентті pVapA-оң *R. equi* штаммдарымен жұқтырылған ешкілерде айқын және тұрақты гематологиялық синдром қалыптаспағанын көрсетті. Бұл pVapA-тәуелді вируленттілік қоздырғыштың патогендік қасиеттерінде маңызды рөл атқарғанымен, жүйелік гематологиялық жауаптың айқындылығы жануар түріне, жұқтыру дозасына, енгізу жолына және бақылау ұзақтығына тәуелді болуы мүмкін екенін көрсетеді [1, 2, 8].

Гемоглобин (Hb) мен гематокрит (HCT) қанның оттегін тасымалдау әлеуетін сипаттайтын негізгі көрсеткіштер болып табылады. Біздің зерттеуде бұл параметрлер көпшілік уақыт нүктелерінде салыстырмалы тұрақты деңгейде сақталды, тек жекелеген топтарда уақытша ауытқулар байқалды. Мұндай өзгерістер қанның оттегімен қамтамасыз ету жүйесінде айқын декомпенсация емес, функционалдық тұрақтылық сақталғанын аңғартады [9, 10].

Эритроциттер санының (RBC) 0–65 күн аралығында айқын және тұрақты өзгермеуі эритроциттік массаның салыстырмалы тұрақтылығын көрсетті. Бұл тәжірибелік жұқтыру жағдайында эритропоэз немесе эритроциттердің ыдырау процестері деңгейінде терең бұзылыстар қалыптаспағанын білдіреді. Сонымен қатар, эритроциттерге қатысты көрсеткіштердің бағытталған, бірақ статистикалық мәнге жетпеген ауытқулары инфекциялық ықпалдың әлсіз немесе өтпелі сипатта болғанын меңзейді [11–14].

Лейкоциттер (WBC) деңгейі жүйелік қабыну мен инфекциялық белсенділіктің жанама көрсеткіші болып саналады. Біздің зерттеуде WBC мәндері жекелеген мерзімдерде ауытқығанымен, топтар арасында тұрақты статистикалық мәнді айырмашылықтар анықталған жоқ. Бұл тәжірибелік жағдайда айқын жүйелік қабыну реакциясы қалыптаспағанын немесе оның әлсіз, құбылмалы түрде жүргенін көрсетеді [15, 16].

Эритроцитарлық индекстердің (MCV, MCH, MCHC, RDW) салыстырмалы тұрақтылығы эритроцит популяциясының морфометриялық және функционалдық сипаттамаларында айқын патологиялық қайта құрылу болмағанын көрсетті. Аталған көрсеткіштердің Hb және HCT динамикасымен үйлесуі қанның оттегі тасымалдау әлеуетінің жалпы сақталғанын аңғартады [17–19].

Зерттеудің ұтымды жағы – 0–65 күн аралығында бірнеше гематологиялық көрсеткішті сериялық түрде бақылау арқылы инфекциялық процестің уақыттық бейінін бағалау мүмкіндігі. Сонымен қатар, зерттеуде вирулентті pVapA-оң штаммдардың қолданылуы жұмыстың биологиялық маңызын арттырады. Негізгі шектеуі – әр топтағы жануар санының аз болуы (n=3), соның салдарынан сенімділік интервалдары кең болып, статистикалық қуат төмендеді. Сондықтан келешекте іріктеме көлемін ұлғайтып, иммунологиялық және биохимиялық маркерлерді қосымша бағалау орынды деп есептейміз.

Қорытынды

pVapA- плазмидін R. equi штаммдарымен жұқтырылған Заанен тұқымды ешкілерде 7–14 күн аралығында лейкоциттер мен нейтрофилдер деңгейінің статистикалық мәнді жоғарылауы ($p<0,05$) тіркелді, бұл жедел қабыну реакциясын көрсетеді.

65-күнге қарай VapA-10^7 тобында Hb, RBC және HCT көрсеткіштерінің төмендеуі ($p<0,05$) ұзаққа созылған инфекциялық-қабынулық әсердің дамуын меңзейді.

pVapA-байланысты вируленттілік жүйелік гематологиялық өзгерістермен қатар жүреді. 95% сенімділік интервалдары мен вариация коэффициенттері жануарлар арасындағы жеке айырмашылықтарды көрсетті.

