

<sup>1,2</sup>Б.Т. Байқара \*, <sup>1</sup>М.А. Садуақасова , <sup>1</sup>Ж.С. Жусупбеков ,  
<sup>1</sup>Ж.С. Бегасыл , <sup>1</sup>А.А. Султанов 

<sup>1</sup>Қазақ ғылыми-зерттеу ветеринарлық институты, Қазақстан, Алматы қ.

<sup>2</sup>Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

\*e-mail: baikara.barshagul@gmail.com

## ҚҰС ТҰМАУЫ, ҚТВ-НЫҢ ТАРАЛУЫ ЖӘНЕ ТАРАҒАН ОШАҚТАН ЖИНАҚТАЛҒАН ҮЛГІЛЕРДІ ТЕСТ-ЖҮЙЕ ҚҰРАСТЫРУДА ПАЙДАЛАНУ

### Қысқартулар

ЖПҚТ – жоғары патогенді құс тұмауы, ХЭБ – Халықаралық эпизоотиялық бюро, ҚТВ – құс тұмауы вирусы, ДНҚ – дезоксирибонуклеин қышқылы, РНҚ – рибонуклеин қышқылы, КТ-ПТР – кері транскрипциялы полимеразды тізбекті реакция, СҚО – Солтүстік Қазақстан облысы.

Қазіргі күні тұмаудың А вирусының патогенді штамдары бірнеше қауіпті пандемияға ұшыратты және жоғары өлім-жітім көрсеткішін тудырды. Вирустық аурулар оларды жұқтырған құстардың өнімділігінің едәуір төмендеуі мен өліміне әкеп соғатын орны толмас патология тудырады. Құс тұмауы вирусынан құстарды қорғаудың жалғыз жолы – құстардың жабық сыртқы ортадан оқшауланған жағдайда ұстау және вакцина көмегімен қоздырғышқа қарсы құстың иммунитетін қалыптастыру. Бірақ, жоғарыда айтылған вирустық аурулар қоздырғыштарынан қорғанудың көрсетілген мүмкіндіктерінің барына қарамастан, әлемнің көптеген елдерінде, соның ішінде Қазақстан Республикасында да құстар арасындағы эпизоотикалық жағдай шиеленіскен күйде қалуда. Тест-жүйелерді әзірлеу бойынша көптеген жарияланымдар бар, дегенмен ҚТВ геномының өзгергіштігі, мутацияға бейімділігі зертханалық балау кезінде күрделі мәселелер туғызады. Осыған байланысты құс тұмауын жедел балаудың ПТР-тест жүйелері сияқты отандық тиімді әдістерін әзірлеу өте маңызды. Осылайша, елге инфекцияның таралуына жол бермеу үшін ветеринариялық-санитариялық және арнайы ветеринариялық іс-шаралар кешенін одан әрі күшейтуге аса қажетті бірден бір экспресс әдіс болып табылады. Осы мақсатта ҚТВ анықтауға арналған спецификалық олигонуклеотидті праймерлерді таңдау және жобалау жүргізілуде, сонымен қатар жобаланған праймерлер мен үлгілерді валидациялау үшін СҚО 30-дан астам үлгілер таңдалды.

**Түйін сөздер:** құс тұмауы вирусы, КТ-ПТР, үй құстары, тест-жүйе, ЖПҚТ.

<sup>1,2</sup>B. T. Baikara\*, <sup>1</sup>M. A. Saduakassova, <sup>1</sup>Zh. S. Zhussupbekov, <sup>1</sup>K. S. Begasy, <sup>1</sup>A. A. Sultanov

<sup>1</sup>Kazakh Scientific Research Veterinary Institute, Kazakhstan, Almaty

<sup>2</sup>Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

\*e-mail: baikara.barshagul@gmail.com

### Avian influenza, spreading of the AIV and development of test-systems using samples collected from foci points

#### Abbreviations

HPAI – highly pathogenic avian influenza, OIE – International Epizootic Bureau, DNA – deoxyribonucleic acid, RNA – ribonucleic acid, RT-PCR – reverse transcription polymerase chain reaction.

To date, pathogenic strains of the influenza A virus have caused several dangerous pandemics and caused high mortality. Viral diseases cause irreversible pathology, which leads to a significant decrease in productivity and death of the infected bird. The only way to protect birds from the avian influenza virus is to keep birds in isolation and develop immunity in birds to the pathogen through vaccines. However, despite the above possibilities of protection against the above-mentioned viral pathogens, the epizootic situation among birds in many countries, including the Republic of Kazakhstan, remains tense. There are many publications on the development of test systems, but the variability of the AIV genome

and its susceptibility to mutations creates serious problems in laboratory evaluation. In this regard, the development of effective domestic methods for the rapid diagnosis of avian influenza, such as PCR test systems, is relevant. Thus, this is the only express method necessary to further strengthen the complex of veterinary-sanitary and special veterinary measures to prevent the spread of infection in the country. For this purpose, more than 30 samples were selected in the North Kazakhstan region for the selection and design of specific oligonucleotide primers for the detection of AIV.

**Key words:** avian influenza virus (AIV), RT-PCR, domestic chickens, test-system, HPAI, North Kazakhstan region.

<sup>1,2</sup>Б.Т. Байкара\*, <sup>1</sup>М.А. Садуақасова, <sup>1</sup>Ж.С. Жусупбеков,  
<sup>1</sup>К.С. Бегасыл, <sup>1</sup>А.А. Сұлтанов

<sup>1</sup>Казахский научно-исследовательский ветеринарный институт, Казахстан, г. Алматы

<sup>2</sup>Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

\*e-mail: baikara.barshagul@gmail.com

### **Грипп птиц, распространение ВГП и разработка тест-систем с использованием образцов, собранных из очагов**

#### **Сокращения и обозначения**

ВППГ – высокопатогенный птичий грипп, МЭБ – Международное эпизоотическое бюро, ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота, РНК – рибонуклеиновая кислота, ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

На сегодняшний день патогенные штаммы вируса гриппа А вызвали несколько опасных пандемий и стали причиной высокой смертности. Вирусные заболевания вызывают необратимую патологию, что приводит к значительному снижению продуктивности и гибели зараженной птицы. Единственным способом защиты птиц от вируса птичьего гриппа является содержание птиц в изоляции и выработка у птиц иммунитета к возбудителю с помощью вакцин. Однако, несмотря на указанные выше возможности защиты от вышеназванных вирусных возбудителей, эпизоотическая ситуация среди птиц во многих странах, в том числе и в Республике Казахстан, остается напряженной. Имеется много публикаций по разработке тест-систем, но изменчивость генома ВГП и его подверженность мутациям, создает серьезные проблемы при лабораторной оценке. В связи с этим актуальна разработка эффективных отечественных методов экспресс-диагностики птичьего гриппа, таких как ПЦР тест-системы. Таким образом, это единственный экспресс-метод, необходимый для дальнейшего усиления комплекса ветеринарно-санитарных и специальных ветеринарных мероприятий по предупреждению распространения инфекции в стране. С этой целью отобрано более 30 образцов в Северо-Казахстанской области для подбора и дизайна специфических олигонуклеотидных праймеров для выявления ВГП.

