

ISSN 2707-7241



Қазақстан Республикасы Білім және ғылым министрлігі Ғылым комитетінің «Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты» шаруашылық жүргізу құқығындағы республикалық мемлекеттік кәсіпорыны

Республиканское государственное предприятие на праве хозяйственного ведения «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан

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

Ғылыми журнал
**БИОҚАУІПСІЗДІК
ЖӘНЕ БИОТЕХНОЛОГИЯ**

Научный журнал
**БИОБЕЗОПАСНОСТЬ
И БИОТЕХНОЛОГИЯ**

The scientific journal
**BIOSAFETY AND
BIOTECHNOLOGY**

2020 ЖЫЛДАН ШЫҒА БАСТАҒАН
ИЗДАЕТСЯ С 2020 ГОДА
PUBLISHED SINCE 2020

2021 • 7

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

Редакция алқасы:

Абдураимов Е.О. в.ғ.д., проф. (Қазақстан),
бас ред. орынбасары
Абеуов Х.Б. в.ғ.к. қауымдастырылған проф. (Қазақстан)
Айкимбаев А.М. м.ғ.д., проф. (Қазақстан)
Баракбаев К.Б. в.ғ.к. (Қазақстан)
Булатов Е.А. б. ғ. к. (Қазақстан)
Бурашев Е.Д. PhD (Қазақстан)
Герилевич А.П. в.ғ.д., проф. (Украина)
Risatti G. PhD, проф. (Америка құрама штаттары)
Еспембетов Б.А. в.ғ.к., проф. (Қазақстан)
Жугунисов К.Д. PhD (Қазақстан)
Касенов М.М. в.ғ.к., проф. (Қазақстан)
Коск R. PhD, проф. (Ұлыбритания)
Кошеметов Ж.К. б.ғ.д., проф. (Қазақстан)
Кутумбетов Л.Б. в.ғ.д., проф. (Қазақстан)
Қыдырбаев Ж.К. в.ғ.к., проф. (Қазақстан)
Мамбеталиев М. в.ғ.к., проф. (Қазақстан)
Мырзахметова Б.Ш. б.ғ.к. (Қазақстан)
Наханов А.К. б.ғ.к. (Қазақстан)
Нургазиев Р.З. в.ғ.д., проф. (Қырғызстан)
Нурпейсова А.С. PhD (Қазақстан)
Орынбаев М.Б. в.ғ.к., проф., ҚР ҰҒА корр.-мүшесі (Қазақстан)
Рсалиев А.С. а-ш.ғ.к., проф. (Қазақстан)
Саттори И. в.ғ.д., проф. (Тәжікістан)
Султанкулова К.Т. б.ғ.к., проф. (Қазақстан)
Стукова М.А. м.ғ.к. (Ресей)
Червякова О.В. б.ғ.к., проф. (Қазақстан)

Корректор: Н.Т. Амирханова

Ғылыми журнал «Биоқауіпсіздік және Биотехнология»
ISSN 2707-7241

Құрылтайшы: ҚР БҒМ ҒК «Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты»
ЖЖҚ РМК

Қазақстан Республикасының Ақпарат және қоғамдық даму министрлігінің
Ақпарат комитетінде 20.11.2019 ж.
№ KZ33V00017380 куәлікпен тіркелген.

Мерзімділігі: жылына 4 рет
Тиражы: 200 дана

Редакцияның мекен-жайы: 080409, Жамбыл облысы,
Қордай ауданы, Гвардейский қтк., Б. Момышұлы к-сі, 15,
тел. (726-36) 7-22-28, ішкі 112.
www: biosafety.kz, e-mail: unots@biosafety.kz

© Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының
ғылыми-зерттеу институты, 2021

Главный редактор
д.б.н., профессор, академик АЕН РК
К.Д. Закарья

Редакционная коллегия

Абдураимов Е.О. д.в.н., проф. (Казахстан),
зам. главного редактора
Абеуов Х.Б. к.в.н., ассоц. проф. (Казахстан)
Айкимбаев А.М. д.м.н., проф. (Казахстан)
Баракбаев К.Б. к.в.н. (Казахстан)
Булатов Е.А. к.б.н. (Казахстан)
Бурашев Е.Д. PhD (Казахстан)
Герилович А.П. д.в.н., проф. (Украина)
Risatti G. PhD, проф. (США)
Еспембетов Б.А. к.в.н., проф. (Казахстан)
Жугунисов К.Д. PhD (Казахстан)
Касенов М.М. к.в.н., проф. (Казахстан)
Kock R. PhD, проф. (Великобритания)
Кошеметов Ж.К. д.б.н., проф. (Казахстан)
Кутумбетов Л.Б. д.в.н., проф. (Казахстан)
Кыдырбаев Ж.К. к.в.н., проф. (Казахстан)
Мамбеталиев М. к.в.н., проф. (Казахстан)
Мырзахметова Б.Ш. к.б.н. (Казахстан)
Наханов А.К. к.б.н. (Казахстан)
Нургазиев Р.З. д.в.н., проф. (Кыргызстан)
Нурпейсова А.С. PhD (Казахстан)
Орынбаев М.Б. к.в.н., проф., член-корр. НАН РК
(Казахстан)
Рсалиев А.С. к.с.-х.н., проф. (Казахстан)
Саттори И. д.в.н., проф. (Таджикистан)
Султанкулова К.Т. к.б.н., проф. (Казахстан)
Стукова М.А. к.м.н. (Россия)
Червякова О.В. к.б.н., проф. (Казахстан)

Корректор: Н.Т. Амирханова

Научный журнал «Биобезопасность и Биотехнология»
ISSN 2707-7241

Учредитель: РГП на ПХВ «Научно-исследовательский
институт проблем биологической безопасности»
КН МОН РК
Свидетельство о постановке на учет периодического
печатного издания в Комитете информации
Министерства информации и общественного
развития Республики Казахстан № **KZ33V00017380**,
выданное 20.11.2019 г.

Периодичность: 4 раза в год
Тираж: 200 экземпляров

Адрес редакции: 080409, Жамбылская область,
Кордайский район, пгт. Гвардейский, ул. Момышулы
15, тел. (726-36) 7-22-28, вн. 112. www: biosafety.kz,
e-mail: unots@biosafety.kz

© Научно-исследовательский институт проблем
биологической безопасности, 2021

Editor in chief
Doctor of Biology Sciences, Professor,
academician of the ANS RK
K.D. Zakarya

Editorial board:

Abduraimov E.O. Doc. Vet., Prof. (Kazakhstan),
deputy editor-in-chief
Abeuov Kh.B. Cand. Vet., Assoc. Prof. (Kazakhstan)
Aikimbayev A.M. Doc. Med., Prof. (Kazakhstan)
Barakbayev K.B. Cand. Vet. (Kazakhstan)
Bulatov E.A. Cand. Biol. (Kazakhstan)
Burashev Ye.D. PhD (Kazakhstan)
Gerilovich A.P. Doc. Vet., Prof. (Ukraine)
Risatti G. PhD., Prof. (USA)
Espembetov B.A. Cand. Vet., Prof. (Kazakhstan)
Kassenov M.M. Cand. Vet., Prof. (Kazakhstan)
Kock R. PhD., Prof. (United Kingdom)
Koshemetov Zh.K. Doc. Biol., Prof. (Kazakhstan)
Kutumbetov L.B. Doc. Vet., Prof. (Kazakhstan)
Kydyrbayev Zh.K. Cand. Vet., Prof. (Kazakhstan)
Mambetaliev M. Cand. Vet., Prof. (Kazakhstan)
Myrzakhmetova B.Sh. Cand. Biol. (Kazakhstan)
Nakhanov A.K. Cand. Biol. (Kazakhstan)
Nurgaziyev R.Z. Doc. Vet., Prof. (Kyrgyzstan)
Nurpeisova A.S. PhD (Kazakhstan)
Orynbayev M.B. Cand. Vet., Prof., Corresponding
member NAS RK (Kazakhstan)
Rsaliev A.S. Cand. Agri., Prof. (Kazakhstan)
Sattori I. Doc. Vet., Prof. (Tajikistan)
Sultankulova K.T. Cand. Biol., Prof. (Kazakhstan)
Stukova M.A. Cand. Med. (Russia)
Chervyakova O.V. Cand. Biol., Prof. (Kazakhstan)
Zhugunisov K.D. PhD (Kazakhstan)

Editor: N.T. Amirkhanova

The scientific journal «Biosafety and Biotechnology»
ISSN 2707-7241

Founder: RGE on the basis of ECR «Research
Institute for Biological Safety Problems»
of the CS MES RK
The certificate of registration of a periodic printed
publication I the Committee of Information of the
Mnistry of Information and Social Development of
the Republic of Kazakhstan # **KZ33V00017380**,
issued 20.11.2019.

Periodicity: 4 times a year
Circulation: 200 copies

Editorial address: 15, B. Momyshuly street,
Gvardeyskiy, Korday region, Zhambyl oblast, 080409,
tel. (726-36) 7-22-28, int. 112, www: biosafety.kz,
E-mail: unots@biosafety.kz

© Research Institute for Biological Safety
Problems, 2021

МАЗМҰНЫ

ШОЛУ МАҚАЛА

Усербаев Б.С., Бурашев Е.Д., Мелисбек А.М., Ширинбеков М.Ж.

XXI ҒАСЫРДА ЖАҢА В-КОРОНАВИРУСТЫҚ ИНФЕКЦИЯЛАРДЫҢ ПАЙДА БОЛУЫ 6

ВЕТЕРИНАРИЯ

Калимолда Э.Ж., Джекебеков К.К., Абай Ж.С., Шораева К.А., Нурпейсова А.С.

НЬЮКАСЛ АУРУЫНА ҚАРСЫ ВАКЦИНАЛАР БИОТЕХНОЛОГИЯСЫНДАҒЫ
ПЕРСПЕКТИВАЛЫҚ ИНАКТИВАНТТАР 16

*Сейсенбаева М.С., Оразымбетова Н.К., Наханова Г.Д.,
Кошеметов Ж.К., Умуралиев Б.К., Кылышева М.Б.*

ҰСАҚ КҮЙІС ҚАЙЫРАТЫН ЖАНУАРЛАР ОБАСЫН БАЛАУ ҮШІН КОНЬЮГАТТЫ ДАЙЫНДАУ 23

*Керімбаев А.А., Жүгүнісов С.Ш., Мырзахметова Б.Ш., Нұрабаев С.Ш., Бисенбаева К.Б.,
Анарбекова А.М., Қауқарбаева М.Ж., Чоров М.Ж., Мұхамбетов М.Т., Құтымбетов Л.Б.*

АНТИГЕНДІГІ САҚТАЛЫП ҚАЛАТЫН SARS-CoV-2 ВИРУСЫН ИНАКТИВАЦИЯЛАУДЫҢ
ТИІМДІ РЕЖИМІ 28

БИОЛОГИЯЛЫҚ ҚАУІПСІЗДІК ПЕН БИОЛОГИЯЛЫҚ ҚОРҒАУ

*Килибаев С.С., Еспембетов Б.А., Таболдиев Д.Р., Сармыкова М.К.,
Тұрғын М.Б., Джалдыбаева А.Е.*

БИОЛОГИЯЛЫҚ ҚАУІПСІЗДІК ПРОБЛЕМАЛАРЫҢ ҒЫЛЫМИ-ЗЕРТТЕУ ИНСТИТУТЫНДА
ВАКЦИНА ДАЙЫНДАУ КЕЗІНДЕГІ МИКРОБИОЛОГИЯЛЫҚ МОНИТОРИНГ 35

МОЛЕКУЛАЛЫҚ БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ГЕНДІК ИНЖЕНЕРИЯ

*Жаппарова Г.А., Мараховская Л.Г., Теребай А.А., Джуматаева Г.П.,
Калимолда Э.Ж., Наханов А.К.*

БҚМҒЗИ ЖАСУШАЛАР ӨСІНДІСІ ЖИНАҚТАРЫНДАҒЫ МИКОПЛАЗМАЛЫҚ
КОНТАМИНАЦИЯНЫҢ ИНДИКАЦИЯСЫ 44

*Арғымбаева Т.У., Тайлақова Э.Т., Исабек И.У., Абаева М., Бопи А.,
Тағайев А., Червякова О.В., Сұлтанқұлова К.Т., Орынбаев М.Б., Наханов А.К.*

SARS-CoV-2 КОРОНАВИРУСЫНДАҒЫ S-АҚҰЫЗЫНЫҢ РЕКОМБИНАНТТЫ
РЕЦЕПТОР БАЙЛАНЫСТЫРАТЫН ДОМЕНІН ҚҰРУ ЖӘНЕ ЭКСПРЕССИЯЛАУ 51

ФИТОСАНИТАРИЯ

Рсалиев А.С.

КҮРІШ ПИРИКУЛЯРИОЗЫ: ТАРАЛУЫ, ЗИЯНДЫЛЫҒЫ ЖӘНЕ ПАТОГЕНМЕН
КҮРЕСУДІҢ НЕГІЗГІ ТӘСІЛДЕРІ 58

ЖУРНАЛДА ЖАРИЯЛАУ ҮШІН МАҚАЛАЛАРҒА ҚОЙЫЛАТЫН ТАЛАПТАР 68

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРНАЯ СТАТЬЯ

Усербает Б.С., Бурашев Е.Д., Мелисбек А.М., Ширинбеков М.Ж.

ВОЗНИКНОВЕНИЕ НОВЫХ В–КОРОНАВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ В XXI ВЕКЕ 6

ВЕТЕРИНАРИЯ

Калимолда Э.Ж., Джекебеков К.К., Абай Ж.С., Шораева К.А., Нурпейсова А.С.

ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ИНАКТИВАНТЫ В БИОТЕХНОЛОГИИ ВАКЦИНЫ
ПРОТИВ БОЛЕЗНИ НЬЮКАСЛА 16

*Сейсенбаева М.С., Оразымбетова Н.К., Наханова Г.Д.,
Кошематов Ж.К., Умуралиев Б.К., Кылышева М.Б.*

ПРИГОТОВЛЕНИЕ КОНЪЮГАТА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ЧУМЫ МЕЛКИХ ЖВАЧНЫХ ЖИВОТНЫХ 23

*Керимбаев А.А., Бисенбаева К.Б., Анарбекова А.М., Каукарбаева М.Ж., Мухамбетов М.Т.,
Нурабаев С.Ш., Жугунисов К.Д., Мырзахметова Б.Ш., Кутумбетов Л.Б.*

ЭФФЕКТИВНЫЙ РЕЖИМ ИНАКТИВАЦИИ ВИРУСА SARS-CoV-2, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИЙ
СОХРАННОСТЬ ЕГО АНТИГЕННОСТИ 28

БИОЛОГИЧЕСКАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ И БИОЗАЩИТА

*Килибаев С.С., Еспембетов Б.А., Таболдиев Д.Р., Сармыкова М.К.,
Тұрғын М.Б., Джалдыбаева А.Е.*

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ ВАКЦИННЫХ
ПРЕПАРАТОВ В УСЛОВИЯХ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ИНСТИТУТА
ПРОБЛЕМ БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ 35

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ И ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

*Жаппарова Г.А., Мараховская Л.Г., Терейбай А.А., Джуматаева Г.П.,
Калимолда Э.Ж., Наханов А.К.*

ИНДИКАЦИЯ МИКОПЛАЗМЕННОЙ КОНТАМИНАЦИИ В КОЛЛЕКЦИИ КУЛЬТУР
КЛЕТОК НИИПБ 44

*Аргимбаева Т.У., Тайлакова Э.Т., Исабек И.У., Абаева М., Бопи А., Тагайев А.,
Червякова О.В., Султанкулова К.Т., Орынбаев М.Б., Наханов А.К.*

КОНСТРУИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО РЕЦЕПТОР-СВЯЗЫВАЮЩЕГО
ДОМЕНА S-БЕЛКА КОРОНАВИРУСА SARS-CoV-2 51

ФИТОСАНИТАРИЯ

Рсалиев А.С.

ПИРИКУЛЯРИОЗ РИСА: РАСПРОСТРАНЕНИЕ, ВРЕДНОСНОСТЬ И ОСНОВНЫЕ ПОДХОДЫ
В БОРЬБЕ С ПАТОГЕНАМ 58

ТРЕБОВАНИЯ К АВТОРАМ ДЛЯ ПУБЛИКАЦИИ В ЖУРНАЛЕ 73

CONTENTS

REVIEW ARTICLE

Usserbayev B.S., Burashev Ye.D., Melisbek A.M., Shirinbekov M.Zh.

THE EMERGENCE OF NEW B–CORONAVIRUS INFECTIONS IN THE XXI CENTURY..... 6

VETERINARY

Kalimolda E.Zh., Jekebekov K.K., Abay Zh.S., Shoraeva K.A., Nurpeisova A.S.

PROSPECTIVE INACTIVENTS IN BIOTECHNOLOGY VACCINES AGAINST NEWCASTLE'S DISEASE 16

Seisenbayeva M.S., Orazymbetova N.K., Nakhanova G.D.,

Koshemetov Zh.K., Umuraliev B.K., Kylysheva M.B.

PREPARATION OF A VIRUS-CONJUGATE TO DETECT THE ANTIGEN OF THE PLAGUE

VIRUS OF SMALL RUMINANTS 23

Kerimbaev A.A., Zhugunisov S.Sh., Myrzahmetova B.Sh., Nurabaev S.Sh., Bisenbaeva K.B.,

Anarbekova A.M., Kaukarbaeva M.Zh., Chorov M.Zh., Muhambetov M.T., Kutumbetov L.B.

EFFECTIVE REGIME OF INACTIVATION OF SARS-CoV-2 VIRUS WHICH KEEPS ITS ANTIGEN 28

BIOLOGICAL SAFETY AND BIOSECURITY

Kilibayev S.S., Yespembetov B.A., Taboldiev D.R., Sarmykova M.K., Turgyn M.B., Dzhaldybaeva A.E.

MICROBIOLOGICAL MONITORING IN THE PRODUCTION OF VACCINE PREPARATIONS UNDER
THE CONDITIONS OF THE RESEARCH INSTITUTE FOR BIOLOGICAL SAFETY PROBLEMS 35

MOLECULAR BIOLOGY AND GENETIC ENGINEERING

Zhapparova G.A., Marahovskaya L.G., Terebai A.A., Jumatayeva G.P.,

Kalimolda E.Zh., Nahanov A.K.

INDICATION OF MYCOPLASMA CONTAMINATIONS IN THE RIBSP CELL CULTURE COLLECTION..... 44

Argimbaeva T.U., Tailakova E.T., Isabek I.U., Abaeva M., Bopi A., Tagaev A.,

Chervyakova O.V., Sultankulova K.T., Orynbaev M.B., Nahanov A.K.

CONSTRUCTION AND EXPRESSION OF THE RECOMBINANT RECEPTOR-BINDING

DOMAIN OF THE S-PROTEIN OF THE SARS-CoV-2 CORONAVIRUS..... 51

PHYTOSANITARY

Rsaliyev A.S.

RICE BLAST: DISTRIBUTION, SEVERITY AND MAIN APPROACHES TO PATHOGEN CONTROL..... 58

AUTHOR INSTRUCTIONS TO THE JOURNAL 78

ОБЗОРНАЯ СТАТЬЯ

УДК 578.54

Б.С. Усербаев, Е.Д. Бурашев, А.М. Мелисбек, М.Ж. Ширинбеков

РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности»
КН МОН РК, пгт. Гвардейский, Казахстан
E-mail: usserbayev.bekbolat@mail.ru

ВОЗНИКНОВЕНИЕ НОВЫХ В-КОРОНАВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ В XXI ВЕКЕ

Аннотация. Коронавирусы представляют собой группу очень разнообразных, оболочечных, одноцепочечных (+) РНК вирусов. Коронавирусная инфекция способна поражать определенные виды животных, а также человека. За последние два десятилетия коронавирусы были причиной эпидемических вспышек двух респираторных заболеваний: тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV) и ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV). В конце декабря 2019 г. в городе Ухань, КНР был выявлен новый вариант коронавируса, способный передаваться от человека к человеку, вызвавший вспышку вирусной пневмонии. В 11 марта 2020 года в связи по количеству и географическому распространению новый вариант коронавируса SARS-CoV-2 побудило Всемирную организацию здравоохранения (ВОЗ) объявить вспышку COVID-19 пандемией. В настоящем обзоре рассмотрены происхождение, клинических симптомов и показатель распространенности в мире.

Ключевые слова: коронавирус, COVID-19, SARS-CoV-2, MERS-CoV, SARS-CoV.

Б.С. Усербаев, Е.Д. Бурашев, А.М. Мелисбек, М.Ж. Ширинбеков

ҚР ҒФМ ҒК «Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты» РМҚ,
Гвардейский қтп., Қазақстан

XXI ҒАСЫРДА ЖАҢА В-КОРОНАВИРУСТЫҚ ИНФЕКЦИЯЛАРДЫҢ ПАЙДА БОЛУЫ

Аннотация. Коронавирустар – әр түрлі топты, қабықпен қоршалған, бір тізбекті (+) РНК вирустарының тобы. Коронавирустық инфекция жануарлардың белгілі бір түрлерімен қатар адамдарға да әсер етуі қабілеті бар. Соңғы екі онжылдықта коронавирустар екі респираторлық аурудың эпидемиялық өршуіне себеп болды: ауыр жедел респираторлық синдром (SARS-CoV) және таяу шығыс респираторлық синдромы (MERS-CoV). 2019 жылдың желтоқсан айының соңында Қытайдың Ухань қаласында вирустық пневмонияның өршуіне

себеп болған адамнан адамға берілетін коронавирустың жаңа нұсқасы анықталды. 2020 жылғы 11 наурызда SARS-CoV-2 коронавирусының жаңа нұсқасы сандық және географиялық таралуына байланысты Дүниежүзілік денсаулық сақтау ұйымын (ДДСҰ) COVID-19 індетін пандемия деп жариялауға негіздеді. Бұл шолуда шығу тегі, клиникалық симптом, әлемде таралу көрсеткіші қарастырылған.

Түйін сөздер: коронавирус, COVID-19, SARS-CoV-2, MERS-CoV, SARS-CoV.

B.S. Ussebayev, Ye.D. Burashev, A.M. Melisbek, M.Zh. Shirinbekov

RGE “Research Institute of Biological Safety Problems” CS MES RK, Gvardeiskiy, Kazakhstan

THE EMERGENCE OF NEW B-CORONAVIRUS INFECTIONS IN THE XXI CENTURY

Abstract. Coronaviruses are a group of very diverse, enveloped, single-stranded (+) RNA viruses. Coronavirus infection can affect certain types of animals, as well as humans. Over the past two decades, coronaviruses have caused epidemic outbreaks of two respiratory diseases: severe acute respiratory syndrome (SARS-CoV) and Middle East respiratory syndrome (MERS-CoV). At the end of December 2019, a new variant of coronavirus capable of being transmitted from person to person was identified in Wuhan, China, which caused an outbreak of viral pneumonia. On March 11, 2020, a new variant of the SARS-CoV-2 coronavirus in terms of quantity and geographical distribution prompted the World Health Organization (WHO) to declare the COVID-19 outbreak a pandemic. This review examines the origin, clinical symptom, and prevalence rate in the world.

Key words: coronavirus, COVID-19, SARS-CoV-2, MERS-CoV, SARS-CoV.

Введение. С 30-х гг. 20 века в результате многочисленных исследований коронавирусы были официально установлены патогенными для животных, а три декады спустя были идентифицированы штаммы коронавируса, способные вызывать респираторные заболевания у человека [1]. В 1971 г в первые появились группа коронавирусов в каталогах Международного комитета по таксономии вирусов (*International Committee on Taxonomy of Viruses – ICTV*). В 1976 г., от отдельного рода увеличился до семейства [2, 3]. В настоящее время согласно данным по *ICTV* коронавирусы образуют самую большую группу порядка *Nidovirales*, включающую семейства *Coronaviridae*, *Arteriviridae*, *Roniviridae* и *Mesoviridae* [4].

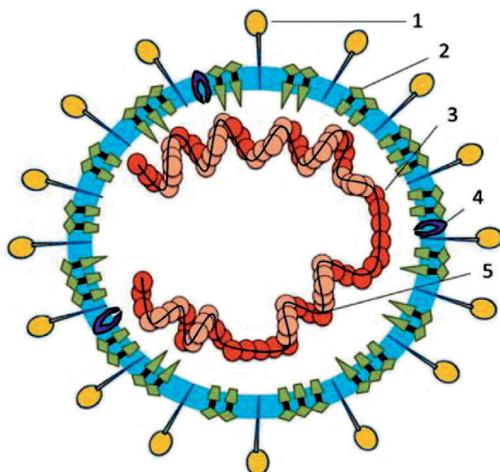


Рисунок 1 – Схема строения вирусной частицы коронавируса (по L. Geng [17] с изменениями):
1 - Белок S;
2 - Белок M;
3 - белок нуклеокапсида N;
4 - Белок E;
5 - РНК.

Коронавирусы (*Coronaviridae*) – это семейство РНК вирусов, содержащих в качестве нуклеинового материала одноцепочечную положительную (+) РНК размером от 26 до 32 килобайт в длину, которые вызывают заболевания у человека, млекопитающих и птиц [5-8]. Исследования с помощью криоэлектронной томографии и криоэлектронной микроскопии показали вирионы коронавируса имеют сферическую форму с диаметром примерно 125 нм (рис.1) [9, 10]. Наиболее характерной особенностью вирионы всех коронавирусов являются булавовидные пепломеры длиной 5-10 нм, исходящие от поверхности вириона. Внутри оболочки вириона находится нуклеокапсид [11]. Частицы коронавируса содержат четыре основных структурных белка: белки шипа (S), мембраны (M), оболочки (E) и нуклеокапсид (N). Гены неструктурных белков репликативного комплекса занимают 2/3 генома коронавируса и состоит из 16 белков. Белок S играет важную роль связывание с рецептором и последующее проникновение в клетку хозяина [12]. Белок M является чаще встречается структурным белком вириона коронавируса. Белок M придает вириону его форму и имеет три трансмембранных домена [13]. Белок E ответственен в сборке и высвобождении вируса, а также в вирусном патогенезе заболевания. Белок N имеет спиральную симметрию и образует фосфорилированным белком и содержит два домена, каждый из которых может связывать геном РНК вируса с помощью определенных механизмов [14-16].

Современная таксономия семейства *Coronaviridae* включает 2 подсемейства, 5 родов, 26 подродов и 46 видов. Семейство *Coronaviridae* состоит из двух подсемейств – *Orthocoronavirinae* и *Letovirinae*. Согласно данным классификации ICTV, в настоящее время по геномной организации и филогенетической кластеризации подсемейство *Orthocoronavirinae* подразделено на 4 рода: *Alphacoronavirus* (α -CoV), *Betacoronavirus* (β -CoV), *Gammacoronavirus* (γ CoV) и *Deltacoronavirus* (δ -CoV) [4]. Основные представители рода бета-коронавирусов, которые могут вызывать заболевания человека, представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Классификация вирусов *Coronaviridae*

Family	Subfamily	Genus	Subgenus	Species	GeneBank ID
Coronaviridae	Ortho-coronavirinae	Beta-coronavirus	Sarbecovirus	SARS-CoV SARS-CoV-2	AY278489 NC_045512
			Embecovirus	HCoVHKU1 HCoVOC-43	NC_006577 NC_003045
			Merbecovirus	MERS-CoV	KF917527

Коронавирусы человека HCoV-OC43 и HCoV-NKU1. HCoV-OC43 – оболочечный, положительно-смысловый (+), одноцепочечный РНК-вирус, который проникает в клетку, связываясь с рецептором N-ацетил-9-O-ацетилнейраминовой кислоты [18]. В 1967 г., K.McIntosh с соавт. изолировали штаммов коронавируса с помощью HETOC (*Human embryonic tracheal organ culture*), которые полученные штаммов назвали OC1, OC2 и т.д. Среди штаммов наиболее известным считается OC43. По степени патогенности штаммов OC43 был отнесен ко III группе [19]. Экспериментальные исследования доказали, что HCoV-OC43 характерен воздушно-капельный путь передачи. HCoV-OC43 распространены по всему миру, на долю случаев простудных заболеваний приходится 20-30% [20].

HCoV-NKU1 представляет собой одноцепочечные положительные РНК-вирусы [21]. В 2005 г., Woo P.C., с соавт выделили новый коронавирус человека *NKU1* (*HCoV-NKU1* – *Human coronavirus NKU1*) от пациента с диагнозом острое респираторное заболевание. Название вируса вышло сокращенным словам *NKU* (от англ. *Hong Kong University*) с порядковым номером штамма. Вирус *HCoV-NKU1* принадлежит ко III группе патогенности [22, 23]. У большинства заболевших вирусами наблюдались такие основные симптомы: лихорадка, кашель и свистящее дыхание [24].

Тяжелый острый респираторный синдром (SARS). SARS-CoV, β -коронавирус группы, был идентифицирован как возбудитель вспышки тяжелого острого респираторного синдрома (SARS), которая произошла в 2002-2003 годах в населенном пункте Шанлане, провинции Гуандун на Юге КНР (рис.2). Во время вспышки зарегистрировано около 8098 случаев заболевания, 774 случаев летального исхода, в результате уровень смертности составил 9% [52].

2005 г. в результате среди многочисленных исследований было показано, что возбудителем болезни является неизвестный этиологический вариант коронавируса. Он был назван как SARS-CoV. Его геномная организация схожа с ранее изученными видами коронавирусов, но филогенетический анализ и сравнение последовательностей показывает, что SARS-CoV не имеет сродства ни с одним из коронавирусов, появившимся до него [26, 27]. Вирионы представляет одноцепочную (+) РНК вирус, с длиной 16-30 kb. SARS-CoV был отнесен ко III группе патогенности по классификации [28].



Рисунок 2 – Карта КНР с указанным место появившегося новых SARS COV (Львов Д.К., Альховский С.В.)

Природные резервуары SARS-CoV окончательно не установлены, в качестве потенциальных природных хозяев рассматриваются летучие мыши, так как большое количество китайских подковообразных летучих мышей содержат последовательности связанных с SARS-CoV. Предположительным промежуточным хозяином являются гималайские циветы (рис. 3) (*Paguma larvata*), употребляемые в качестве деликатесов на юге Китая [29, 30].

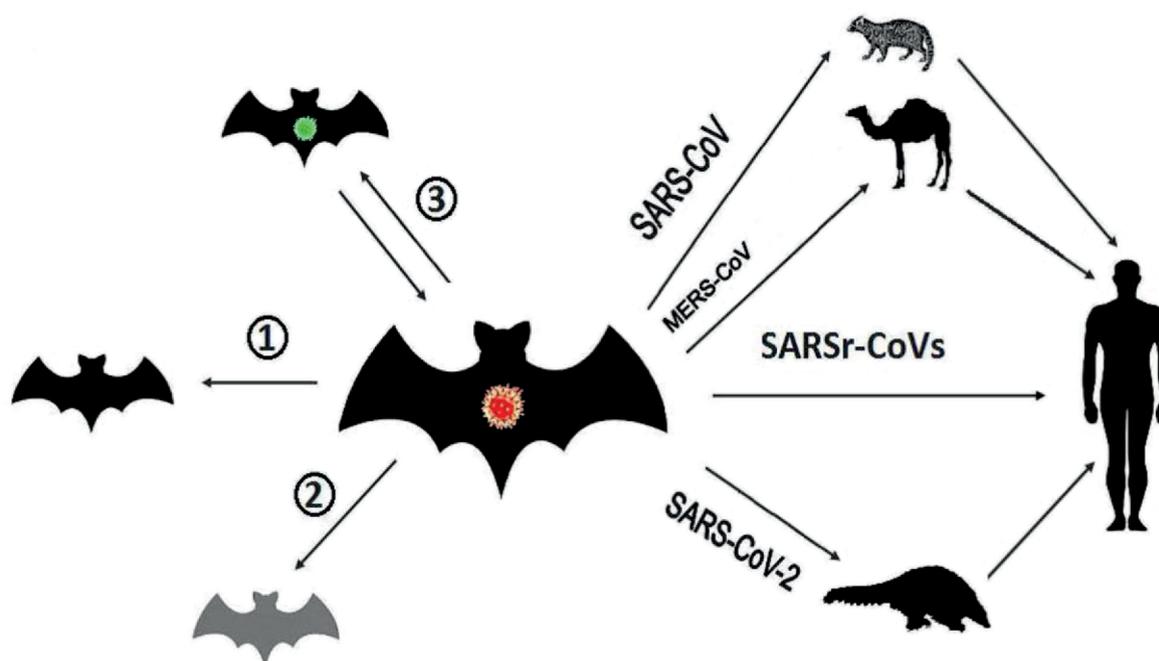


Рисунок 3 – Циркуляция коронавирусов рукокрылых (А.М. Shestopalov et al.):
 1 - передача вируса неинфицированным особям своего вида; 2 - передача вируса неинфицированным особям других видов; 3 - инфицирование другим коронавирусом.