Бұл жұмыс ешкі моделін pVapA-байланысты вируленттілік пен жүйелік гематологиялық жауапты бағалау үшін қолдануға болатынын көрсетті. Келесі зерттеулерде жұқтыру дозасы мен енгізу жолын нақтылап, иммунологиялық және биохимиялық маркерлерді енгізу ұсынылады.

Қаржыландыру. Осы зерттеу Қазақстан Республикасы Ғылым және жоғары білім министрлігінің Ғылым комитеті тарапынан қаржыландырылды (AP19680565).

Мүдделер қақтығысы: Авторлар жұмыстың кәсіби қызмет аясында жүргізілгенін мәлімдейді және ұсынылған нәтижелердің объективтілігіне әсер етуі мүмкін жағдайлар жоқ.

Әдебиеттер

1. Jain S., Bloom B.R., Hondalus M.K. Deletion of vapA encoding Virulence Associated Protein A attenuates the intracellular actinomycete Rhodococcus equi // Molecular Microbiology. – 2003. – Vol. 50[1]. – P. 115–128. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03689.x.

2. MacArthur I., Anastasi E., Alvarez S. et al. Comparative genomics of Rhodococcus equi virulence plasmids and host adaptation // (review, PMC). – 2017.

3. Salazar-Rodríguez D., Azevedo V., Calderón-Espinoza M.L. et al. Virulence Plasmids of Rhodococcus equi Isolates From Humans and Animals // Frontiers in Veterinary Science. – 2021. – 8:628239. doi:10.3389/fvets.2021.628239.

4. Rofe A.P., Davis L.J., Whittingham J.L. et al. The Rhodococcus equi virulence protein VapA dis-

rupts endolysosome function and stimulates lysosome biogenesis // MicrobiologyOpen. – 2017. doi:10.1002/mbo3.416.

5. Miranda-CasoLuengo R., Meijer W.G. The N-terminal domain is required for cell surface localisation of VapA in Rhodococcus equi // PLOS ONE. – 2024. doi:10.1371/journal.pone.0298900.

6. Okoko T., Rao L., Proulx-Millimaki R. et al. Structural characterisation of the virulence-associated plasmid of Rhodococcus equi // Veterinary Microbiology. – 2015.

7. Takai S. et al. Virulence plasmids in clinical isolates of Rhodococcus equi from sick foals // Letters in Applied Microbiology. – 2022.

8. Yerlikaya Z., Miranda-CasoLuengo R., Meijer W.G. Clade-1 Vap virulence proteins of Rhodococcus equi and their functional roles // (review, PMC). – 2025.

9. Weronika Kruczkowska, Mateusz Kciuk, Zbigniew Pasieka, Karol Kłosiński, Elżbieta Płuciennik, Jacob Elmer, Klaudia Waszczykowska, Damian Kołat & Żaneta Kałuzińska-Kołat. The artificial oxygen carrier erythrocruorin-characteristics and potential significance in medicine. Journal of Molecular Medicine. Volume 101, pages 961–972, (2023). doi.org/10.1007/s00109-023-02350-3.

10. Chng, K.Z., Ng, Y.C., Namgung, B. et al. Assessment of transient changes in oxygen diffusion of single red blood cells using a microfluidic analytical platform. Commun Biol 4, 271 (2021). https://doi.org/10.1038/s42003-021-01793-z.

11. Wearing, O.H., Ivy, C.M., Gutiérrez-Pinto, N. et al. The adaptive benefit of evolved increases in hemoglobin-O2 affinity is contingent on tissue O2 diffusing capacity in high-altitude deer mice. BMC Biol 19, 128 (2021). https://doi.org/10.1186/s12915-021-01059-4.

12. Baskurt OK, Meiselman HJ. Blood rheology and hemodynamics. Semin Thromb Hemost. 2003;29(5):435–450. DOI: 10.1055/s-2003-44551

13. Jensen FB. The dual roles of red blood cells in tissue oxygen delivery: oxygen carriers and regulators of local blood flow. J Exp Biol. 2009;212(Pt 21):3387-3393. DOI: 10.1242/jeb.023697

14. Perutz MF. Mechanisms of cooperativity and allosteric regulation in proteins. Q Rev Biophys. 1989;22(2):139-237. DOI: 10.1017/s0033583500003826.

15. Zimmerman D, DiIusto M, Dienes J, Abdulmalik O, Elmer JJ. Direct comparison of oligochaete erythrocruorins as potential blood substitutes. Bioeng Transl Med. 2017 Jul 19;2(2):212-221. doi: 10.1002/btm2.10067.