**Ключевые слова:** вирус гриппа птиц (ВГП), ОТ-ПЦР, домашние куры, тест-система, ВППГ, Северо-Казахстанская область.

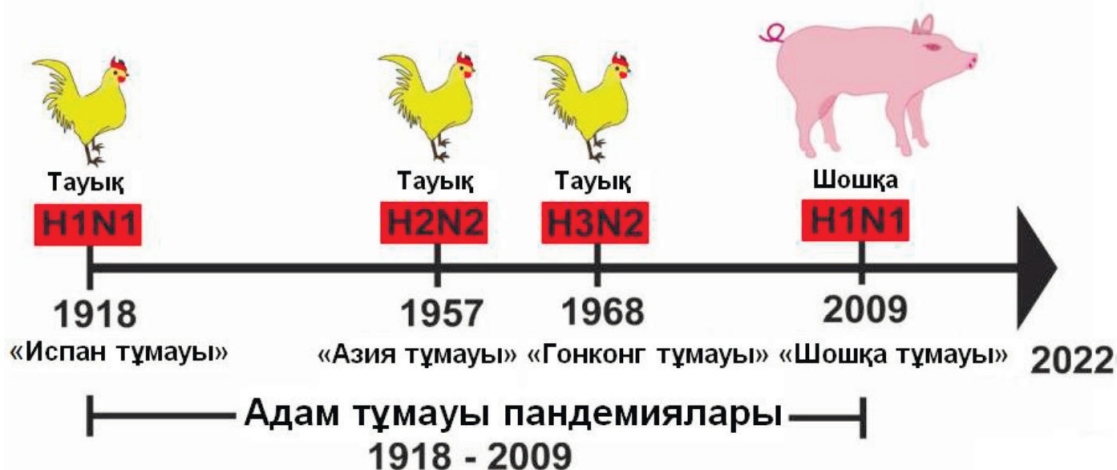
#### **Кіріспе**

Тұмау вирусы Orthomyxoviridae тұқымдасының өкілдері болып табылады және қожайынының көптігімен ерекшеленеді [1, 2]. Шошқаның физиологиялық ерекшелігінің арқасында тұмау вирусы үшін ол «қоспалауыш құты» болып саналады [3]. Шошқа тұмауы вирусының төрт типі белгілі, атап айтқанда, тұмаудың А вирусы, тұмаудың В вирусы, тұмаудың С вирусы және тұмаудың D вирусы. Тұмаудың А және В вирусының геномы бір тізбекті кері мәнді РНҚ сегіз гендік сегментінен тұрады, ал тұмаудың С және D вирустары жеті гендік сегментінен тұрады [4]. Тұмаудың А және В вирусының сегіз гендік сегменті бар, PB2 (полимераза), PB1 (патогенділікке жау-

ап беретін белок), PA, HA (гемагглютинин), NP (нуклеопротеин), NA (нейраминидаза), M (мембраналық-құрылымдық белок), and NS (интерферонның синтезіне кедергі), олардың арасында HA мен NA ең маңыздысы болып табылады және осы вирустардың патогенділігі үшін шешуші рөл атқарады. HA гені вирус бөлшегінің рецептор-қожайынға жабысуын реттейді, ал NA гені вирус ұрпағының қожайын-клеткаға кіруін реттейді. Шошқаның екі немесе одан да көп тұмаудың А вирусы штамдарымен коинфицирленуі рекомбинацияны туындатуы мүмкін [5], ол өз кезегінде, тұмау вирусының жаңа штамдарының пайда болуына ықпал ете алады [6]. Қате жасауға бейім РНҚ-полимераза арқасында пайда болған, репликация кезінде түзету мен жөндеу мүмкіндігі жоқ нүктелік

мутациялар да тұмау вирусының генетикалық алуан-түрлілігін толықтырып отыруы мүмкін [7]. Реассортация механизмдері мен нүктелік мутациялар HA мен NA гендерінде «антигендік қозғалыс» пен «антигендік жылжуға» әкеп соғуы мүмкін, сәйкесінше, ол тұмау вирусының жаңа подтиптері мен линияларының пайда болуына ықпал етеді [8, 9]. M гені матриксті де, мембраналық та белоктарды кодтайды және көптеген қызмет атқарады (мысалы, вирустық бөлшектердің түзілуіне, қожайынның иммундық жүйесімен танылады). M гені (1027 жұп нуклеотидтен тұрады) екі белокты, атап айтқанда M1 мен M2 кодтайды [10].

Қазіргі күні тұмаудың А вирусының патогенді штаммдары бірнеше қауіпті пандемияға ұшыратты және жоғары өлім-жітім көрсеткішін тудырды, мысалы, 1918, 1957, 1968 және 2009 жылғы пандемиялар [11]. Тарихтағы бірінші тұмау пандемиясы (испандық тұмау) 1918 жылы адамзат популяциясына зиян келтірді [12] және әлемде шамамен 50 миллион адамның өмірін алып кетті [13]. 1918 жылғы тұмау пандемиясы рекомбинация негізінде пайда болды, ол кезде адамның H1 вирусы ішкі белоктар генімен бірге құстың N1 нерамининадасын иеленіп, қазіргі кезде «классикалық H1N1» деп атайтын вирусқа айналды [14] (сур. 1).