Связывание вируса с клетками опосредуется рецепторами ангиотензинпревращающего фермента-2 (ACE 2), широко распространенными в эпителиальных клетках альвеол, трахеи, бронхов, а также тонкого кишечника [31, 32]. Поэтому SARS-CoV в первую очередь поражает эпителиальные клетки легких. SARS-CoV относится к следующим основным симптомам: лихорадка (температура тела 38°C или выше), головная боль, общее недомогание, миалгии (мышечные боли), сухой, непродуктивный кашель. Продолжительность инкубационного периода заболевания колеблется от 2 до 10 сут, в среднем – 4,6 сут [33, 34]. Затем происходит повышение температуры тела (38°C и выше), сопровождаемое лихорадкой, сухим кашлем, болью в горле и грудной клетке, миалгией и, часто, диареей, рвотой и болями в животе [31]. Через несколько суток развивается пневмония, которая примерно в 25% случаев быстро прогрессирует, что может привести к фатальной дыхательной недостаточности [32].

Ближневосточный респираторный синдром (MERS). В июне 2012 г. в городе Джидда, Саудовская Аравия появился новый человеческий коронавирус. Во время новый вспышек врач-вирусолог Али Мохамед Заки впервые выделил появившегося нового коронавируса от мокроты пациента, погибшего от тяжелой вирусной пневмонии, осложненной острой почечной недостаточностью [35]. В мае 2013 г. на заседании группы изучения коронавирусов при ICTV, получило современное номенклатурное название *Middle East Respiratory Syndrome-CoV (MERS-CoV)* [36].

Согласно данным по ВОЗ, с сентября 2012 г. по декабря 2019 г. представлено 2502 лабораторно подтвержденных случаев, 861 случаев летальных исходов и распространилось в 27 странах мира (рис.4). Около 80% случаев заболеваемости людей были инфицированы в Саудовской Аравии [37].

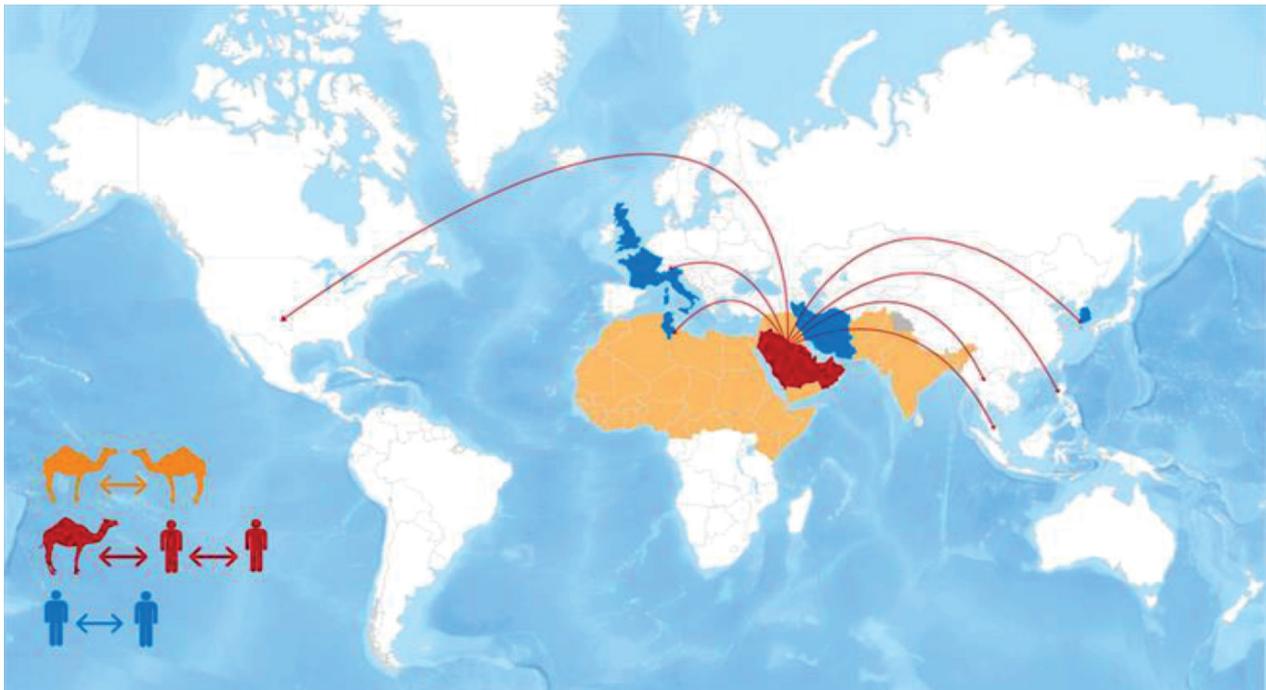


Рисунок 4 – Локализация MERS-CoV в мире по данным ВОЗ

Предполагается, что вирус произошел от летучих мышей, но, вероятно имеет промежуточного хозяина, так как люди редко контактируют с секретами летучих мышей [38]. Путь передачи от животных к человеку до конца не выяснен, но установлено предположение, что одногорбые верблюдов являются промежуточными хозяевами (рис. 3). Вероятно, что люди контактируются с зараженными верблюдами [39].

MERS-CoV использует дипептидилпептидазу 4 (DPP4) в качестве первичным рецептором, экспрессируемый в большом количестве на эпителиальных клетках почек, альвеол, тонкого кишечника, печени и простаты [40-41]. В среднем инкубационный период для MERS-CoV, продолжается 5-6 сут, варьируя от 2 до 16 сут. Клинические симптомы отличается такими основными характеристиками: жар, кашель, одышка, желудочно-кишечного тракта, в том числе диарея. Тяжелая форма может вызвать дыхательную недостаточность, которая требует искусственной вентиляции легких и на хождения пациента в отделении интенсивной терапии [42].

Коронавирус тяжелый острый респираторный синдром 2 (SARS-CoV-2). В конце декабря 2019 года в городе Ухань китайской провинции Хубэй появилась пневмония неизвестной этиологии. 31 декабря 2019 г. Китайский центр по контролю и профилактике заболеваний (*China CDC*) проинформировали ВОЗ о вспышке пневмонии неизвестной причины в городе Ухань [43, 44]. 7 января 2020 г. экспертами *China CDC* выявлено, что причиной является *коронавирус 2019-nCoV*. 30 января 2020 г. ВОЗ объявила вспышку коронавирусной инфекции 2019-nCoV чрезвычайной ситуации для здравоохранения международного значения [45]. В 11 марта 2020 года ВОЗ объявила вспышку нового коронавируса (COVID-19) глобальной пандемией [46].

Согласно данным ВОЗ в 21 октября 2021 года зафиксировано в общей сложности 241 886 635 подтвержденных случаев, в результате чего было зарегистрировано 4 919 755 смертельных исходов [47].

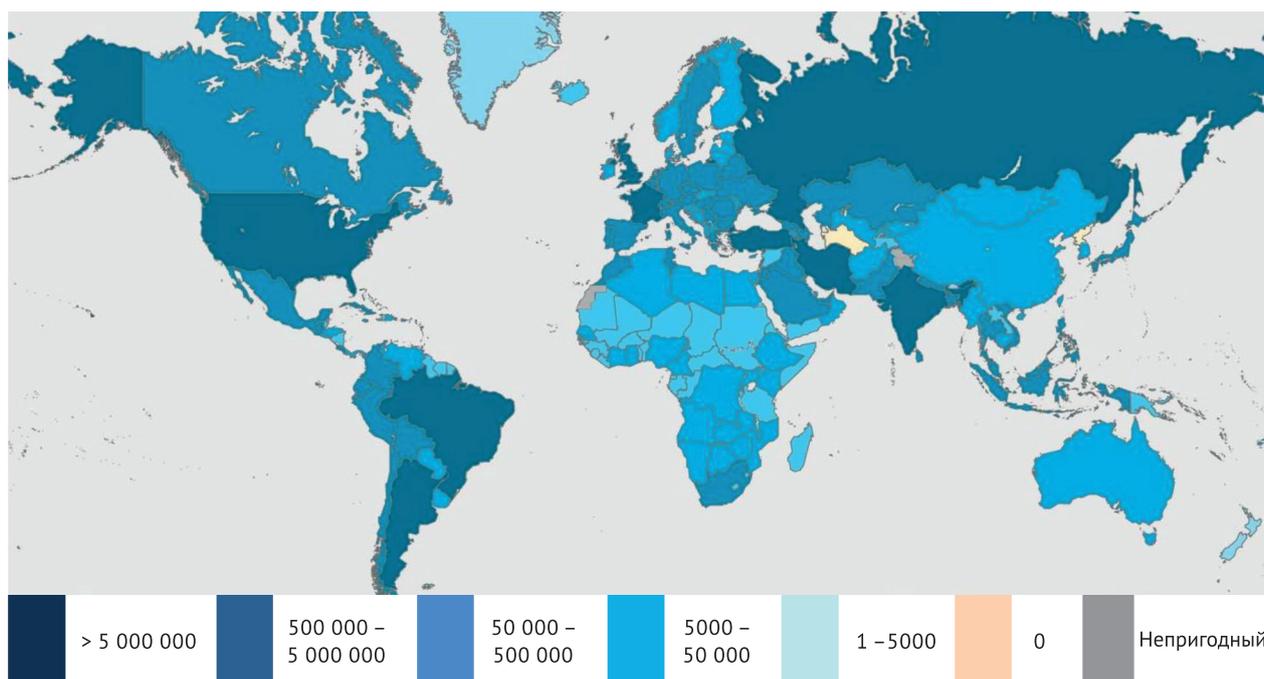


Рисунок 5 – Распространение COVID-19 по всему миру по данным ВОЗ

Естественный резервуар SARS-CoV-2 могут являться летучие мыши (рис. 3), при этом в качестве промежуточный хозяин официально не установлено (48). Предполагается, что основными путями передачи SARS-CoV-2 считается воздушно-капельный и контактный. Основным источником инфекции являются больные люди, бессимптомные и больные, которые находятся в инкубационном периоде. От человека к человеку вирус передается при тесном контакте. Согласно определению ВОЗ к тесным контактам относятся: оказание медицинской помощи больным, совместная работа с человеком инфицированного nCoV, поездка с человеком инфицированного nCoV, проживание в одной семье с инфицированным nCoV (49). Срок инкубационного периода, составляет от 1 до 12,5 сут, в среднем 5-6 сут. Основными симптомами SARS-CoV-2 являются повышенная температура, утомление, кашель с небольшим количеством мокроты. Повышенная температура тела регистрируется более чем у 90% больных, сухой кашель – примерно у 80% [50, 51].

Заключение. В 30 г. прошлого века началась история изучения коронавирусов и многочисленных исследований было установлено, что COVs патогенным для определенных животных. В середине 20 – го века в каталоге ICTV появился семейства коронавирусов.

Коронавирусы (*Coronaviridae*) – это семейство разнообразных, положительно-смысловой РНК вирусов, размером от 16-32 килобайт, вызывающих инфекционные заболевания определенных животных и человека. Исследования с помощью высокотехнологических микроскопов показали, что имеет сферическую форму с диаметром примерно 125 нм, состоит с различным белком (*S*; *M*; *N*; *E*) и гены неструктурных белков.

Согласно данным ICTV семейства *Coronaviridae* включает 2 подсемейства, 5 родов, 26 подродов и 46 видов. Подсемейство *Orthocoronavirinae*, семейства *Coronaviridae* подразделено на 4 рода: *Alphacoronavirus* (α -CoV), *Betacoronavirus* (β -CoV), *Gammacoronavirus* (γ -CoV) и *Deltacoronavirus* (δ -CoV).

Основные представители рода бета – коронавирусов, которые могут вызывать заболевания человека являются, *HCoVOC-43*; *HCoVHKU-1*; *SARS-CoV*; *MERS-CoV*; *SARS-CoV-2*. В 1967 г. изолирован штамм коронавируса *HCoVOC-43*. В 2005 г. выделен новый коронавирус человека HKU1. Выше перечисленных коронавирусов, включая *HCoVOC-43*; *HCoVHKU-1*

относятся ко III группе патогенности. Тяжелый острый респираторный синдром (SARS) – появился в 2002 г. в провинции Гуандун, КНР. Во время вспышки зарегистрировано около 8100 подтвержденных случаев заболевания. Ближневосточный респираторный синдром (MERS) – появился в июне 2012 г. в городе Джидда, Саудовской Аравии. Согласно данным по ВОЗ, до 2019 г. общей сложности зарегистрировано 2502 подтвержденных случаев, в результате чего было в порядке зарегистрировано 861 случаев летальных исходов и распространилась в 27 странах мира. Коронавирус тяжелый острый респираторный синдром 2 (SARS-CoV-2) – появился в конце декабря 2019 года в городе Ухань, КНР с неизвестной этиологии. В начале января 2020 г. экспертами China CDC открыл геномную свойств ранее неизвестного штамма с β -CoV. В 11 марта 2020 г. в связи масштабно географического распространения COVID-19, поводом со стороны ВОЗ объявила глобальной пандемией. В настоящее время согласно данным ВОЗ в мире зарегистрировано 241 886 635 подтвержденных случаев и 4 919 755 летальных исходов.

Природным резервуаром и источником генетического разнообразия для представителей родов *Betacoronavirus* семейства *Coronaviridae* являются рукокрылые. Предположительным промежуточным хозяином являются гималайские циветы для SARS-CoV, одногорбые верблюды для MERS-CoV, а для SARS-CoV-2 не установлено.

Работа выполнена в рамках грантового проекта **AP09058338 «Изучение противовирусной активности лекарственных препаратов в отношении вируса SARS-CoV-2 in vitro и молекулярно-эпидемиологического анализа циркулирующих штаммов COVID-19».**

ЛИТЕРАТУРА

1. Щелканов М.Ю., Попова А.Ю., Дедков В.Г., Акимкин В.Г., Малеев В.В. История изучения и современная классификация Коронавирусов (Nidovirales: Coronaviridae) // Инфекция и иммунитет. – 2020. – Т.10. – №2. – С. 221-246.
2. Ed. Wildy P. Classification and nomenclature of viruses. First report of the International committee on nomenclature of viruses. Basel: Karger. – 1971.
3. Ed. Fenner F. Classification and nomenclature of viruses. Second report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Basel: Karger. – 1976.
4. Таксономия вирусов: выпуск 2020 г. <https://talk.ictvonline.org>
5. Zhu N., Zhang D., Wang W., Li X. et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. The new England journal of medicine. February 20, 2020. – P. 727-733.
6. Shereen M.A., Khan S., Kazmi A., Bashir N., Siddique R. COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. Journal of Advanced Research, 2020. – P. 91-98.
7. Zhang X.Y., Huang H.J., Zhuang D.L. et al. Biological, clinical and epidemiological features of COVID-19, SARS and MERS and AutoDock simulation of ACE2. Infectious Diseases of Poverty. – 2020. – №9. – 99 p.
8. Paoli D., Pallotti F., Colangelo S., Basilico F., Mazzuti L., Turriziani O. et al. Study of SARS CoV-2 in semen and urine samples of a volunteer with positive naso-pharyngeal swab // J. Endocrinol Invest. – 2020. – Vol.23. – P. 1-4.
9. Zhao L., Jha B.K., Wu A. et al. Antagonism of the interferon-induced OAS-RNase L pathway by murine coronavirus ns2 protein is required for virus replication and liver pathology. Cell Host Microbe. – 2012. – P. 607-616.
10. Barcena M., Oostergetel G.T., Bartelink W. et al. Cryo-electron tomography of mouse hepatitis virus: insights into the structure of the coronavirus. Proc Natl Acad Sci USA. – 2009. – P. 582-587.
11. Anthony R. Fehr and Stanley Perlman Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. – 2020. – P. 10-12.
12. Collins A.R., Knobler R.L., Powell H. et al. Monoclonal antibodies to murine hepatitis virus-4 (strain JHM) define the viral glycoprotein responsible for attachment and cell-cell fusion. Virology, 1982. – P. 358-371.

13. Armstrong J., Niemann H., Smeekens S. et al. Sequence and topology of a model intracellular membrane protein, E1 glycoprotein, from a coronavirus. *Nature*, 1984. – P. 751-752.
14. Chen Y., Liu Q., Guo D. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis// *J Med Virol.* – 2020. – P. 418-423.
15. DeDiego M.L., Alvarez E., Almazan F. et al. A severe acute respiratory syndrome coronavirus that lacks the E gene is attenuated in vitro and in vivo// *J Virol.* – 2007. – P. 1701-1713.
16. Nieto-Torres J.L., DeDiego M.L., Verdiá-Báguena C. et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein ion channel activity promotes virus fitness and pathogenesis // *PLOS Pathog.* – 2014. – 10 p.
17. Geng L., Fan Y., Lai Y. et al. Coronavirus infections and immune responses// *J Med Virol.* – 2020. – P. 424-432.
18. Li F. Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. *Annual Review of Virology.* – 2020. – P. 237-261.
19. Tyrrell D.A., Bynoe M.L. Cultivation of a novel type of common cold virus in organ cultures. *Br Med J.*, 1965.– P. 1467-1470.
20. King A. An uncommon cold // *New Sci*, 2020. – P. 32-35.
21. Vabret A., Dina J., Gouarin S., Petitjean J., Corbet S., Freymuth F. Detection of the new human coronavirus HKU1: a report of 6 cases// *Clin Infect Dis.* – 2006. – P. 634-639.
22. Woo P.C., Lau S.K., Chu C.M. et al. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia// *J. Virol.* – 2005. – Vol. 79. – P. 884-895.
23. Кононенко А.А., Носков А.К., Водяницкая С.Ю., Подойницына О.А. Коронавирусы человека, способные вызывать чрезвычайные ситуации. *Медицинский вестник Юга России*, 2021. – P. 14-23.
24. Chiu S.S., Chan K.H., Chu K.W. et al. Human coronavirus NL63 infection and other coronavirus infections in children hospitalized with acute respiratory disease in Hong Kong, China. *Clin Infect Dis*, 2005. – P. 1721-1729.
25. Львов Д.К., Альховский С.В., Колобухина Л.В., Бурцева Е.И. Этиология эпидемической вспышки COVID-19 в г. Ухань, ассоциированной с вирусом 2019-ncov (Nidovirales, Coronaviridae, Coronavirinae, Betacoronavirus, Подрод Sarbecovirus): уроки эпидемии SARS-CoV. *Вопросы вирусологии*, 2020. – №1. – С. 6-15.
26. Lau S.K. et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2005. – P. 14040-14045.
27. Li W. et al. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses// *Science.* – 2005.– P. 676-679.
28. Чучалин А.Г. Тяжелый острый респираторный синдром. *Русский медицинский журнал*, 2003. – Т.11. – С. 1197-1204.
29. Lau S.K., Woo P.C., Li K.S. et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005. – P. 14040-14045.
30. Li W., Shi Z., Yu M. et al. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses// *Science*, 2020. – P. 14-18.
31. Song Z., Xu Y., Bao L., Zhang L., Yu P., Qu Y. From SARS to MERS, thrusting coronaviruses into the spotlight. *Viruses*, 2019. – 59 p.
32. Hui D.S., Zumla A. Severe acute respiratory syndrome. Historical, epidemiologic, and clinical features// *Infect Dis Clin North Am.* – 2019. – P. 869-889.
33. Hui D.S., Azhar E.I., Madani T.A., Ntoumi F., Kock R., Dar O. The continuing 2019-nCoV epidemic threat of novel coronavirus to global health// *Int J Infec Dis*, 2020. – P. 264-266.
34. Donnelly C.A., Ghani A.C., Leung G.M., Hedley A.J., Fraser C., Riley S. Epidemiological determinants of spread of causal agent of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong// *Lancet.* – 2003. – P. 1761-1766.
35. Zaki A.M., Boheemen S., Bestebroer T.M. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med*, 2012. – P. 1814-1820.
36. Щелканов М.Ю., Ананьев В.Ю., Кузнецов В.В., Шуматов В.Б. Ближневосточный респираторный синдром: когда вспыхнет тлеющий очаг. *Тихоокеанский медицинский журнал*, 2015. – №2. – С. 94-98.

37. Коронавирус Ближневосточного респираторного синдрома (БВРС-Ков). <https://www.who.int/ru>.
38. Meyer B., Muller M.A., Corman V.M. et al. Antibodies against MERS coronavirus in dromedary camels. *Emerg Infect Dis*, 2014. – P. 552-559.
39. Müller M.A., Corman V.M., Jores J. et al. MERS coronavirus neutralizing antibodies in camels, Eastern Africa, 1983-1997. *Emerg Infect Dis*, 2014. – P. 2093-2095.
40. Meyerholz D.K., Lambert A.M., McCray P.B. Dipeptidyl peptidase 4 distribution in the human respiratory tract: implications for the Middle East Respiratory Syndrome. *Am J Pathol*, 2016. – P. 78-86.
41. Widagdo W., Raj V.S., Schipper D. et al. Differential expression of the Middle East respiratory syndrome coronavirus receptor in the upper respiratory tracts of humans and dromedary camels. *J Virol*, 2016. – P. 4838-4842.
42. Ackay I.M., Arden K.E. MERS coronavirus: diagnostics, epidemiology and transmission//*Virology*, 2015. – P. 222 p.
43. Lu H., Stratton C.W., Tang Y.W. Outbreak of pneumonia of unknown etiology in Wuhan, China: The mystery and the miracle//*J Med Virol*, 2020. – P. 401-402.
44. World Health Organization. Situation Report 1 2020 (World Health Organization. Novel coronavirus (2019-nCoV), situation report-1. January, 2020.
45. Statement on the second meeting of the International Health Regulations Emergency Committee regarding the outbreak of novel coronavirus (2019-nCoV). WHO, 2020.
46. Domenico C., Maurizio V. WHO Declares COVID-19 a Pandemic. *Acta Biomed*, 2020. – P.157-160.
47. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. <https://covid19.who.int/>
48. Zhou P., Yang X.L., Wang X.G. et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin [published online ahead of print, 2020 Feb 03]. *Nature*, 2020.
49. Surveillance case definitions for human infection with novel coronavirus (nCoV). Interim guidance v1. January 2020. WHO.
50. Novel Coronavirus (2019-nCoV). Situation Report-7. WHO.
51. Временные рекомендации по лабораторной диагностике новой коронавирусной инфекции, вызванной 2019-nCoV от 21.01.2020. Роспотребнадзор.

ВЕТЕРИНАРИЯ

УДК 571.27

Э.Ж. Калимолда, К.К. Джекебеков, Ж.С. Абай, К.А. Шораева, А.С. Нурпейсова

РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности»
КН МОН РК, пгт. Гвардейский, Казахстан
E-mail: elina.kalimolda@mail.ru

ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ИНАКТИВАНТЫ В БИОТЕХНОЛОГИИ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ БОЛЕЗНИ НЬЮКАСЛА

Аннотация. Болезнь Ньюкасла является опасным патогеном для птиц, вызываемым вирусом семейства *Paramyxoviridae*, которое может поражать множество диких и домашних птиц. Самым эффективным средством борьбы с данной болезнью является вакцинация-профилактика. Основными видами вакцины против БН являются инактивированные и живые вакцины. Живые вакцины имеет ряд недостатков, главный из которых – реактогенность, при вакцинации живыми вакцинами возрастает риск распространения и возникновения случаев БН.

Решающим шагом в технологии инактивированной вакцины против вирусных болезней является сбалансированная инактивация вируса и выбор инактиванта. Наиболее перспективным по литературным данным инактивантами являются формальдегид, бетапропилактон и димерэтиленмина. Однако, при использовании формальдегида в качестве инактиванта необходимо соблюдать температурно-временной режим. БПЛ должным образом инактивирует вирусы, однако БПЛ в связи дороговизной, экономический не выгодно в масштабном производстве вакцины БН. Формальдегид и ДЭИ должным образом инактивируют вирус и являются экономический доступными.

Ключевые слова: Болезнь Ньюкасла, инактиванты, реактогенность, вирус, вакцина.

Э.Ж. Қалимолда, К.К. Джекебеков, Ж.С. Абай, К.А. Шораева, А.С. Нурпейсова

ҚР БҒМ ҒК «Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты» РМК,
Гвардейский қтп., Қазақстан

НЬЮКАСЛ АУРУЫНА ҚАРСЫ ВАКЦИНАЛАР БИОТЕХНОЛОГИЯСЫНДАҒЫ ПЕРСПЕКТИВАЛЫҚ ИНАКТИВАНТТАР

Аннотация. Ньюкасл ауруы – *Paramyxoviridae* тұқымдасына жататын құстарда вирустық ауру тудыратын қауіпті қоздырғыш, ол жабайы және үй құстарының алуан түрлеріне жұғуы мүмкін. Бұл аурумен күресудің ең тиімді құралы-иммундық профилактика. Ньюкасл ауруына қарсы вакцинаның негізгі түрлері белсенді емес және тірі вакциналар болып

табылады. Тірі вакциналардың бірқатар кемшіліктері бар, олардың негізгісі реактогенділігі, сонымен қатар тірі вакциналармен вакцинацияланған кезде Ньюкасл ауруларының таралуы және пайда болуы қаупі артады.

Вирустық ауруларға қарсы инактивтендірілген вакцина технологиясының шешуші қадамы – вирусты толықтай инактивтеу және инактивантты дұрыс таңдау. Әдебиет деректеріне сәйкес, ең қолданылмалы инактиванттарға формальдегид, БПЛ және ДЭИ жатады. Бірақ формальдегидті инактивтендіргіш ретінде пайдаланған кезде температуралық уақыт режимін сақтау қажет. БПЛ вирустарды тиісті түрде инактивтендіреді, алайда, Ньюкасл ауруына қарсы вакцина өндірісінде кең ауқымда қолдану оның қымбаттығына байланысты экономикалық тұрғыдан тиімсіз. Формальдегид пен ДЭИ вирусты дұрыс инактивациялайды және экономикалық жағынан қолжетімді.

Түйін сөздер: Ньюкасл ауруы, инактиванттар, реактогенділік, вирус, вакцина.

E.Zh. Kalimolda, K.K. Jekebekov, Zh.S. Abay, K.A. Shoraeva, A.S. Nurpeisova

RGE “Research Institute of Biological Safety Problems” CS MES RK, Gvardeiskiy, Kazakhstan

PROSPECTIVE INACTIVENTS IN BIOTECHNOLOGY VACCINES AGAINST NEWCASTLE’S DISEASE

Abstract. Newcastle disease is a dangerous avian pathogen caused by a virus in the *Paramyxoviridae* family that can infect a wide variety of wild and domestic birds. The most effective means of combating this disease is vaccination prophylaxis. The main types of vaccine against ND are inactivated and live vaccines. Live vaccines have a number of disadvantages, the main of which is reactogenicity; when vaccinated with live vaccines, the risk of spread and occurrence of ND cases increases.

A decisive step in inactivated vaccine technology against viral diseases is the balanced inactivation of the virus and the selection of the inactivant. According to the literature data, the most promising inactivants are formaldehyde and DEI. However, when using formaldehyde as an inactivant, it is necessary to observe the temperature-time regime. In part, some temperature failures can lead to incomplete inactivation of the virus, which leads to outbreaks. BPL properly inactivates viruses and is capable of eliciting a protective immune response. However, due to its high cost, BPL is not economically viable in large-scale vaccine production. Formaldehyde and DEI properly inactivate the virus and inactivated vaccines can induce an immune response.

Key words: Newcastle disease, inactivants, reactogenicity, virus, vaccine.

Введение. Болезнь Ньюкасла (лат. *Pseudopestis avium*) – всемирное инфекционное заболевание птицеводства, поражающее множество диких и домашних птиц. БН является эндемическим заболеванием во многих развивающихся странах мира и легко распространяется различными путями. Первые БН была зарегистрирована на острове Ява Краневальдом в 1926 году. С 1927 года ее стали регистрировать в различных странах Азии, Америки и Европы. Дойль в 1927 году обнаружил эту болезнь вблизи города Ньюкасл и дал соответствующее название болезни. В США заболевание описано в 1935 г. как пневмоэнцефалит цыплят, далее в 1941-1945 гг. болезнь широко распространилась в европейских странах и на территории бывшего СССР. За все годы существования болезнь Ньюкасла нанесла большой экономический ущерб заграничным и отечественным птицефермам. Все обусловлено тем, что 80-90% заболевших кур – погибает [1-5].

В 2010, 2012 и 2013 годах заболевание птиц вирусом болезни Ньюкасла отмечено в различных регионах Республики Казахстан. По состоянию на 21 сентября 2021 года Минсельхоз Казахстана сообщил о падеже 54 тыс. голов птицы в Северо-Казахстанской, Акмолинской, Костанайской, Павлодарской и Карагандинской областях [6].

Возбудителем болезни является РНК-содержащий вирус, относящийся к роду парамиксовирусов семейства *Paramyxoviridae*. Вирион чаще сферической формы (диаметр 120-180 нм), иногда палочковидной, головастикообразной и овальной формы. Вирионы авирулентных штаммов более крупных размеров, чем вирулентных штаммов (90-200 нм) [4]. Поверхность вириона покрыта небольшими, радиально расположенными отростками. В состав вирусной частицы входят рибонуклеопротеид (РНП), гемагглютинин, ферменты (нейраминидаза, полимеразы), а также гемолизин, липиды и углеводы. Вирус хорошо размножается в развивающихся 10-12 суточных куриных эмбрионах при любом методе заражения [4, 5]. Все выделенные до настоящего времени вирусы БН, семейства *Paramyxoviridae*, род *Paramyxovirus*, разделены на два класса, представляющие разнообразные и постоянно развивающиеся группы вирусов. Выявленные штаммы вируса являются иммунологически однородными, однако их вирулентность – способность вызывать заболевания у чувствительных организмов – значительно отличается, что влияет на степень проявления заболевания [7]. При первом занесении возбудителя в хозяйство заболеваемость может составлять до 100 % поголовья и заканчиваться гибелью до 60-90 % птицы [8].

Основным источником инфекции для БН является инфицированная и переболевшая птица, которая способна выделять вирус с воздухом при дыхании, снесенными яйцами и всеми выделениями организма. Всего через сутки после инфицирования начинается выделение возбудителя, а после выздоровления вирус сохраняется в организме еще на протяжении от двух до четырех месяцев. Чаще всего БН проявляется в виде эпизоотии, имеет определенную периодичность и склонность летне-осеннего сезона. Устойчивость вируса БН к действию физических и химических факторов зависит от наличия белка и pH среды [8, 9]. Вирус устойчив при pH в диапазоне (2,0-10,0) в высушенных органах при температуре 17-18 °С 2 года, в птичниках в зимнее время – 140 дней, летом 7 дней. Эта сезонность, в свою очередь, связана с активизацией хозяйственной деятельности и увеличением поголовья птицы в это время. Однако на промышленных хозяйствах могут формироваться стационарные очаги заболевания, связанные с гигиеническими недостатками в текущей системе выращивания, с которыми трудно бороться [9, 10].

Сложность окончательного устранения возбудителя болезни заключается в его способности к длительному сохранению во внешней среде и возможности постоянной циркуляции в одном комплексе между различными половозрастными группами птицы [10, 11].

Для окончательного искоренения БН рекомендуется избавляться от всего поголовья птиц и для полного уничтожения возбудителя труп нужно закопать поглубже и засыпать негашеной известью [11].

Обсуждение. Во многих странах основным элементом защиты птиц от БН является иммунопрофилактика, основанная на применении вакцин, которые содержат: – инактивированный штамм (изолят) вируса БН. К этой группе относятся вакцины: *Nobilis Paramyxо P201* и *Colombovac PMV* (Голландия), *Paramixovacol* (Румыния), *Salmovir* – (Польша), *Hipraviar* – AP (Испания) [3-5]; – живой аттенуированный вирус БН. К этой группе относятся вакцины из штамма Ла-Сота New Vac-LS и штамма Ulster Poulvac – NDW Fort Dodge (США) [9].

Параллельно с инактивированной вакциной против данной инфекции в мире применяют и живые вакцины. Живые вакцины, на примере коммерческого препарата New VacLS и Poulvac–NDW, состоит в том, что они создают местный иммунитет (в месте первичного контакта на слизистых оболочках верхних дыхательных путей), а также в короткие сроки – напряженный общий иммунитет. Однако живые вакцины имеет ряд недостатков, главный из которых – реактогенность, частота проявления которого находится в прямой зависимости от иммунного состояния привитой птицы, наличия сопутствующих инфекций и инвазий. Результативность первичной иммунизации живыми вакцинами против НБ может снижаться при наличии у прививаемых птенцов материнских антител. Кроме того, при вакцинации живыми вакцинами возрастает риск распространения и возникновения случаев БН, в результате несоблюдения инструкций по применению и наличия иммунодепрессивных птиц [11, 12].