16. Zhu K, Wang L, Xiao Y, Zhang X, You G, Chen Y, Wang Q, Zhao L, Zhou H, Chen G. Nanomaterial-related hemoglobin-based oxygen carriers, with emphasis on liposome and nano-capsules, for biomedical applications: current status and future perspectives. J Nanobiotechnology. 2024 Jun 16;22(1):336. doi: 10.1186/s12951-024-02606-1.

17. Mohanto N, Park YJ, Jee JP. Current perspectives of artificial oxygen carriers as red blood cell substitutes: a review of old to cutting-edge technologies using in vitro and in vivo assessments. J Pharm Investig. 2023;53:153–90. doi: 10.1007/s40005-022-00590-y.

18. Cao M, Wang G, He H, Yue R, Zhao Y, Pan L, Huang W, Guo Y, Yin T, Ma L et al (2021) Hemoglobin-based oxygen carriers: potential applications in solid organ preservation. Front Pharmacol 12:760215. 10.3389/fphar.2021.760215.

19. Drvenica IT, Stancic AZ, Maslovaric IS, Trivanovic DI, Ilic VL (2022) Extracellular hemoglobin: modulation of cellular functions and pathophysiological effects. Biomolecules 12. 10.3390/biom12111708.

References

1. Jain S., Bloom B.R., Hondalus M.K. Deletion of vapA encoding Virulence Associated Protein A attenuates the intracellular actinomycete Rhodococcus equi // Molecular Microbiology. – 2003. – Vol. 50[1]. – P. 115–128. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03689.x.

2. MacArthur I., Anastasi E., Alvarez S. et al. Comparative genomics of Rhodococcus equi virulence plasmids and host adaptation // (review, PMC). – 2017.

3. Salazar-Rodríguez D., Azevedo V., Calderón-Espinoza M.L. et al. Virulence Plasmids of Rhodococcus equi Isolates From Humans and Animals // Frontiers in Veterinary Science. – 2021. – 8:628239. doi:10.3389/fvets.2021.628239.

4. Rofe A.P., Davis L.J., Whittingham J.L. et al. The Rhodococcus equi virulence protein VapA disrupts endolysosome function and stimulates lysosome biogenesis // MicrobiologyOpen. – 2017. doi:10.1002/mbo3.416.

5. Miranda-CasoLuengo R., Meijer W.G. The N-terminal domain is required for cell surface localisation of VapA in Rhodococcus equi // PLOS ONE. – 2024. doi:10.1371/journal.pone.0298900.

6. Okoko T., Rao L., Proulx-Millimaki R. et al. Structural characterisation of the virulence-associated plasmid of Rhodococcus equi // Veterinary Microbiology. – 2015.

7. Takai S. et al. Virulence plasmids in clinical isolates of Rhodococcus equi from sick foals // Letters in Applied Microbiology. – 2022.

8. Yerlikaya Z., Miranda-CasoLuengo R., Meijer W.G. Clade-1 Vap virulence proteins of Rhodococcus equi and their functional roles // (review, PMC). – 2025.

9. Weronika Kruczkowska, Mateusz Kciuk, Zbigniew Pasieka, Karol Kłosiński, Elżbieta Płuciennik, Jacob Elmer, Klaudia Waszczykowska, Damian Kołat & Żaneta Kałuzińska-Kołat. The artificial oxygen carrier erythrocruorin-characteristics and potential significance in medicine. Journal of Molecular Medicine. Volume 101, pages 961–972, (2023). doi.org/10.1007/s00109-023-02350-3.

10. Chng, K.Z., Ng, Y.C., Namgung, B. et al. Assessment of transient changes in oxygen diffusion of single red blood cells using a microfluidic analytical platform. Commun Biol 4, 271 (2021). https://doi.org/10.1038/s42003-021-01793-z.

11. Wearing, O.H., Ivy, C.M., Gutiérrez-Pinto, N. et al. The adaptive benefit of evolved increases in hemoglobin-O2 affinity is contingent on tissue O2 diffusing capacity in high-altitude deer mice. BMC Biol 19, 128 (2021). https://doi.org/10.1186/s12915-021-01059-4.