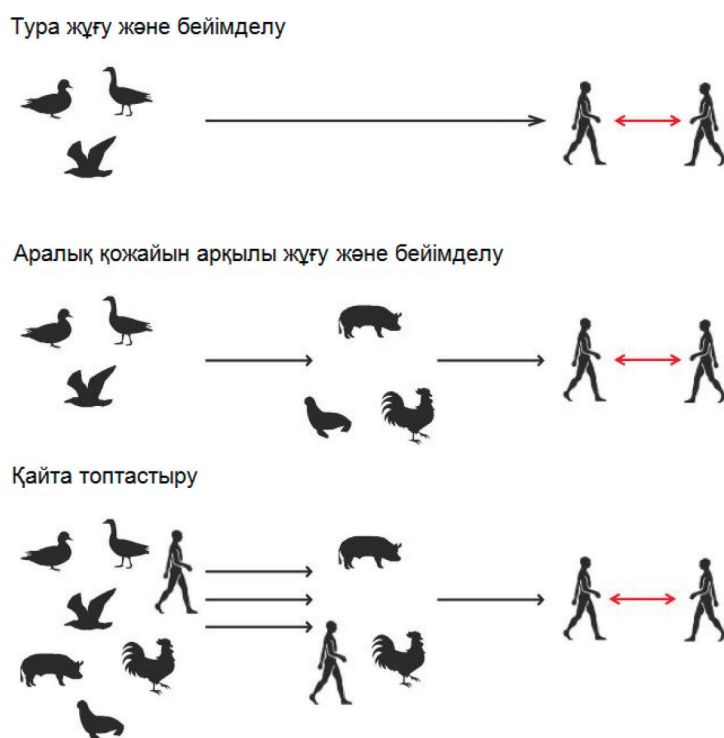


**1-сурет** – 1918 жыл мен 2022 жылғы наурыз мерзімі аралығындағы адам тұмауының төрт пандемиясы ұсынылған хронология. «Испандық» деген атпен танылған бірінші тұмау пандемиясы тауықтарда 1918 жылы пайда болды. Екінші тұмау пандемиясы (азия тұмауы) мен үшінші тұмау пандемиясы (гонконг тұмауы) тауықтарда, сәйкесінше, 1957 және 1968 жылдары тіркелді. «Шошқа тұмауы» деген атпен белгілі, тұмаудың ең соңғы пандемиясы 2009 жылдың наурызы мен мамыр айы аралығында Мексикада шошқалар арасында пайда болды [3].

Тұмаудың екінші пандемиясы (азия тұмауы) 1957 жылы пайда болып, шамамен екі миллиард адамның өмірін жалмады және H2N2 вирусымен байланысты болды [15]. Үшінші тұмау пандемиясы 1968 жылы H3N2 өршуімен (Гонконг тұмауы) адам популяциясына зиянын тигізіп, шамамен екі миллиард адамды өлімге душар етті [15, 16]. Ең соңғы тұмау пандемиясы (шошқа тұмауы) 2009 жылы наурыз бен мамыр

аралығында Мексикада шошқаларда пайда болып, әлемде шамамен 575 мың адамның өмірін қиды. Шошқа тұмауы «А(H1N1)pdm09» атына ие болған, пандемикалық H1N1 реассортантты вирустың арқасында туындады [17].

Құс тұмауы вирусы (КТВ) әдетте адамға жұқпайды, бірақ 1997 жылдан бері көптеген, әдетте, адамға вирустың H5, H6, H7, H9 бен H10 подтиптері жұққан ауыр жағдайлар тіркелген [18, 19].



**2-сурет** – Тұмау вирусының мүмкін жұғу жолдары мен бейімделуі. Көптеген жағдайларда тұмау вирусының алғашқы көзінен адамнан адамға жұғуы мен ауа-тамшылы жолмен жұғуы үшін әрі қарай бейімделуіне ықпал етуі мүмкін: (i) суда жүзетін құстардан адамға тікелей жұғуы мен одан әрі адамға бейімделуі; (ii) суда жүзетін құстардан аралық қожайынға жұғуы және осы қожайынға бейімделіп, одан әрі адамға жұғуы; және (iii) әр түрлі жануарлар түрінен шығатын және адамға жұғатын тұмау вирусының аралық қожайынына рекомбинациялануы [20]

ҚТВ жабайы суда жүзетін құстардан адамға тікелей зоонозды жұғуы жайлы хабарламалар, болжаммен адамның жабайы құстар нәжістерімен байланысы шектелгендіктен сирек жасалынды. Жабайы құстармен тығыз байланыс зоонозды жағдайлармен байланысты болған бірнеше жағдайларды ескермегенде, мысалы, аңшылық кезінде немесе [21] шошқа мен үй құстары сияқты адамдар жиі байланысатын аралық түрлер арқылы зоонозды тұмау вирусын жұқтыруы жиі кездескен (сур. 2). Адамдардың зоонозды вирустарды жұқтырған жағдайлардың басым көпшілігі адамдар арасындағы тұрақты жұғу белгілерінсіз, кездейсоқ орын алған. Жұғу адам жануармен тығыз байланыста болған уақытта тіркелген, мысалы, тірі жануарлар базары немесе жәрмеңкелерін аралағанда, жануарларды баптау кезінде, етті өндегенде, ауру жұқтырған жануарларды жойғанда немесе ауру жануарды сою жүргізу кезінде.

Вирустық аурулар оларды жұқтырған құстардың өнімділігінің едәуір төмендеуі мен

өліміне әкеп соғатын орны толмас патология тудырады [22]. Осы аурулардың қоздырғышына қарсы арнайы емдеу құралдары мен тиімді жақсартулар ветеринария практикасында жоқ. Жоғарыда айтылған аурулардан құстарды қорғаудың жалғыз жолы – құстардың жабық сыртқы ортадан оқшауланған жағдайда ұстау және вакцина көмегімен қоздырғышқа қарсы құстың иммунитетін (қарсы тұра алушылығын) қалыптастыру арқылы ауру қабылдағыш құстың ағзасына олардың қоздырғышын ендіруді алдын-алу болып табылады. Бірақ, жоғарыда айтылған вирустық аурулар қоздырғыштарынан қорғанудың көрсетілген мүмкіндіктерінің барына қарамастан, әлемнің көптеген елдерінде, соның ішінде Қазақстан Республикасында да құстар арасындағы эпизоотикалық жағдай шиеленіскен күйде қалуда, және оқтын-оқтын инфекциялық вирустық аурулардың ошағы пайда болуда [23]. Қолайсыз эпизоотикалық жағдайдың туындауына жемнің ауру қоздырғыштарымен ластануы, үй құстарының ауру қоздырғышын тасушы бо-

лып табылатын синантропты құс түрлерімен байланысуы, сонымен қатар иммунитеттің болмауы немесе вакцина салынған соң түзілетін иммунитеттің жеткіліксіз ширалмағандығы ықпал етеді [24, 25].