Инактивированные вакцины обладают рядом преимуществ, к их числу следует отнести: сравнительно низкий уровень побочных реакций у привитой птицы, возможность использования в ситуациях, непригодных для применения живых вакцин, их можно применять в независимости от иммунного статуса или наличия материнских антител у молодняка, сопутствующих вирусных и бактериальных инфекций. После вакцинации инактивированными препаратами формируется напряженный общий иммунитет продолжительностью не менее года [12].

При инактивации вирусосодержащей суспензии для составления вакцины необходимо решить две основные задачи: во-первых, инфекционный вирус должен быть полностью инактивирован, чтобы быть безопасным, и, во-вторых, вирусные эпитопы, важные для индукции защитного иммунитета, должны сохраняться после инактивации, чтобы иметь антиген высокого качества [13, 14].

В производстве инактивированных препаратов, ввиду простоты и надежности технологического процесса инактивации, широко используются химические соединения. При разработке вакцины против вирусных болезней очень важно сохранение структуры вируса. На основе литературных данных, встречаются инактивации вирусов БН формальдегидом, БПЛ, ДЭИ, глутаральдегидом, гидроксиламином, активированной плазмой водой, эмульгаторами типа Tween для создания инактивированной вакцины [14, 15]. Однако, среди вышеперечисленных химических инактиваторов наиболее широкое применение нашли формальдегид, ДЭИ и БПЛ, которые на протяжении многих лет используются в производстве вакцин как ветеринарного, так и медицинского назначения [16, 17].

Согласно исследованиям Ирис Дельру и соавторов (2012), Кирилла М. и соавторов (2017) составлена таблица 1, где представлены наиболее широко применяемые инактиваторы в биотехнологии вакцины против болезни Ньюкасла.

Таблица 1 – Виды широко применяемых инактивантов в биотехнологии вакцины против болезни Ньюкасла

№ п/п	Используемый инактивант	Возможность влияние на образования иммунного ответа	Реактогенность, безопасность	Возможные побочные реакции на организм	Действия на вирусные белки (сшивание денатурация, разложение)
1	Формальдегид	Могут обеспечить формирование защитного уровня иммунитета на 14-21 сутки, с продолжительностью иммунной защиты не менее года [14, 17-21]	Безвредна [14, 17-21]	Могут наблюдаться недомогание, одышка, снижение аппетита самопроизвольно исчезающие через 10-12 суток [14, 17-21]	Высокая концентрация остаточного формальдегида в инактивируемом материале могут разрушить структуру вирусных белков [14, 17].
2	β-пропиолактон (БПЛ)	Могут обеспечить образования иммунного ответа [14, 17, 22, 23]	Безвредна [14, 17, 22, 23]	Могут наблюдаться недомогание на 1-2 сутки [14, 17, 22, 23]	Может алкилировать (разрушить) вирусный геном [14, 17].
3	Димерэтилен-имин (ДЭИ)	Могут обеспечить выработку защитного уровня иммунитета [14, 17, 24]	Безвредна [14, 17, 24]	На 4-5 день после вакцинации у молодняка может появиться недомогание, одышка, снижение аппетита [14, 24]	Высокая концентрация остаточного ДЭИ в инактивируемом материале могут разрушить структуру вирусных белков [14, 17].
4	Глутаральдегид	Могут обеспечить выработку защитного уровня иммунитета [14, 17, 25-29]	Высокая реактогенность [14, 17, 25-29]	На 2 сутки у молодняка могут наблюдаться недомогание, одышка, снижение аппетита, а у взрослых птиц снижение яйценоскости. [14, 17].	Может разрушить структуру, как генома, так и белка [14, 17].

БПЛ, формальдегид и ДЭИ являются наиболее успешными и перспективными инактивантами вирусных болезней и в том числе БН, который в основном нацелены на геном [14, 17-24].

БПЛ широко используется для инактивации вирусов в вакцинах, в основном действуя как алкилирующий агент на гуанин вирусной ДНК или РНК. Нуклеофильный гуанин нуклеиновых кислот реагирует с электрофильным БПЛ через механизм нуклеофильного замещения, вызывая раскрытие кольца, напряженного БПЛ и N-алкилирование гуанина [14, 17].

Инактивация вирусов с применением ДЭИ была впервые представлена более 30 лет назад [14, 17]. ДЭИ может инактивировать вирус с сохранением доменов, связанных с проникновением вируса. Более того не влияет на антигенность вируса, также ДЭИ при масштабном производстве является экономический доступным инактивантом [14, 17, 24].

При использовании формальдегида в качестве инактиванта необходимо соблюдать температурно-временной режим [17]. Частично некоторые свои температурного режима могут привести к неполной инаktivации вируса, однако в масштабном производстве иммунобиологических препаратов экономический удобно из-за его дешевизны [14, 17, 21].

Выводы. Таким образом, БПЛ должным образом инаktivирует вирусы. Инаktivированная вакцина с БПЛ способен вызывать защитный иммунный ответ. Однако БПЛ в связи дороговизной, экономический не выгодно в масштабном производстве вакцины. Формальдегид и ДЭИ должным образом инаktivируют вирусы БН и являются экономический доступными инаktivантами [14, 17-21, 24].

ЛИТЕРАТУРА

1. Alexandr D.J., Aldous E.W., Fuller C.M. The long view a selective review of 40 years of Newcastle disease research // Avian Pathology. – 2012. – P. 329-335.
2. Kraneveld F.C. Apoultry disease in the Dutch East Indies // Ned. Indisch. Bl. Diergeneeskd, 1926. – P. 448-450.
3. Doyle T.M. Ahitherto unrecorded disease of fowls due to a filter-passing virus // J. Comp. Pathol. – 1927. – P. 44-69.
4. Kaleta E.F., Baldaus C. Newcastle disease in free-living and pet birds. In: Newcastle disease // D.J. Alexander (ed.). Kluwer Acad. Publ., Boston. – 1988. – 246 p.
5. Kim L.M., King D.J., Curry P.E., Suarez D.L., Swayne D.E., Stallknecht D.E., Slemmons R.D., Pedersen J.C., Senne D.A., Winker K., Afonso C.L. Phylogenetic diversity among low-virulence newcastle disease viruses from waterfowl and shorebirds and comparison of genotype distributions to those of poultry-origin isolates // Virol J. – 2007. – 81. – P. 12641-12653.
6. <https://eldala.kz/novosti/zerno>
7. Singh R.K., Dhama K., Chakraborty S. et al. Nipah virus: epidemiology, pathology, immunobiology and advances in diagnosis, vaccine designing and control strategies a comprehensive review // Vet Q. – 2019. – P. 26-55.
8. Diel D.G., Silva L.H.A., Liu H., Wang Z., Miller P.J., Afonso C.L. Genetic diversity of avian paramyxovirus type 1: Proposal for a unified nomenclature and classification system of Newcastle disease virus genotypes // Infect. Genet. Evol. – 2012. – P. 1770-1779.
9. Darrell R., Kapczynski D.R., Claudio L., Afonso C.L., Patti J. Miller Immune responses of poultry to Newcastle disease virus // Dev Comp Immunol, 2013. – P.187-189.
10. Alexander D.J. Newcastle disease and other avian paramyxoviruses // Rev Sci Tech. – 2000. – P. 17-19.
11. Bello M.B., Yusoff K., Ideris A., Hair-Bejo V., Peeters P.H. Abdul Rahman Omar Diagnostic and Vaccination Approaches for Newcastle Disease Virus in Poultry // The Current and Emerging Perspectives Biomed Res Int. – 2018. – 213 p.
12. Bell J.A., Sundberg J.P., Ghim S.J., Newsome J., Jenson A.B., Schlegel R. A formalin-inactivated vaccine protects against mucosal papillomavirus infection: a canine model // Pathobiology. – 1994. – P. 19-48.
13. Mahmoud N.R., El-Deeb A.H., Emara M.M., Abd El-Khaleck M.A., Hussein A.H. Genotypes II and VIId-based inactivated Newcastle disease vaccine reduces virus shedding // Virusdisease. – 2019. – P. 453-461.
14. Dimitrov K.M., Afonso C.L., Qingzhong Y., Miller P.J. Newcastle disease vaccines - A solved problem or a continuous challenge // Vet Microbiol. – 2017. – P. 126-136.
15. Naveed G., Ehtisham-Ul-Haque S., Khan I., Rahman S.U., Anam S., Usman M., Shakir M Z., Naveed A., Abbas G., Faisal R.A. Enhancement in humoral response against inactivated Newcastle disease vaccine in broiler chickens administered orally with plant-derived soyasaponin // Poult. Sci., 2020. – P. 1921-1927.

16. Su X., Tian Y., Zhou H., Li Y., Zhang Z., Jiang B., Yang B., Zhang J., Jing Fang Inactivation Efficacy of Nonthermal Plasma-Activated Solutions against Newcastle Disease Virus // *Appl Environ Microbiol.* – 2018. – P. 36-37.
17. Delrue I., Verzele D., Annemieke M., Nauwynck H.J. Inactivated virus vaccines from chemistry to prophylaxis: merits, risks and challenges // *Expert Review of Vaccines.* – 2014. – P. 695-719.
18. Metz B., Kersten G.F., Hoogerhout P. et al. Identification of formaldehyde-induced modifications in proteins reactions with model peptides // *Biol. Chem.* – 2004. – P. 6235-6243.
19. Fraenkel-Conrat H., Mechem D.K. The reaction of formaldehyde with proteins demonstration of intermolecular crosslinking by means of osmotic pressure measurements // *Biol. Chem.* – 1949. – P. 477-486.
20. Kuykendall J.R., Bogdanffy M.S. Efficiency of DNA-histone crosslinking induced by saturated and unsaturated aldehydes in vitro // *Mutat. Res.* – 1992. – P. 131-136.
21. Permana P.A., Snapka R.M. Aldehydeinduced protein-DNA crosslinks disrupt specific stages of SV40 DNA replication // *Carcinogenesis*, 1994. – P. 1031-1036.
22. Perrin P., Morgeaux S. Inactivation of DNA by beta-propiolactone. // *Biologicals.* – 1995. – P. 207-211.
23. Uittenbogaard J.P., Zomer B., Hoogerhout P., Metz B. Reactions of beta-propiolactone with nucleobase analogues, nucleosides, and peptides: implications for the inactivation of viruses // *Biol. Chem.* – 2011. – P. 36198-36214.
24. Oday A.A., Bello M.B., Yeap S.K., Omar A.R., Aini I. Protective efficacy of inactivated Newcastle disease virus vaccines prepared in two different oil-based adjuvants // *Onderstepoort J Vet Res.* – 2020. – P. 1-7.
25. Chemistry E. Glutaraldehyde Versus Formaldehyde // Bedino J.H. (Ed.). The Champion Company, Springfield, OH, USA, 2003.
26. Cheung D.T., Nimni M.E. Mechanism of crosslinking of proteins by glutaraldehyde II. Reaction with monomeric and polymeric collagen // *Connect Tissue Res.* – 1982. – P. 201-216.
27. Richards F.M., Knowles J.R. Glutaraldehyde as a protein cross-linkage reagent // *Mol. Biol.* – 1968. – P. 231-233.
28. Keles I., Woldehiwet Z., Murray R.D. Vaccination with glutaraldehyde-fixed bovine respiratory syncytial virus (BRSV)-infected cells stimulates a better immune response in lambs than vaccination with heat-inactivated cell-free BRSV // *Vaccine.* – 1998. – P. 1172-1178.
29. Cepica A., Beauregard M., Qian B. Fluorescence spectroscopy monitoring of the conformational restraint of formaldehyde- and glutaraldehyde-treated infectious bursal disease virus proteins // *Vaccine.* – 1998. – P. 1957-1961.

УДК 62.13.99

**М.С. Сейсенбаева, Н.К. Оразымбетова, Г.Д. Наханова,
Ж.К. Кошеметов, Б.К. Умуралиев, М.Б. Кылышева**

РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности»
КН МОН РК, пгт. Гвардейский, Казахстан
E-mail: unots@biosafety.kz

ПРИГОТОВЛЕНИЕ КОНЪЮГАТА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ЧУМЫ МЕЛКИХ ЖВАЧНЫХ ЖИВОТНЫХ

Аннотация. Приготовлен вирус специфический иммуноферментный конъюгат на основе метки специфического глобулина вируса чумы мелких жвачных животных с ферментом пероксидазы для выявления антигена вируса ЧМЖЖ. Предельный титр конъюгата при диагностике ЧМЖЖ в ИФА составил 1:400 и рабочий титр 1:50, соответственно. Полученный конъюгат позволяет модифицировать и упростить технику прямого ИФА для быстрой диагностики вируса ЧМЖЖ.

Ключевые слова: антиген, чумы мелких жвачных животных, специфический глобулин.

**М.С. Сейсенбаева, Н.К. Оразымбетова, Г.Д. Наханова,
Ж.К. Кошеметов, Б.К. Умуралиев, М.Б. Кылышева**

ҚР БҒМ ҒК «Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты» РМК,
Гвардейский қтп., Қазақстан

ҰСАҚ КҮЙІС ҚАЙЫРАТЫН ЖАНУАРЛАР ОБАСЫН БАЛАУ ҮШІН КОНЪЮГАТТЫ ДАЙЫНДАУ

Аннотация. ҰҚҚМО вирусының антигенін анықтау үшін пероксидаза ферментімен ұсақ күйіс қайыратын жануарлардың оба вирусының тәнді глобулиннің байланысы негізінде тәнді иммуноферментті конъюгат вирусы дайындалды. ИФТ-да ҰҚҚМО диагностикасы кезіндегі конъюгаттың шекті титрі 1:400 және жұмыс титрі тиісінше 1:50 құрады. Алынған конъюгат ҰҚҚМО вирусын жылдам диагностикалау үшін тікелей ИФТ техникасын өзгертуге және жеңілдетуге мүмкіндік береді.

Түйін сөздер: антиген, ұсақ күйіс қайыратын малдардың обасы, тәнді глобулин.

**M.S. Seisenbayeva, N.K. Orazymbetova, G.D. Nakhanova,
Zh.K. Koshemetov, B.K. Umuraliev, M.B. Kylysheva**

RGE "Research Institute of Biological Safety Problems" CS MES RK, Gvardeiskiy, Kazakhstan

PREPARATION OF A VIRUS-CONJUGATE TO DETECT THE ANTIGEN OF THE PLAGUE VIRUS OF SMALL RUMINANTS

Abstract. A virus-specific enzyme immunoassay conjugate was prepared based on the label of a specific globulin of the small ruminant plague virus with a peroxidase enzyme to detect

the antigen of the small ruminant plague virus. The limiting conjugate titer in the diagnosis of plague of small ruminants in ELISA was 1:400 and the working titer was 1:50, respectively. The resulting conjugate makes it possible to modify and simplify the technique of direct ELISA for rapid diagnosis of the plague virus of small ruminants.

Key words: antigen, plague of small ruminants, specific globulin.

Введение. ЧМЖЖ – высококонтагиозное вирусное заболевание, характеризующееся некротическим стоматитом, диареей и бронхопневмонией. Возбудитель – РНК-содержащий вирус, относится к семейству парамиксовирусов, роду морбилливирус [1].

Болезнь впервые идентифицирована и описана в 1942 году [2]. С тех пор данное заболевание описано разными исследователями под разными названиями, включая «Ката», «псевдочума крупного рогатого скота», «стоматитопневмоэнтеритный синдром», «энтеритно-пневмонийный комплекс». Заболевание было названо ЧМЖЖ из-за его клинического, патологического и иммунологического сходства с чумой крупного рогатого скота (КРС). Инкубационный период инфекции длится 4-5 дней, после чего развивается лихорадка, длящаяся 6-8 дней, а затем у коз наступает смерть, которые более чувствительны, чем овцы [3, 4].

ЧМЖЖ причиняет большой экономический ущерб, особенно в странах, где преимущественно разводят мелких жвачных животных. Например, в Нигерии ежегодные потери составляют 1,5 млн. долларов. Среди восприимчивых животных заболеваемость достигает 100%, а смертность до 90%.

ЧМЖЖ за последнее 20-летие всё больше и больше охватывает новые территории Африканских и Азиатских стран. Изучение и анализ эпизоотологических данных по ЧМЖЖ показали, что данное заболевание с 1942 по 1979 годы регистрировалось только на западе африканского континента, в таких странах как Нигерия, Бенин, Того, Гана и Сенегал. А в 1980-1982 годы болезнь уже регистрировали на востоке Африки в Судане, а начиная с 1987 года она перекинулась на Индию и Абу-Даби, захватывая все новые страны [5-7].

В последние годы болезнь была зафиксирована на Ближнем Востоке и аравийском полуострове, в таких странах как Исламская Республики Иран, Ирак, Израиль, Иордания, Кувейт, Ливан, Оман, Саудовская Аравия, Объединенные Арабские Эмираты и Йемен, а также есть серологическое подтверждение указанной болезни в Сирийской Арабской Республике и Турции [8, 9].

Развитие торговых отношений, транспорта, туризма и миграция диких восприимчивых к вирусу животных способствует распространению ЧМЖЖ за пределы западной Африки. Так в последние годы болезнь регистрируется практически во всех странах центральной, средней и южной Азии, в странах ближнего востока и Африканского континента [10, 11].

Вспышки, произошедшие в Западной Турции и Китае, показывают, что риски, связанные с вирусом, могут погубить до 90 процентов животных в течение нескольких дней.

Болезнь регистрируется в Турции, Китае и установлена в Таджикистане, Кыргызстане и Казахстане [12-15].

В настоящее время для диагностики инфекционных болезней в лабораторных условиях и научных учреждений всё ещё часто используются серологические тесты, такие как РДП, РТГА, РСК, РНГА, МФА, ИФА. Среди них метод ИФА, который благодаря своей простоте и высокой чувствительности, зарекомендовал себя как эффективный и современный метод лабораторной диагностики вирусных инфекций сельскохозяйственных животных, пушных зверей и птиц.

В связи с этим, целью нашей работы являлась усовершенствование тест-системы на основе ИФА для выявления антигена в биоматериалах с использованием специфического конъюгата вируса чумы мелких жвачных животных.

Материалы и методы. Для получения специфического конъюгата использовали производственный штамм «G-45 МК» вируса ЧМЖЖ и фермент пероксидазы из корней хрена производства Великобритании. Для конъюгирования специфическим глобулином с ферментом проводили активирование углеводов остатков фермента пероксидазы до альдегидных форм периодатным методом по M. Wilson, P. Nakane (1978). К раствору активированного фермента (20 мг/мл) добавляли различные концентрации от 10 до 30 мг специфического глобулина. Для оптимальной конъюгации и восстановления иминовой связи добавляли боргидрит натрия. Все условия, необходимые для оптимального соотношения фермента и специфического глобулина в конъюгате найдены опытным путем.

Очистку приготовленного иммунопероксидазного конъюгата проводили путем гель-фильтрации через сефадекс G-200. Собирали фракции по 3-5 см³ при скорости элюции 15-20 см³/час. Собранные фракции контролировали на спектрофотометре при длинах волн 280 и 403 нм.

Для каждой фракции конъюгата вычисляли показатель «RZ» по формуле (1):

$$RZ = D_{403}/D_{280} \quad (1)$$

где, фракции с $RZ = 0,3-0,6$ собирали в единый конъюгат, а остальное отбрасывали.

Активность и специфичность полученных иммунопероксидазных конъюгатов проверяли в ИФА.

Титром диагностического конъюгата считали то максимальное его разведение которое еще выявляло специфические антигены в наивысшем разведении. Визуально результат учитывали по разнице окраски субстрата в лунках, содержащих специфические антигены вируса ЧМЖЖ, в сравнении с окраской субстрата в лунках с отрицательными (гетерологичными) пробами. При инструментальном учете результат реакции считали положительными, если отношение оптической плотности субстрата со специфическими антигенами вируса ЧМЖЖ к оптической плотности субстрата с отрицательными составляет 2 и больше.

Результаты исследований. Полученными данными показана принципиальная возможность конъюгирования специфического глобулина с ферментом пероксидазой. В опыте испытаны три разных концентрации белка. После получения фракции конъюгатов измеряли оптические плотности на спектрофотометре Genova Plus, результаты представлены в графике 1.

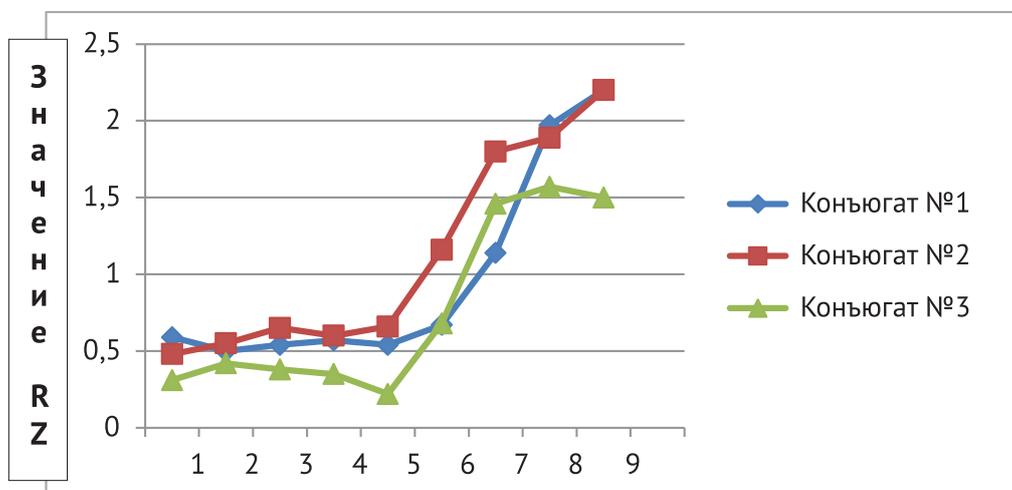


График 1 – Фракции конъюгатов
Конъюгат 1 – 30 мг белка; конъюгат 2 – 20 мг белка; конъюгат 3 – 10 мг белка

По результатам ИФА наиболее активный конъюгат получен при использовании 30 мг белка. В дальнейших исследованиях использовали конъюгат №1.

В результате проведенных исследований конъюгат №1 оказался активным и специфичным, предельный титр конъюгата при диагностике ЧМЖЖ в ИФА составил 1:400 и рабочий титр 1:50, соответственно.

Таблица 1 – Определение рабочей разведений вирусспецифического конъюгата в ИФА при ЧМЖЖ

Конъюгат		Разведения специфического антигена							Разведение нормального антигена	
№ серии	Разведения конъюгата	10	20	40	80	160	320	640	10	20
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Вируса ЧМЖЖ										
1	50	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	100	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	200	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	400	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	800	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	1600	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3200	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6400	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечания:
 1. Разведения конъюгата и антигенов выражены в обратных величинах
 2. «+» – положительный результат в ИФА
 3. «-» – отрицательный результат

Как видно из таблицы, все представленные и испытанные варианты ИФА позволяли выявлять антигены вируса ЧМЖЖ в биоматериалах. При этом отмечено, что изготовленный нами вирусспецифический иммунопероксидазный конъюгат обладает универсальностью, то есть с применением этого конъюгата можно выявлять антигены в любых биоматериалах, не прибегая к дорогим коммерческим наборам.

Наряду с этим в сравнительных исследованиях полученный меченый специфический глобулин в концентрации 30 мг белка оказался наиболее активным по сравнению с другими конъюгатами в 2-4 раза, что позволило применять тест-систему прямого ИФА как перспективное средство диагностики.

Заключение. В результате приготовлен вирус специфический иммуноферментный конъюгат для выявления антигена вируса чумы мелких жвачных животных. Вирус специфический иммуноферментный конъюгат №1 активный и специфичный, предельный титр конъюгата при диагностике ЧМЖЖ в ИФА составил 1:400 и рабочий титр 1:50, соответственно.

ЛИТЕРАТУРА

- Gibbs E.P., Taylor W.P., Lawman M.J.P., Bryant J. Classification of peste des petits ruminants virus as the fourth member of the genus morbillivirus // Intervirology II. – 1979. – P. 268-274.
- Gargadennec L., Lalanne A. La peste des petits ruminants // Bull. Serv. Zoo. A.O.F., 1942. – 16 p.
- Степанов А.В., Вишняков И.Ф., Стрижаков А. Персистенция вируса чума мелких жвачных в перевиваемых культуре клетке // Материалы межд. науч.-практ. конф. – Покров, 2000. – 58 с.
- Неверовская Н.С. и др. Чувствительность серийных культур клеток тестикулярного ткани ягненка (ТЯ) к вирусам пограничной болезни овец и чумы мелких жвачных // Материалы межд. науч.-практ. конф. – Покров, 2000. – 32 с.

5. Gibbs E.P.J., Taylor W.P., Lawman M.J.P. The isolation of adenoviruses from goats affected with peste des petits ruminants in Nigeria // *Res. Vet. Sci.*, 1977. – Vol. 23. – P. 331-335.
6. Ali B.E.H., Taylor W.P. The isolation of peste des petits ruminants virus (PPRV) from the Sudan // *Res. Vet. Sci.*, 1984. – Vol. 36. – P. 1-4.
7. Govindarajan R., Koteeswaran A., Venugopalan A.T., Shyam G., Shaouna S., Shaila M.S., Ramachandran S. Isolation of pestes des petits ruminants virus from an outbreak in Indian buffalo (*Bubalus bubalis*) // *Vet. Rec.* – 1997. – Vol. 141. – P. 573-574.
8. Abu Elzein E.M.E., Hassanien M.M., Al Afaleq A.I., Elhadi M.A., Housawi F.M.I. Isolation of peste des petits ruminants from goats in Saudi Arabia // *Vet. Rec.*, 1990. – Vol. 127. – P. 309-310.
9. Moustafa T. Rinderpest and peste des petits ruminants-like disease in the Al-A in region of the United Arab Emirates / Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Banha, Zagazig University, Egypt // *Rev. Sci. Tech.* – 1993. – Vol. 12. – P. 857-863.
10. Amjad H., Qamar-ul-Islam, Forsyth M., Barrett T., Rossiter P.B. Peste des petits ruminants in goats in Pakistan // *Vet. Rec.* – 1996. – Vol. 139. – P. 118-119.
11. Akakpo A.J., Deconinck P., Amegatse K., Kaboret Y., Oudar J. An outbreak of pest of small ruminants virus in periurban herds of Dakar, epidemiological and medical importance. Une epizootie de la Peste des Petits Ruminants (PPR) en élevage periurbain a Dakar: importance épidémiologique et médicale // *Rev. Med. Vet.* – 1996. – Vol. 147. – P. 447-452.
12. Закутский Н.И., Балышев В.М., Книзе А.В., Юрков С.Г. Чума мелких жвачных животных (современное состояние, эпизоотология, специфическая профилактика и меры борьбы) // *Научный журнал КубГАУ.* – 2012. – С. 1-15.
13. Орынбаев М.Б., Мамадалиев С.М., Кошеметов Ж.К., Нурабаев С.Ш. Чума мелких жвачных животных в Республике Таджикистан // *Международная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы ветеринарной медицины и сельскохозяйственной биотехнологии».* – Павлодар, 2005. – С. 66-71.
14. Мамадалиев С.М., Кошеметов Ж.К., Нурабаев С.Ш., Матвеева В.М. Ажибаев А.Ж., Хайруллин Б.М. Мониторинг чумы мелких жвачных животных на территории Республик Казахстан и Средней Азии // *Материалы межд. науч.- практ. конф. Ульяновск, 2006.* – С. 313-316.
15. Книзе А.В., Париков С.В., Болгова М.В., Тураев Р.А., Балышев В.М. Мониторинг мировой эпизоотической ситуации по чуме мелких жвачных животных и прогноз ее распространения в 2015-2018 годы // *Актуальные вопросы ветеринарной биологии, 2014.* – С. 15-20.

УДК: 619:580.20/08-018

А.А. Керимбаев^{1,2}, С.Ш. Жугунисов¹, Б.Ш. Мырзахметова¹,
С.Ш. Нурабаев¹, К.Б. Бисенбаева¹, А.М. Анарбекова¹, М.Ж. Кауқарбаева¹,
М.Ж. Чоров², М.Т. Мухамбетов¹, Л.Б. Кутумбетов¹.

¹РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности»
КН МОН РК, пгт. Гвардейский, Казахстан

²Киргизский Государственный университет им. И.Арабаева, г. Бишкек, Киргизская Республика

ЭФФЕКТИВНЫЙ РЕЖИМ ИНАКТИВАЦИИ ВИРУСА SARS-COV-2 ОБЕСПЕЧИВАЮЩИЙ СОХРАННОСТЬ ЕГО АНТИГЕННОСТИ

Аннотация. В данной работе представлены результаты исследования по отработке метода инактивации вируса SARS-CoV-2. На основании проведенных данных было установлено, что при инактивации данного вируса оптимальным параметром является 0,05% формальдегид в конечной концентрации при температуре 20-22°C.

Ключевые слова: культивирование, инактивация, антитела, вирус SARS-CoV-2, формальдегид, контроль.

А.А. Керімбаев^{1,2}, С.Ш. Жүгүнісов¹, Б.Ш. Мырзахметова¹,
С.Ш. Нұрабаев¹, К.Б. Бисенбаева¹, А.М. Анарбекова¹, М.Ж. Қауқарбаева¹,
М.Ж. Чоров², М.Т. Мұхамбетов¹, Л.Б. Құтымбетов¹.

¹ҚР БҒМ ҒК «Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты» РМҚ,
Гвардейский қтп., Қазақстан

²И. Арабаева атындағы Қырғыз мемлекеттік университеті, Бішкек қ., Қырғызстан

АНТИГЕНДІГІ САҚТАЛЫП ҚАЛАТЫН SARS-COV-2 ВИРУСЫН ИНАКТИВАЦИЯЛАУДЫҢ ТИІМДІ РЕЖИМІ

Аннотация. Бұл жұмыста SARS-CoV-2 вирусын инактивациялау әдісін пысықтау бойынша зерттеу нәтижелері ұсынылған. Жүргізілген деректер негізінде осы вирустың инактивациясы кезінде 20-22°C температурада соңғы концентрациядағы 0,05% формальдегид оңтайлы параметр болып табылатыны анықталды.

Түйін сөздер: өсіру, инактивация, антиденелер, SARS-CoV-2 вирусы, формальдегид, бақылау.

A.A. Kerimbaev^{1,2}, S.Sh. Zhugunisov¹, B.Sh. Myrzahmetova¹,
S.Sh. Nurabaev¹, K.B. Bisenbaeva¹, A.M. Anarbekova¹, M.Zh. Kaukarbaeva¹,
M.Zh. Chorov², M.T. Muhambetov¹, L.B. Kutumbetov¹.

¹RGE "Research Institute of Biological Safety Problems" CS MES RK, Gvardeiskiy, Kazakhstan
² I. Arabaeva Kyrgyz State University, Bishkek, Kyrgystan

EFFECTIVE REGIME OF INACTIVATION OF SARS-COV-2 VIRUS WHICH KEEPS ITS ANTIGEN

Abstract. This paper presents the results of a study on the development of a method of inactivation of the SARS-CoV-2 virus. Based on the data obtained, it was found that when inactivating this virus, the optimal parameter is 0.05% formaldehyde in the final concentration at a temperature of 20-22°C.

Key words: cultivation, inactivation, antibodies, SARS-CoV-2 virus, formaldehyde, control.

Введение. В конце 2019 года в Китайском городе Ухань провинции Хубэй отмечена вспышка пневмонии неизвестного происхождения. Экспертами и учеными установлено, что возбудителем заболевания стал новый тип коронавируса SARS-CoV-2 [1]. Новая коронавирусная инфекция COVID-19 с момента официального объявления по сегодняшний день распространилась в 222 страны мира, поразив 27 5063 925 человек по всему миру, и привела к смерти 5 372 188 человек [2]. В марте 2020 года в Казахстане зарегистрированы первые случаи заболевания коронавирусной инфекцией COVID-19. Появление SARS-CoV-2 выдвинуло *Coronavirus* на первый план как потенциально важный человеческий патогенный вирус. Возникновение еще одной инфекции, вызванной считавшимся ранее не пандемическим, представителем семейства *Coronaviridae*, подчеркивает проблему постоянно возникающих инфекционных заболеваний и важность готовности реагирования.

В современном мире вакцинация в целях профилактики коронавируса рассматривается как социально значимый, экономически эффективный подход. Поэтому, разработка технологии изготовления вакцины против коронавирусной инфекции COVID-19 для обеспечения потребности Республики Казахстан является важнейшей и основной задачей биологической безопасности и устойчивого развития нашего государства [3, 4].