12. Baskurt OK, Meiselman HJ. Blood rheology and hemodynamics. Semin Thromb Hemost. 2003;29(5):435–450. DOI: 10.1055/s-2003-44551

13. Jensen FB. The dual roles of red blood cells in tissue oxygen delivery: oxygen carriers and regulators of local blood flow. J Exp Biol. 2009;212(Pt 21):3387-3393. DOI: 10.1242/jeb.023697

14. Perutz MF. Mechanisms of cooperativity and allosteric regulation in proteins. Q Rev Biophys. 1989;22(2):139-237. DOI: 10.1017/s0033583500003826.

15. Zimmerman D, DiIusto M, Dienes J, Abdulmalik O, Elmer JJ. Direct comparison of oligochaete erythrocruorins as potential blood substitutes. Bioeng Transl Med. 2017 Jul 19;2(2):212-221. doi: 10.1002/btm2.10067.

16. Zhu K, Wang L, Xiao Y, Zhang X, You G, Chen Y, Wang Q, Zhao L, Zhou H, Chen G. Nanomaterial-related hemoglobin-based oxygen carriers, with emphasis on liposome and nano-capsules, for biomedical applications: current status and future perspectives. J Nanobiotechnology. 2024 Jun 16;22(1):336. doi: 10.1186/s12951-024-02606-1.

17. Mohanto N, Park YJ, Jee JP. Current perspectives of artificial oxygen carriers as red blood cell substitutes: a review of old to cutting-edge technologies using in vitro and in vivo assessments. J Pharm Investig. 2023;53:153–90. doi: 10.1007/s40005-022-00590-y.

18. Cao M, Wang G, He H, Yue R, Zhao Y, Pan L, Huang W, Guo Y, Yin T, Ma L et al (2021) Hemoglobin-based oxygen carriers: potential applications in solid organ preservation. Front Pharmacol 12:760215. 10.3389/fphar.2021.760215.

19. Drvenica IT, Stancic AZ, Maslovaric IS, Trivanovic DI, Ilic VL (2022) Extracellular hemoglobin: modulation of cellular functions and pathophysiological effects. Biomolecules 12. 10.3390/biom12111708.

ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПОСЛЕ ИНФИЦИРОВАНИЯ КОЗ ПЛАЗМИДОЙ PVAPA ШТАММА RHODOCOCCUS EQUI

Г.Д. Илгекбаева*, Б.К. Отарбаев, М.З. Занилабдин, С. Курман, У. Жолдас, А.М. Кадеев, Б.А. Валиева
Казахский национальный аграрный исследовательский университет, Алматы, Казахстан
*gulnaz66@mail.ru

Аннотация. В исследовании оценивали временную динамику гематологических показателей у коз зааненской породы в возрасте 2–3 месяцев после введения вирулентных pVapA-положительных штаммов *Rhodococcus equi*. В период 0–65 суток в сравнении с контрольной группой анализировали показатели гемоглобина (Hb), эритроцитов (RBC), лейкоцитов (WBC), гематокрита (HCT), а также MCV, MCH, MCHC и RDW. В целом в основные временные точки между группами не было выявлено стойких статистически значимых различий. Только по показателю Hb в группе VapA-108 на 65-е сутки отмечено снижение по сравнению с контролем (p=0,033), однако малое число животных в каждой группе (n=3) требует осторожной интерпретации этого результата. Широкие 95% доверительные интервалы и высокие коэффициенты вариации свидетельствовали о выраженной индивидуальной вариабельности. Полученные данные показывают, что в модели на козах pVapA-положительные штаммы *R. equi* вызывали скорее слабый и вариабельный ответ, чем выраженные и стойкие системные гематологические нарушения.

Ключевые слова: Rhodococcus equi, pVapA, лейкоциты, эритроциты, гемоглобин, воспалительная реакция, модель на козах.

HEMATOLOGICAL PARAMETERS AFTER INFECTION OF GOATS WITH THE RHODOCOCCUS EQUI PVAPA PLASMID

G.D. Ilgekbayeva*, B.K. Otarbayev, M.Z. Zanilabdin, S. Kurman, U. Zholdas, A.M. Kadeyev, B.A. Valieva
Kazakh National Agrarian Research University, Almaty, Kazakhstan
*gulnaz66@mail.ru

Abstract. This study evaluated the temporal dynamics of hematological parameters in 2–3-month-old Saanen goats after inoculation with virulent pVapA-positive *Rhodococcus equi* strains. Hemoglobin (Hb), red blood cells (RBC), white blood cells (WBC), hematocrit (HCT), MCV, MCH, MCHC, and RDW were analyzed over a 0–65-day period in comparison with the control group. Overall, no persistent statistically significant differences were detected between the groups at the main time points. A decrease in Hb was observed only in the VapA-108 group on day 65 compared with the control (p=0.033); however, the small number of animals in each group (n=3) requires cautious interpretation of this result. The wide 95% confidence intervals and high coefficients of variation indicated marked individual variability. The obtained data suggest that, in the goat model, pVapA-positive *R. equi* strains induced a weak and variable response rather than pronounced and persistent systemic hematological alterations.