Қазақстан Республикасында жабайы құстардың арасындағы ҚТВ өршуі Маңғыстау, Атырау, Ақмола, Солтүстік-Қазақстан (СҚО), Қостанай және Павлодар облыстарында 2005-2020 жылдар аралығында тіркелген болатын. ҚТВ кейбір подтиптері зоонозды болуы мүмкін және сондықтан да Қазақстанның құс шаруашылығына елеулі қауіп төндіріп отыр [26]. Сонымен қатар, құс тұмауының біздің елімізге шекаралас жатқан, іргелес елдерден ену қаупі бар. Осыған байланысты шекаралас Қытай, Қырғызстан, Өзбекстан, Монғолия мен Ресей елдердегі құс тұмауы бойынша эпизоотикалық жағдай жайлы мәліметтерден хабардар болып отыру керек. Халықаралық эпизоотикалық бюроның (ХЭБ) есебіне сәйкес 2020 жылдың қаңтары мен мамыр айы аралығында Қытайда құс тұмауының жаңа ауру ошақтары (үй құстарының және құс фабрикаларындағы құстар арасында 30 астам ауру ошағы (H5N1, H5N2 және H5N5)), Иракта үй құстарының арасында 1 жаңа ауру ошағы (H5N8) және Вьетнамда үй құстары арасында 5 жаңа ауру ошағы (H5N1, H5N6) жайлы хабарланды. 2020 жылдың тамыз айында Ресей үй құстарының арасында ҚТВ 28 ауру ошағы мен құс шаруашылығына жатпайтын саладағы 1 ауру ошағы (H5) жайлы хабарлады. Ал 2020 жылдың қыргүйек-қазан айларында Қазақстанның Ресеймен шекарасына іргелес жатқан 4 облысында, Ақмола, Солтүстік-Қазақстан, Қостанай және Парлодарда үй құстары, құс фабрикалары мен жабайы құстар арасында жоғары патогенді құс тұмауы ауруының өршуі және жалпы 11 ауру ошағы (H5N8) тіркелді [27]. Осы ауру ошақтарының таралуының себебі үй құстарының жабайы құстармен байланысуы және одан әрі жергілікті жұғуы болуы мүмкін.

Әдетте, антигенді немесе молекулалаық скрининг алдымен ҚТВ типін (А немесе В) анықтау үшін пайдаланылады. Кейін нақты подтипті екі вирустық беттік гликопротеиндер, НА мен NA серологиялық реактивтілігі негізінде, немесе осы екі белокты кодтайтын гендердің молекулалық сипаттамасы негізінде анықтайды. Жабайы суда жүзетін құстар тұмаудың А вирусының табиғи көзі болып саналады және бұл құстарда А тұмауының барлық

НА және NA подтиптері тіркелген. Қазіргі кезде А тұмауы подтипінің тек екеуі (H1N1 и H3N2) ғана адамдар арасында қайталанатын мерзімдік тұмау эпидемиясын туындатып, адамдарда таралған немесе анықталған [28].

Жоғары патогенді құс тұмауы (ЖПКТ) вирусы Еуразия, Таяу Шығыс пен Африкада құс шаруашылығы мен сауда-саттық қауіпсіздік саласына қауіп төндіруде [29]. 2008 жылдан бастап H5Nx клады гентикалық және антигенді ауқымды бірқатар изоляттар түзіп, үздіксіз дамып отырды [30]. 2020 жылдың мамыр айында Ирак Республикасында, 2020 жылдың шілде мен тамыз айында Ресейде, 2020 жылы қыргүйекте Қазақстанда және 2020 жылдың басында үй құстарынан H5N8 вирусының таралуы анықтағанға дейін 2020 жылдың басында Еуропаның құс шаруашылығы саласында H5N8 кіші-гірім таралу ошақтары тіркелген болатын.

2020 жылдың мамыр айында Ирак Республикасы H5N8 вирусының үй құстарында таралғанын хабарлады, бұл елде ауру ошақтары бір жылдан астам тіркелмеген болатын. 2020 жылдың шілде айының аяғындағы Ирактағы ауру тұтануынан кейін Ресейдің оңтүстік-орталық бөлігіндегі Челябинск облысында H5N8 вирусының таралу жағдайы тіркелген болатын, және ол үй тауықтарын, қаздар мен үйректерді қамтыды. Үй құстарының жабайы құстармен байланысуы ауру таралуының ең мүмкін жолы болып көрсетілді [32]. Тамыздан қыркүйек айына дейінгі аралықта Тюмень, Омск және Курганда барлығы 11 жағдай сипатталды.

Ресейде H5 анықталуымен параллель Қазақстанның солтүстік-орталық аумағында, Қостанай, Ақмола мен Павлодар облыстарын қосқанда, үй құс шаруашылығында құс тұмауының таралу жағдайлары тіркелді. Құстар тобын жою, бақылау және вакцинациялау аймақта бір уақытта жүргізілді. Ветеринария бойынша ұлттық референттік орталық ұсынған үлгілер негізінде вирустық нуклеин қышқылының анықталуына диагностикалық сұрыптауға ұшыратылды.

### Материалдар мен зерттеу әдістері

Зерттеуде пайдаланылған үлгілер Қазақстан Республикасында 2020 жылы қыргүйек пен қазан айларында жоғары патогенді ҚТВ таралған уақытта СҚО, ауру үй және ҚФ жинақталған патологиялық материал (құстардың асқазаны,



бауыры мен жүрегі). Зерттеуле қолданылған үлгілер мен дәл осы мезеттегі полимеразалық тізбектік реакция (ПТР) әдісінің нәтижелері 1

кестеде көрсетілген. Келтірілген ақпарат үлгілер жинақталған елді-мекен мен құстардың түрін көрсетеді.

**1-Кесте** – 2020 жылы СҚО үй мен ҚФ құстарынан жинақталған патологиялық материалдардың алынған орны мен құстар түрі және ҚТВ ПТР әдісімен анықтау нәтижесі