Одним из важных этапов приготовления инактивированной вакцины является режим инактивации вируса. В связи с этим нами были проведены исследования по разработке эффективного режима инактивации вируса SARS-CoV-2 с максимальным сохранением его антигенного потенциала, являющегося основой иммуногенности антигена.

Материалы и методы

Вирус. В исследовании использовался штамм SARS-CoV-2/KZ_Almaty04.2020 вируса коронавирусной инфекции COVID-19, депонированный в республиканском депозитарии микроорганизмов РГП «НИИ проблем биологической безопасности». Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан, полученный из эпидемического вируса SARS-CoV-2.

Животные. В исследованиях использованы сирийские хомяки (n = 100) обоего пола в возрасте 3-4 месяцев и живой массой 60-80 г.

Культивирование вируса SARS-CoV-2. Культивирование вируса проводили в монослойной культуре клеток Vero, используя в качестве поддерживающей среды DMEM с содержанием 2 % FBS. Наличие вируса устанавливали по ЦПД в культуре клеток. Специфичность цитопатологии и идентификацию вируса подтверждали в ПЦР и реакции нейтрализации.

Определение инфекционной активности вирусов. Инфекционную активность вирусов определяли методом титрования в культуре клеток. Готовили последовательные 10-кратные разведения вирусной суспензии от 10⁻¹ до 10⁻⁸ в поддерживающей среде с добавлением 2% FBS. Монослой клеток, полученный в 96-луночном планшете инфицировали, внося по 100 мкл в 8 лунок планшета каждого разведения вируса. Клетки инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 7-10 сут. Наличие цитопатического эффекта оценивали с использованием инвертированного микроскопа. Титры вируса рассчитывали по методу Reed и Muench [4] и выражали в lg ТЦД₅₀/мл.

РТ-ПЦР в режиме реального времени для идентификации коронавируса. Идентификацию коронавируса SARS-CoV-2 осуществляли методом РТ-ПЦР в режиме реального времени согласно [6], используя праймеры N_Sarbeco_F, N_Sarbeco_R и зонд N_Sarbeco_P и набор Superscript® III Platinum One-Step RT-PCR System with Platinum™Taq DNA Polymerase (Invitrogen, США). Реакцию проводили в термоциклере Rotor-Gene 6000 Series (Qiagen, Германия) по следующей программе: 1 цикл обратной транскрипции при 50°C в течение 20 мин, 1 цикл при 95°C в течение 3 мин, затем 45 циклов: 95°C – 15 с, 58°C – 30

Инактивация вируса SARS-CoV-2. Инактивацию вируса проводили в закрытых стеклянных колбах. В качестве инактиванта использовали 37% водный раствор формальдегида. Для инактивации вируса готовили 3% рабочий водный раствор формальдегида. Для инактивации вируса SARS-CoV-2 в вирусосодержащих суспензиях добавляли раствор формальдегида в финальных концентрациях 0,05% и 0,1%. Вирус инактивировали при температурах 6±2°C, 22±2 °C и 37±0,5°C. Значение pH реакционной среды устанавливали в диапазонах 7,0-7,4.

Необходимый pH реакционной среды в течение всего периода инактивации устанавливали с помощью 8,5 % раствора аммиака и 30% раствора уксусной кислоты. Колбы с реакционной смесью постоянно перемешивали с помощью магнитной мешалки со скоростью вращения 60-80 об/мин. Через каждый час отбирали пробы, прекращали действие инактиванта добавлением 25% раствора бисульфита натрия в концентрации, пропорциональной по молекулярной массе формальдегиду, добавленному в биомассу, и помещали в холодильник при температуре (6±2)°C.

Определение полноты инактивации вируса. Полноту инактивации вируса, обработанного формальдегидом, определяли путем 3-х кратного пассирования в культуре клеток Vero. С этой целью использовали пробирки с полным монослоем клеток. В стерильные пробирки вносили по 2 мл инактивированного вируса каждого образца и 18 мл питательной среды ДМЕМ. Содержимое пробирки перемешивали и вносили в 6-луночный культуральный планшет с монослоем 1-2 сут. культуры клеток Vero по 1 мл в каждую лунку. Культуру клеток выдерживали при температуре (37,0±0,5)°C в течении 60 мин. Затем монослой двукратно отмывали средой ДМЕМ (по 2 мл). После этого в пробирки заливали по 2 мл питательной среды и инкубировали в течение 6 сут. при температуре (37,0±0,5)°C. Питательную среду меняли через 1 сут. после заражения. Для проведения следующего пассажа испытуемую культуру клеток замораживали при температуре минус 60°C, оттаивали при комнатной температуре и проводили второй пассаж путем заражения суспензией первого пассажа культуры клеток Vero. Инкубировали испытуемую культуру в течение 6 сут, при температуре (37,0±0,5)°C. Третий пассаж проводили аналогично. Полноту инактивации вируса оценивали по наличию или отсутствию ЦПД вируса в культуре на третьем пассаже.

Инактивированную суспензию считали авирулентной, если инактивированная вирусная суспензия после третьего пассажа не вызывала деструктивных изменений в монослое культуры клеток.

Результаты и обсуждение. Результаты инактивации вируса SARS-CoV-2 под воздействием формальдегида в испытуемых концентрациях при различных температурных режимах приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Динамика титров вируса SARS-CoV-2 в присутствии формальдегида в сравнении с контролем, $TCD_{50/см}^3$

(n=3)

Время экспозиции, ч	Температура, °C								
	6±2,0			22±2,0			37±0,5		
	Концентрация формальдегида, %								
	0,0	0,1	0,05	0,0	0,1	0,05	0,0	0,1	0,05
0	6,33±0,08	6,33±0,08	6,33±0,08	6,33±0,08	6,33±0,08	6,33±0,08	6,33±0,08	6,33±0,08	6,33±0,08
1	6,16±0,08	4,00±0,14	5,58±0,22	5,41±0,08	1,08±0,08	1,41±0,08	5,16±0,12	0,41±0,08	0,58±0,16
2	6,16±0,08	2,41±0,22	4,00±0,14	5,33±0,08	0,66±0,08	0,91±0,08	4,66±0,34	0,00	0,00
3	6,00±0,14	0,33±0,08	2,41±0,22	5,08±0,08	0,00	0,00	4,17±0,17	0,00	0,00
4	6,00±0,14	0,00	0,58±0,08	4,58±0,08	0,00	0,00	н/и	н/и	н/и
5	5,91±0,08	0,00	0,00	н/и	н/и	н/и	н/и	н/и	н/и
6	5,83±0,08	0,00	0,00	н/и	н/и	н/и	н/и	н/и	н/и
7	5,33±0,16	н/и							
8	5,08±0,08	н/и							
9	5,08±0,08	н/и							
10	5,08±0,08	н/и							

Примечания: н/и – не исследовано

№7
2021

Как видно из данных таблицы 1, вирус SARS-CoV-2, находящийся вне клеток и без протектантов, постепенно снижает свою инфекционную активность. Скорость снижения титра вируса оказалась зависимой от температуры среды экспозиции. Если, при температуре 6±2,0°C в течение 10 ч титр вируса снизился от 6,33±0,08 $TCD_{50/см}^3$ до 5,08±0,08 $TCD_{50/см}^3$, то при температуре 22±2,0°C в течение 4 ч и температуре 37±0,5°C в течение 3 ч до 4,58±0,08 $TCD_{50/см}^3$ и 4,17±0,17 $TCD_{50/см}^3$, соответственно. Полученные данные показывают, что вирус SARS-CoV-2 не обладает высокой стойкостью к температуре окружающей среды и при положительных температурных режимах постепенно снижает свою инфекционную активность. Скорость снижения такой активности возбудителя пропорционально связана с уровнем значения температуры.

Наличие формальдегида в биомассе с вирусом значительно ускоряет скорость снижения титра возбудителя, которая была зависима от концентрации использованного инактиванта и, так же, как и в контрольных пробах, температуры среды экспозиции. Сравнительно повышенная концентрация формальдегида быстрее подвергало снижению репродуктивной активности возбудителя по сравнению с меньшей концентрацией этого химического соединения.

В присутствии формальдегида с концентрацией 0,05% при температуре $6 \pm 2,0^\circ\text{C}$ вирус полностью потерял инфекционную активность в течение 4 часов, а при концентрации инактиванта 0,1% – в течение 3 ч. При более высокой температуре, равной $22 \pm 2,0^\circ\text{C}$, полная инактивация вируса наступила в течение двух часов при обеих концентрациях инактиванта, а при $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ – в течение первого часа после добавления формальдегида, также при обеих использованных концентрациях.

Полнота инактивации после указанных сроков обработки формальдегидом была подтверждена результатами трехкратного пассирования образцов вируса, которые не проявляли признаков цитопатогенного действия в зараженной культуре клеток. Данные пассирования таких образцов вируса приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты пассирования в культуре клеток Vero образцов вируса SARS-CoV-2, которые не проявляли цитопатогенное действие при первичном заражении (n=3)

Испытуемый температурный режим, °C	Испытуемые концентрации формальдегида, %	Время обработки вируса формальдегидом, ч	Пассажи в культуре клеток Vero, №№		
			1-й	2-й	3-й
6±2,0	0,05	5	-	-	-
	0,1	4	-	-	-
	0,0*	5	+	+	+
22±2,0	0,05	3	-	-	-
	0,1	3	-	-	-
	0,0*	3	+	+	+
37±0,5	0,05	2	-	-	-
	0,1	2	-	-	-
	0,0*	2	+	+	+

Примечание: «*» – контрольный вирус без инактиванта выдержанный в соответствующем температурно-временном режиме; «+» – наличие ЦПД вируса; «-» – отсутствие ЦПД вируса в монослое культуры клеток Vero

Как видно из данных таблицы 2, все испытуемые образцы вируса, обработанные формальдегидом в приведенных концентрациях и в течение до полного отсутствия ЦПД после первичного заражения, при последующем дополнительном двукратном пассировании с интервалом в 6 суток не вызывали цитопатогенного действия в тестовой культуре клеток. Тогда как контрольные образцы вируса, которые не подвергались обработке формальдегидом, но выдерживались при тех же температурных режимах и в течение такой же продолжительности, активно вызывали ЦПД в монослое культуры клеток, как при первом, так и в последующих двух пассажах.

Полученные данные указывают на то, что вирус в указанных сроках и использованных режимах полностью теряет свои инфекционные свойства и становятся авирулентными.

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что вирус SARS-CoV-2 обладает не высокой устойчивостью к действию формальдегида и полностью теряет свои инфекционные свойства в течение не более первых 4 часов после контакта с реагентом в конечной концентрации от 0,05%. Скорость инактивации регулируется температурой экспозиции. Повышение температуры окружающей среды ускоряет процесс инактивации вируса.

Применение инактивированного вируса в составе вакцины предусматривает необходимости наличия антигенности на достаточно активном уровне, которая способна стимулировать в организме модельных или целевых объектов стимулировать формирование специфических антител. В связи с чем, для подтверждения сохранности антигенных показателей и оценки эффективного использованных режимов инактивации, были проведены экспериментальные исследования антигенности образцов инактивированного вируса SARS-CoV-2 на модельных лабораторных животных – сирийских хомяках. Испытанию подвергали 6 образцов вируса, каждый из которых инактивировался отдельным режимом, но при одной экспозиции по времени, продолжительность которой составила 24 ч. В качестве контроля использовали дополнительную 7 группу животных, которым вместо инактивированного вируса был введен физиологический раствор. Антигенность устанавливали по уровню вируснейтрализующих антител, сформированных после внутримышечного введения на 7, 14, 21 сутки. Динамика титров антител приведена на рисунке 1.

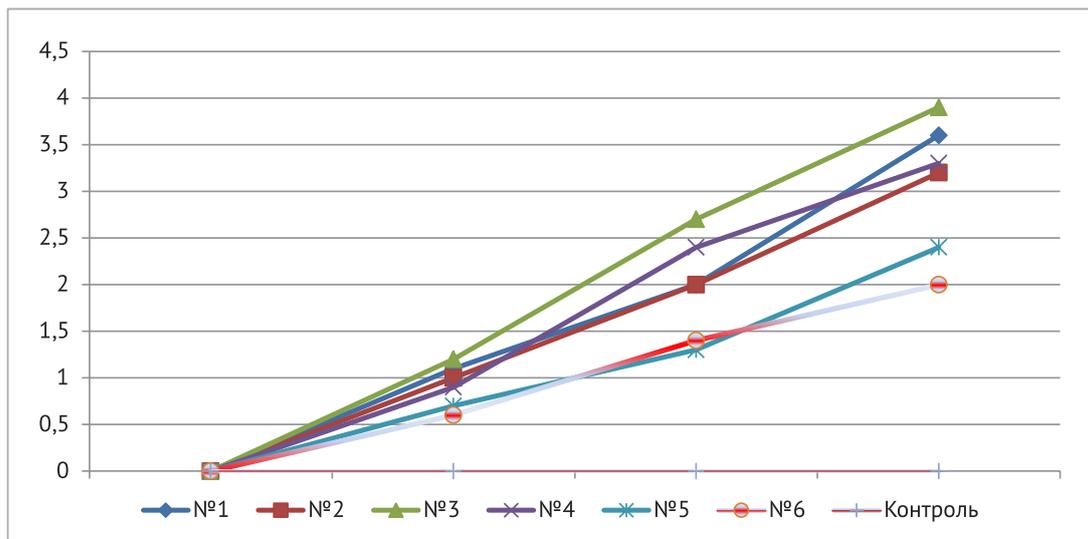


Рисунок 1 – Сохраняемость антигенной активности инактивированного вируса на лабораторных животных

Как видно из рисунка 1, в сыворотке крови всех животных, кроме контрольной группы, в использованном тесте выявлялись вируснейтрализующие антитела с 7 дня после введения образцов вируса. Наиболее высокий уровень антител, достигавший $5,6 \log_2$, отмечали у животных, привитых образцом инактивированного вируса (№3), обработанного формальдегидом в концентрации 0,05% и выдержанного при температуре $6 \pm 2,0^\circ\text{C}$. У животных, привитых вирусом с режимом инактивации 0,1% при той же температуре выдержки, титр антител был несколько ниже. При обеих концентрациях формальдегида и более высоких температурных режимах экспозиции уровень антител, сформированный в организме привитых животных, был сравнительно ниже, чем при температуре $6 \pm 2,0^\circ\text{C}$.

Полученные данные свидетельствуют о том, что вирус SARS-CoV-2, инактивированный с помощью обработки формальдегидом в концентрациях 0,05-0,1% при температуре

не выше $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ в течение 24 ч, сохраняет антигенность и стимулирует в организме привитых модельных животных специфические вируснейтрализующие антитела, уровень которых в определенной степени зависит от температуры его выдержки в процессе инактивации.

Выводы. Вирус SARS-CoV-2 полностью инактивируется и сохраняет свою антигенную активность при обработке раствором формальдегида в концентрациях 0,05-0,1% при температуре от $6 \pm 2,0^\circ\text{C}$ до $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ с экспозицией до 24 ч. Режим инактивации с концентрацией формальдегида в 0,05% и температурой экспозиции от $6 \pm 2,0^\circ\text{C}$ до $22 \pm 2,0^\circ\text{C}$ является сравнительно щадящей для антигенности возбудителя. Использование вируса, инактивированного в таком режиме, стимулирует формирование в организме привитых модельных животных антитела в наиболее высоком титре. Полученные данные позволяют использовать описанные продуктивные режимы инактивации в технологии изготовления инактивированной вакцины против коронавирусной инфекции COVID-19.

ЛИТЕРАТУРА

1. Huang C., Wang Y., Li X., Ren L., Zhao J., Hu Y., Zhang L., Fan G, Xu J., Gu X., Cheng Z., Yu T., Xia J., Wei Y., Wu W., Xie X., Yin W., Li H., Liu M., Xiao Y., Gao H., Guo L., Xie J. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China // *The Lancet*. – 2020. – Vol. 395, N.10223. – P. 467-506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5).
2. <https://index.minfin.com.ua/reference/coronavirus/geography/> Коронавирус: статистика по странам
3. Zhugunissof K., Zakarya K., Khairullin B., Orynbayev M., Abduraimov Y., Kassenov M., Sultankulova K., Kerimbayev A., Nurabayev S., Myrzakhmetova B., Nakhanov A., Nurpeisova A., Chervyakova O., Assanzhanova N., Burashev Y., Mambetaliev M., Azanbekova M., Kopeyev S., Kozhabergenov N., Issabek A., Tuyskanova M., Kutumbetov L. Development of the Inactivated QazCovid-in Vaccine: Protective Efficacy of the Vaccine in Syrian Hamsters // *Front Microbiol*. 2021 Sep 27;12:720437. doi: 10.3389/fmicb.2021.720437. eCollection 2021.
4. Zakarya K., Kutumbetov L., Orynbayev M., Abduraimov Y., Sultankulova K., Kassenov M., Sarsenbayeva G., Kulmagambetov I., Davlyatshin T., Sergeeva M., Stukova M., Khairullin B. Safety and immunogenicity of a QazCovid-in® inactivated whole-virion vaccine against COVID-19 in healthy adults: A single-centre, randomised, single-blind, placebo-controlled phase 1 and an open-label phase 2 clinical trials with a 6 months follow-up in Kazakhstan. *EClinical Medicine* 2021 Sep;39:101078. doi: 10.1016/j.eclinm.2021.101078.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ И БИОЗАЩИТА

УДК 579.8

С.С. Килибаев, Б.А. Еспембетов, Д.Р. Таболдиев,
М.К. Сармыкова, М.Б. Тұргын, А.Е. Джалдыбаева

РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности»
КН МОН РК, пгт. Гвардейский, Казахстан
E-mail: sanat.kilibaev@mail.ru

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ ВАКЦИННЫХ ПРЕПАРАТОВ В УСЛОВИЯХ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ИНСТИТУТА ПРОБЛЕМ БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ

Аннотация. В данной статье отражены работы по микробиологическому контролю этапов приготовления вакцинных препаратов, производимых в НИИПББ. В ходе мониторинга была установлена количественная оценка микроорганизмов в воздухе, поверхностях и персонала. Типичная микробная популяция по морфологическим признакам состояла из грамположительных кокков, бацилл и плесневых грибов. Применяемые в обработке производственных помещений дезинфектанты, поддерживали рекомендуемые пределы микробиологического загрязнения в помещениях по классификации GMP EU.

Ключевые слова: микробиологический мониторинг, микроорганизм, пробы воздуха, смывы, микробиологическое загрязнение.

С.С. Килибаев, Б.А. Еспембетов, Д.Р. Таболдиев,
М.К. Сармыкова, М.Б. Тұргын, А.Е. Джалдыбаева

ҚР БҒМ ҒК «Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты» РМК,
Гвардейский қтп., Қазақстан

БИОЛОГИЯЛЫҚ ҚАУІПСІЗДІК ПРОБЛЕМАЛАРЫҢ ҒЫЛЫМИ-ЗЕРТТЕУ ИНСТИТУТЫНДА ВАКЦИНА ДАЙЫНДАУ КЕЗІНДЕГІ МИКРОБИОЛОГИЯЛЫҚ МОНИТОРИНГ

Аннотация. Бұл мақалада БҚПФЗИ-да шығарылатын вакциналық препараттарды дайындау кезеңдерін микробиологиялық бақылау бойынша жұмыстар көрсетілген. Мониторинг кезінде ауадағы, заттардың беттеріндегі, персоналдағы микроорганизмдердің сандық бағасы анықталды. Морфологиялық белгілері бойынша типтік микробтық популяция

оңграмды кокктардан, бациллалардан және зең саңырауқұлақтардан тұрды. Өндірістік бөлмелерін өңдеу кезінде қолданылатын дезинфекциялаушы заттар, GMP EU ұсынған микробиологиялық ластануының шектерін сақтады.

Түйін сөздер: микробиологиялық мониторинг, микроорганизм, ауа сынамалары, шайындылар, микробиологиялық ластану.

**S.S. Kilibayev, B.A. Yespembetov, D.R. Taboldiev,
M.K. Sarmykova, M.B. Turgyn, A.E. Dzhaldybaeva**

RGE "Research Institute of Biological Safety Problems" CS MES RK, Gvardeiskiy, Kazakhstan

MICROBIOLOGICAL MONITORING IN THE PRODUCTION OF VACCINE PREPARATIONS UNDER THE CONDITIONS OF THE RESEARCH INSTITUTE FOR BIOLOGICAL SAFETY PROBLEMS

Abstract. This article reflects the work on microbiological control of the stages of preparation of vaccine preparations produced in NIIPBB. During the monitoring, a quantitative assessment of microorganisms in the air, surfaces and personnel was established. A typical microbial population according to morphological characteristics consisted of gram-positive cocci, bacilli and mold fungi. The disinfectants used in the treatment of industrial premises maintained the recommended limits of microbiological contamination in premises according to the GMP EU classification.

Keywords: microbiological monitoring, microorganism, air samples, flushes, microbiological contamination

Введение. Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности (НИИПББ) представляет собой один из крупных научных центров республики в области ветеринарной вирусологии, иммунологии, молекулярной биологии, микологии, фитопатологии и биологической безопасности, имеющий экспериментальную базу, позволяющую проводить исследования по созданию нового поколения биологических препаратов методами генной инженерии и биотехнологии, целью которой является обеспечение биологической безопасности страны. При разработке и производстве профилактических и диагностических препаратов человека, животных, птиц по научно-техническим программам выполняет рабочие процедуры в соответствии с требованиями стандартов СТ РК ISO [1, 2] и международных стандартов надлежащей производственной практики (GMP) [3]. В соответствии с этими руководящими принципами, соблюдая рекомендуемые пределы микробиологического загрязнения в отношении концентрации жизнеспособных микроорганизмов, регулярно ведется контроль всех этапов приготовления вакцинных препаратов. Кроме того, в соответствии с Руководящими принципами GMP успешно внедрил требования, которые соответствуют GMP EU и получил сертификат.

Производство вакцинных препаратов производится в асептических условиях, избегая загрязнения воздуха рабочей зоны за счет комплексной фильтрации, состоящей из приточно-вытяжных систем, снабженной воздушными фильтрами тонкой очистки (HEPA) [4-6]. Согласно нормативам международной организации по стандартизации (ISO) необходимо оценивать не только класс чистоты, но и производственные условия. Эти работы должны быть рутинными в производстве, как в отношении микробиологического мониторинга чистых зон и мониторинга окружающей среды, так и для персонала, работающих в производстве.

Мировой рынок требует от производителей вакцинных препаратов приспосабливаться к международным требованиям, касающимся контроля окружающей среды при производстве [7-9]. Пассивный и активный метод отбора микробиологических проб воздуха, может обеспечить оценку воздуха на предмет наличия жизнеспособных частиц. При пассивном отборе проб воздуха, окружающая среда контролируется путем определения количества микроорганизмов, оседающих на чашках Петри с питательной средой под действием силы тяжести [9-12]. При активном отборе проб воздуха, мы можем определить количество микробов по объему пробы воздуха. Один из основных источников загрязнения это персонал, выполняющий асептические процедуры, которые должны знать о процедурах поведения в асептических зонах [10].

Микробиологический мониторинг окружающей среды в производстве включает в себя микробиологические оценки воздуха рабочей зоны, чистоты одежды и СИЗ операторов, чистоты воздуха и поверхностей рабочих предметов, инструментов и внутри помещений рабочей зоны. Такая программа контролирует жизнеспособную микробную нагрузку (био-нагрузку) и эффективность воздушной системы в рабочих зонах. Регулярный рутинный микробиологический контроль дает нам возможность определить на каком этапе производства идут отклонения от нормальных условий и провести корректирующие процедуры до того, как это повлияет на качество продукции.

Целью этой работы было внедрение программы микробиологического мониторинга для чистых помещений или классифицированных питательных сред, предназначенных для контроля стерильности вакцинных препаратов производимые в НИИПББ.

Материалы и методы.

Критические точки для отбора проб

Были выбраны критические точки для микробиологического отбора проб. Такие зоны были подвержены риску загрязнения продукта и давали ложные результаты в тестах на стерильность. Этапы по приготовлению вакцинных препаратов осуществляются в боксовых и предбоксовых помещениях, где в каждом боксе расположены шкафы биологической безопасности (ШББ), за исключением составления балк продукта и розлива. Эти этапы производятся в помещении под ламинарным потоком.

С критических точек отбирали пробы воздуха (пп1), пробы с поверхностей (столов, оборудования, инструментов и т.п) (пп1; 2) осуществляли методом смывов, отпечатка пяти пальцев (с перчаток) персонала отбирались на твердые питательные среды и доставлялись в лабораторию микробиологии для дальнейшей инкубации твердых питательных сред, а с транспортной среды делали посева на твердые питательные среды и инкубировали (пп 3).

Микробиологические методы

1. *Отбор проб воздуха.* Отбор воздуха проводили пассивным методом (седиментация), осаждения на твердые питательные среды мясо-пептонный агар (МПА) и Сабура агар в чашках Петри (КОЕ/4 часа) [3, 13].

2. *Смывы.* Смывы с рабочей поверхности, инструментов и оборудования проводили вискозным тампоном предварительно намочив в транспортной среде, которая состоит из 1 % пептона в конечной концентрации. Засеянные транспортные среды доставлялись в микробиологическую лабораторию не позднее 2 часов, где высевали на твердые питательные среды (МПА и Сабура агар) в чашках Петри, для дальнейшей инкубации [13, 14].

3. *Инкубация засеянных питательных сред.* Пробы в чашках с МПА инкубировали в течение 48 часов при температуре $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$, пробы с Сабура агар инкубировали в течение 72 часов при температуре $(28 \pm 2,0)^\circ\text{C}$ [13, 14].

4. *Индикация выросших колоний.* После инкубации, количество колоний подсчитывались и регистрировались в протоколах. При индикации выросших колоний, применяли

метод окраски мазков по Граму [15]. Так же для индикаций изучали морфологические характеристики колонии выросших на МПА и Сабуро [16].

5. *Анализ и учет.* Анализ микробиологических проб проводили согласно рекомендуемым пределам микробиологического загрязнения GMP EU, которые показаны в таблице 1.

Таблица 1 – Рекомендуемые пределы микробиологического загрязнения [3]

Рекомендуемые пределы микробиологического загрязнения				
Класс GMP EU	Пробы воздуха, КОЕ/м ³	Седиментация на чашку (d=90 мм), КОЕ/4 ч.	Контактные пластины (d=55 мм), КОЕ/пластина	Отпечатка 5 пальцев в перчатке, КОЕ/перчатка
A	<1	<1	<1	<1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	-
D	200	100	50	-

Результаты. Микробиологически контроль этапов производства вакцинного препарата проводилось в 3-х повторностях. Результаты представлены в таблицах 2-4.

Таблица 2 – Седиментационный метод отбора пробы воздуха

Этапы приготовления вакцины	Количество отобранных проб на чашке Петри (d = 90 мм.) КОЕ/4 ч. и количество выросших колоний (X/X)				
	Класс чистоты «А» (предел микробиологического загрязнения <1)		Класс чистоты «В» (предел микробиологического загрязнения <5)	Класс чистоты «С» (предел микробиологического загрязнения <50)	
	ШББ	Линия розлива	Бокс	Предбоксник	Раздевалка
Культивирование клеток	4/0	-	10/4	10/38	-
	4/0	-	10/3	10/29	-
	4/0	-	10/5	10/35	-
Культивирование вируса	4/0	-	10/4	10/35	-
	4/0	-	10/2	10/32	-
	4/0	-	10/3	10/25	-
Инактивация вирусной суспензии	4/0	-	10/3	10/29	-
	4/0	-	8/2	8/25	-
	4/0	-	8/3	8/29	-
Очистка и концентрирование	4/0	-	10/4	10/36	-
	3/0	-	10/5	10/37	-
	4/0	-	10/3	10/36	-
Составление балк продукта	4/0	-	10/2	10/26	-
	4/0	-	10/3	10/24	-
	4/0	-	10/2	10/29	-
Розлив балк продукта	4/0	20/0	-	-	10/29
	4/0	22/0	-	-	10/25
	4/0	20/0	-	-	10/26

Примечание: Например: 10/4, где, 10 – количество отобранных проб, 4 – количество выросших колоний, «-» – нет помещений.

Из таблицы 2 видно, что в микробиологических пробах воздуха на чашках Петри со средами МПА и Сабуро агар при установленной инкубации, во всех этапах приготовления вакцины в результате 3-х кратного отбора проб, выросших колоний не обнаружено. Это говорит о том, что класс чистоты «А» соблюдается в ШББ и на линии розлива балк продукта.

Результаты микробиологических проб смывов представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Отбор проб смывов

Этапы приготовления вакцины	Количество отобранных проб смывов и количество выросших колоний				
	Класс чистоты «А» (предел микробиологического загрязнения <1)		Класс чистоты «В» (предел микробиологического загрязнения <5)	Класс чистоты «С» предел микробиологического загрязнения <50)	
	ШББ	Линия розлива	Бокс	Предбоксник	Раздевалка
Культивирование клеток	6/0	-	20/5	8/7	-
	6/0	-	18/3	8/10	-
	6/0	-	20/4	10/12	-
Культивирование вируса	6/0	-	12/3	10/8	-
	4/0	-	20/2	10/20	-
	4/0	-	18/3	10/22	-
Инактивация вирусной суспензии	6/0	-	14/4	6/9	-
	4/0	-	18/3	10/21	-
	4/0	-	18/4	10/25	-
Очистка и концентрирования	6/0	-	18/4	6/10	-
	4/0	-	20/3	10/25	-
	4/0	-	18/3	10/32	-
Составление балк продукта	6/0	-	18/3	10/15	-
	4/0	-	20/3	10/25	-
	4/0	-	20/4	10/32	-
Розлив балк продукта	6/0	20/0	-	-	6/10
	4/0	20/0	-	-	6/12
	4/0	20/0	-	-	6/29

Примечание: Например: 6/0, где 6 – количество отобранной пробы, 0 – количество выросших колоний, «-» – нет помещений.

Из таблицы 3 следует, что в пробах смывов из поверхности рабочих зон ШББ и с линии розлива (инструментов, оборудования и персонала) в результате 3-х кратного отбора, рост микроорганизмов в пробах не обнаружен. Это доказывает соответствие к классу чистоты «А» по GMP EU (Таблица 1). Выросшие колоний в пробах из боксов, предбоксников и раздевалки, где при индикации обнаружены колоний бактериальной и грибной этиологии, которые по числу выросших колоний соответствуют классу чистоты: боксы – «В», предбоксники и раздевалка – «С», соответственно. Результаты микробиологических проб, отпечатки пальцев персонала работавшие на этапах приготовления вакцины представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Отпечатки пяти пальцев (перчатки) персонала

Этапы приготовления вакцины	Количество отобранных проб смывов и количества выросших колоний			
	Класс чистоты «А» (предел микробиологического загрязнения <1)		Класс чистоты «В» (предел микробиологического загрязнения <5)	Класс чистоты «С» (предел микробиологического загрязнения <50)
	ШББ	Линия розлива	Бокс	Предбоксник
Культивирование клеток	2/0	-	4/2	2/9
	2/0	-	4/2	2/12
	2/0	-	4/0	2/3
Культивирование вируса	2/0	-	4/4	2/5
	2/0	-	4/3	2/22
	2/0	-	4/2	2/15
Инактивация вирусной суспензии	2/0	-	4/3	2/10
	2/0	-	4/2	2/22
	2/0	-	4/2	2/15
Очистка и концентрирования	2/0	-	4/4	2/20
	2/0	-	6/5	2/2
	2/0	-	4/3	2/18
Составление балк продукта	2/0	-	4/2	2/5
	2/0	-	4/3	2/26
	2/0	-	4/0	2/10
Розлив балк продукта	2/0	6/0	-	-
	2/0	6/0	-	-
	2/0	6/0	-	-

Примечание: Например: 4/0, где 4 – количество отобранной пробы, 0 – количество выросших колоний; «-» – нет помещений.

Как видно из таблицы 4, в пробах отпечатки пяти пальцев (перчатки) персонала работавшие в ШББ и на линии розлива в результате 3-х кратного отбора, при визуальном осмотре проб после инкубирования, выросшие колоний не выявлены, что соответствуют классу «А». В пробах персонала из боксов и предбоксников обнаружены колоний бактериальной и грибной этиологии. Результаты микробиологических исследований (индикация выросших колоний) показаны в таблице 5.