Keywords: *Rhodococcus equi*, pVapA, leukocytes, erythrocytes, hemoglobin, inflammatory response, goat model.

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

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ СЕРИЙ ПРЕПАРАТА ПРОТИВ ПАТОГЕНОВ ESKAPE

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

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

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

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

Введение

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

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

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

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

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

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

Материалы и методы

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

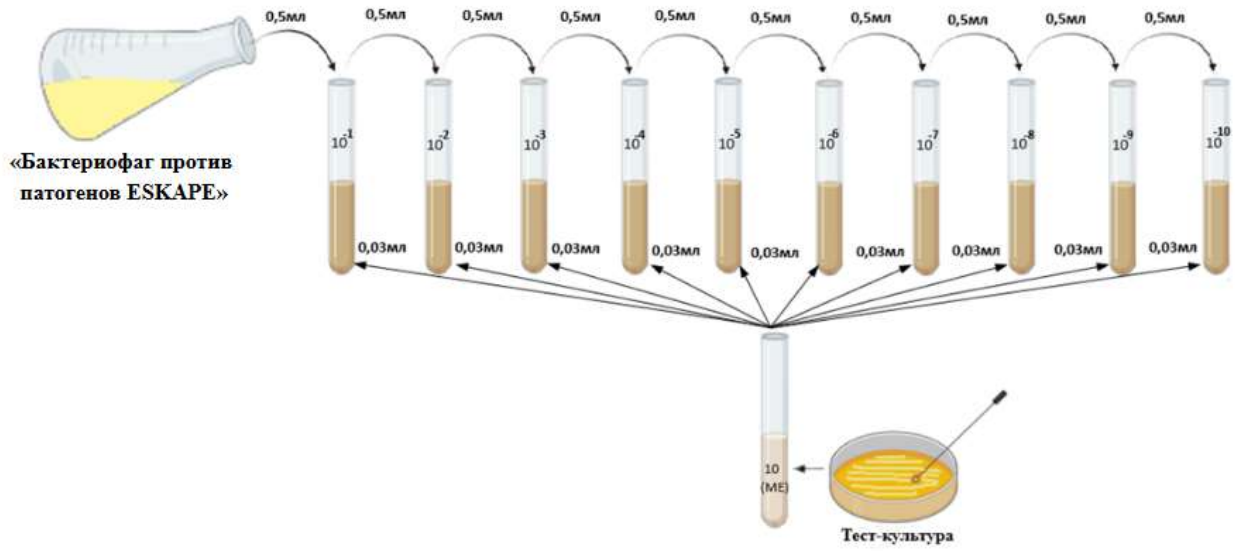


Рисунок 1. Схема определения подлинности по методу Аппельмана

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

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

Расчеты включают:

Среднее значение:

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

Стандартное отклонение:

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

Стандартная неопределенность среднего:

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

Расширенная неопределенность:

$$U = 2 * u$$

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

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

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

Результаты

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Обсуждение

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

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

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

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

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

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

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

Заключение

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

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

Финансирование

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

Благодарность

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

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

Конфликт интересов: Конфликт интересов не заявлен.

Литература

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

References

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ESKAPE ПАТОГЕНДЕРІНЕ ҚАРСЫ ПРЕПАРАТТАРДЫҢ ЭКСПЕРИМЕНТТІК СЕРИАЛАРЫНЫҢ САПАСЫН БАҚЫЛАУ

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

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

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

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

QUALITY CONTROL OF EXPERIMENTAL BATCHES OF THE PREPARATION AGAINST ESKAPE PATHOGENS

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

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

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

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

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

ДАННЫЕ ОБ АВТОРАХ

1. Майлыбаева Айгерим Мухаметалиевна, магистр, научный сотрудник, ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID 0000-0002-4722-0495, a.mailybayeva@biosafety.kz.