№р/р	Аудан	Елді мекен	Жиналған күні	Құс түрі	М ген (сг мәні)
1	Есіл	Явленка	22.09.2020	қаз	42,16
2	Есіл	Бұлақ	22.09.2020	тауық	34,63
3	Ақжар	Қазан	19.09.2020	тауық	No Ct
4	Айыртау	Ағымтай батыр	22.09.2020	қаз	34,3
5	Есіл	Таранкөл	19.09.2020	қаз	25,71
6	М. Жұмабаев	Куломзино	20.09.2020	қораз	40,31
7	М. Жұмабаев	Булаев қ.	20.09.2020	қаз	32,56
8	М. Жұмабаев	Қарақоға	20.09.2020	тауық	27,27
9	Мамлют	Мамлют қ.	21.09.2020	қаз	32,36
10	Тимирязев	Ақжан	22.09.2020	үйрек	31,15
11	Тимирязев	Дзержинск	22.09.2020	қаз	24,97
12	Мүсірепов қ.	Рагульное	24.09.2020	үйрек	21,18
13	Айыртау	Егіндіағаш	26.09.2020	қаз	28,19
14	Аққайың	Тоқуш	26.09.2020	тауық	26,5
15	Мамлют	Новомихайловка	25.09.2020	қаз	21,97
16	Қызылжар	Бескөл, ҚФ	19.09.2020	қаз	21,2
17	Қызылжар	Якорь а., "Фирма Алекри" ЖШС ҚФ	19.09.2020	тауық	38,81
18	Қызылжар	Пресновка	17.09.2020	түйе тауық	No Ct
19	Қызылжар	Архангельское	17.09.2020	қаз	26,07
20	Қызылжар	Красный Яр	17.09.2020	қаз	35,4
21	Тимирязев	Белоградovка	17.09.2020	тауық	41,31
22	Айыртау	Қарақамыс	17.09.2020	тауық	28,94
23	Жамбыл	Екатериновка	17.09.2020	қаз	27,69
24	Тимирязев	Тимирязев	14-15.09.20	үйрек	35,34
25	Шал Ақын	Сухоравовка	14-15.09.20	түйе тауық	38,47
26	Мүсірепов қ.	Шұқыркөл	14-15.09.20	қаз	28,98
27	Мүсірепов қ.	Чернобаевка	14-15.09.20	қаз	No Ct
28	Жамбыл	Новорыбинка	14-15.09.20	қаз	No Ct
29	Тайыншы	Алабота	14-15.09.20	қаз	40,11
30	Тимирязев	Тимирязев	14-15.09.20	қаз	33,58
31	Тимирязев	Тимирязев	14-15.09.20	үйрек	37,19
32	Тимирязев	Тимирязев	14-15.09.20	қаз	38,95
33	М. Жұмабаев		14-15.09.20	қаз	No Ct
<b>Барлығы</b>				<b>33</b>	<b>28</b>

## 2.2 Вирустық РНҚ бөліп алу

Вирустық РНҚ бөліп алуды ғылыми зерттеулерге арналған QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, АҚШ) жиынтығын өндіруші хаттамасына сай пайдалана отырып жүргізілді.

## 2.3 КТ-ПТР реакция

РНҚ матрицасында қДНҚ алғаннан кейін, қДНҚ аймақтарын амплификациялау (ПТР)

жүргізілді және амплификация фрагменттерін детекциялау гибридизация-флуоресценциялы форматында іске асырылды. Кері транскрипциялы полимеразалық тізбектік реакцияны (КТ-ПТР) қою үшін 3 праймерді (М ген Sep (тура) – AGA TGAGTCTTCTAACCAGGTCG, Sep2 (кері) – TGCAAAAACATCTTCAAGTCTCTG, SePRO (зонд) – FAM-5'-TCAGGCCCCCTCAAAGCCGA-3'-TAMRA

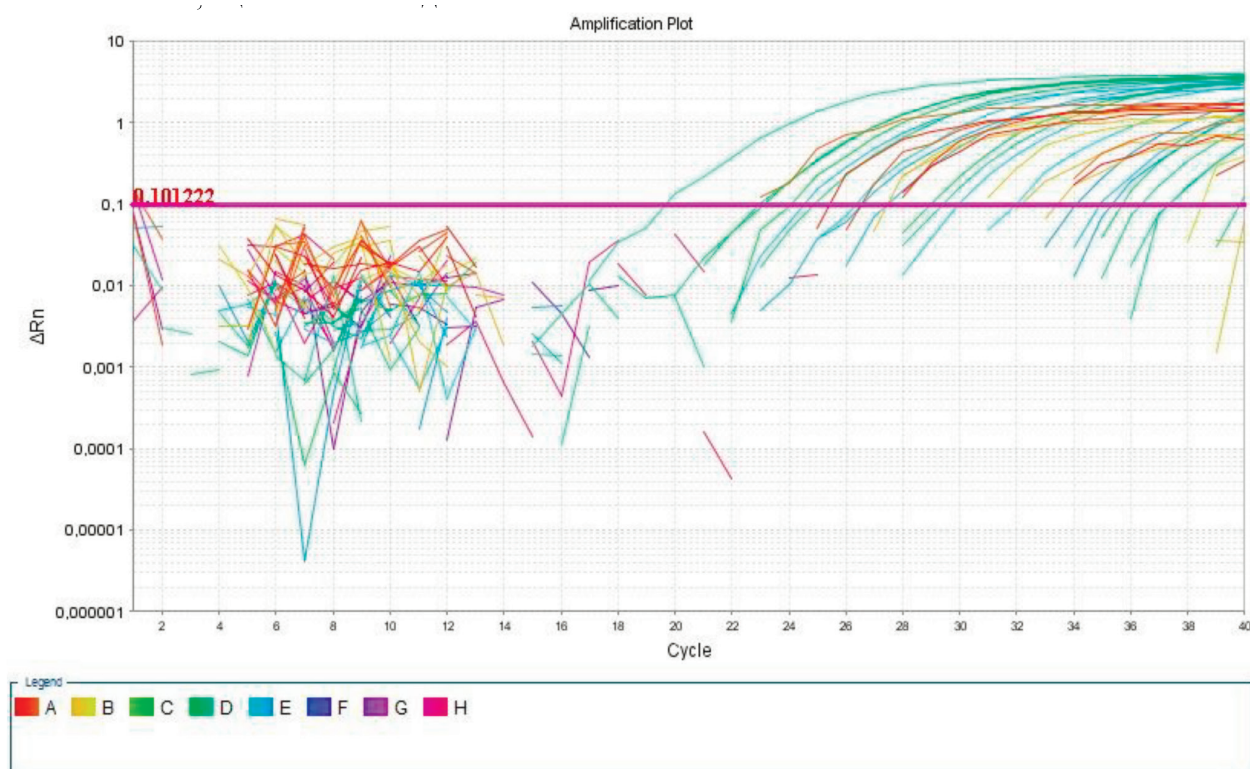
[33]) OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, АҚШ) жиынтығын пайдаланып жүргізілді.