Таблица 5 – Результаты индикации выросших колоний

Этапы приготовления вакцины	Места отбора	Классы помещений по GMP EU	Результаты индикаций (окраска по Граму)		
			Воздух	Смывы	Отпечатки 5 пальцев в перчатке
Культивирование клеток	ШББ	A	Нет роста	Нет роста	Нет роста
	Бокс	B	Грам (+) кокки, плесневые грибы	Грам (+) бациллы	Плесневые грибы и Грам (+) кокки,
	Пред боксник	C	Грам (+) кокки, плесневые грибы.	Грам (+) бациллы, плесневые грибы.	Грам (+) бациллы
Культивирование вируса	ШББ	A	Нет роста	Нет роста	Нет роста
	Бокс	B	Грам (+) бациллы	Грам (+) бациллы, плесневые грибы	Грам (+) бациллы, плесневые грибы
	Пред боксник	C	Грам (+) кокки, плесневые грибы	Грам (+) бациллы, плесневые грибы Грам (+) кокки	Грам (+) кокки,
Инактивация вирусной суспензии	ШББ	A	Нет роста	Нет роста	Нет роста
	Бокс	B	Грам (+) бациллы, плесневые грибы	Грам (+) кокки,	Грам (+) бациллы, Грам (+) кокки,
	Пред боксник	C	Грам (+) кокки,	Грам (+) кокки,	Грам (+) кокки, плесневые грибы
Очистка и концентрирования	ШББ	A	Нет роста	Нет роста	Нет роста
	Бокс	B	Грам (+) кокки	Грам (+) кокки	Грам (+) кокки
	Пред боксник	C	Грам (+) бациллы, Грам (+) кокки	Грам (+) бациллы, плесневые грибы	Грам (+) кокки, Грам (+) бациллы
Составление балк продукта	ШББ	A	Нет роста	Нет роста	Нет роста
	Бокс	B	Грам (+) кокки	Грам (+) кокки, плесневые грибы	Грам (+) бациллы, Грам (+) кокки
	Пред боксник	C	Грам (+) кокки, плесневые грибы	Грам (+) кокки, плесневые грибы	плесневые грибы и Грам (+) кокки,
Розлив балк продукта	Линия розлива	A	Нет роста	Нет роста	Нет роста
	ШББ	A	Нет роста	Нет роста	Нет роста
	Раздевалка	C	Грам (+) кокки, плесневые грибы	Грам (+) бациллы, плесневые грибы	Грам (+) бациллы

№7
2021

Из таблицы 5 видно, что при индикации выросших колоний в пробах воздуха, смывов и отпечатков 5 пальцев (перчатки) персонала обнаружены типичные микроорганизмы, относящиеся к грамположительным бактериям и плесневым грибкам.

В микробиологических пробах воздуха из боксовых помещений отобранных методом седиментации на чашки (d = 90 мм.) КОЕ/4 ч. по 10 проб (чашки со средой МПА и Сабура агар) при установленной инкубации, выросло от 2 до 38 КОЕ.

При индикации выросших колонии, получены следующие результаты, на поверхности МПА после суточной инкубации, наблюдались серовато-белые бугристые колонии с неровными краями вязкой консистенции. В мазках, окрашенных по Граму, обнаружили грамположительные цепочки бацилл, не образующие спор. Также были круглые, гладкие

колонии, желтого и кремового цвета, микроскопирования мазков, показала шаровидных грамположительных кокков, напоминающие гроздь винограда, не имеющие спор.

На питательной среде Сабура выросли пушистые, бархатистые округлые колонии плесневых грибов, сине-зеленого, серого цвета. На обратной стороне чашки – бесцветная, желтоватая, пурпурная. При микроскопии: конидиеносцы встречались простые и разветвленные, иногда соединены в пучки.

Таким образом, по морфологическим признакам были обнаружены типичные микроорганизмы как грамположительные кокки, грамположительные палочки и плесневидные грибки. Эти же микроорганизмы обнаружены и в пробах смывов и отпечатков пальцев. Однако, применяемые в обработке рабочих помещений дезинфицирующие средства (3% перекись водорода + 1% уксусная кислота, 70% этиловый спирт, ультрафиолетовые лампы и т.п.) сдерживали пределы микробиологического загрязнения.

Обсуждение. Реализация программы микробиологического мониторинга окружающей среды разработаны и внедрены в других учреждениях [17]. Однако количество опубликованных результатов ограниченное, поэтому трудно провести сравнение данных этого исследования с данными других программ. Общее количество жизнеспособных микроорганизмов, обнаруженных в производственных помещениях, выявило некоторые различия в приточно-вытяжных воздушных системах. В предбоксовых помещениях имело до 38 КОЕ, что составляет 76% загрязненности по классу чистоты «С» (таблица 1), в помещении раздевалки – до 29 КОЕ (58%) классу чистоты «С», в боксах – до 4 КОЕ (80%) классу чистоты «В». Эти результаты показывают не качественную эффективность воздушной системы, поскольку процедуры очистки одинаковы для каждого помещения. Такие сравнения описывают Бразильские микробиологи [18]. Они так же описывают влияние сезонности, влажности и температуры на количество жизнеспособных микроорганизмов.

На количество жизнеспособных микроорганизмов, обнаруженных в рабочих помещениях, оказывает влияние объема оборудования и инструментов, а также рабочие процедуры выполняемое персоналом. При сравнении этих рабочих помещений с ШББ и линии розлива, где имеется ламинарный поток чистого воздуха, число КОЕ ровняется к нулю.

Популяция жизнеспособных микроорганизмов при индикации в пробах воздуха, смывов и отпечатки 5 пальцев (перчатки) персонала, состояла из бактерий грамположительных кокков и палочки, и плесневых грибов с преобладанием грамположительными кокками во всех этапах приготовления вакцины. Эти три рода бактерий имеют повсеместное распространение. Они были изолированы от окружающей среды, с кожи и слизистых оболочках человека. Жизнеспособные микроорганизмы с отпечатков пальцев (перчатки) персонала указывает на основной источник заражения. Из этого следует, что операторы, даже одетые в полную специальную одежду, нуждаются в постоянном обучении и контроля поведения в асептической зоне.

Полученные результаты показывают, что количество оборудований и инструментов в производственных помещениях и процедуры выполняемое персоналом, могут влиять на микробиологические характеристики рабочих помещений, которые связаны с видом деятельности и эффективностью воздушной системы. Кроме того, результаты микробиологического контроля ШББ, линии розлива, а также во всех рабочих помещениях удовлетворительные и соответствуют классу чистоты GMP EU. Это обеспечивало высокое качество выпускаемой продукции. Рутинный микробиологический контроль во всех этапах приготовления вакцинных препаратов позволяет контролировать отклонения до того, как это повлияет на качество продукции и программа микробиологического мониторинга могло быть рекомендовано другим производителям иммунобиологических и биофармацевтических препаратов.

Заключение. Проведены работы по микробиологическому контролю этапов приготовления вакцинных препаратов, производимых в НИИПББ. В ходе мониторинга была установлена количественная оценка микроорганизмов в воздухе, поверхностях и персонала. Типичная микробная популяция по морфологическим признакам состояла из грамположительных кокков, бацилл и плесневых грибов. Применяемые в обработке производственных помещений дезинфектанты, поддерживали рекомендуемые пределы микробиологического загрязнения в помещениях по классификации GMP EU.

ЛИТЕРАТУРА

1. СТ РК ISO 9001-2016 «Системы менеджмента качества. Требования».
2. СТ РК ИСО/МЭК 17025-2018.
3. <http://www.arfp.ru/data/files/GMP.pdf>.
4. СТ РК ГОСТ Р ИСО 14644-5-2006 «Чистые помещения и связанные с ними контролируемые среды» Часть 5. Эксплуатация.
5. СТ РК ГОСТ Р ИСО 14644-1-2002 «Чистые помещения и связанные с ними контролируемые среды» Часть 1. Классификация чистоты воздуха.
6. СТ РК ИСО 14644-2-2011 «Чистые помещения и связанные с ними контролируемые среды» Часть 2. Требования к мониторингу для подтверждения постоянного соответствия ISO 14644-1.
7. Food and Drug Administration. FDA. Food and Drug Administration Guideline on Sterility Drug Products Produced by Aseptic Processing, June, 1987.
8. Luxemburg. Office for Official Publications of the European Communities Manufacture of Sterile Medicinal Products, Annex 1. Rules and guidance for pharmaceutical manufactures and distributors, July, 1996.
9. United States. The United States Pharmacopeia USP 24, Microbiological Evaluation of Clean Rooms and Other Controlled Environments <1116>.
10. Institute of Environmental Sciences. IES-RP-CC023.1. Microorganisms in clean rooms, 1998.
11. Беркли Р., Бок Э., Бун Д., Бреннер Д., Хоулт Д., Криг Н., Снит П., Заварзин Г.А. Определитель бактерий Берджи: в 2 т. Справочник: перев. с англ. – 9-е изд. – М.: Мир, 1997.
12. Luxemburg. Office for Official Publications of the European Communities. The rules governing medicinal products in the European Union. Vol. 4: Good manufacturing practices – Medicinal products for human and veterinary use, 1998.
13. ГОСТ 28085-2013. Средства лекарственные биологические для ветеринарного применения. Метод бактериологического контроля стерильности.
14. ГОСТ ISO/TS 11133-1-2014. Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Руководящие указания по приготовлению и производству питательных сред. Часть 1. Общие руководящие указания по обеспечению качества приготовления питательных сред в лаборатории.
15. <https://www.wikiwand.com/ru>
16. Чубенко Г.И. Методы идентификации бактерий. Методическое пособие. Благовещенск, 2018.
17. Seabra M. Salas limpas na produção de vacinas. Rev. da Soc. Bras. de Controle de Contam. (SBCC), 4-6, 2002.
18. Utescher C.L.A. et al. Microbiological monitoring of clean rooms in development of vaccines. Brazilian Journal of Microbiology, 2007. – P. 710-716.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ И ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

УДК: 57.086.833

Г.А. Жаппарова, Л.Г. Мараховская, А.А. Терейбай,
Г.П. Джуматаева, Э.Ж. Калимолда, А.К. Наханов

РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности»
КН МОН РК, пгт. Гвардейский, Казахстан

ИНДИКАЦИЯ МИКОПЛАЗМЕННОЙ КОНТАМИНАЦИИ В КОЛЛЕКЦИИ КУЛЬТУР КЛЕТОК НИИПББ

Аннотация. В настоящее время в коллекции НИИПББ имеется более 35 видов перевиваемых культур клеток. Для обнаружения микоплазм-контаминантов клеточных культур использовали методы окрашивание ДНК флуорохромами, микробиологический метод и ПЦР широко рекомендуемые в практике. В работе были исследованы 20 видов клеточных культур часто используемые для научных и производственных работ. В результате индикации установлено, что нами изученные перевиваемые культуры клеток не контаминированы микоплазмами.

Ключевые слова: клеточные культуры, перевиваемые линии клеток, микоплазмы, методы определения микоплазм, флуоресценция, флуорохромы, контаминация, полимеразная цепная реакция, индикация.

Г.А. Жаппарова, Л.Г. Мараховская, А.А. Терейбай,
Г.П. Жұматаева, Э.Ж. Қалимолда, А.Қ. Наханов

ҚР БҒМ ҒК «Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты» РМК,
Гвардейский қтп., Қазақстан

БҚМҒЗИ ЖАСУШАЛАР ӨСІНДІСІ ЖИНАҚТАРЫНДАҒЫ МИКОПЛАЗМАЛЫҚ КОНТАМИНАЦИЯНЫҢ ИНДИКАЦИЯСЫ

Аңдатпа. Қазіргі уақытта БҚМҒЗИ коллекциясында шексіз көбейетін жасуша өсінділерінің 35-тен астам түрі бар. Жасуша өсінділеріндегі микоплазма ластаушыларын анықтау үшін фторхромдармен ДНҚ бояуы, микробиологиялық әдіс және ПТР тәжірибеде кеңінен ұсынылады. Бұл жұмыста ғылыми және өндірістік жұмыстар үшін жиі қолданылатын жасушалық өсінділердің 20 түрі зерттелген. Зерттеу нәтижесінде біз қарастырған шексіз көбеетін жасушалық өсінділердің микоплазмалармен ластанбағандығы анықталды.

Түйін сөздер: жасушалар өсіндісі, шексіз көбейетін жасушалар іздері, микоплазмалар, микоплазманы анықтау әдістері, флуоресценция, флуорохромдар, контаминация, полимеразды тізбекті реакция, индикация.

G.A. Zhapparova, L.G. Marahovskaya, A.A. Terebai,
G.P. Jumatayeva, E.Zh. Kalimolda, A.K. Nahanov

RGE "Research Institute of Biological Safety Problems" CS MES RK, Gvardeiskiy, Kazakhstan

INDICATION OF MYCOPLASMA CONTAMINATIONS IN THE RIBSP CELL CULTURE COLLECTION

Abstract. Nowadays at the Research Institute of Biological Safety Problems have more than 35 types of continuous cell cultures. For detection of mycoplasma contaminants in cell cultures we used widely recommended in practice DNA staining with fluorochromes, microbiological and PCR methods. In current research were investigated 20 types of cell cultures that often used for scientific and industrial work. As a result of the indication, it was established that the studied transplantable cell cultures were not contaminated with mycoplasmas.

Keywords: cell cultures, continuous cell culture lines, mycoplasmas, methods of mycoplasma detection, fluorescence, fluorochromes, contamination, polymerase chain reaction, indication.

Введение. Клетки человека и животных в культурах первичных и пересеваемых линий подвержены постоянной опасности заражения микроорганизмами, которые прекрасно могут размножаться в богатых питательных средах. Даже при квалифицированной культуральной работе в оптимальных лабораторных условиях источником случайного микробиологического заражения может оказаться сыворотка крови, входящая в состав питательных сред. В технологическом процессе использования клеточных культур наиболее значимым и неизбежным является контаминация микроорганизмами, главным образом микоплазмами. Культура клеток, сыворотка крови, питательные среды, трипсин, инструменты, лабораторные животные и сами сотрудники лаборатории могут быть источником контаминации [1].

Одним их факторов, вызывающих существенные изменения в клетках культур и затрудняющих исследования, является их контаминация микоплазмами, которая чаще всего протекает латентно. Многочисленные научные работы указывают на то, что от 50 до 100% длительно культивируемых клеточных культур контаминированы микоплазмами [2-5]. Таким образом при работе с клеточными культурами практически неизбежно приходится сталкиваться с микоплазменной инфекцией, даже в тех случаях, когда предпринимаются самые настойчивые усилия предотвращения и устранения контаминации. Инфицирование клеток микоплазмами ведет к снижению качества клеточных культур, снижению уровня репродукции вируса в них, что отрицательно сказывается на достоверности и стандартности проводимых с их использованием исследований, а также существенно снижает качество культуральных биопрепаратов. Кроме этого, латентное присутствие микоплазм существенно влияет на метаболизм клеток, вызывает хромосомные aberrации и изменяет клеточные функции. Освобождение клеточных линий от микоплазм представляет собой очень сложную задачу [6].

Микоплазменная контаминация имеет тенденцию распространяться на другие клеточные культуры, с которыми ведут работу в лаборатории. Латентная форма микоплазменной инфекции не сопровождается видимыми изменениями клеток и, без проведения специальных исследований по выявлению микоплазм, как правило, остается незаметной. В настоящее время имеется более 20 способов выявления микоплазм.

Несмотря на наличие множества диагностических методов, микоплазменные контаминации являются серьезной проблемой для большинства лабораторий. В начале 90-х годов были обнародованы результаты проверки на наличие микоплазменной контаминации коллекций клеточных культур в лабораториях ряда стран. Оказалось, что в США 15% культур инфицировано микоплазмами, в Японии – 80%, в Аргентине – 65%, в Израиле – 32%. Известно, что уровень контаминации перевиваемых линий клеток достигает в различных коллекциях РФ и мира от 45 до 96%. Относительная встречаемость различных видов микоплазм неодинакова в лабораториях разных районов мира и меняется со временем. Истинная распространенность микоплазменной инфекции клеточных культур может быть выше, чем публикуемые данные, так как чувствительность методов, используемых для тестирования, различна [7].

Целью настоящего исследования явилось определение наличия микоплазм в перевиваемых культурах клеток имеющихся в лаборатории тремя рекомендуемыми методами.

Материалы и методы. Для окрашивания ДНК-флуорохромами использовали краситель Hoechst 33258, при этом клетки выращивали на покровных стеклах в течение 48-72 час. Препарат фиксировали в смеси метанола и ледяной уксусной кислоты (3:1), добавляя 3-4 капли фиксатора в культуральную среду на 2-3 мин. Затем среду удаляли и добавляли свежий фиксатор и фиксировали еще 5 мин. После удаления фиксатора препарат высушивали на воздухе и наносили на 10-15 мин раствор красителя Hoechst 33258. Затем дважды промывали дистиллированной водой и высушивали. Анализ препаратов проводили с помощью флуоресцентного микроскопа BHF Olympus при 1000-кратном увеличении с масляной иммерсией [8].

При обнаружении микоплазм с помощью ПЦР, использовали коммерческий набор EZ-PCR™ Mycoplasma Detection Kit. Подготовка ПЦР состоит из 3 этапов:

- подготовка проб культуры клеток к постановке ПЦР. Пробный образец готовили путем осаждения микоплазмы при 15000-20000 g в течение 10 минут. Нагревали до 95°C в течение 3 минут. Тестовый образец может храниться на этой стадии при – 20°C для последующего использования.

- амплификация микоплазменного консервативного участка гена 16S с использованием готовых компонентов набора;

- обнаружение амплифицированного ПЦР продукта в агарозном геле с помощью электрофорезной детекции [9, 10].

При микробиологическом методе контроля микоплазм клетки высевали в чашки с агаром. Для этого клетки культивировали до прохождения трех пассажей или в течение двух недель в ростовой среде без добавления антибиотиков. Затем проводили посев прокалыванием всего столбика питательной среды содержащейся в чашке, концом пипетки вместимостью 0.1-0.2 мл клеточной суспензии, выпуская равномерно ее содержимое, начиная от дна до поверхности.

Инкубировали при 37°C в течение 21 дней в атмосфере, обогащенной 5% CO₂. Учет результатов проводили путем визуального просмотра засеянных чашек в проходящем свете на 4, 7, 10, 14 сутки. Культура клеток считается свободной от микоплазм, если через 14 суток не обнаруживают роста микоплазм ни в одной из засеянных чашек. В случае получения сомнительных результатов проводят повторный контроль. При повторном

контроле, при наличии роста микоплазм хотя бы в одной пробирке, культура клеток считается контаминированной микоплазмами [11].

Результаты исследований. Индикацию микоплазменной контаминации проводили в 20-ти широко используемых для научных и производственных работ клеточных линиях. Определение микоплазменной контаминации в данных культурах проводили методами ДНК- флуорохромирования (Hoechst 33258), ПЦР (EZ-PCR™ Mycoplasma Detection Kit EZ-PCR™ Mycoplasma Detection Kit) и микробиологическим методом (агаровая среда).

На рисунках 1, 2 и 3 показаны контаминация микоплазмами культур клеток путем индикации выше перечисленными методами.

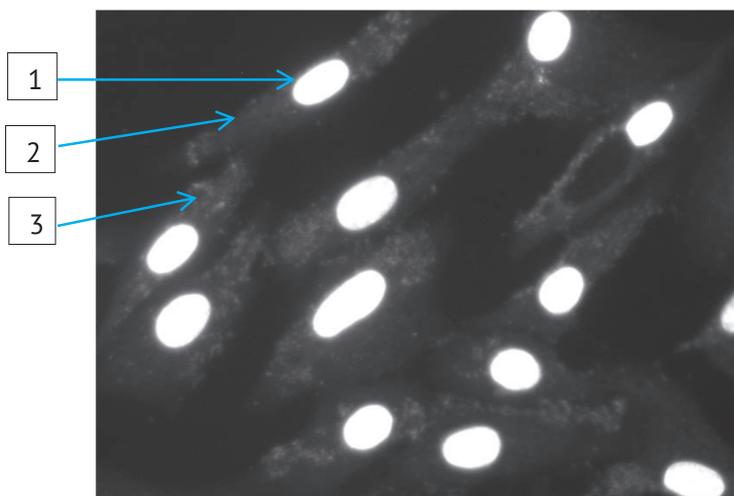


Рисунок 1 – ДНК-флуорохромирование, окраска на Hoechst 33258 культуры клеток ВНК-21 клон 13.
1 – клеточное ядро; 2 – цитоплазма; 3 – микоплазмы

На рисунке 1 изображена перевиваемая культура клеток ПЩ, контаминированная микоплазмами.

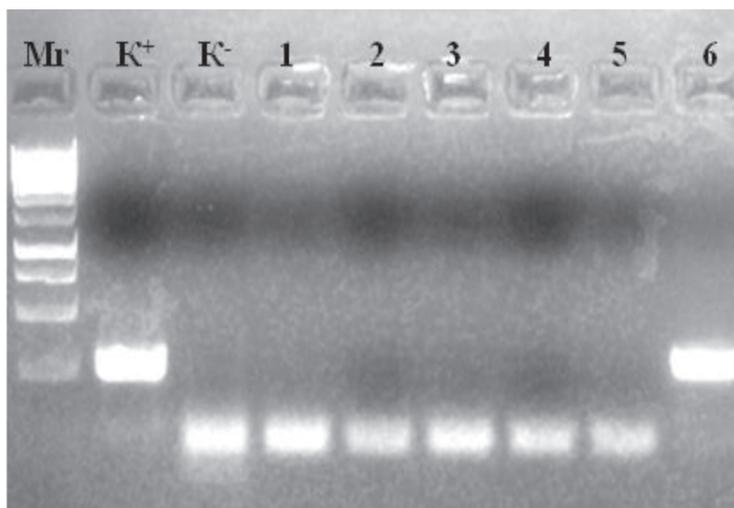


Рисунок 2 – ПЦР с использованием набора EZ-PCR™ Mycoplasma Detection Kit.
K- – отрицательный контроль коммерческого набора;
K+ – положительный контроль (270 п.о.) коммерческого набора;
M – маркер ДНК, 1kb фирмы Invitrogen).
1- СПЭВ; 2 - CV; 3 - Vero; 4 - MA-104; 5 - MDCK; 6 - ПЩ

Из данных электрофореграммы видно, что клеточные пробы под №1, №2, №3, №4, №5 не контаминированы микоплазмами, лишь в одной клеточной пробе под №6 отмечены микоплазмы. Для анализа ПЦР нами был использован 2%-ный агарозный гель с бромистым этидием на ТАЕ буфере.



Рисунок 3 – Индикация микоплазмы микробиологическим методом на агаровой среде, перевиваемая культура клеток ПЦ

Результаты были получены на третьей неделе инкубирования при 37°C в атмосфере, обогащенной 5% CO₂. На рисунке колонии микоплазмы имеют типичный вид «яичницы глазунья».

Методы индикации и результаты контроля микоплазменной контаминации культур клеток имеющих в банке НИИПББ показаны в таблице 1.

Таблица 1 – Контроль микоплазменной контаминации культур клеток

№ п/п	Наименование культуры	Обозначение	Дата закладки	Методы индикации		
				Окраска на Hoechst 33258	ПЦР	Микро-биологический
1	Почка свиньи	IBRS	21.02.2019	-	-	не проводилось
2	Почки новорожденных сирийских хомячков	ВНК – 21 шведская линия	16.10.2018	-	-	-
3	Почки новорожденных сирийских хомячков, клон -13	ВНК – 21 клон 13	12.05.2017	-	-	-
4	Почка зеленой мартышки	CV – 1	02.06.2018	-	-	-
5	Почки обезьяны	МА - 104	15.11.2018	-	-	-
6	Свиная почка эмбриональная версенизированная	СПЭВ	14.11.2018	-	-	не проводилось
7	Почка нормального молодого бычка	MDBK	14.02.2014	-	-	-
8	Почка обезьяны	MARC -145	21.11.2018	-	-	-
9	Почка собаки	MDCK	19.10.09	-	-	-
10	Почка кошки	CRFK	30.11.2008	-	-	не проводилось
11	Почка африканской зеленой мартышки	Vero WHO	23.01.2019	-	-	-
12	Почка африканской зеленой мартышки	VERO китайский	10.10.2018	-	-	-
13	Почки сайгака	ПС	01.07.2015	-	-	-
14	Почки поросенка	PK – 15	20.11.2018	-	-	-
15	Гонада козы	КГ-91	17.10.2018	-	-	-
16	Фибробласты мыши	L -41	05.09.2014	-	-	-
17	Почка теленка	ПТ-80	22.10.2018	-	-	-
18	Почка щенка	ПЩ	5.02.2014	+	+	+
19	Почка овцы	ПО	09.07.2015	-	-	-
20	Карцинома шейки матки человека	HEP- 2	8.01.2019	-	-	-

Как видно из таблицы, по результатам электронной микроскопии и флуоресцентного окрашивания клеток на Hoechst 33258 можно прийти к выводу, что перевиваемые клеточные линии имеющиеся в коллекции культур клеток НИИПББ полностью свободны от микоплазм. Микоплазменную индикацию микробиологическим методом изучали в 16 перевиваемых культурах клеток, на оставшиеся клеточные линии (IBRS, СПЭВ и CRFK) микробиологический посев не проводили.

Перевиваемая культура клеток ПЩ со степенью контаминации оцениваемая на (+) была удалена из банка культур клеток.

Выводы. В настоящее время в банке клеточных культур НИИПББ насчитывается более 35 линий клеток человека и животных. Индикацию проводили 20 видам перевиваемых культур клеток хранящихся в коллекции культур клеток института. Все линии охарактеризованы в соответствии с едиными требованиями к качеству клеточного материала, согласно требованиям, принятым в Международных коллекциях культур клеток и тканей. На протяжении всего периода функционирования лаборатории постоянным разделом работы является индикация (с помощью метода полимеразной цепной реакцией, методом флуоресцентного окрашивания красителем Hoechst 33258, микробиологический посев на специальные питательные среды) микоплазм. По результатам наших исследований следует отметить, что более простыми, доступными и достаточно эффективными являются микробиологический, полимеразная цепная реакция и цитохимический методы, применение которых обеспечивает контроль за контаминацией микоплазмами культур клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шалунова Н.В., Волкова Р.А. и др. Микоплазмы – контаминанты клеточных культур. Биопрепараты. Профилактика, диагностика и лечение, 2016, – №16. – P.151-160.
2. Каган Г.Я. Микоплазмы в патологии человека. Науч. обзор. – Москва 1981. – 84 с.
3. Стегний Б.Т. Методы индикации микоплазм в клеточных культурах и их деконтаминация // Ветеринария. – Киев, 1992. Вып. 57. – С. 56-58.
4. Barile M.F., Mc Garryty G.J. Isolation of mycoplasmas from cell cultures by agar culture and liquing medium techniques // Methods in mycoplasmatology, 1983. – P. 159-166.
5. Mc Garryty G.J., Kotani H. Cell culture mycoplasmas. – Orlando, 1985. – P. 353-390.
6. ISSN 0233-7673. Проблемы криобиологии. 1993. – №4. – С. 48-49.
7. Drexler HG, Uphoff CC. Contamination of cell cultures Mycoplasma. The Encyclopedia of Cell Technology. New York: Wiley; 2000. – P. 609-27.
8. Исмагамбетова Д.Ж., Наханов А.К., Жаппарова Г.А. Оценка влияния фармазина на элиминацию микоплазм в культурах клеток // Инновационное развитие науки в обеспечении биологической безопасности. – Гвардейский, 2014. – 109 с.
9. СОП-GMP-НИИПББ-ПР-265-2020. ПЦР анализ по входному контролю культуры клеток на наличие микоплазмы с помощью набора EZ-PCR™ Mycoplasma Detection Kit.
10. Uphoff C.C., Drexler H.G. Detecting Mycoplasma contamination in cell cultures by polymerase chain reaction. Methods Mol. Med., 1988. – P.319-326.
11. Lesley Y., Julia S., Glyn S., John R.M. Detection of Mycoplasma in cell cultures. Published online 22 April 2010.
12. Harlin H., Gajewski T.F. Diagnosis and treatment of mycoplasma-contaminated cell cultures, Curr Protoc Cytom, 2008.

578.821.21

Т.У. Аргимбаева, Э.Т. Тайлакова, И.У. Исабек, М. Абаева, А. Бопи,
А. Тағайев, О.В. Червякова, К.Т. Султанкулова, М.Б. Орынбаев, А.К. Наханов

РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности»
КН МОН РК, пгт. Гвардейский, Казахстан
Email: 98.constantine.98@gmail.com

КОНСТРУИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО РЕЦЕПТОР-СВЯЗЫВАЮЩЕГО ДОМЕНА S-БЕЛКА КОРОНАВИРУСА SARS-COV-2

Аннотация. Вакцинация является основным средством предупреждения распространения инфекционных заболеваний. В последнее широко распространено использование профилактических препаратов на основе рекомбинантных белков, обладающих антигенными и иммуногенными свойствами. Целью данных исследований являлось получение рекомбинантного рецептор-связывающего домена S-белка коронавируса SARS-CoV-2.

В результате проведенных исследований экспрессия целевого белка в бактериальной системе подтверждена методом иммуноблотинга с использованием антител anti-RBD (SARS-CoV-2 Spike) и сыворотки, полученной от переболевших коронавирусной инфекцией людей. Рекомбинантные белки взаимодействовали в серологических реакциях с антителами, что подтвердило сохранение их специфической антигенной активности при экспрессии в прокариотической системе.

Полученные рекомбинантные белки будут использованы для разработки профилактических препаратов.

Ключевые слова: рекомбинантный белок, клонирование, экспрессия, вирус оспы овец.

Т.У. Арғымбаева, Э.Т. Тайлақова, И.У. Исабек, М. Абаева, А. Бопи,
А. Тағайев, О.В. Червякова, К.Т. Сұлтанқұлова, М.Б. Орынбаев, А.Қ. Наханов

ҚР БҒМ ҒК «Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты» РМК,
Гвардейский қтп., Қазақстан

SARS-COV-2 КОРОНАВИРУСЫНДАҒЫ S-АҚУЫЗЫНЫҢ РЕКОМБИНАНТТЫ РЕЦЕПТОР БАЙЛАНЫСТЫРАТЫН ДОМЕНІН ҚҰРУ ЖӘНЕ ЭКСПРЕССИЯЛАУ

Аннотация. Вакцинация жұқпалы аурулардың таралуының алдын алудың негізгі құралы болып табылады. Соңғысында антигендік және иммуногендік қасиеттері бар рекомбинантты ақуыздарға негізделген профилактикалық препараттарды қолдану кең таралған. Бұл зерттеулердің мақсаты SARS-CoV-2 коронавирусының s-ақуызының рекомбинантты рецептор байланыстыратын доменін алу болды.

Жүргізілген зерттеулер нәтижесінде бактериялық жүйедегі мақсатты ақуыздың көрінісі anti-RBD (SARS-CoV-2 Spike) антиденелерін және коронавирустық инфекциямен ауырған

адамдардан алынған сарысуды қолдана отырып иммуноблотинг әдісімен расталды. Рекомбинантты ақуыздар серологиялық реакцияларда антиденелермен өзара әрекеттесіп, прокариоттық жүйеде көрініс кезінде олардың антигендік белсенділігінің сақталуын растады.

Алынған рекомбинантты ақуыздар профилактикалық препараттарды жасау үшін қолданылады.

Түйін сөздер: рекомбинантты ақуыз, клондау, экспрессия, қой шешегінің вирусы.

**T.U. Argimbaeva, E.T. Tailakova, I.U. Isabek, M. Abaeva, A. Bopi,
A. Tagaev, O.B. Chervyakova, K.T. Sultankulova, M.B. Orynbaev, A.K. Nahanov**

RGE "Research Institute of Biological Safety Problems" CS MES RK, Gvardeiskiy, Kazakhstan

CONSTRUCTION AND EXPRESSION OF THE RECOMBINANT RECEPTOR-BINDING DOMAIN OF THE S-PROTEIN OF THE SARS-COV-2 CORONAVIRUS

Abstract. Vaccination is the main means of preventing the spread of infectious diseases. In the latter, the use of prophylactic drugs based on recombinant proteins with antigenic and immunogenic properties is widespread. The aim of these studies was to obtain a recombinant receptor-binding domain of the S-protein of the SARS-CoV-2 coronavirus.

As a result of the studies, the expression of the target protein in the bacterial system was confirmed by immunoblotting using anti-RBD antibodies (SARS-CoV-2 Spike) and serum obtained from people who recover from coronavirus infection. Recombinant proteins interacted in serological reactions with antibodies, which confirmed the preservation of their specific antigenic activity when expressed in the prokaryotic system.

The resulting recombinant proteins will be used for the development of prophylactic drugs.

Key words: recombinant protein, cloning, expression, sheeppox virus.