Акмырзаев Нурлан Жарылкасынович, магистр, научный сотрудник, ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID 0000-0001-8896-3482, n.akmyrzayev@biosafety.kz.

Сагимбаева Айгерим Манасовна, магистр, научный сотрудник, ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID 0000-0001-5938-3454, a.sagymbayeva@biosafety.kz.

Мырзахметов Елдос Туребаевич, магистр, младший научный сотрудник, ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID 0000-0003-0627-0442, y.myrzakhmetov@biosafety.kz

Рыскельдинова Шолпан Жанбырбаевна, магитср, старший научный сотрудник, ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID 0000-0002-6538-8486, sh.ryskeldinova@biosafety.kz

Копеев Сырым Калдыбаевич, Ph-D, старший научный сотрудник, ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID 0001-6955-5504, s.kopeyev@biosafety.kz

Яманова Екатерина Сергеевна, старший лаборант, ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID 0009-0006-5245-4444, e.yamanova@biosafety.kz

Сидихов Расул Бекжасарович, старший лаборант, ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID 0009-0007-6131-6470, r.sidikhov@biosafety.kz

Бурашев Ербол Досанович, Ph-D, заведующий лаборатории «Мониторинг инфекционных болезней» ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID 0000-0002-4701-1992, y.burashev@biosafety.kz

Асанжанова Нурика Нарынбекова, кандидат медицинских наук, заведующий лаборатории «Профилактика инфекционных болезней, Цех по производству лекарственных средств» ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID 0000-0001-7267-3931, n.assanzhanova@biosafety.kz

2. Бурашев Е.Д., PhD, заведующий лабораторией «Мониторинг инфекционных болезней», ТОО «Научно исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID: 0000-0002-4701-1992, y.burashev@biosafety.kz

Кожабергенов Н.С., Магистр, заведующий лабораторией «Коллективного пользования», ТОО «Научно исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID: 0000-0001-6299-9399, kozhabergen@biosafety.kz

Әубәкір Н.А., Магистр, младший научный сотрудник, ТОО «Научно исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID: 0000-0003-0878-9168, N.Aubakir@biosafety.kz

Омарова З.Д., Магистр, научный сотрудник, ТОО «Научно исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID: 0000-0003-4215-2638, Z.Omarova@biosafety.kz

Тулендибаев А.Б., Магистр, научный сотрудник, ТОО «Научно исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID: 0000-0001-7741-0938, a.tulendibayev@biosafety.kz

Ермекбай Т.Т., Магистр, младший научный сотрудник, ТОО «Научно исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID: 0000-0002-1597-7784, t.yermekbai@biosafety.kz

Аргимбаева Т.У., Магистр, научный сотрудник, ТОО «Научно исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID: 0000-0002-5656-0678, T.Argimbayeva@biosafety.kz

Әлібекова Д.Ә., Магистр, младший научный сотрудник, ТОО «Научно исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID: 0000-0001-5808-9632, alib3kova@gmail.com

3. Еспембетов Болат Аманбаевич, кандидат ветеринарных наук, профессор, заведующий лабораторией, ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID 0000-0003-3312-4045, b.yespembetov@biosafety.kz.

Алпысбаева Сабира Егизбаевна, квн, доцент, ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID 0009-0002-9839-6199, s.alpysbaeva@biosafety.kz

Сармыкова Махпал Кенжеевна, PhD, старший научный сотрудник, ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID 0000-0002-0650-7457, m.sarmykova@biosafety.kz

Керимбаев Аслан Амангелдиевич, PhD, директор, ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID 0000-0002-9387-6647, A.kerimbayev@biosafety.kz

Әбдімұхтар Азамат Рүстемұлы, магистр естественных наук, научный сотрудник, ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID 0000-0002-4585-7476, a.abdimukhtar@biosafety.kz

Серікбай Елдос Бұхарбекұлы, магистрант, старший лаборант, ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID 0000-0002-9186-0529, y.serikbay@biosafety.kz

Шораева Камшат Абитхановна, PhD (доктор философии), заведующий лабораторией контроля технологии и биопрепаратов, ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID 0000-0001-8777-8453, k.shorayeva@biosafety.kz

Асанжанова Нурика Нарынбековна, кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией профилактики инфекционных болезней, ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID 0000-0001-7267-3931, n.assanzhanova@biosafety.kz