кДНК амплификациялауға арналған ПЦР-қоспа келесі компоненттерден тұрады: Тақ ДНК полимераза – 0,25 мкл (5 бірлік/мкл); 10x ПТР-буфер – 2,5 мкл; арнайы праймерлер (20 пМ) тура және кері праймер – әрқайсысы 1 мкл; дНТФ қоспасы (10 мМ) – 1 мкл; 25 мМ магний хлоридінің ерітіндісі – 2 мкл; ДНҚ – 3 мкл. Деиондалған су – 14,25 мкл. КТ-ПТР арналған температура-уақыттық тәртібі келесі бағдарламаға сай жүргізілді: 50°C – 30 мин, 95°C – 15 мин, 40 цикл: 95°C – 10 сек, 60°C – 30 сек, 72°C – 15 сек. Амплификацияны Real Time 7500, Applied Biosystems (АҚШ) амплификаторында жүргізілді.

### Зерттеу нәтижелері мен оларды талқылау

ПТР нәтижесінде вирустық жүктемені анықтау маңызды болып табылады. Вирустық

жүктеме – 1 мл биоматериалда вирустың қанша мөлшері барын анықтайды. Вирустық жүктемені шартты анықтау үшін талдау нәтижесінде Ct (cycle threshold) ретінде көрсетілетін “шекті цикл” көрсеткішін пайдаланады. Ол вирус анықталған шекті цикл болып табылады. Сәйкесінше, үлгіде вирус бөлшектері көп болған сайын, тест-жүйе оны соншалықты жылдамырақ анықтайды. Зерттеу нәтижесінде Ct-мәні 21 циклдан бастап анықталынған (сурет 3). Барлық үлгілер дәл осы уақыттағы КТ-ПТР қою нәтижесінде үлгілердің басым көпшілігінде анықталды. Тек ғана 18, 28 бен 33 үлгілер М-ген бойынша теріс нәтиже көрсетті. Сонымен жалпы Солтүстік-Қазақстан облысынан құс тұмауы аруры жаппай таралған уақытта жинақталған 33 үлгінің ішінде М-ген бойынша 85%, оң нәтиже алынды.



3-сурет – Зерттелініп отырған 33 РНҚ үлгісіне құс тұмауы вирусының М-гені бойынша қойылған КТ-ПТР нәтижелері

Әрі қарай Сенгер бойынша секвенирлеу нәтижесінде жоғары патогенді құс тұмауы екені анықталды, яғни Қазақстандағы құс тұмауы

ошағынан алынған үлгілердің толық геномының генетикалық талдауы барлық сегмент бойынша Иракта тіркелген H5N8 вирусына өте ұқсас бол-

ды, ол арғы-текті штаммның ұзын тармағымен байланысқан, осы ирандық кластердің ішіндегі қысқа ұзындықты тармаққа сәйкестігін дәлелдейді [31].

Жоғары патогенді құс тұмауының А типінің эволюциясы пандемияға әкелуі мүмкін. Осыған байланысты құс тұмауын жедел балаудың тиімді әдістерін әзірлеу ғылыми зерттеулердің өзекті тақырыбы болып табылады.

Құс тұмауының геномын анықтау, яғни ЖПҚТ әлде төменгі патогенді құс тұмауы (ТПҚТ) екенін анықтаудың негізгі әдісі (ұзақ уақытты қажет ететін) – бұл секвенирлеу.

Тест-жүйелерді әзірлеу бойынша көптеген жарияланымдар бар, дегенмен ҚТВ геномының өзгергіштігі, мутацияға бейімділігі зертханалық балау кезінде күрделі мәселелер туғызады, бұл сынақтың сезімталдығы мен спецификасы төмен болғандықтан жалған-теріс нәтижелерге әкеп соғады. Осыған байланысты құс тұмауын жедел балаудың ПТР-тест жүйелері сияқты отандық тиімді әдістерін әзірлеу өте маңызды.

КТ-ПТР – тұмау түрлері мен қосалқы түрлерін ажыратуға көмектесетін сезімтал және ерекше тест-жүйе. Бұл тест-жүйені қолдану арқылы сараптауды жылдам жүргізуге болады, оның нәтижелері секвенирлерді пайдаланбай-ақ ЖПҚТ әрі H5 штаммын анықтауға мүмкіндік береді.

Осылайша, елге инфекцияның таралуына жол бермеу үшін ветеринариялық-санитариялық және арнайы ветеринариялық іс-шаралар кешенін одан әрі күшейтуге аса қажетті бірден бір экспресс әдіс болып табылады.

Осы мақсатта ҚТВ анықтауға арналған спецификалық олигонуклеотидті праймерлерді таңдау және жобалау жүргізілуде, сонымен қатар жобаланған праймерлер мен үлгілерді валидациялау үшін СҚО 30-дан астам үлгілер таңдалды.

### **Қорытынды**

2020 жылы СҚО құс тұмауы вирусы ауруы жаппай таралған уақытта жинақталған үлгілерді КТ-ПТР әдісімен зерттеу барысында, олардың көп бөлігінің, шамамен 85% оң нәтиже алынды, яғни ЖПҚТ таралуы дәлелденді. Одан әрі қарай оң нәтиже алынған үлгілерді секвенирлеу мен филогенетикалық ағаш құру жұмыстары

Ұлыбританияның Вейбридж қаласында орналасқан Өсімдіктер мен жануарларды қорғау агенттігінде бірлесіп орындалды [31].

Құс тұмауы бойынша келтірілген ақпарат әлемдегі және Қазақстан Республикасымен тығыз экономикалық және туристік байланысы бар елдердегі осы ауру бойынша эпизоотикалық жағдай шиеленіскен. Аурудың қандай да бір елге, соның ішінде Қазақстан Республикасына ену мүмкіндігі жоғары және болжау мүмкін емес. Сондықтан ауру қоздырғышының елге енуін алдын-алу мақсатында, елімізде таралған ҚТВ штаммдарына жылдам әрі арзан анықтауға мүмкіндік беретін диагностикалық тест-жүйелерді құрастыру өзекті мәселе болып отыр. Сонымен қатар вакцина салынған популяция ішінде вирустың ұзақ уақыт аралығында таралуы вирусты антигендік те, генетикалық та өзгерістерге ұшыратуы мүмкін. Вирус подтиптерінің саны көп болғандықтан А тұмауы вирусына қарсы инактивтелген вакциналарды алуға арналған штаммдарды таңдау кезінде көптеген мәселелер туындайды. Айта кететін мәселе, кейбір штаммдар қымбат концентрлендірусіз айтарлықтай мықты вакцина алу үшін вирустар жеткілікті жоғары титрде өспейді.

### **Мүдделер қақтығысы**

Барлық авторлар мақаланың мазмұнымен танысып, оқып шықты және хабардар болды, мүдделер қақтығысы жоқ.