Введение. Коронавирусная инфекция (COVID-19) – это инфекционное заболевание, вызванное новым коронавирусом, 2 тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV-2).

SARS-CoV-2 представляет собой вирус с одноцепочечной РНК-оболочкой, длина генома которого составляет 29 881 п.н. (GenBank № MN908947) [1]. Он кодирует 9860 аминокислот [2], в его геноме заложена информация о экспрессии четырех структурных белков, белка Nucleocapsid (N), белка мембраны (M), белка Spike (S) и белка Envelop (E), а также 16 неструктурных белков (nsp) [1].

M-белок наиболее распространен на поверхности вируса и считается центральным организатором сборки коронавируса. S-белок интегрирован по поверхности вируса, он опосредует прикрепление вируса к поверхностным рецепторам клетки-хозяина и слияние мембран вируса и клетки-хозяина для облегчения проникновения вируса в клетку-хозяина. E-белок представляет собой небольшой мембранный белок, состоящий от 76 до 109 аминокислот и второстепенный компонент вирусной частицы, он играет важную роль в сборке вируса, проницаемости мембраны клетки-хозяина и взаимодействии вируса с клеткой-хозяином. Капсид – это белковая оболочка, внутри капсида находится N-белок, который связан с одноцепочечной РНК вируса, которая позволяет вирусу захватывать

человеческие клетки и превращать их в вирусные фабрики. Белок N покрывает геном вирусной РНК, его N-конец связывается с геномными и субгеномными РНК в вирионах МНV и IBV. Белок N играет важную роль в его репликации и транскрипции. S-белок интегрирован по поверхности вируса, он опосредует прикрепление вируса к поверхностным рецепторам клетки-хозяина и слияние мембран вируса и клетки-хозяина для облегчения проникновения вируса в клетку-хозяина [3].

Spike-белок (S) в закрытом состоит из трех идентичных цепей, каждая из которых содержит 1273 аминокислоты, и состоит из двух четко определенных областей белкового домена: субъединиц S1 и S2 [4]. Субъединица S1 состоит из N-концевого домена (NTD) и рецептор-связывающего домена (RBD). Функцией субъединицы S1 является связывание с рецептором на клетке-хозяине. Субъединица S2 содержит слитый пептид (FP), гептадный повтор 1 (HR1), центральную спираль (CH), коннекторный домен (CD), гептадный повтор 2 (HR2), трансмембранный домен (TM) и цитоплазматический хвост (CT). Функция субъединицы S2 заключается в слиянии вирусной и клеточной мембран [5].

SARS-CoV-2 мутирует в четыре раза медленнее, чем вирус гриппа, и новые варианты оказывают минимальное влияние на антигенность вируса. Хотя коронавирусы мутируют медленнее, некоторые из новых вариантов SARS-CoV-2, имеют более высокую степень инфекционности за счет усиления репликации вируса в тканях легких и дыхательных путей. RBD является более консервативным фрагментом S-белка, следовательно, использование RBD будет эффективно против нескольких вариантов SARS-CoV-2.

Было обнаружено что, использование целого спайкового белка SARS-CoV-2 без остальных вирусных компонентов достаточно, чтобы вызвать передачу сигналов в сосудистых клетках легких. Обработка гладкомышечных клеток легочной артерии человека или эндотелиальных клеток легочной артерии человека субъединицей S1 вызывает активацию фосфорилирования пути MEK. MEK представляет собой митоген-активируемую протеинкиназу, которая фосфорилирует и активирует внеклеточную регулируемую киназу (ERK). Путь MEK/ERK является хорошо известным механизмом роста клеток, также облегчающим репликацию вирусов.

В отличие от полноразмерной субъединицы S1 Spike-белка SARS-CoV-2, которая способна запускать механизм MEK, только рецептор-связывающий домен не активирует MEK в организме человека.

В связи с активацией передачи сигналов роста в клетках сосудов легких S-белка SARS-CoV-2, у пациентов с COVID-19 было обнаружено утолщение стенок легочных сосудов. Таким образом, передача сигналов роста клеток, опосредованная S-белком SARS-CoV-2, способствует гиперплазии и/или гипертрофии гладких мышц сосудов и эндотелиальных клеток, что приводит к сердечнососудистым осложнениям при COVID19 [6].

Целью данной работы является создание рекомбинантных конструкций для бактериальной экспрессии рецептор-связывающего домена S-белка коронавируса SARS-CoV-2.

Материалы и методы.

Вирус, плазмиды, клетки. В работе использовали штамм SARS-CoV-2/KZ_Almaty04.2020, выделенный из клинического образца, депонированный в республиканском депозитарии коллекции микроорганизмов РГП НИИПББ КН МОН РК. Для выбора корректных конструкций использовали pJet1.2 вектор. Экспрессирующие рекомбинантные плазмиды получали на основе вектора pET28b(+) (Novagen) [7].

Выделение ДНК. Плазмидную ДНК выделяли набором MiniPrep, Qiagen согласно инструкции производителя.

Конструирование и синтез специфических праймеров. Конструирование специфических праймеров проводили с использованием программы VectorNTI Suite 9. Синтез праймеров осуществляли на синтезаторе олигонуклеотидов Expedite 8909 (Applied Biosystems).

Экспрессия рекомбинантных белков. Из глицериновых стоков бактериальных штаммов, экспрессирующих рекомбинантные белки, готовили ночную культуру в среде LB с добавлением 50 мкг/мл канамицина (LB-kan50). Ночную культуру разводили средой LB в соотношении 1:100, после чего клетки выращивали при 37°C до OD₆₀₀=0,6-1 на шейкере (200 об/мин) (в случае RBD в течение 2 ч). Экспрессию индуцировали добавлением 1 мМ изопропил-β-D-тиогалактопиранозидом (ИПТГ), продолжали инкубирование при 37°C в течение (в случае RBD – 4 ч). Отбирали пробы и собирали клетки центрифугированием.

Очистка рекомбинантного белка. Для лизиса клеток влажный осадок клеток растворяли в буфере 10 мМ трис HCl pH 7,5, 1 % тритон X100, 150 мМ NaCl. К полученной суспензии добавляли лизоцим в конечной концентрации 1 мг/мл, проводили три цикла заморозки при минус 70 °C и оттаивания при 37°C по 30 мин каждого. Суспензию инкубировали в течение 18 ч при 4°C, далее обрабатывали ультразвуком 3 раза по 2 мин с паузой по 2 мин при 200-300 W. Полученный лизат клеток центрифугировали 16000 g в течение 20 мин при 4°C. Осадок (тельца включения) дважды отмывали буфером, содержащим 2 М мочевины, 20 мМ трис HCl pH 7,5, 2 % тритон X100, 500 мМ NaCl, затем однократно буфером, содержащим 20 мМ трис HCl pH 7,5, 500 мМ NaCl. Полученные включения солибилизовали в буфере DBB (50 мМ NaH₂PO₄, 300 мМ NaCl, 8 М мочевины, pH 7,8). Далее, проводили очистку белков с использованием Ni-NTA агарозы в денатурирующих условиях согласно инструкции производителя. На всех этапах очистки отбирали пробы для анализа электрофорезом ДСН-ПААГ.

Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) и вестерн-блот. Образцы белков разделяли методом электрофореза в 12% ДНС-ПААГ по Laemmli [8] и визуализировали путем окрашивания Coomassie G-250 или иммунодетекцией. Для иммунодетекции белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану и исследовали в соответствии с инструкциями производителя либо антителами anti-RBD (SARS-Cov-2 Spike), либо сывороткой, полученной от переболевших коронавирусной инфекцией людей. После переноса белка нитроцеллюлозную мембрану инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре в блокирующем буфере [ББ: 150 мМ NaCl, 20 мМ трис-HCl, pH 7,5, содержащим 5% обезжиренного сухого молока, содержащем 5 % обезжиренного сухого молока]. Затем мембрану обрабатывали первичной антиген-специфической сывороткой в течение двух часов при комнатной температуре, трижды промывали буфером TBST (150 мМ NaCl, 20 мМ трис-HCl, pH 7,5, 0,1% твин-20) и инкубировали с анти – антителами, конъюгированными со щелочной фосфатазой течение 1-2 ч при комнатной температуре. После трех промывок TBST мембрану обрабатывали с использованием системы субстратов BCIP/NBT в соответствии с инструкцией производителя.

Результаты и обсуждение. На первом этапе исследований проведен анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей генов целевых белков коронавируса на наличие трансмембранных доменов. Для получения экспрессирующих кассет использованы только поверхностные компоненты белковых молекул (outside). Конструирование праймеров проводили с использованием программы Vector NTI 10.0.1. Для возможности последующего клонирования целевых генов в экспрессирующие плазмиды в последовательности праймеров были внесены соответствующие сайты для ферментов рестрикции NcoI – NotI/XhoI. С использованием пар праймеров RBD-F/RBD-R была амплифицирована последовательность, кодирующая рецептор-связывающий домен S-белка.

В таблице 1 представлена последовательность праймеров. Размер продукта амплификации гена RBD составил ~ 400 п.о. (рисунок 1).

Таблица 1 – Праймеры, использованные при проведении исследований

Праймеры	Последовательность 5'-3'	Размер, п.о.
RBD_F	GCCACCATGGTTAGATTTTCCTAATATTAC	400
RBD_R	CATCTCGAGCAAATTAGTAGAC	

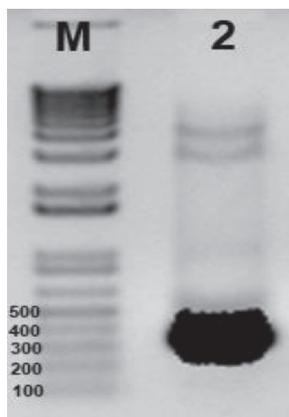


Рисунок 1 – ПЦР продукт гена коронавируса SARS-CoV-2:
М – маркер длин фрагментов ДНК;
2 – RBD

ПЦР-продукт гена коронавируса SARS-CoV-2 были клонированы в pJet1.2 вектор для последующего секвенирования и выбора корректных конструкций. Корректная последовательность целевого гена были субклонирована в экспрессирующий вектор pET28b(+) под контроль промотора фага T7. В результате проведенных исследований была получена конструкция pET/RBD для экспрессии гена коронавируса в бактериальной системе *E.coli*. Для очистки и детекции рекомбинантного белка аминокислотная последовательность была модифицирована путем добавления на С-конце шести молекул гистидина HIS-Tag.

В результате индукции бактериальных клеток ER2566 *E.coli*, трансформированных рекомбинантной плазмидой pET/RBD, установлена экспрессия белка, молекулярный вес которого соответствовал расчетному для RBD, и составил 23 кДа, (рисунок 2).

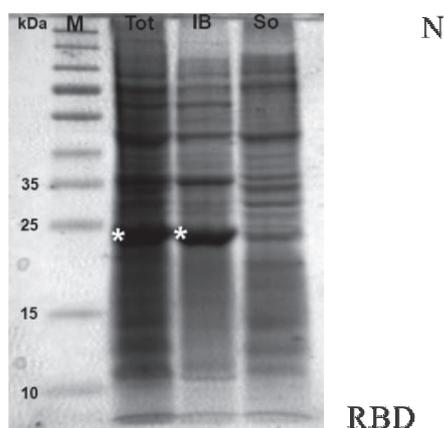


Рисунок 2 – Электрофоретический анализ белков клеточного лизата *E.coli* ER2566, трансформированного плазмидами pET/RBD:
М – белковый маркер молекулярного веса; Tot – после индукции IPTG;
So – растворимые белки;
IB – включения

№7
2021

Иммунодетекцию рекомбинантного белка проводили с использованием антител anti-RBD (SARS-CoV-2 Spike) (рисунок 2), либо сывороткой, полученной от переболевших коронавирусом инфекцией людей (рисунок 3).

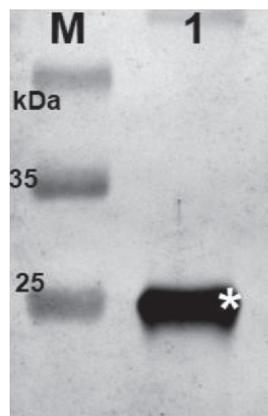


Рисунок 3 – Иммуноблотинг белка RBD, с использованием антител anti-RBD Domain (SARS-Cov-2 Spike):
 М – белковый маркер молекулярного веса;
 1 – очищенный белок RBD

Как видно на рисунке 3 очищенный рекомбинантный белок RBD связывался с антителами anti-RBD (SARS-CoV-2 Spike), что подтверждает его специфичность.

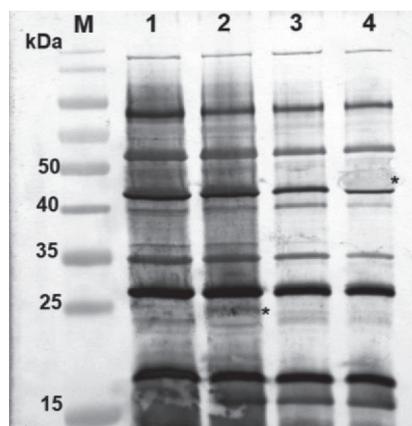


Рисунок 3 – Иммуноблотинг белков клеточного лизата *E.coli*, трансформированного рекомбинантными плазмидами рЕТ/RBD, с использованием сыворотки полученной от переболевших коронавирусной инфекцией людей:
 М – белковый маркер молекулярного веса;
 1,2 – RBD; 2,3 – N;
 1,3 – клеточный лизат до индукции;
 2,4 – после индукции IPTG

Таким образом, полученная рекомбинантная плазмида обеспечивает экспрессию целевого вирусного белка, который специфически взаимодействует с сывороткой, полученной от переболевших коронавирусной инфекцией людей. Несмотря на то, что ген экспресировался в прокариотической системе, это никак не повлияло на антигенные свойства полученного рекомбинантного белка. Штамм *E. coli*, экспрессирующий рекомбинантный вирусный белок, депонирован в коллекцию микроорганизмов НИИПББ.

Заключение. Таким образом, проведены экспрессия целевого белка, оценка подлинности методом вестерн-блота со специфическими сыворотками, а также оптимизация уровня экспрессии целевого белков коронавируса SARS-CoV-2.

Анализ клеточных лизатов методом вестерн блота с использованием с использованием антител anti-RBD (SARS-CoV-2 Spike) и сыворотки, полученной от переболевших корона-вирусной инфекцией людей, подтвердил наличие антигенной активности рекомбинантного белка.

В результате индукции бактериальных клеток, содержащих рекомбинантную плазмиду рЕТ28b(+), был получен белок RBD с молекулярной массой 23 кДа.

Полученные рекомбинантные антигенные белки будут использованы для разработки средств специфической профилактики коронавирусной инфекции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Yuan H., Chan Y., Xin-feng X., Wei X. and Shu-wen L. Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antivirus drug development for COVID-19 // *Acta Pharmacologica Sinica*, 2020. – Vol. 41. – P. 1141-1149.
2. Chan J.F., Kok K.H., Zhu Z., Chu H., To K.K., Yuan S. et al. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan // *Emerg Microbes Infect*, 2020. – Vol. 9. – P. 221-236.
3. Kirchdoerfer R.N., Cottrell C.A., Wang N., Pallesen J., Yassine H.M., Turner H.L., Corbett K.S., Graham B.S., McLellan J.S., Ward A.B. Pre-fusion structure of a human coronavirus spike protein // *Nature*, 2016. – Vol. 531. – P. 118-121.
4. Boopathi S., Poma A. B., Kolandaivelc P. Novel 2019 coronavirus structure, mechanism of action, antiviral drug promises and rule out against its treatment // *J Biomol Struct Dyn.* – 2020. – P. 1–10.
5. Wang M.Y., Zhao R., Gao L.J., Gao X.-F., Wang D.-P., Cao J.-M. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* – 2020. – Vol. 10 – P. 1-17.
6. Suzuki Y.J., Nikolaienko S.I., Dibrova Y.V., Vasylyk V.M., Novikov, Shults N.V., Gychka S.G. SARS-CoV-2 spike protein-mediated cell signaling in lung vascular cells // *Vascular Pharmacology.* – 2021. – Vol. 167. – P. 1-6.
7. Тайлакова Э.Т., Ажибаева Д.Т., Червякова О.В. и др., Создание генетических конструкции для экспрессии рекомбинантных белков А4L и В5R вируса оспы овец // *Актуальные проблемы и перспективы биологической безопасности: Сб. статей научн.- практ. конф.* – п.г.т. Гвардейский. – 2012. – С. 174-179.
8. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. – Vol. 227. – P. 680-685.

ФИТОСАНИТАРИЯ

УДК 633.18.03:632.4.01.08

А.С. Рсалиев

РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности»
КН МОН РК, пгт. Гвардейский, Казахстан
E-mail: aralbek@mail.ru

ПИРИКУЛЯРИОЗ РИСА: РАСПРОСТРАНЕНИЕ, ВРЕДНОСНОСТЬ И ОСНОВНЫЕ ПОДХОДЫ В БОРЬБЕ С ПАТОГЕНАМ

Аннотация. В обзоре показаны основные крупные производители риса в мире и роль устойчивых сортов риса в борьбе с пирикуляриозом. Приведены сведения об эпидемиях пирикуляриоза риса, основной ареал распространения и вредоносность болезни в условиях Казахстана. Описаны общее количество генов устойчивости к пирикуляриозу риса, источники и локализации в хромосомах риса, а также показаны ДНК маркеры с известной локализацией в хромосомах *Oryza sativa*, и тесно сцепленные с целевыми генами устойчивости пирикуляриоза. Приведены данные по идентификации носителей *Pi*-генов устойчивости к пирикуляриозу риса. Отмечается, что применение химических средств защиты от этого заболевания увеличивает себестоимость продукции и пагубно сказывается на экологическом фоне в зонах возделывания риса, к тому же у многих хозяйств недостаточно средств для их использования. Исходя из этого, наиболее перспективные методы борьбы с пирикуляриозом – это выявление и использование сортов риса, имеющих гены устойчивости к болезни.

Ключевые слова: рис, сорт, пирикуляриоз, гены устойчивости, ДНК маркеры

№7
2021

А.С. Рсалиев

ҚР БҒМ ҒК «Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты» РМК,
Гвардейский қтп., Қазақстан

КҮРІШ ПИРИКУЛЯРИОЗЫ: ТАРАЛУЫ, ЗИЯНДЫЛЫҒЫ ЖӘНЕ ПАТОГЕНМЕН КҮРЕСУДІҢ НЕГІЗГІ ТӘСІЛДЕРІ

Аннотация. Шолуда әлемдегі негізгі күріш өндіруші елдер және пирикуляриоз ауруымен күресуде төзімді сорттардың рөлі көрсетілді. Қазақстан жағдайында күріш пирикуляриозының эпидемиясы, аурудың негізгі таралуы мен зияндылығы туралы деректер баяндалды. Күріш пирикуляриозының төзімділік гендерінің жалпы саны, олардың көздері

мен хромосомаларда орналасуы сипатталды, сонымен қатар күріш пирикулярриозының төзімділік гендеріне тығыз байланысқан және *Oryza sativa* хромосомаларында орналасқан ДНҚ маркерлер көрсетілді. Күріш пирикулярриозы ауруының *Pi*-төзімділік гендеріне ие өсімдіктерді жіктеу туралы мәліметтер келтірілді. Бұл аурумен қорғануда химиялық құралдарды қолдану өнімнің өзіндік құнын арттыратыны және күріш өсіру аймақтарының экологиялық жағдайына зиянды әсері, сонымен қатар көптеген шаруашылықтарда оларды пайдалануға қаражат жетіспейтіні баяндалды. Осыған сүйене отырып, пирикулярриоз ауруымен күресудің ең оңтайлы әдісі ауруға төзімділік гендері бар күріш сорттарын анықтау және қолдану болып табылады.

Түйін сөздер: күріш, сорт, пирикулярриоз, төзімділік гендері, ДНҚ маркерлер

A.S. Rsaliyev

RGE "Research Institute of Biological Safety Problems" CS MES RK, Gvardeiskiy, Kazakhstan

RICE BLAST: DISTRIBUTION, SEVERITY AND MAIN APPROACHES TO PATHOGEN CONTROL

Abstract. The main major rice producers in the world and the role of resistant rice varieties in the fight against rice blast show in this review. The information about the epidemics of rice blast, the main area of distribution and the harmfulness of the disease in Kazakhstan is given. The total numbers of resistance genes to rice blast, sources and localities in rice chromosomes are described, as well as DNA markers with known localization in *Oryza sativa* chromosomes, and closely linked to the target rice blast resistance genes are shown. Data on the identification of carriers of *Pi*-genes of resistance to rice blast are presented. It is noted that the use of chemical means of protection against this disease increases the cost of production and adversely affects the environmental background in rice cultivation areas, besides; many farms do not have enough funds for their use. Based on this, the most promising methods of fight with rice blast are the detection and use of rice varieties with genes of resistance to the disease.

Key words: rice, variety, rice blast, resistance genes, DNA markers

Систематика и географическое распространение риса. Рис принадлежит к классу однодольных (*Monocotyledones*), семейству злаков (*Poaceae*), подсемейству *Pooidea*, трибе *Oryzae* – рисовых. В эту трибу включены еще 18 родов, генетически наиболее близки рису роды *Leersia* Swz., и *Zizania* L [1]. Наиболее известен вид *Zizania aquatica* L, который под названием «дикий рис» культивируется в США для продовольственного использования [2].

В подродовой классификации собственно риса разные авторы называли от 17 до 32 видов [3]. Большинство специалистов в настоящее время признано существование 24 видов риса [4, 5]. Из них в производстве возделывается всего два вида *O. sativa* и *O. glaberrima* [6]. Мировое разнообразие сортов риса посевного представляется в виде иерархического ряда: вид – подвид – эколого-географическая группа – агроэкотип – сортотип – сорт [7]. Впервые подвидовую дифференциацию установили японский генетик С. Kato с коллегами в 1928 г. [8], выделившие два таксона: индика (*Indika*) и японика (*Japonica*). Подвиды риса еще делят на разновидности, которые ранжированы в восемь групп по окраске семян, консистенции эндосперма и подвидовой принадлежности. Разновидности риса (их около 400) не отражает реальные эволюционные процессы, а служат лишь инструментарием при сортовой апробации [9].

Посевы риса размещаются в 112 странах мира на площади более 145 млн. га, а ежегодное производство зерна, по данным ФАО, составляет приблизительно 445 млн. тонн. Ареал распространения этой культуры выходит за пределы субтропиков в северном и южном полушариях. Основными крупными производителями риса в мире являются Китай, Индия, Бангладеш, Вьетнам, США и другие. Китай мировой лидер по производству риса [7, 10]. Республика Казахстан занимает второе место по производству риса в СНГ после Российской Федерации [11, 12].

Биологическая особенность, распространение и вредоносность пирикулярноза риса.

Растения и зерно риса подвергаются поражению огромным количеством грибных заболеваний. Насчитывается более 270 видов грибов-возбудителей болезней риса, которые поражают органы и ткани, зерновки в период вегетации, а также семена во время хранения. Наиболее распространенные болезни на посевах риса в СНГ: пирикулярноз; альтернариоз; гельминтоспориоз; фузариозы, вызывающие корневую гниль [13]. Из всех грибных болезней наиболее вредоносным и широко распространенным является пирикулярноз. Возбудителем пирикулярноза риса является несовершенный гриб *Pyricularia oryzae* Cavara, синоним *Pyricularia grisea* Sacc. (Телеморф.: *Magnaporthe grisea* Barr). Патоген поражает все надземные органы растения, что приводит к потере урожая на 30-60 %, а в годы эпифитотий – на 80-100 %. В зависимости от характера поражения различают листовую, узловую и метельчатую формы болезни [14-17].

По научной и экономической важности возбудитель пирикулярноза риса *P. oryzae* возглавляет «Топ-10» грибных болезней растений. Эксперты подчеркивают экономическое значение этого гриба, так как он может буквально уничтожать рисовые поля, являющиеся основой для пропитания половины населения Земли [18]. Возбудитель *P. oryzae* образует фитотоксины – пирикулярин и α -пиколиновую кислоту, вызывающие у растений типичные симптомы заболевания. Устойчивые к пирикулярнозу сорта риса устойчивы и к действию этих токсинов [19].

В Казахстане основной ареал распространения и вредоносности болезни риса находится в Кызылординской области. При этом пирикулярноз риса впервые в этом регионе был зафиксирован в 1950 годы [20]. Затем до середины 1990 годов это заболевание здесь не отмечалось. Эпифитотии болезни в Сырдаринском, Жалагашском, Жанакорганском районах наблюдались в 1998 г. и были обусловлены благоприятными погодными условиями [21]. В 2005 году рис был поражен в отдельных хозяйствах, где были нарушены технологии применения минеральных удобрений, в 2006 году вновь зафиксирована вспышка этой болезни [22]. В 2012 году очаги пирикулярноза обнаружены на рисовых чеках в Кармакшинском, Сырдаринском, Шиелийском районах, где потери зерна доходили до 25% [23].

Субъективные причины появления пирикулярноза риса в Казахстане заключаются в массовом нарушении агротехники – несоблюдение севооборотов, отсутствие зяблевой вспашки, неудовлетворительное состояние коллекторно-дренажных сетей, применение некачественных семян восприимчивых сортов, отсутствие предпосевного протравливания семян и несвоевременная химическая обработка посевов в период вегетации [23].

В 2013-2015 годы на базе Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности был реализован грантовый проект по теме «Изучение генов устойчивости сортов риса к пирикулярнозу с использованием фитопатологических и молекулярно-генетических методов». В рамках данного проекта был проведен фитосанитарный мониторинг на производственных посевах в Казалийском, Кармакшинском, Жанакорганском, Сырдаринском и Шиелийском районах Кызылординской области. В результате в конце июля – начале августа повсеместно отмечены очаги пирикулярноза,

заболевание выражено в листовой и метельчатой формах [24]. Кроме того, в условиях НИИПББ подобраны доступные и несложные в приготовлении среды, благоприятные для роста колоний и спорующий изоляты возбудителя *P. oryzae* [25], отработаны основные методы создания инфекционного фона пирикулярноза риса [26], дифференцированы казахстанские изоляты гриба по морфолого-культуральным признакам и вирулентности [27], а также с использованием фитопатологических и молекулярных методов проведена оценка устойчивости сортов и линии риса к пирикулярнозу [28, 29]. Однако существующий в рисосеющих районах страны большой инфекционный запас пирикулярноза, а также использование неустойчивых сортов будет способствовать поражению риса пирикулярнозом и в дальнейшем. В последнее время крупные хозяйства стали заблаговременно обрабатывать посеы риса фунгицидами, хотя это требует немало затрат финансовых средств, особенно где возделываются неустойчивые сорта к пирикулярнозу. Стоимость одной обработки 1 га посева обходится сельхоз товаропроизводителю в 4000-4500 тенге. По подсчетам ежегодный урон, то есть потери продукции рисоводства от пирикулярноза составляет 3-4 ц/га, в целом по Кызылординской области это около 20 тыс. тонн или же в денежном выражении более 1 млрд. тенге. Применение химических средств защиты от этого заболевания увеличивает себестоимость продукции и пагубно сказывается на экологическом фоне в зонах возделывания риса, к тому же у многих хозяйств недостаточно средств для их использования.

Основные подходы в борьбе с пирикулярнозом. Наиболее перспективными методами борьбы с пирикулярнозом являются выявление и создание «иммунных сортов» и быстрое внедрение их в производство. Особенно практичным и экономичным подходом в борьбе с пирикулярнозом риса является использование сортов, имеющих гены устойчивости к болезни. Гены устойчивости к пирикулярнозу обозначаются символом «*Pi*» – от английского названия *Pyricularia* (пирикулярноз). До настоящего времени в мире были определены 100 генов устойчивости к пирикулярнозу риса, и они локализованы в 11 хромосомах риса, за исключением хромосомы 3. Среди них некоторые гены были клонированы (*Pib*, *Pita*, *Pi9*, *Pi2*, *Piz-t*, *Pid2*, *Pi36*, *Pi37*, *Pik-m*, *Pit*, *Pi5*, *Pid3*, *pi21*, *Pb1*, *Pish*, *Pik*, *Pik-p*, *Pi54*, *Pia*, *NLS1* и *Pi25*) [30]. Все клонированные гены устойчивости принадлежат к наиболее распространенному классу генов устойчивости растений – *NBS-LRR*, кодирующих белки, в структуру которых входит нуклеотид-связывающий домен – *nucleotide binding site* (NBS), а также рецепторная область, богатая лейцином – *leucine rich repeat* (LRR). Полные нуклеотидные последовательности *Pi*-генов устойчивости доступны в открытой базе генетических данных GenBank (www.ncbi.nih.gov) и Gramene (www.gramene.org).

В создании генетически устойчивых к пирикулярнозу сортов риса применение ДНК-маркеров может быть полезно как для непосредственного проведения селекции с помощью маркеров, так и для поиска доноров генов устойчивости. Широкое разнообразие ДНК-маркеров требует более тщательного их подбора для решения поставленной задачи. Эффективность ДНК-маркера определяется степенью его сцепления с локусом идентифицируемого гена и высокой воспроизводимостью в генотипах растений. В связи с этим на начальных этапах работ по молекулярному скринингу риса, в первую очередь, возникает необходимость подбора ДНК-маркеров, позволяющих получить достоверные результаты. На основе анализа общей международной базы данных генов (NCBI), базы данных генов растений (Gramene), и мировой литературы определены общее количество генов устойчивости к пирикулярнозу риса и их расположение на хромосоме, а также выявлены источники генов устойчивости и ДНК маркеры, тесно сцепленные с целевыми генами устойчивости пирикулярноза риса. Характеристика клонированных генов устойчивости к пирикулярнозу риса и их молекулярные маркеры представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Клонированные гены устойчивости риса к пирикулярриозу и их молекулярные маркеры

Гены	Локализация в геноме риса		Источник гена (сорта риса)	ДНК маркеры, сцепленные с целевыми локусами генов	Ссылки
	хромосома	позиция, п.н.			
<i>Pi-b</i>	2	35107768-35112900	Tohoku IL9 (J*)	Os02g57310, b213, b28, b2, b3989, RM208, S1916, G7031	[31]
<i>Pi-ta</i>	12	10603772-10609330	Tadukan (I**), Yashiro-mochi (J)	Os12g18360, SP4B9, SP9F3, ta642, ta801, ta3, ta577, Pi-ta 440, Pi-ta 1042, Pi-ta 403	[32]
<i>Pi54</i> (<i>Pi-kh</i>)	11	24761902-24762922	Tetep (I)	TRS26, TRS33, RM206	[33]
<i>Pid-2</i>	6	17159337-17163868	Digu (I)	CAPS1, CAPS 8, Os06g29810	[34]
<i>Pi9</i>	6	10386510-10389466	O. minuta (W)	Os06g17900	[35]
<i>Pi-z</i>	6	10155975-10517612	Zenith (J), Fukunishiki (J), Toride 1 (J), Tadukan (I)	Z4792	[36]
<i>Pi36</i>	8	2870061-2884353	Q61 (I)	Os08g05440, CRG3	[37]
<i>Pi37</i>	1	33110281-33489931	St- No 1 (J)	RM543, FPSM1, RM302, RM212	[38]
<i>Pikm</i>	11	27314916-27532928	Tsuyuake (J)	K2167, K4731, K6441, 85H07554, k3952	[39]
<i>Pi5</i>	9	неизвестно	Moroberekan (J)	JJ113-T3, JJ817	[40]
<i>Pi-t</i>	1	2270216-3043185	Tjahaja (I), K59 (I)	t311, t256, t8042	[41]
<i>Pi21</i>	4	5242654-5556378	Owarihatamochi (J)	RM16913, RM1359	[42]
<i>Pb1</i>	11	21711437-21361768	Modan (I)	RM206, S723-Pb3810	[43]
<i>Pi-k</i>	11	27314916-27532928	Kusabue (I)	RM5766, K33, 34, 28	[44]
<i>Pik-p</i>	11	27314916-27532928	HR22 (I)	K37-K22	[45]

Примечания

1 «*» – подвид Japonica;

2 «**» – подвид Indica

В соответствии с тем, какие гены представлены в генотипе, определяется уровень устойчивости растений риса к этому патогену. Вместе с тем, в селекционно-генетических программах могут использоваться комбинации разных генов. Для создания более прочного барьера защиты риса от пирикулярриоза необходимо работать только с эффективными генами устойчивости. В настоящее время во многих рисосеющих странах мира высокоэффективными к пирикулярриозу являются гены *Pi-ta* и *Pi-z*. В результате анализа

литературных источников и базы данных по генам риса нами отобраны ДНК-маркеры к отмеченным генам устойчивости. Эти ПЦР-маркеры тесно сцеплены с целевыми генами и используются для контроля наличия в коллекционных сортах и образцах риса доминантных и рецессивных аллелей *Pi*-генов устойчивости к пирикулярриозу.