Сырым Назым Сырымқызы, квн, профессор, ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID 0000-0002-4361-5676, n.syrym@biosafety.kz

Шестаков Андрей, ФБГОУ «Ульяновский государственный аграрный университет имени П.А.Стотыпина», Scopus ID: 59238244700

Төлеухан Алинұр Тулегенұлы, магистр ветеринарных наук, ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID 0009-0002-1906-746X, a.toleukhan@biosafety.kz

Анарбекова Ақтоты Маратқызы, магистр естественных наук, младший научный сотрудник, ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID 0000-0002-3884-4458, a.anarbekova@biosafety.kz

Мауленбаева Меруерт Мамырахимовна, лаборант, ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID 0009-0001-3948-7966, m.maulenbayeva@biosafety.kz

Ержігіт Бекзат Бауыржанұлы, старший лаборант, ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID 0009-0008-0681-0035, b.yerzhigit@biosafety.kz

Абдықалық Ақбөпе Әбдіғалымқызы, магистр ветеринарных наук, младший научный сотрудник, ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID 0000-0002-1998-8798, a.abdykalyk@biosafety.kz

4. Есимбекова Назым Бейсехановна, магистр, руководитель отдела контроля качества, ТОО «OtarBioPharm», ORCID 0000-0003-0351-7374, nazym.esimbekova@mail.ru

Шериаздан Гулжан Қалжанқызы, магистр, мастер-контролер, ТОО «OtarBioPharm», ORCID 0009-0009-3736-3108, Gsheriyazdan@bk.ru

Кераматдинова Айкерим Муратқызы, бакалавр, мастер-контролер, ТОО «OtarBioPharm», ORCID 0009-0000-8902-3003, aigerym293@gmail.com

Дуйсенбаев Беккали Дуйсенбаевич, магистрант, химик-аналитик, ТОО «OtarBioPharm», ORCID 0009-0008-7867-7050, duysen6767@gmail.com

Мырзахан Сезім Мадиярқызы, бакалавр, микробиолог, ТОО «OtarBioPharm», ORCID 0009-0000-5679-344X, sezimmyrzakann@mail.ru

Кубыр Сабина Санатқызы, бакалавр, микробиолог, ТОО «OtarBioPharm», ORCID 0009-0000-8151-9872, kubyrsabina@gmail.com

Курмантай Аружан Маулетқызы, бакалавр, химик-аналитик, ТОО «OtarBioPharm», ORCID 0009-0003-9041-9795, aruzhan.kurmantai@icloud.com

Ершебулов Закир Джапарович, PhD, генеральный директор, ТОО «OtarBioPharm», ORCID 0000-0002-4733-9971, ershebulov@mail.ru

5. Ильгекбаева Гульназ Дуйсековна, доктор ветеринарных наук, профессор кафедры «Биологическая безопасность», НАО «Казахский национальный аграрный исследовательский университет», ORCID 0000-0001-7140-2961, gulnaz66@mail.ru.

Отарбаев Бауржан Камалович, кандидат ветеринарных наук, ассоциированный профессор кафедры «Биологическая безопасность», НАО «Казахский национальный аграрный исследовательский университет», ORCID 0000-0002-8280-367X, bauken_68@mail.ru.

Курман Серикжан, магистр сельскохозяйственных наук, НАО «Казахский национальный аграрный исследовательский университет», ORCID 0000-0003-3852-2472, Seke7021@gmail.com.

Занилабдин Макпал Занилабдинкызы, магистр ветеринарной санитарии, НАО «Казахский национальный аграрный исследовательский университет», ORCID 0009-0000-6710-2368, zhabykpaev1994@gmail.com.

Жолдас Улан, магистр ветеринарии, НАО «Казахский национальный аграрный исследовательский университет», ORCID 0009-0000-8651-6523, ulanzholdass@mail.com.

Кадеев Айбек Мухтарулы, магистрант, НАО «Казахский национальный аграрный исследовательский университет», ORCID 0009-0003-4995-0592, aibek2448@gmail.com.

Валиева Баян Азатовна, лаборант кафедры «Биологическая безопасность», НАО «Казахский национальный аграрный исследовательский университет», ORCID 0009-0004-2263-0940, valievabayan1973@gmail.com.

6. Молдагулова Сабина Улановна**,** магистр, младший научный сотрудник, ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID 0000-0002-8353-1629, s.moldagulova@biosafety.kz.

Ұланқызы Ақнұр, младший научный сотрудник, ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID 0000-0002-8771-3868, a.ulankyzy@biosafety.kz.

Джекебеков Куаныш Кайратович, PhD, заведующий лабораторией, ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID 0000-0002-7801-6198, k.zhekebekov@biosafety.kz.

Наханова Гульнур Джолдасбековна, магистр, старший научный сотрудник, ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID 0000-0002-5500-9913, g.nakhanova@biosafety.kz.

Жақыпбек Айгерім Серіккызы**,** магистр, младший научный сотрудник, ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID https://orcid.org/0009-0007-0183-4401, a.zhakypbek@biosafety.kz.

Өмуртай Әлішер Дәулетұлы, старший лаборант, ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID 0000-0002-9331-5161, a.omurtay@biosafety.kz.

Байсейт Темірлан Исағалиұлы, магистр, старший лаборант, ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID 0009-0000-2816-6377, t.baiseit@biosafety.kz.

Сырым Назым Сырымовна, кандидат ветеринарных наук, профессор, главный научный сотрудник, ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID 0000-0002-4361-5676, n.syrym@biosafety.kz.

Еспембетов Болат Аманбаевич, кандидат ветеринарных наук, профессор, заведующий лабораторией, ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID 0000-0003-3312-4045, b.yespembetov@biosafety.kz.

Шораева Камшат Абитхановна, PhD, заведующая лабораторией, ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID 0000-0001-8777-8453 k.shorayeva@biosafety.kz.

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 биозащита
- Микробиология
- Медицинская и ветеринарная биотехнология
- Фитопатология и биотехнология растений

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, a 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 объёме 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, ORCID, 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
ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» 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 Фамилия[1], Имя Фамилия[2], Имя Фамилия[2],*

[1] Место работы
[2] Место работы
***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 кактаковые. 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.

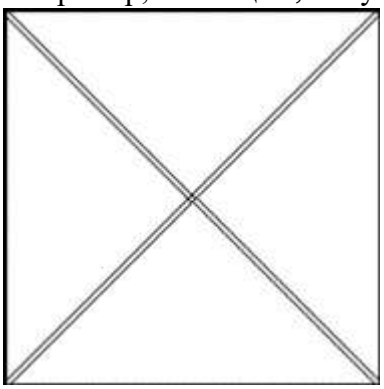
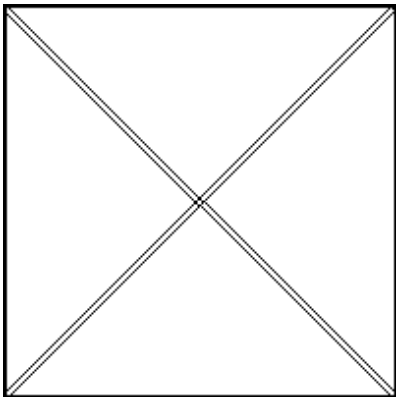


Рисунок 1 – Это рисунок. Схемы имеют такое же форматирование

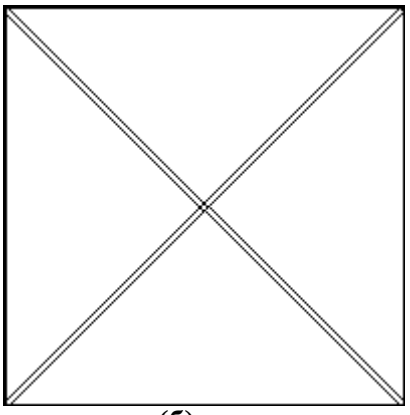
Таблица 1 – Это таблица. Таблицы следует размещать в основном тексте рядом с местом первого упоминания

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 (Pt8). – P. 1985-1996. doi: ... (при наличии)
2. Туненков 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.
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 коневодства: 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:

11. 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.

Данные об авторах

Фамилия, имя и отчество (полностью), ученая степень, должность, место работы, ORCID, адрес для переписки (e-mail)

*для каждого автора.

МАҚАЛА ТАҚЫРЫБЫ

Аты Тегі[1], Аты Тегі[2], Аты Тегі[2],*

[1] Жұмыс орны

[2] Жұмыс орны

*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 Lastname[1], Firstname Lastname[2], Firstname Lastname[2],*

[1] Affiliation

[2] Affiliation

* 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)