### **Қаржыландыру көзі**

Жұмыс Қазақстан Республикасының Ауыл шаруашылық министрлігінің 2021-2023 жылдар аралығындағы қолдауымен орындалды. Қаржыландыру Қазақстан Республикасының Ауыл шаруашылық министрлігінің ҒТӨ «Жұқпалы ауруға шалдыққан жануарларды диагностикалау, ауруды алдын-алу мен емдеу және топырақтағы сібір жарасының ошақтарын залалсыздандырудың өндірістік әдістерін жасап шығару мен ұсыну» бағдарламалық-мақсатты қаржыландыруы шеңберіндегі, 2021 жылдың 1 қыркүйегіндегі №22 Келісім-шартқа сай орындалған аграрлық-өнеркәсіптік кешен саласындағы қолданбалы ғылыми зерттеулер.



Әдебиеттер

- 1 Ran Zh., Shen H., Lang Y., Kolb E.A., Turan N., Zhu L., Ma J., Bawa B., Liu Q., Liu Haixia., Quast M., Sexton G., Krammer F., Hause B.M., Christopher-Hennings J., Nelson E.A., Richt J., Li F., Ma W., Sandri-Goldin R.M. Domestic Pigs Are Susceptible to Infection with Influenza B Viruses // *Journal of Virology* 89(9). – 2015. – P. 4818–4826. doi:10.1128/JVI.00059-15.
- 2 Hause B.M., Collin E.A., Liu R., Huang B., Sheng Z., Lu W., Wang D., Nelson E.A., Li F. Characterization of a novel influenza virus in cattle and Swine: Proposal for a new genus in the Orthomyxoviridae family // *Mbio*. – 2014. – 5:e00031-14. doi: 10.1128/mBio.00031-14.
- 3 Chauhan R.P., Gordon M.L. A Systematic Review Analyzing the Prevalence and Circulation of Influenza Viruses in Swine Population Worldwide // *Pathogens*. – 2020. – P. 9(5):355. Published 2020 May 8. doi:10.3390/pathogens9050355.
- 4 Nakatsu S., Murakami S., Shindo K., Horimoto T., Sagara H., Noda T., Kawaoka Y. Influenza C and D Viruses Package Eight Organized Ribonucleoprotein Complexes // *J. Virol.* – 2018. – P. 92. doi: 10.1128/JVI.02084-17.
- 5 Tao H., Li L., White M.C., Steel J., Lowen A.C. Influenza A Virus Coinfection through Transmission Can Support High Levels of Reassortment // *J. Virol.* 89. – 2015. – P. 8453–8461. doi: 10.1128/JVI.01162-15.
- 6 Vincent A., Awada L., Brown I., Chen H., Claes F., Dauphin G., Donis R., Culhane M., Hamilton K., Lewis N. Mumford E., Nguyen T., Parchariyanon S., Pasick J., Pavade G., Pereda A., Peiris M., Saito T., Swenson S., Van Reeth K., Webby R., Wong F., Ciacci-Zanella J. Review of Influenza A Virus in Swine Worldwide: A Call for Increased Surveillance and Research // *Zoonoses and Public Health*. – 2014. – 61(1). – P. 4–17. doi:10.1111/zph.12049.
- 7 Rajao D.S., Vincent A.L., Perez D.R. Adaptation of Human Influenza Viruses to Swine // *Front. Vet. Sci.* – 2018. – 5:347. doi: 10.3389/fvets.2018.00347.
- 8 Jang J., Bae S.E. Comparative Co-Evolution Analysis Between the HA and NA Genes of Influenza A Virus // *Virol. (Auckl)*. – 2018. – 9. doi: 10.1177/1178122X18788328.
- 9 Kosik I., Yewdell J.W. Influenza Hemagglutinin and Neuraminidase: Yin(-)Yang Proteins Coevolving to Thwart Immunity // *Viruses*. – 2019. – 11:346. doi: 10.3390/v11040346.
- 10 Furuse Y., Suzuki A., Kamigaki T., Oshitani H. Evolution of the M gene of the influenza A virus in different host species: large-scale sequence analysis. – 2009. – 6(1), – P. 67–. doi:10.1186/1743-422x-6-67.
- 11 Medina R.A. 1918 influenza virus: 100 years on, are we prepared against the next influenza pandemic? // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2008. – 16 61–62. doi: 10.1038/nrmicro.2017.174.
- 12 Koen J.S. A practical method for field diagnosis of swine diseases // *Am. J. Vet. Med.* – 1919. – 14. – P. 468–470.
- 13 Taubenberger J.K., Morens D.M. 1918 Influenza: The mother of all pandemics // *Emerg. Infect. Dis.* – 2006. – 12. – P. 15–22. doi: 10.3201/eid1209.05-0979.
- 14 Worobey M., Han G.Z., Rambaut A. Genesis and pathogenesis of the 1918 pandemic H1N1 influenza A virus // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2014. – 111. – P. 8107–8112. doi: 10.1073/pnas.1324197111.
- 15 Saunders-Hastings P.R., Krewski D. Reviewing the History of Pandemic Influenza: Understanding Patterns of Emergence and Transmission // *Pathogens*. – 2016. – 5:66. doi: 10.3390/pathogens5040066.
- 16 Smith G.J., Bahl J., Vijaykrishna D., Zhang J., Poon L.L., Chen H., Webster R.G., Peiris J.S., Guan Y. Dating the emergence of pandemic influenza viruses // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2009. – 106. – P. 11709–11712. doi: 10.1073/pnas.0904991106.
- 17 Ignacio M., Nelson M.I., Quezada-Monroy F., Dutta J., Cortes-Fernández R., Lara-Puente J.H., Castro-Peralta F., Cunha L.F., Trovão N.S., Lozano-Dubernard B., Rambaut A., van Bakel H., García-Sastre A. Origins of the 2009 H1N1 influenza pandemic in swine in Mexico // *eLife*. – 2016. – 5. e16777–. doi:10.7554/eLife.16777.
- 18 Paules C., Subbarao K. Influenza // *Lancet* 390. – 2017. – P. 697–708. doi: 10.1016/S0140-6736(17)30129-0.
- 19 Shi J., Deng G., Ma Sh., Zeng X., Yin X., Li M., Zhang B., Cui P., Chen Y., Yang H., Wan X., Liu L., Chen P., Jiang Y., Guan Y., Liu J., Gu W., Han Sh., Song Y., Liang L., Qu Zh., Hou Y., Wang X., Bao H., Tian G., Li Y., Jiang L., Li Ch., Chen H. Rapid Evolution of H7N9 Highly Pathogenic Viruses that Emerged in China in 2017 // *Cell Host & Microbe*. – 2018. S1931312818304347–. doi:10.1016/j.chom.2018.08.006.
- 20 Richard M., Fouchier R.A. Influenza A virus transmission via respiratory aerosols or droplets as it relates to pandemic potential // *FEMS Microbiol Rev.* – 2016. – 40(1). – P. 68-85. doi:10.1093/femsre/fuv039.
- 21 Gilsdorf A., Boxall N., Gasimov V., Agayev I., Mammadzade F., Ursu P., Gasimov E., Brown C., Mardel S., Jankovic D., Pimentel G., Amir I.A., Maher E.L., Salvi C., Legros D., Pessoa C. da Silva, Hay A., Andraghetti R., Rodier G., Ganter B. Two Clusters of Human Infection with Influenza A/H5N1 Virus in the Republic of Azerbaijan // *Euro Surveill*. – 2006. – 11(5). – P. 122-6.
- 22 Arafa A., Suarez D., Kholosy S.G., Hassan M.K., Nasef S., Selim A., Dauphin G., Kim M., Yilma J., Swayne D., and Aly M.M. Evolution of highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses in Egypt indicating progressive adaptation // *Archives of Virology*. – 2012. – P. 1931–1947.
- 23 Sultankulova K., Orynbayev M., Kozhabergenov N., Akylbayeva K., Melisbek A., Jekebekov K., Zhunushov A., Zakarya K., Burashev Y. Complete Coding Genome Sequence of an Avian Influenza A/H3N8 Virus Strain Detected in North Kazakhstan in 2018 // *Microbiol Resour Announc.* – 2020. – Jul 16;9(29):e00441-20. doi: 10.1128/MRA.00441-20.
- 24 Abbas M.A., Spackman E., Fouchier R., Smith D., Ahmed Z., Siddique N., Naeem K., McKinley E.T., Ha-meed A., Rehmani S., and Swayne D.E. H7 avian influenza virus vaccines protect chickens against challenge with antigenically diverse isolates // *Vaccine*. – 2011. – P. 7424–7429.
- 25 Swayne D.E. Impact of vaccines and vaccination on global control of avian influenza // *Avian Dis.* – 2012. – Dec;56(4 Suppl):818-28. doi: 10.1637/10183-041012-Review.1.