Доминантный ген устойчивости к пирикулярриозу *Pi-ta* секвенирован, он расположен в области центромеры 12 хромосомы. Нуклеотидные последовательности доминантной (источник – сорт Yashiro-mochi) и рецессивной (источник – сорт Tsuyake) аллелей гена *Pi-ta* находятся в базе генетических данных GenBank с номерами – AF207842 и AY196754, соответственно. При этом доминантная и рецессивная аллели этого гена отличаются одной аминокислотной заменой кодируемого геном белка: в положении 918 серина на аланин. Это обуславливает наличие двух аллелей данного гена: *Pi-ta* и *Pi-ta**. Для идентификации гена *Pi-ta* подобрано две пары праймеров, так, что в каждой паре праймеров один является специфичным для конкретной аллели. Подобранные праймеры имеют в своей последовательности один общий олигонуклеотид – точку единичной нуклеотидной замены, но синтез специфичных ПЦР-продуктов идет в разных направлениях. При этом размер ПЦР-продукта у сортов с устойчивой аллелью гена составляет 270 п.н., а у сортов с восприимчивой аллелью – 563 п.н. (таблица 2).

Таблица 2 – Характеристики ДНК-маркеров к эффективным генам устойчивости к пирикулярриозу риса *Pi-ta*, *Pi-z*, *Pi-1*, *Pi-2* и *Pi-33*

Гены	Праймеры	Последовательность праймеров	Tm, оС	Размер ПЦР продукта, п.н.
<i>Pi-ta</i>	F1	F: GCCGTGGCTTCTATCTTTACCTG	65	270/563
	R1	R: ATCCAAGTGTTAGGGCCAACATTC		
	F2	F: TTGACACTCTCAAAGG ACTGGGAT		
	R2	R: TCAAGTCAGGTTGAAGATGCATAGA		
<i>Pi-z</i>	Z60510Piz-F	F: GGAGTTGGTTGCGACGGTGCCGTTAT	60	390
	Z60510Piz-R	R: GCGCGGACCGGCCAGCTAGTTGAC		
<i>Pi-1</i>	MRG4766	F: ATTGCTGCAAAGTGGGAGAC	58	104
		R: AAGTGGAGGCAGTTCACCAC		
<i>Pi-2</i>	AP22	F: GTGCATGAGTCCAGCTCAAA	60	143
		R: GTGTACTCCCATGGCTGCTC		
<i>Pi-33</i>	RM72	F: CCGGCGATAAAACAATGAG	55	166
		R: GCATCGGTCCTAATAAGGG		

№7
2021

Ген устойчивости к пирикулярриозу *Pi-z*, локализованный в хромосоме 6, был идентифицирован как объединенный в кластер с геном *Pi-zt*, определяемый как *Pi-z* локус. Кроме того, был создан ряд ДНК-маркеров к ним, основанных на полиморфизме единичных нуклеотидных замен (SNP) у доминантных и рецессивных аллелей генов. При использовании пара праймера Z60510Piz продукт амплификации размером 390 п.н. указывает на доминантную аллель данного гена [46].

В настоящее время во многих рисосеющих странах мира, кроме генов *Pi-ta* и *Pi-z*, высокоэффективными к пирикулярриозу являются гены *Pi-1*, *Pi-2* и *Pi-33* [45]. Многочисленные исследования показывают, что наибольший эффект гены устойчивости *Pi-1*, *Pi-2* и *Pi-33* проявляют при совместном действии [47, 48].

Ген *Pi-1* локализован на длинном плече хромосомы 11 [45], генетическое расстояние между RFLP маркером RZ536 и геном оценивается в 11 сМ [49]. Так же анализируемый ген генетически отображается между SSR-маркерами RZ536 (проксимальной) и NrB18l (дистальной), с интервалом расстояний 7,9 сМ и 3,5 сМ, соответственно [50]. Для идентификации носителей указанного гена нами выбрана пара праймеров к локусу MGR4766, т.к. генетическое расстояние между маркером MGR4766 и геном *Pi-1* составляет в 1,5 сМ [51]. По литературным данным, выбранный нами маркер является наиболее специфичным по сравнению с другими известными маркерами [52].

Ген *Pi-2* расположен около центромеры в коротком плече хромосомы 6, тесно связан с генами *Pi-9*, *Piz* и *Piz-t* [53, 54]. Данный ген интогрессирован в геном изогенной линии C101A51 из сорта риса *indica* 5173 [55]. Ген еще широко не используется в селекции, в связи, с чем он должен играть определенную роль при создании новых сортов риса в комбинации с другими генами. К настоящему времени разработано несколько молекулярных маркеров, тесно сцепленных с геном *Pi-2*. Ранее было установлено, что ген *Pi-2* генетически отображается между маркерами 2123 и RG64, с интервалом расстояний 2.2 сМ [52]. Для идентификации носителей гена *Pi-2* нами был выбран маркер AP22 к SSR-локусу, генетическое расстояние между маркером и геном оценивается в 1,2 сМ [56].

Ген устойчивости *Pi-33* находится на коротком плече хромосомы 8. Данный ген находится между двумя молекулярными маркерами RM72 и C483 с интервалом расстояний 1,6 сМ [57].

В 2015 году на базе Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности с помощью молекулярно-генетических подходов была охарактеризована генетическая основа устойчивости 60 сортов риса к пирикулярриозу [21]. При этом молекулярный скрининг показал наличие у 8 сортов риса (Livorno, Matusaska, Shinsetsu, Садри Массол, Юбилейный, Zurru 10, Nucleorisa и M-3902) гена устойчивости *Pi-ta*, у 5 образцов (Лазурный, Sorachi, Zurru 10, Камертон и Кзыл-шалы) – *Pi-z*, у 8 образцов (Новатор, Крепыш, Виола, Флагман, Победа-65, ВНИИР-102-24, ВНИИР-101-78 и Бальдо) – *Pi-2*, соответственно. У остальных высокоустойчивых сортов и линии при постановке ПЦР маркерные компоненты генов *Pi-ta*, *Pi-z* и *Pi-2* отсутствовали. На основе этих результатов можно предположить, что их устойчивость к пирикулярриозу контролируется другими генами [21].

Таким образом, на основе анализа различных источников определены общее количество генов устойчивости к пирикулярриозу риса, выявлены расположение генов на хромосоме и их позиция в геноме риса, а также отобраны ДНК маркеры с известной локализацией в хромосомах *O. sativa*, и тесно сцепленные с целевыми генами устойчивости пирикулярриоза. Выявленные сорта риса с эффективными *Pi*-генами представляют собой ценный исходный материал, который может быть использован как доноры в селекционных программах, направленных на создание новых сортов, устойчивых к болезни. Отобранные источники устойчивости и носителей, эффективных *Pi*-генов устойчивости (38 образцов риса) рекомендованы селекционерам Казахского научно-исследовательского института рисоводства имени Ы. Жахаева для использования их при создании новых сортов риса, устойчивых к пирикулярриозу.

ЛИТЕРАТУРА

1. Tsunoda S. Synthesis and perspectives // Biol. Rice. Tokyo Amsterdam. – 1984. – P. 361-375.
2. Jopes C.G. El arroz Silvestre culturado y comercializado en norteamerica // Arroz. – 1977. – Vol.58. No7. – P. 211-216.
3. Chang T.T. Present knowledge of rice genetics and cytogenetics // Tech. Bull. IRRI. – 1994. – No.17. – P. 1-96.
4. Nayar N.M. Origin and cytogenetics of rice // Advances in Genetics. – 1973. – No.17. – P. 153-202.

5. Aggarwal R.K., Brar D.S., Khush G.S. New genomes found in rice // RBQ. – 1997. – No.3. – P. 16-131.
6. Anonymous. Types of rice – International rice research: 25 years of partnership. – IRRI, 1985. – P. 4-5.
7. Ляховкин А.Г. Рис. Мировое производство и генофонд. – Санкт Петербург, 2005. – 288 с.
8. Kato S., Kosaka H., Hara S. On the affinity of rice varieties as shown by the fertility of hybrid plants // Bull. Sci. Facult. Tehkult. Imp. – 1928. – No.3. – P. 132-147.
9. Ляхопкин А.Г. Происхождение и эволюция риса посевного (*Oryza sativa* L.) доноров хозяйственно ценных признаков риса // Сб. науч. тр. по прикладной ботанике, генетике и селекции. – ВНИИ растениеводства. – 1987. – С. 63-74.
10. Харитонов Е.М. Возрождение: актуальные проблемы и перспективы развития рисоводства России // Вестник Краснодарского НЦ АМАН. – 2001. – №8. – С. 124-131.
11. Мамонов Л.К., Таранов О.Н. Проблемы и перспективы рисосеяния в Казахстане // Матер. междунар. конф. «Развитие ключевых направлений сельскохозяйственной науки в Казахстане: селекция, биотехнология, генетические ресурсы». – Алматы, 2004. – Т.1. – С. 169-175.
12. Жайлыбай К.Н. Модель и характеристика высокопродуктивных сортов риса в Казахстане Приаралье // Научные основы и практика рисоводства в Казахстане. – Алматы, 2012. – С. 154-168.
13. Коломиец Т.М. Отбор исходного материала риса для селекции на иммунитет к пирикулярриозу: автореф. ... канд. биол. наук. – Голицыно, 1990. – 21 с.
14. Wang X., Lee S., Wang J., Ma J., Bianco T., Jia Y. Current advances on genetic resistance to rice blast disease // Rice – Germplasm, Genetics and Improvement. 2014. – P. 195-217.
15. Wang G.L., Valent B. Advances in genetics, genomics and control of rice blast disease. Springer Science+Business Media B.V. 2009. – 27 p.
16. Мухина Ж.М., Волкова С.А., Дубина Е.В. Изучение биоразнообразия фитопатогенного гриба *Magnaporthe grisea* (Herbert) Barr с использованием методов молекулярного маркирования (Методические рекомендации). – Краснодар: ВНИИ риса. 2007. – 19 с.
17. Jena K.K., Moon H.P., Mackill D.J. Marker assisted selection - a new paradigm in plant breeding // Korean J. Breed. – 2003. – Vol.35. – P. 133-140.
18. Dean R. et al. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology // Mol. Plant Pathol. 2012. – Vol.13. – P. 804-804.
19. Мусаев Ф.А., Захарова О.А., Морозова Н.И. Класс несовершенные грибы (Учебное пособие). – Рязань: Издательство РГАТУ. 2014. – 135 с.
20. Казенас Л.Д. Болезни сельскохозяйственных растений Казахстана. – Алма-Ата: Кайнар, 1974 – 366 с.
21. Койшибаев М. Болезни зерновых культур. – Алматы: Бастау, 2002. – 368 с.
22. Абилдаева Ж.А. Основные болезни риса в Приаралье и меры борьбы с ними / Кызылординский Государственный Университет им. Коркыт-Ата – 2006. http://www.rusnauka.com/ESPR_2006/Agricole/5_abildaeva.doc.htm
23. Жакибаева М. Когда цветет рис // Кызылординские вести. http://kv.ucoz.kz/news/kogda_cvetet_ris/2012-07-26-11093. 26.07.2012.
24. Рсалиев А.С., Пахратдинова Ж.У., Амирханова Н.Т., Ыскакова Г.Ш. Идентификация источников устойчивости риса к пирикулярриозу // Известия Национальной Академии Наук Республики Казахстан, серия биологическая. – 2015. – №5. – С. 84-91.
25. Рсалиев А.С., Амирханова Н.Т., Пахратдинова Ж.У., Ыскакова Г.Ш. Морфолого-культуральные особенности роста гриба *Pyricularia oryzae* на агаризованных питательных средах // Новости науки Казахстана. – 2015. – №3 (125). – С. 97-110.
26. Омарова Г.Х., Рсалиев А.С., Пахратдинова Ж.У., Амирханова Н.Т., Ыскакова Г.Ш. Выбор эффективного метода по созданию инфекционного фона пирикулярриоза риса // Исследования, результаты. – 2015. – №3. – С. 198-205.
27. Пахратдинова Ж.У., Рсалиев А.С., Амирханова Н.Т., Ыскакова Г.Ш. Вирулентность казахстанских изолятов возбудителя *Pyricularia oryzae* // Материалы международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии, биотехнологии, экологии и биобезопасности», посвященной 80-летию заслуженного ученого, профессора В.Л.Зайцева, 13 июля 2015. Гвардейский, 2015. – С. 240-244.

28. Рсалиев А.С., Рсалиев Ш.С., Агабаева А.Ч. Устойчивость сортов риса к пирикулярриозу в Казахстане // Материалы международной научно-практической конференции «Современные научные достижения». – Чехия: Прага. 2014. – С. 96-99.
29. Рсалиев А.С., Пахратдинова Ж.У., Амирханова Н.Т., Таутенов И.А. Изучение коллекционных сортов и перспективных линий риса по устойчивости к пирикулярриозу // Материалы международной научной конференции «Инновационные экологически безопасные технологии защиты растений». – Алматы, 2015. – С. 417-422.
30. Sharma T.R., Rai A.K., Gupta S.K., Vijayan J., Devanna B.N., Ray S. Rice Blast Management Through Host-Plant Resistance: Retrospect and Prospects. //Agric Res. 2012. – Vol.1. – P. 3-18.
31. Wang Z.X., Yano M., Yamanouchi U., Iwamoto M., Monna L., Hayasaka H., Katayose Y., Sasaki T. The *Pib* gene for rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine rich repeat class of plant disease resistance genes // Plant J. – 1999. – Vol.19. – P. 55-64.
32. Bryan G.T., Wu K.S., Farrall L., Jia Y., Hershey H.P., McAdams S.A., Faulk K.N., Donaldson G.K., Tarchini R., Valent B. A single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene *Pi-ta* // Plant Cell. – 2000. – Vol.12. – P. 2033-2046.
33. Sharma T.R., Madhav M.S., Singh B.K., Shanker P., Jana T.K. High-resolution mapping, cloning and molecular characterization of the *Pi-kh* gene of rice, which confers resistance to *Magnaporthe grisea* // Mol Gen Genomics. – 2005. – Vol.274. – P. 569-578.
34. Chen X.W., Shang J., Chen D., Lei C., Zou Y. A B-lectin receptor kinase gene conferring rice blast resistance // Plant J. – 2006. – Vol.46. – P. 794-804.
35. Qu S., Liu G., Zhou B., Bellizzi M., Zeng L., Dai L., Han B., Wang G. The broad-spectrum blast resistance gene *Pi9* encodes an NBS-LRR protein and is a member of a multigene family in rice // Genetics. – 2006. – Vol.172. – P. 1901-1914.
36. Zhou B., Qu S., Liu G., Dolan M., Sakai H. The eight amino-acid differences within three leucine-rich repeats between *Pi2* and *Piz-t* resistance proteins determine the resistance specificity to *Magnaporthe grisea* // Mol. Plant Microbe Interact. – 2006. – Vol.19. – P. 1216-1228.
37. Liu X.Q., Wang L., Chen S., Lin F., Pan Q.H. Genetic and physical mapping of *Pi36(t)*, a novel rice blast resistance gene located on rice chromosome 8 // Mol. Gen. Genomics. – 2005. – Vol.274. – P. 394-401.
38. Chen S., Wang L., Que Z., Pan R., Pan Q. Genetic and physical mapping of *Pi37(t)*, a new gene conferring resistance to rice blast in the famous cultivar St. No. 1 // Theor Appl Genet. – 2005. – Vol.111. – P. 1563-1570.
39. Kaji R., Ogawa T. RFLP mapping of a blast resistance gene, *Pi-km*, in rice // Breed Sci. 1996. – Vol.46. – P.70.
40. Jeon J.S., Chen D., Yi G.H., Wang G.L., Ronald P.C. Genetic and physical mapping of *Pi5(t)*, a locus associated with broadspectrum resistance to rice blast // Mol. Gen. Genomics. – 2003. – Vol.269. – P. 280-289.
41. Hayashi K., Yasuda N., Fujita Y., Koizumi S., Yoshida H. Identification of the blast resistance gene *Pit* in rice cultivars using functional markers // Theor Appl Genet. – 2010. – Vol.121. – P. 1357-1367.
42. Fukuoka S., Okuno K. QTL analysis and mapping of *Pi21*, a recessive gene for field resistance to rice blast in Japanese upland rice // Theor Appl Genet. – 2001. – Vol.103. – P. 185-190.
43. Hayashi N., Inoue H., Kato T., Funao T., Shirota M. Durable panicle blast-resistance gene *Pb1* encodes an atypical CC-NBS-LRR protein and was generated by acquiring a promoter through local genome duplication // Plant J. – 2010. – Vol.64. – P. 498-510.
44. Wang L., Xu X.K., Lin F., Pan Q.H. Characterization of rice blast resistance genes in the *Pik* cluster and fine mapping of the *Pik-p* locus // Phytopathology. – 2009. – Vol.99. – P. 900-905.
45. Hayashi K., Yoshida H., Ashikawa I. Development of PCR-based allele specific and InDel marker sets for nine rice blast resistance genes // Theor Appl Genet. – 2006. – Vol.113. – P. 251-260.
46. Kim J.S., Ahn S.N., Kim C.K., Shim C.K. Screening of rice blast resistance genes from aromatic rice germplasms with SNP markers // Plant Pathol. J., 2010. – Vol.26. – P. 70-79.
47. Мухина Ж.М. Эффективность методов молекулярного маркирования в селекции, семеноводстве сельскохозяйственных культур и для изучения биоразнообразия растительных ресурсов: автореф. ... док. биол. наук. – Краснодар: ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт риса, 2012. – 47 с.

48. Hittalmani S., Parco T.A., Mew T.V., Zeigler R.S. Fine mapping and DNA marker-assisted pyramiding of the three major genes for blast resistance in rice // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2000. – Vol. 100. – P. 1121-1128.
49. Yu Z.H., Mackill D.J., Bonman J.M., Tanksley S.D. Tagging genes blast resistance in rice via linkage to RFLP marker // *Theor Appl Genet*. – 1991. – Vol. 81. – P. 471-476.
50. Mew T.V., Parco A.S., Hittalmani S., Inukai T., Nelson R., Zeigler R.S., Huang N. Fine mapping of major genes for blast resistance in rice // *RGN*. – 1994. – Vol. 11. – P. 126-128.
51. Liu S.P., Xue Y.H. Locating rice blast resistance gene by DNA microsatellite markers // *Journal of China Three Gorges University (Natural Sciences)*. – 2003. – Vol. 25. – P. 574-576.
52. Li J., Li D., Sun Y., Xu M. Identified by MRG4766 Marker in 173 Yunnan Rice Landraces // *Rice Genomics and Genetics*. – 2012. – Vol. 3. – P. 13-18.
53. Hauashi K., Hashimoto N., Daigen M., Ashikawa I. Development of PC-based SNP markers for rice blast resistance genes at the *Piz* locus // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2004. – Vol. 108. – P. 1212-1220.
54. Liu G., Lu G., Zeng L., Wang G.L. Two broad-spectrum blast resistance genes Pi9 (t) and Pi2 (t), are physically linked on rice chromosome 6 // *Mol. Genet. Genomics*. – 2002. – Vol. 267. – P. 472-480.
55. Mackill D.J., Bonman J.M. Inheritance of blast resistance in near-isogenic lines of rice // *Phytopathology*. – 1992. – Vol. 82. – P. 746-749.
56. Wu J.H., Jiang J.S., Chen H.L., Wang S.P. Fine mapping of rice blast resistance gene Pi2(t) // *Acta Agronica Sinica*. – 2002. – Vol. 28. – P. 505-509.
57. Berruyer R., Adreit H., Milazzo J., Gaillard S., Berger A., Dioh W., Lebrun M.H., Tharreau D. Identification and fine mapping of Pi33, the rice resistance gene corresponding to the *Magnaporthe grisea* avirulence gene ACE1 // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2003. – Vol. 107. – P. 1139-1147.

ЖУРНАЛДА ЖАРИЯЛАУ ҮШІН ҒЫЛЫМИ МАҚАЛАЛАРҒА ҚОЙЫЛАТЫН ТАЛАПТАР

Журнал келесі ғылым бағыттары бойынша мақалаларды қабылдайды:

- Ветеринария;
- Медицина;
- Биотехнология;
- Биологиялық қауіпсіздік пен биологиялық қорғау;
- Молекулалық биология және гендік инженерия;
- Фитосанитария.

Мақаланың бастапқы бөлігіне қойылатын құрылымдық талаптар:

1. ОӘЖ
2. Автордың (-лардың) Т.А.Ә.
3. Автордың (-лардың) жұмыс орны
4. Мақала атауы
5. Жарияланушы материал мәтінінің тіліндегі аннотация (150 сөзден артпауы тиіс)
6. Түйін сөздер (150 сөз/сөз тіркесінен артпауы тиіс)

Мақаланың тарауларына қойылатын құрылымдық талаптар:

Мақалада келесі тараулар болуы тиіс:

1. Аннотация
2. Кіріспе
3. Зерттеу әдістемесі
4. Зерттеулерден алынған нәтижелер
5. ҒЗЖ нәтижелерін талқылау
6. Қорытынды (тұжырым)
7. Әдебиет

Аннотация жарияланатын материал тілінен ерекшеленетін басқа екі тілде болуы тиіс (150 сөзден артпауы тиіс). Аннотация – мақалаға тәуелді емес ақпарат көзі. Оны мақаланың негізгі мәтінімен жұмыс аяқталғаннан кейін жазады. Ол негізгі тақырыптың сипаттамасын, мәселелерді, нысанды, жұмыс мақсатын және оның нәтижелерін қамтиды. Аннотацияда осы құжаттың тақырыбы мен арнайы мақсаты бойынша басқа да мәнделес құжаттармен салыстыра отырып, осы құжаттың қандай жаңалық алып келетіні көрсетіледі. Аннотациялар халықаралық стандарттар бойынша ресімделуі және келесі сәттерді қамтуы тиіс:

1. Зерттеу тақырыбы бойынша алғысөз.
2. Ғылыми зерттеу мақсаты.
3. Жұмыстың ғылыми және тәжірибелік маңызын сипаттау.
4. Зерттеу әдістемесін сипаттау.
5. Зерттеу жұмыстарының негізгі нәтижелері, тұжырымдары.
6. Жүргізілген зерттеудің құндылығы (осы жұмыс тиесілі білім саласына қандай үлес қосты).
7. Жұмыс нәтижелерінің тәжірибелік мәні.

Аннотацияда мақаланың мәтіні, (мақаладан ұсыныстар алуға және оларды аннотацияға көшіруге болмайды), сондай-ақ оның атауы қайталанбауы тиіс. Онда сандар, кестелер, мәтін ішіндегі түсіндірме болмауы тиіс.

Аннотацияда зерттеу жұмысының нәтижелері мен қорытындыларының негізгі сәттері баяндалуы тиіс және мақалада жоқ материал болмауы тиіс.

Алғыс (Бұл бөлім, егер мақала грант шеңберінде дайындалса немесе жарияланатын жұмысқа жәрдемдескен, бірақ тең авторлардың қатарына кірмеген адамдарға алғыс білдіру үшін қажет). Әдетте жарияланымның соңында көрсетіледі.

Автордың (-лардың) аты-жөні әр адамның жұмыс орнымен индекстеледі. Мысалы, **С.С. Сеитов¹, А.А. Ахметов², Б.Б. Болатов³**

Автордың (-лардың) жұмыс орны. Мысалы: ¹Қазақ ұлттық аграрлық университеті, Алматы, Қазақстан; ²Ставрополь мемлекеттік аграрлық университеті, Ставрополь, Ресей; ³Жәңгір хан атындағы Батыс Қазақстан аграрлық-техникалық университеті, Орал, Қазақстан.

Мақаланың мазмұны туралы

Мақалада автор зерттеулерінің нәтижелерін көрсететін түпнұсқа материал ғана болуы тиіс. Мақаланың негізгі мазмұнын ашатын аннотацияда (50-ден 150-ге дейін сөз) және мақаланың қорытынды бөлімінде (50-ден 150-ге дейін сөз) зерттеу нәтижелерінің жаңалығын, олардың практикалық маңыздылығын көрсету қажет.

Ғылыми мақаланы рәсімдеудің негізгі талаптары.

Мақала қазақ, орыс немесе ағылшын тілдерінің бірінде 5-11 бет көлемінде (суреттер мен кестелерді қоса алғанда) болуы тиіс.

Мәтін Microsoft Word редакторында, Times New Roman шрифтімен, 12 өлшемде, бір интервалмен терілуі тиіс. Мәтін келесі жиектердің өлшемдерін сақтай отырып басылуы тиіс: жоғарғы және төменгі – 2 см, сол және оң – 2 см. Тегістелуі – енібойынша (тасымалды автоматты түрде жүргізу арқылы). Жоларалық интервалы – бір. Азат жол шегінісі – 1,25.

Парақтың жоғарғы сол жақ бұрышына ОӘЖ қойылады. Төменде, ортаға тегістеліп автордың (-лардың) аты-жөндерінің бірінші әріптері, фамилиялары, бір жол төменде ұйымның (-дардың) толық атауы, онан кейін, үтір қою арқылы қаланың атауы, елдің атауы (шет елдік авторлар үшін), онан кейін, бір жолдан кейін ортаға тегістеліп бас әріптермен мақала атауы көрсетілуі тиіс.

Тағы төменде, бір жолдан кейін, аннотация мәтіні (50-ден 150-ге дейінгі сөз) және жарияланатын материал мәтініндегі түйінді сөздер (10 сөзден/сөз тіркестерінен артпауы тиіс) болады. Одан әрі, бір жолдан кейін, мақаланың келесі бөлімдерден тұратын негізгі мәтіні орналастырылады:

Кіріспе. Бұл бөлім осы зерттеудің өзектілігін және автор тауып алған осы тақырып бойынша әдеби дереккөздерге (мақалалар, патенттер, есептер, Интернеттен алынған ақпараттар) шолу жасауды қамтиды. Сондай-ақ, бұл бөлімде зерттеудің мақсаттары мен міндеттері, болжанатын гипотезалар мен тұжырымдар көрсетіледі. Бұл бөлім әдетте мақаланың жалпы көлемінің 5-10 % құрайды.

Зерттеу әдістемесі. Бұл бөлімде ҒЗЖ-да пайдаланылған материалдар мен әдістер сипатталады. Егер бұл алғаш рет жарияланатын әдістеме болмаса, әдіснамалық ерекшеліктерді көрсетудің қажеті жоқ. Қажет болған жағдайда әдіснаманың негізгі сәттері сипатталады. Бұл бөлім әдетте мақаланың жалпы көлемінің 10-20 % құрайды.

Зерттеудің негізгі нәтижелері. Бұл бөлім көлемі бойынша ғылыми мақалада орталық орын алады. Бұл негізгі бөлім, оның мақсаты талдау, қорыту және деректерді түсіндіру арқылы жұмыс гипотезасын (гипотезаларын) дәлелдеу болып табылады. Нәтижелер қажет болған жағдайда бастапқы материалды немесе дәлелдемелерді тұжырылған түрде

ұсынатын иллюстрациялармен – кестелермен, графиктермен, суреттермен расталады. *Суреттелген ақпарат мәтінді қайталамауы маңызды.* Мақалада ұсынылған нәтижелерді автордың және басқа зерттеушілердің осы саладағы алдыңғы жұмыстарымен салыстырылғаны дұрыс. Мұндай салыстыру жүргізілген жұмыстың жаңалығын қосымша ашады, оған объективтілік береді. Бұл бөлім әдетте мақаланың жалпы көлемінің 50-55 % құрайды.

Алынған деректерді талқылау және қорытынды. Мақаланың бұл бөліктері алынған мәліметтердің интерпретациясын қамтиды, анықталған заңдылықтар сипатталады, бір-бірін қайталамайтын кестелер мен суреттерді қамтиды. Нәтижелерді өткен уақытта баяндау ұсынылады. Талқылау зерттеу нәтижелерін сипаттауды қайталамауы тиіс. Қорытынды зерттеу нәтижелерінің қысқаша тұжырымын қамтиды. Бұл бөлімде алынған нәтижелерді жұмыстың басында белгіленген мақсатпен салыстыру қажет. Қорытындыда тақырыпты түсіну нәтижелері жинақталады, жұмыстан туындайтын қорытындылар, тұжырымдар мен ұсыныстар жасалады, олардың практикалық маңыздылығы көрсетіледі, сондай-ақ осы саладағы одан әрі зерттеу үшін негізгі бағыттар анықталады. Мақаланың қорытынды бөлігіне қаралған мәселелердің дамуын болжау әрекеттерін енгізу қажет. Мақала тақырыбындағы мәліметтер авторлық түйіндеме мәтінінде қайталанбауы тиіс. Ұсынылатын көлем – мақаланың жалпы көлемінен 10-15 %.

Әдебиет. Бұл бөлім дәйексөз келтірілетін, қаралатын немесе мақаланың мәтінінде айтылған, оны сәйкестендіру, іздеу және жалпы сипаттама үшін қажетті және жеткілікті басқа құжат туралы библиографиялық мәліметтер қамтылады. Жарияланғанына 5 жылдан асқан дереккөздерге сілтеме жасау ұсынылмайды. Жақында жарияланған мақалаларға сілтемелер беру, өз мақаласынан дәйек сөз алуға ең аз мөлшерде рұқсат етіледі. Мақала берілетін БҚПФЗИ ғылыми-практикалық журналындағы мақалаларға сілтеме жасау міндетті. Мақалада біздің журналдарда бұрын шыққан мақалаларға міндетті түрде сілтеме жасау керек. Негізгі мәтіннен (немесе ескертулердің мәтінінен) төменірек ортаға тегістеу арқылы «**ӘДЕБИЕТ**» деген атау жазылады, онан бір жолдан кейін библиографиялық сипаттамаға қойылатын қолданыстағы талаптарға сәйкес мәтін бойынша сілтеме ретінде нөмірленген деректер тізбесі орналастырылады. Тізбенің бір тармағында тек бір ақпарат көзін көрсету керек. Ақпарат көздеріне сілтемелер төрт бұрышты жақша (мысалы, [1]) ішіндегі сандармен ресімделеді.

Библиографиялық сипаттама МЕМСТ 7.1-2003 сәйкес рәсімделеді және мұқият тексеріледі. Егер ақпарат көзіне сілтеме мақала мәтінінде қайталанатын болса, онда қайта, шаршы жақшада оның тізімдегі нөмірі көрсетіледі (библиографиялық тізімде келесі реттік нөмірі мен «тағы да сонда» сілтемесі пайдаланылмай). Бір көзден алынған әр түрлі материалдарға сілтеме жасалған жағдайда, шаршы жақшадағы беттің нөмірін әр жолы көрсету қажет. Мысалы, [1, 17] немесе [1, 28-29].

Мысал ретінде неғұрлым таралған сипаттамалар – мақалалар, кәтаптар, конференция материалдары, патенттер және электрондық қорлар беріледі, мысалы:

Автор фамилиясындағы кітап

1 Максимов Н.В., Партыка Т.Л., Попов И.И. Максимов, Н.В. ЭЕМ және есептеуіш жүйелердің архитектурасы: ЖОО-ларына арналған оқу құралы. – М.: Инфра – М, 2005.-512 б.

2 Душков Б.А., Королев А.В., Смирнов Б.А. Еңбектің, кәсіби, ақпараттық және ұйымдастырушылық қызметтің психологиясы: ЖОО-ларға арналған оқу құралы. – М: Академический проект, 2005.-848 б.

Атаулы кітап.

Егер, кітап төрт немесе одан көп авторлармен жазылған болса кітап сипаттамасы атауында беріледі. Атауында ұжымдық монографиялар, мақалалар жинағы және т.б. сипатталады.

1 Әлем көркем әдебиеті: 2 томда / Б.А. Эренгросс [және басқалары]. – М.: Высшая школа, 2005. – Т.2. – 511 б.

2 Экономикалық талдау бойынша бақылау тапсырмалары мен тестілерінің кешені [Мәтін]: ЖОО-ларға арналған оқу-әдістемелік құрал / А.А. Сливинская [және басқалары]. – Елец: Елецк мемлекеттік университетінің баспасы, 2003. – 73 б.

Заңнамалық материалдар

Ресей Федерациясының конституциясы [Мәтін]. – М.: Приор, 2001. – 32 б. РСФКР азаматтық процессуалдық кодексі [Мәтін]: [РСФКР алтыншы шақырылымдағы Жоғарғы Кеңесінің үшінші сессиясында 1964 жылы 11 маусымда қабылданған]: ресми мәтін: 2001 жылғы 15 қарашағағы жағдайы бойынша / Ресей Федерациясының Әділет министрлігі.- М.: Маркетинг, 2001. – 159 б.

Стандарттар

Радиоэлектронды тұрмыстық аппаратура. Кіріс және шығыс параметрлері мен байланыстыру типтері. Техникалық талаптар [Мәтін]: МЕМСТ Р517721 – 2001. – 2002-01 -01 енгізілген. – М.: Изд-во стандартов, 2001. – IV, 27 б.: ил.

Патенттік құжаттар

Қабылдаушы-беруші құрылғы [Мәтін]: пат. 2187888 Рес. Федерациясы: МПК Н 04 В 1/38, Н 04 J 13/00/ Чугаева В.И.; өтініш беруші мен патент иесі Воронеж, Байланысты ғылыми-зерттеу институты. – № 2000131736/09; өтініш берілген 18.12.00; жарияланған 20.08.02, Бюл. № 23 (II б.). – 3 б.: ил.

Диссертациялар, диссертациялардың авторефераттары

Белозеров И.В. Алтын Орданың 13-14 ғасырлардағы Ресейдегі діни саясаты [Мәтін]: тарих ғылымдары кандидатының дис.: 07.00.02: қорғалды 22.01.02: бекітілді 15.07.02 / Белозеров Иван Валентинович. -М., 2002. -215 с. -Библиогр.: б. 202-213. -04200201565.

Internet желісінен алынған құжаттың библиографиялық сипаттамасы

1 Бычкова Л.С. Конструктивизм // 20 ғасырдағы культурология – «К». – (<http://www.philosophy.ru/edu/ref/enc/k.htm> 1).

2 Мән психологиясы: Д.А. Леонтьевтің табиғаты, құрылымы және серпіні – Бірінші басылым. – 1999. – (<http://www.smysl.ru/annot.php>).

Мақалалық әдебиетті ресімдеу кезінде жарияланымның авторларының толық тізімі берілуі тиіс (басқаларсыз).

Егер, мәтінде ескертулер бар болса, онда, негізгі мәтіннен кейін әдебиет көздерінің алдында, ортаға тегістелу арқылы **«Ескертпелер»** теріледі, және бір жолдан кейін, мәтін бойынша сілтеме ретінде жоғарғы индекс түрінде (мысалы, 1) санмен нөмірленген ескертулер мәтіні жазылады. Негізгі мәтіндегі ескертулерге сілтеме қалың емес қаріппен, жоғарғы индекс түріндегі санмен (мысалы, 1 үлгілі) ресімделеді.

Кестелер мәтін бойынша орналастырылады. Кестелердің нөмірленуі мәтін бойынша сілтемелер тәртібінде жүргізіледі. Кестенің нөмірлеу атауы қалың қаріппен, сол жаққа тегістеу арқылы жазылады (мысалы, **кесте 1**). Тақырыптық атау осы долда қалың емес қаріппен, сол жаққа тегістеу арқылы жазылады. Негізгі мәтінде кестеге сілтеме жақшада қалың қаріппен көрсетіледі – мысалы, (**Кесте 1 –**). Егер кесте үлкен көлемді болса, жеке бетте, ал ені үлкен болса – бейімі альбомдық бетте орналастырылуы мүмкін.

Суреттер мәтін бойынша орналастырылады. Суреттердің нөмірленуі мәтін бойынша сілтемелер тәртібінде жүргізіледі. Нөмірлеу атауы қалың қаріппен, сол жаққа тегістеу арқылы жазылады (мысалы, **сурет 1**). Тақырыптық атауы (бар болған жағдайда) осы жолда, нөмірлеу атаудан кейін жазылады (мысалы, **Сурет 1 – Тәуелділік...**).

Негізгі мәтінде суретке сілтеме жақшада қалың қаріппен жазылады – мысалы, (**сурет 1**). Егер сурет үлкен көлемді болса, жеке бетте, ал ені үлкен болса – бейімі альбомдық

бетте орналастырылуы мүмкін. Суреттер түпнұсқадан скандау арқылы алынған (сұр түс градациясында 150 dpi) немесе компьютерлік графика құралдары арқылы орындалған болуы мүмкін. Суреттерді электрондық нұсқаның жеке файлына орналастыруға рұқсат етіледі, ал, үлкен көлемді иллюстрациялар (файл) болған жағдайда құпталады. Суреттерге қол қою тікелей суреттің астында орындалуы тиіс.

Формулалар. Қарапайым жолішілік және бір жолдық формулалар арнайы редакторларды пайдаланбай символдармен терілуі тиіс (Symbol, Greek Math Symbols, Math-PS, Math A Mathematica қаріптерінен арнайы символдарды пайдалануға рұқсат етіледі). Күрделі және көп жолды формулалар Microsoft Equation 2.0, 3.0 формула редакторларында толық терілуі тиіс. Формуланың бір бөлігін символдармен, ал бір бөлігін формула редакторында теруге жол берілмейді.

Мақалаға қосымша беріледі:

- ілеспе хат (сыртқы ұйымдар үшін)
- кемінде екі сарапшының қорытындысы:

1) Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты сараптау комиссиясынан (*ішкі сараптау*);

2) бейіні сай келетін сыртқы ұйымдардың тәуелсіз сараптшыларынан (*сыртқы сараптау*);

3) ағылшын тіліндегі мақалалар үшін – БҚПФЗИ «Биобезопасность и Биотехнология/Биоқауіпсіздік және Биотехнология» ғылыми-тәжірибелік журналының шетелдік редакторлық-сараптау кеңесінің ішінен бағыттар бойынша тәуелсіз сарапшыларынан.

- автор туралы мәліметтер: тегі, аты және әкесінің аты (толық), ғылыми дәрежесі, лауазымы, жұмыс орны, байланыс телефондары, хат алмасу деректері (e-mail).

Төлем сараптаудан өткеннен кейін және мақалаға рецензия алынғаннан кейін жүргізілуі тиіс. 1 мақаланы жариялауға төлеу қазақстандық ғалымдар мен ғылыми қызметкерлер үшін 2 АЕК-ті, ал, шетелдік авторлар үшін АҚШ 15 \$ құрайды.

Көрсетілген талаптарға сәйкес келмейтін мақалалар жариялауға қабылданбайды.

Біздің мекен-жайымыз:

080409, Жамбыл облысы, Қордай ауданы, Гвардейский қтк., Б. Момышұлы к-сі, 15.

ҚР БҒМ ҒК «Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты» РМК

Оқу ғылыми-білім беру орталығы (ОҒБО), тел. (726-36) 7-22-28, ішкі 112.

E-mail: unots@biosafety.kz

Жарияланым үшін төлем жүргізу деректері:

Бенефициар: ҚР БҒМ ҒК «Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты» РМК

Бенефициара банкі: «Қазақстан халық банкі» АҚ-ы

Банк БСК-ы: HSBK KZKX

ЖСК: KZ656010131000155334

ЖСК: KZ766010131000133020 (USD)

КБЕ: 16

ТМК: 859

Төлем мақсаты: «Биобезопасность и Биотехнология/Биоқауіпсіздік және Биотехнология» ғылыми-тәжірибелік журналында мақала жариялау.

ТРЕБОВАНИЯ К НАУЧНЫМ СТАТЬЯМ ДЛЯ ПУБЛИКАЦИИ В ЖУРНАЛЕ «БИОБЕЗОПАСНОСТЬ И БИОТЕХНОЛОГИЯ»

Журнал принимает статьи по следующим направлениям науки:

- Ветеринария;
- Медицина;
- Биотехнология;
- Биологическая безопасность и биозащита;
- Молекулярная биология и генная инженерия;
- Фитосанитария.

Структурные требования к начальной части статьи:

1. УДК (универсальная десятичная классификация)

В начале статьи, вверху слева следует указать УДК

2. Инициалы и фамилии автора (-ов)

Посередине страницы обычным жирным шрифтом (С.С. Сеитов¹, А.А. Ахметов², Б.Б. Болатов³)

3. Место работы автора (-ов)

Название организации (ий), в которой выполнена работа, рядом с фамилией автора индексом указать цифру организации, эту же цифру указать в названии организации, затем город, страну (¹Казахский национальный аграрный университет, Алматы, Казахстан, ²Ставропольский государственный аграрный университет, Ставрополь, Российская Федерация, ³Западно-Казахстанский аграрно-технический университет им. Жангир-хана, Уральск, Казахстан).

4. Адреса e-mail авторов

5. Название статьи

Название статьи прописными жирными буквами (около 30-40 символов)

6. Аннотация на языке текста публикуемого материала (не более 150 слов)

7. Ключевые слова (6-10 слов)

Структурные требования к разделам статьи:

Статья должна содержать следующие разделы:

1. Аннотация

2. Введение

3. Методика исследований

4. Полученные результаты исследований

5. Обсуждение результатов

6. Выводы (заключение)

7. Литература

Аннотация должна быть на двух других языках, отличающихся от языка публикуемого материала (не более 150 слов). Аннотация – это не зависимый от статьи источник информации. Ее пишут после завершения работы над основным текстом статьи. Она включает характеристику основной темы, проблемы, объекта, цели работы и ее результаты. В ней указывают, что нового несет в себе данный документ в сравнении с другими, родственными по тематике и целевому назначению. Аннотации должны быть оформлены по международным стандартам и включать следующие моменты:

1. Вступление по теме исследования.

2. Цель научного исследования.

3. Описание научной и практической значимости работы.
4. Описание методологии исследования.
5. Основные результаты, выводы исследовательской работы.
6. Ценность проведенного исследования (какой вклад данная работа внесла в соответствующую область знаний).
7. Практическое значение итогов работы.

В аннотации не должен повторяться текст самой статьи (нельзя брать предложения из статьи и переносить их в аннотацию), а также ее название. В ней не должно быть цифр, таблиц, внутри – текстовых сносок.

В аннотации должны излагаться основные моменты результатов и заключения исследовательской работы, и не должно содержать материал, который отсутствует в самой статье.

Введение включает актуальность данного исследования и обзор найденных автором литературных источников (статей, патентов, отчетов, информации из Интернета) по этой теме. Также, в этом разделе указывается цели и задачи исследования, предполагаемые гипотезы и формулировки. Этот раздел обычно составляет 5-10 % от общего объема статьи.

Методика исследований. В этом разделе описываются материалы и методы, использованные в НИР. Нет необходимости указывать методологические особенности, если это не впервые публикуемая методика. При необходимости, описываются ключевые моменты методологии. Этот раздел обычно составляет 10-20 % от общего объема статьи.

Основные результаты исследований. По объему этот раздел занимает центральное место в научной статье. Это основной раздел, цель которого заключается в том, чтобы при помощи анализа, обобщения и разъяснения данных доказать рабочую гипотезу (гипотезы). Результаты при необходимости подтверждаются иллюстрациями – таблицами, графиками, рисунками, которые представляют исходный материал или доказательства в свернутом виде. *Важно, чтобы проиллюстрированная информация не дублировала текст.* Представленные в статье результаты желательно сопоставить с предыдущими работами в этой области как автора, так и других исследователей. Такое сравнение дополнительно раскроет новизну проведенной работы, придаст ей объективности. Эта часть обычно составляет 50-55 % от общего объема статьи.

Обсуждение полученных данных. Этот раздел содержит интерпретацию полученных данных, описываются выявленные закономерности, включать таблицы и рисунки не дублирующие друг друга. Результаты рекомендуется излагать в прошедшем времени. Обсуждение не должно повторять описание результатов исследования.

Заключение. Заключение содержит краткую формулировку результатов исследования. В этом разделе необходимо сопоставить полученные результаты с обозначенной в начале работы целью. В заключении суммируются результаты осмысления темы, делаются выводы, обобщения и рекомендации, которые вытекают из работы, подчеркивается их практическая значимость, а также определяются основные направления для дальнейшего исследования в этой области. В заключительную часть статьи желательно включить попытки прогноза развития рассмотренных вопросов.

Сведения, содержащиеся в заглавии статьи, не должны повторяться в тексте авторского резюме. Рекомендуемый объем – 10-15 % от общего объема статьи.

Если в тексте есть примечания, то после основного текста перед списком литературы набирается по центру заглавие «**Примечания**», и через строку помещается текст примечаний, пронумерованные числом в виде верхнего индекса (например, 1) в порядке ссылок по тексту. Ссылка на примечания в основном тексте оформляется не жирным шрифтом, числом в виде верхнего индекса (например, ... модели 1).

Таблицы помещаются по тексту. Нумерация таблиц производится в порядке ссылок по тексту. Нумерационный заголовок таблицы набирается нежирным шрифтом с

выравниванием по центру (например, Таблица 1 – название таблицы). Тематический заголовок (если имеется) набирается на этой же строке нежирным шрифтом с выравниванием по центру. Ссылка на таблицу в основном тексте оформляется нежирным шрифтом в скобках – например, (таблица 1). Если таблица имеет большой объем, она может быть помещена на отдельной странице, а в том случае, когда она имеет значительную ширину – на странице с альбомной ориентацией.

Рисунки размещаются по тексту. Нумерация рисунков производится в порядке ссылок по тексту. Нумерационный заголовок набирается нежирным шрифтом с выравниванием по центру (например, Рисунок 1 – название рисунка). Ссылка на рисунок в основном тексте оформляется нежирным шрифтом в скобках – например, (рисунок 1). Если рисунок имеет большой формат, он должен быть помещен на отдельной странице, а в том случае, когда он имеет значительную ширину – на странице с альбомной ориентацией. Рисунки могут быть сканированными с оригинала (150 dpi в градациях серого) или выполнены средствами компьютерной графики. Допускается, а в случае с иллюстрациями большого объема (файла), приветствуется, размещение рисунков в отдельном файле электронной версии. Подписи к рисункам должны быть выполнены непосредственно под рисунком.

Формулы. Простые внутри строчные и однострочные формулы должны быть набраны символами без использования специальных редакторов (допускается использование специальных символов из шрифтов Symbol, Greek Math Symbols, Math-PS, Math AMathematica BTT). Сложные и многострочные формулы должны быть целиком набраны в редакторе формул Microsoft Equation 2.0, 3.0. Не допускается набор – часть формулы символами, а часть – в редакторе формул.

Литература. Этот раздел содержит библиографические сведения о цитируемом, рассматриваемом, или упоминаемом в тексте статьи другом документе, необходимые и достаточные для его идентификации, поиска и общей характеристики. Не рекомендуется ссылаться на источники, которым более 5 лет. Ссылки давать на недавно опубликованные статьи, самоцитирование допускается в минимальном количестве. Ниже основного текста (или текстов примечаний) печатается по центру заглавие «ЛИТЕРАТУРА», затем, через строку, помещается пронумерованный перечень источников в порядке ссылок по тексту, в соответствии с действующими требованиями к библиографическому описанию. В одном пункте перечня следует указывать только один источник информации. Ссылки на источники информации оформляются числами, заключенными в квадратные скобки (например, [1]).

Библиографические описания оформляются в соответствии с ГОСТ 7.1-2003 и тщательно выверяются. Если ссылка на источник информации в тексте статьи повторяется, то, повторно, в квадратных скобках указывается его номер из списка (без использования в библиографическом списке следующего порядкового номера и ссылки «Там же»). В случае ссылки на различные материалы из одного источника, необходимо каждый раз указать еще и номер страницы в квадратных скобках. Например, [1, 17] или [1, 28-29].

В качестве примера приводятся наиболее распространенные описания – статьи, книги, материалы конференций, патенты и электронные ресурсы, например:

Книга под фамилией автора

1 Максимов Н.В., Партыка Т.Л., Попов И.И. Архитектура ЭВМ и вычислительных систем: учеб. для вузов. – М.: Инфра, 2005. – 512 с.

2 Душков Б.А., Королев А.В., Смирнов Б.А. Психология труда, профессиональной, информационной и организационной деятельности: учеб. пособие для вузов. – М.: Академический проект, 2005. – 848с.

Книга под заглавием

Описание книги дается на заглавие, если книга написана четырьмя и более авторами. На заглавие описываются коллективные монографии, сборники статей и т.п.

1 Мировая художественная культура: в 2-х т. / Б.А. Эренграсс [и др.]. – М.: Высшая школа, 2005. – Т.2. – 511 с.

Комплекс контрольных заданий и тестов по экономическому анализу: учеб-метод, пособие для вузов / А.А. Сливинская [и др.]. – Елец: Изд-во Елецкого гос. ун-та, 2003. – 73 с.

Законодательные материалы

Конституция Российской Федерации. – М.: Приор, 2001. – 32 с. Гражданский процессуальный кодекс РСФСР [Текст]: [принят третьей сес. Верхов. Совета РСФСР шестого созыва 11 июня 1964 г.]: офиц. текст: по состоянию на 15 нояб. 2001 г. / М-во юстиции Рос. Федерации. – М.: Маркетинг, 2001. – 159 с.

Стандарты

Аппаратура радиоэлектронная бытовая. Входные и выходные параметры и типы соединений. Технические требования: ГОСТ Р 517721 – 2001. – Введ. 2002-01-01. – М.: Изд-во стандартов, 2001. – IV, 27 с.: ил.

Патентные документы

1 Приемопередающее устройство: пат. 2187888 Рос. Федерация: МПК Н 04 В 1/38, Н 04 J 13/00/ Чугаева В.И.; заявитель и патентообладатель Воронеж, науч. – исслед. ин-т связи. – № 2000131736/09; заявл. 18.12.2000; опубл. 20.08.2002, Бюл. № 23 (II ч.). – 3 с: ил.

Диссертации, авторефераты диссертаций

1 Белозеров И.В. Религиозная политика Золотой Орды на Руси в 13-14 вв.: дис... канд. ист. наук: 07.00.02: защищена 22.01.2002: утв. 15.07.2002 / Белозеров Иван Валентинович. – М., 2002. – 215 с. – Библиогр.: с. 202-213. – 04200201565.

Библиографическое описание документа из Internet

1 Бычкова Л.С. Конструктивизм // Культурология 20 век – «К». – (<http://www.philosophy.ru/edu/ref/enc/k.htm> 1).

2 Психология смысла: природа, строение и динамика Леонтьева Д.А. -Первое изд. – 1999. – (<http://www.smysl.ru/annot.php>).

Основные требования к оформлению научной статьи.

Статья должна быть объемом 5-11 страниц (включая рисунки и таблицы) на одном из языков: казахском, русском или английском.

Текст должен быть набран в редакторе Microsoft Word, шрифт Times New Roman размера 12, одинарный интервал. Текст следует печатать, соблюдая следующие размеры полей: верхнее и нижнее – 2 см, левое и правое – 2 см. Выравнивание – по ширине (с автоматической расстановкой переносов). Межстрочный интервал – одинарный. Абзацный отступ – 1,2.

К СВЕДЕНИЮ АВТОРОВ

К статье прилагаются:

- сопроводительное письмо (для сторонних организаций)

- заключения не менее двух экспертов:

1) от экспертной комиссии Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности (*внутренняя экспертиза*);

2) от независимых экспертов сторонних профильных организаций (*внешняя экспертиза*);
- сведения об авторе: фамилия, имя и отчество (полностью), ученая степень, должность, место работы, контактные телефоны, адрес для переписки (e-mail).

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

Вид рецензирования – двойное «слепое» рецензирование, то есть и автор, и рецензент остаются анонимными. Рукопись направляется на отзыв члену редколлегии и рецензенту; в спорных случаях по усмотрению редколлегии привлекаются дополнительные

рецензенты; на основании экспертных заключений редколлегии определяется дальнейшая судьба 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 редколлегии вновь решается вопрос о приемлемости рукописи для публикации. Переработанная рукопись должна быть возвращена в редакцию в течение месяца после получения авторами отзывов; в противном случае рукопись рассматривается как вновь поступившая. Рукопись, получившая недостаточно высокие оценки при рецензировании, отклоняется как не соответствующая уровню или профилю публикаций журнала.

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

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

Наш адрес:

080409, Жамбылская область, Кордайский район, пгт. Гвардейский, ул. Момышулы 15
РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» КН МОН РК

Учебный научно-образовательный центр (УНОЦ), тел. (726-36) 7-22-28, вн. 112.

E-mail: unots@biosafety.kz

ОПЛАТА ЗА ПУБЛИКАЦИЮ СТАТЕЙ

Оплата производится после одобрения статьи и включения в номер журнала. Автору высылается письмо с реквизитами об оплате. Если оплату производит организация, необходимо нам отправить реквизиты организации для составления договора.

Размер оплаты за публикацию 1 статьи для казахстанских ученых и научных сотрудников составляет 2 МРП, авторам из зарубежных стран – 15 \$ США.

Реквизиты для оплаты публикации:

Бенефициар: РГП на ПХВ «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» КН МОН РК

Банк бенефициара: АО «Народный банк Казахстана»

БИК банка: HSBKZKX

ИИК: KZ656010131000155334

ИИК: KZ766010131000133020 (USD)

КБЕ: 16

КНП: 859

Назначение платежа: Публикация статьи в научно-практическом журнале «Биоқауіпсіздік және Биотехнология/Биобезопасность и Биотехнология».

AUTHOR INSTRUCTIONS TO THE JOURNAL

The journal accepts articles in the following areas of science:

- Veterinary medicine;
- Medicine;
- Biotechnology;
- Biological safety and biosecurity;
- Molecular biology and genetic engineering;
- Phytosanitary.

Structural requirements for the initial part of the article:

- 1 DOI
- 2 Name, surname of the author (s)
- 3 Place of work of the author (s)
- 4 Title of article
- 5 An annotation in the language of the text of the published material (not more than 150 words)
- 6 Keywords (no more than 10 words/phrases)

Structural requirements for sections of the article:

The article should contain the following sections:

1. Abstract
2. Introduction
3. Research methodology
4. The obtained research results
5. Discussion of the results of research
6. Conclusions (conclusion)
7. References

The abstract should be in two other languages that differ from the language of the published material (no more than 150 words). The abstract is a source of information independent of the article. It is written after completion of the main text of the article. It includes a description of the main topic, problem, object, purpose of the work and its results. It indicates what the new document bears in itself in comparison with others related to the subject and purpose. Abstracts should be formatted according to international standards and include the following points:

- 1 Introduction to the research topic.
- 2 The purpose of scientific research.
- 3 Description of the scientific and practical significance of the work.
- 4 Description of the research methodology.
- 5 The main results, conclusions of the research work.
- 6 The value of the study (what contribution this work made to the relevant knowledge field).
- 7 The practical significance of the results of the work.

The abstract should not repeat the text of the article itself (you cannot take sentences from the article and transfer them to the abstract), as well as its title. It should not contain numbers, tables, intra-text footnotes.

The abstract should set out the main points of the results and conclusions of the research work, and should not contain material that is not in the article itself.

Acknowledgements (this section is needed if the article was prepared as part of a grant, or to express gratitude to those who contributed to the published work, but were not included in the number of co-authors). It is usually indicated at the end of the publication.

Full name of the author (s) are indexed with the workplaces of each. *For example, (S.S. Seitov¹, A.A. Akhmetov², B.B. Bolatov³)*

Place of work of the author (s). For example: ¹Kazakh National Agrarian University, Almaty, Kazakhstan; ²Stavropol State Agrarian University, Stavropol, Russia; ³Western Kazakhstan Agrarian Technical University named after Zhangir Khan, Oral, Kazakhstan.

On the content of the article

The article should contain only original material reflecting the results of research by the author. In the abstract (from 50 to 150 words), revealing the main content of the article, and in the final part (conclusions, from 50 to 150 words) of the article, it is necessary to reflect the novelty of the research results, their practical significance.

Basic requirements for the execution of a scientific article.

The article should be 5-11 pages long (including figures and tables) in one of the languages: Kazakh, Russian or English.

The text should be typed in the Microsoft Word editor, font Times New Roman size 12, single spacing. The text should be printed, observing the following margins: top and bottom – 2 cm, left and right – 2 cm. Justification – breadthwise (with automatic hyphenation). Line spacing is single. Indention – 1.25.

The **DOI** is affixed in the upper left corner of the sheet. Below, after one interval center alignment – in italics, initials, surnames of the author (s), a line below the full name of the organization (s), then, separated by a comma, it is necessary to indicate the city, the name of the country (for foreign authors), then center alignment – in capital letters the name of the article. Even lower, through the line, follows the text of the abstract (from 50 to 150 words) and keywords in the language of the text of the published material (no more than 10 words/phrases). Next, through the line, the main text of the article is placed, consisting of the following sections:

Introduction. This section includes the relevance of this study and a review of literature found by the author (articles, patents, reports, information from the Internet) on this topic. Also, this section indicates the goals and objectives of the study, hypotheses and statements. This section usually accounts for 5-10 % of the total article.

Research methodology. This section describes the materials and methods used in research. There is no need to indicate methodological features if this is not the first published methodology. If necessary, the key points of the methodology are described. This section usually accounts for 10-20 % of the total article.

Key research findings. By volume, this section is takes central place in the scientific article. This is the main section, the purpose of which is to use the analysis, synthesis and explanation of the data to prove the working hypothesis (hypotheses). The results, if necessary, are confirmed by illustrations – tables, graphs, figures, which represent the source material or evidence in folded form. It is important that the illustrated information does not duplicate the text. It is desirable to compare the results presented in the article with previous works in this area by both the author and other researchers. Such a comparison will additionally

reveal the novelty of the work done, give it objectivity. This part usually accounts for 50-55 % of the total article volume.

Discussion of the obtained data. These parts of the article contain an interpretation of the data obtained, describe the revealed patterns, include tables and figures not duplicating each other. Results are recommended to be stated in the past tense. The discussion should not repeat the description of the study results.

Conclusion. The conclusion contains a brief statement of the results of the study. In this section, it is necessary to compare the results obtained with the goal indicated at the beginning of the work. In conclusion, the results of comprehension of the topic are summarized, conclusions, generalizations and recommendations that arise from the work are made, their practical significance is emphasized, and the main directions for further research in this area are determined. In the final part of the article, it is desirable to include attempts to forecast the development of the issues addressed. The information contained in the title of the article should not be repeated in the text of the author's summary. The recommended volume is 10-15 % of the total volume of the article.

References. This section contains bibliographic information about another document cited, considered, or referred to in the text of the article, necessary and sufficient for its identification, search, and general characteristics. It is not recommended to refer to sources that are more than 5 years old. Links to recently published articles, self-citation is allowed in a minimal amount. Required links to articles from the scientific and practical journal RIBSP, in which the article is submitted. The article must refer to previously published articles in our journals. Below the main text (or texts of notes), the title "**REFERENCES**" is printed in the center, then, through a line, a numbered list of sources is placed in the order of references in the text, in accordance with the current requirements for bibliographic description. Only one source of information should be indicated in one list item. References to information sources are drawn up in numbers enclosed in square brackets (for example, [1]).

Bibliographic descriptions are drawn up in accordance with GOST 7.1-2003 and carefully verified. If the link to the source of information in the text of the article is repeated, then, repeatedly, in square brackets indicate its number from the list (without using the following serial number and the link "Ibid" in the bibliographic list). In the case of links to various materials from the same source, you must also indicate each time the page number in square brackets. For example, [1, 17] or [1, 28-29].

The most common descriptions – articles, books, conference proceedings, patents and electronic resources are given as an example, for example:

Book under the name of the author

1 Maximov N.V., Partyka T.L., Popov I.I. Architecture of computers and computing systems: Textbook for universities. – M.: Infra – M, 2005.-512 p.

2 Dushkov B.A., Korolev A.V., Smirnov B.A. Psychology of labor, professional, informational and organizational activities: Textbook for universities. – M: Academic project, 2005.-848 p.

Book under the title.

The description of the book is given in the title if the book is written by four or more authors. The title describes collective monographs, collections of articles, etc.

1 World art culture: in 2 volumes / B.A. Erengross [et al.]. – M.: Higher School, 2005. – Vol.2. – 511 p.

2 A set of control tasks and tests for economic analysis: a training method, a manual for universities / A.A. Slivinskaya [et al.]. – Yelets: Publishing house of the Yelets state University, 2003.- 73 p.

Legislative materials

The Constitution of the Russian Federation. – М.: Prior, 2001. – 32 p. The Code of Civil Procedure of the RSFSR: [adopted on the third session of the Supreme Council of the RSFSR of the sixth convocation on June 11, 1964]: offic. text: as of Nov 15 2001 / Ministry of Justice of RF. – М.: Marketing, 2001. – 159 p.

Standards

Household electronic equipment. Input and output parameters and connection types. Technical requirements [Text]: GOST R 517721 – 2001. – Introduction. 2002-01-01. – М.: Publishing house of standards, 2001. – IV, 27 p.: Ill.

Patent documents

Transceiver: Pat. 2187888 Russ. Federation: IPC H 04 B 1/38, H 04 J 13/00 / Chugayeva V.I.; applicant and patent holder Voronezh, scientific – research Institute of Communication. – No. 2000131736/09; declared 12/18/00; publ. 08/20/02, Bull. No. 23 (II hour). – 3 s: ill.

Dissertations, abstracts of dissertations

Belozarov I.V. The religious policy of the Golden Horde in Russia in the 13-14 centuries: cand. of Hist. Sciences: 07.00.02: defended 01.22.02: approved. July 15, 02 / Belozarov Ivan Valentinovich. –М., 2002.215 s. -Bibliogr.: p. 202-213. -04200201565.

Bibliographic Description of a Document from the Internet

1 Bychkova L.S. Constructivism // Cultural Studies 20th Century – “K”. – (<http://www.philosophy.ru/edu/ref/enc/k.htm> 1).

2 The psychology of meaning: nature, structure and dynamics Leontieva D.A. -First ed. – 1999. – (<http://www.smysl.ru/annot.php>).

When preparing article literature, it is necessary to provide a complete list of authors of the publication (without etc.).

If there are notes in the text, then after the main text the heading “**Notes**” is typed in the center, and the text of the notes, numbered by a number in the form of a superscript (for example 1) in the order of links in the text, is placed in a line. The link to the notes in the main text is drawn up not in bold, but as a superscript (for example, ... of model 1).

Tables are placed on the text. The numbering of the tables is carried out in the order of links in the text. The numbering heading of the table is typed in bold with left justification (for example, Table 1). The thematic title (if any) is typed on the same line in bold with left justification. The link to the table in the main text is made in bold in brackets – for example, (table 1). If the table has a large volume, it can be placed on a separate page, and in the case when it has a significant width – on a page with landscape orientation.

Figures are placed on the text. Numbering of figures is made in the order of links in the text. The numbering heading is typed in bold and centered (for example, Figure 1). Thematic title (if available).

-in the same line immediately after the numbering line (for example, Figure 1 – Dependence).

The link to the figure in the main text is made in bold in brackets – for example (Figure 1). If the picture has a large format, it should be placed on a separate page, and in the case when it has a significant width – on a page with landscape orientation. Pictures can be scanned from the original (150 spi in grayscale) or executed by computer graphics. It is allowed, and in the case of illustrations of a large volume (file), the placement of figures in a separate file of the electronic version is welcome. Captions for drawings should be made directly below the drawing.

Attached to the article:

- cover letter (for third-party organizations)

- conclusions of at least two experts:

1) from the expert commission of the Research Institute for Biological Safety Problems (internal expertise);

2) from independent experts of third-party specialized organizations (external expertise);

3) for articles in English – from an independent expert in areas from among the foreign editorial and expert council of the scientific and practical journal of RIBSP “**Биоқауіпсіздік және Биотехнология/Биобезопасность и Биотехнология**”.

- information about the author: surname, name and patronymic (in full), academic degree, position, place of work, contact phones, address for correspondence (e-mail).

Payment should be made after passing the examination and receiving a review of the article. The payment for the publication of 1 article for Kazakhstani scientists and researchers is 2 monthly calculation indexes, for authors from foreign countries – \$15 US.

Articles that do not meet the specified requirements are not accepted for publication.

Our address:

15, B. Momyshuly Street, Gvardeyskiy, Korday, Zhambyl oblast, 080409.

RSE “Research Institute for Biological Safety Problems” SC MES RK

Scientific and Educational Training Center (SETC), tel. (726-36) 7-22-28, int. 112.

E-mail: unots@biosafety.kz

Details for payment of publication:

Beneficiary: RSE at REM “Scientific Research Institute of Biological Safety Problems” of the Science Committee of the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan

BIC of bank: HSBKKZKX

IIC: KZ656010131000155334

IIC: KZ766010131000133020 (USD)

BC: 16

PPC: 859

Payment destination: Publication of an article in a scientific and practical journal «Биоқауіпсіздік және Биотехнология/Биобезопасность и Биотехнология».



Подписано в печать 18.01.2022 г.
Формат 60x84 1/8. Усл. п.л 5,25.
Тираж 200 экз. Заказ № 16.
Отпечатано в ТОО «Шаңырақ-Медиа».
г. Нур-Султан, ул. Кокарал, 2/1, тел. 87077770066.
www.smedia.kz