- 26 Sonnberg S., Webby R.J., and Webster R.G. Natural history of highly pathogenic avian influenza H5N1 // *Virus Research*. – 2013. – P. 63–77.
- 27 High Pathogenicity Avian Influenza (H5N8) in Russia. 4 September 2020. Ref. VITT/1200.
- 28 Global Influenza Programme. Expert consultation on diagnosis of H5N1 avian influenza infections in humans. *Influenza Other Respir Viruses*. – 2007. – 1(4). – P.131-138. doi:10.1111/j.1750-2659.2007.00028.x
- 29 Duan L., Campitelli L., Fan X.H., Leung Y.H.C., Vijaykrishna D., Zhang J.X., Donatelli I., Delogu M., Li K.S., Foni E., Chiapponi C., Wu W.L., Kai H., Webster R.G., Shortridge K.F., Peiris J.S.M., Smith G.J.D., Chen H., Guan Y. Characterization of Low-Pathogenic H5 Subtype Influenza Viruses from Eurasia: Implications for the Origin of Highly Pathogenic H5N1 Viruses // *Journal of Virology*. – 2007. – 81(14). – P. 7529–7539. doi:10.1128/JVI.00327-07.
- 30 Lee D., Sharshov K., Swayne D.E., Kurskaya O., Sobolev I., Kabilov M., Alekseev A., Irza V., Shestopalov A. Novel Reassortant Clade 2.3.4.4 Avian Influenza A(H5N8) Virus in Wild Aquatic Birds, Russia, 2016 // *Emerging Infectious Diseases*. – 2017. – 23(2). – P. 359–360. doi:10.3201/eid2302.161252.
- 31 Lewis N.S., Banyard A.C., Whittard E., Karibayev T., Al Kafagi T., Chvala I., Byrne A., Saduakassova M.A., King J., Harder T., Grund C., Essen S., Reid S.M., Brouwer A., Zinyakov N.G., Tegzhanov A., Irza V., Pohlmann A., Beer M., Fouchier R.A.M., Sultanov A.A., Brown I.H. Emergence and spread of novel H5N8, H5N5 and H5N1 clade 2.3.4.4 highly pathogenic avian influenza in 2020 // *Emerg Microbes Infect.* – 2021. – Dec;10(1):148-151. doi: 10.1080/22221751.2021.1872355.
- 32 Verhagen J.H., Fouchier R.A.M., Lewis N. Highly pathogenic avian influenza viruses at the wild-domestic bird interface in Europe: future directions for research and surveillance // *Viruses*. – 2021. – 13. – P.212. 10.3390/v13020212
- 33 Nagy, Z., Riss, A., Fujiyama, S., Krebs, A., Orpinell, M., Jansen, P., Cohen, A., Stunnenberg, H.G., Kato, S., Tora, L. The metazoan ATAC and SAGA coactivator HAT complexes regulate different sets of inducible target genes // *Cell. Molec. Life Sci.* – 2010. – 67(4). – P. 611-628.
- 34 Spackman E., Senne D.A., Myers T.J., Bulaga L.L., Garber L.P., Perdue M.L., Lohman K., Daum L.T., Suarez D.L. Development of a Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay for Type A Influenza Virus and the Avian H5 and H7 Hemagglutinin Subtypes // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2020. – 40(9). – P. 3256–3260. doi:10.1128/jcm.40.9.3256-3260.2002.
- 35 Olsen B., Munster V.J., Wallensten A., Waldenström J., Osterhaus A.D., Fouchier R.A. Global patterns of influenza a virus in wild birds // *Science*. – 2006. – 312. – P.384–8. 10.1126/science.1122438.
- 36 Marchenko V., Goncharova N., Susloparov I., Kolosova N., Gudymo A., Svyatchenko S., Danilenko A., Durymanov A., Gavrilova E., Maksyutov R., Ryzhikov A. Isolation and characterization of H5Nx highly pathogenic avian influenza viruses of clade 2.3.4.4 in Russia // *Virology*. – 2018. – 525(). – P. 216–223. doi:10.1016/j.virol.2018.09.024.

3-бөлім  
**МОЛЕКУЛАЛЫҚ  
БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ГЕНЕТИКА**

---

Section 3  
**MOLECULAR  
BIOLOGY AND GENETICS**

---

Раздел 3  
**МОЛЕКУЛЯРНАЯ  
БИОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА**