

**НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК  
КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ  
ИНСТИТУТ БИОТЕХНОЛОГИИ**

**НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК  
КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ  
ИНСТИТУТ ГОРНОЙ ФИЗИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЫ**

Диссертационный совет Д 03.23.680

На правах рукописи  
УДК 578.2.578.832

**Джекебеков Куаныш Кайратович**

**РАЗРАБОТКА СОВРЕМЕННОГО МЕТОДА МОНИТОРИНГА  
ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ**

03.01.06 – Биотехнология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

**БИШКЕК – 2023**

Диссертационная работа выполнена в РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» МЗ Республики Казахстан и в Институте биотехнологии НАН Кыргызской Республики.

**Научный  
руководитель:**

**Жунушов Асанкадыр Темирбекович**  
доктор ветеринарных наук, профессор, академик НАН  
КР

**Официальные  
оппоненты:**

**Девришев Давудай Абдулсемедович**  
доктор биологических наук, член-корр. РАН, профессор  
кафедры иммунологии и биотехнологии Московской  
государственной академии ветеринарной медицины и  
биотехнологии - МВА имени К. И. Скрябина

**Серикбаева Асия Демеухановна**  
доктор биологических наук, профессор кафедры  
«Технология и безопасность пищевых продуктов»  
КазНАИУ

**Ведущая  
(оппонирующая)  
организация:**

Всероссийский научно-исследовательский и  
технологический институт биологической  
промышленности (ФГБНУ ВНИТИБП) (Россия,  
Московская обл., г.о. Лосино-Петровский)

Защита диссертации состоится «\_\_»\_\_\_\_\_ 2023 года в 14:00 часов на заседании диссертационного совета Д 03.23.680 по защите диссертаций на соискание ученой степени (доктора) кандидата биологических наук при Институте биотехнологии НАН Кыргызской Республики и Институте горной физиологии и медицины НАН Кыргызской Республики по адресу: 720071, г. Бишкек, пр. Чуй, 265а, 303 ауд. [https://vc.vak.kg/b/d\\_0-hz5-j9k-ng6](https://vc.vak.kg/b/d_0-hz5-j9k-ng6).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Национальной академии наук КР, по адресу: г. Бишкек, пр. Чуй, 265а и на сайте <http://vak.kg>.

Автореферат разослан «\_\_»\_\_\_\_\_ 2023 года

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

Казыбекова А.А.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы диссертации.** Вирус-возбудитель гриппа птиц типа (Influenza virus A) относится к семейству *Orthomixoviridae*, по комплемент связывающему антигену родственен вирусу гриппа А человека и животных, который подразделяют на три серологических типа: А, В и С (Spackman E., 2020; WHO., 2022).

Эта вирусная инфекция поражает все виды пернатых и млекопитающих (Timothy K.W. et al, 2007; Широких К.Е. и соавт., 2015). Международное Эпизоотическое Бюро относит птичий грипп к списку особо опасных трансграничных антропозоонозных (опасных для человека, животных и птиц) болезней (Руководство МЭБ., 2014).

По масштабам распространения и нанесенному экономическому ущербу вирус гриппа птиц типа А намного превосходит все известные аналогичные вспышки данной болезни, когда-либо регистрировавшихся в мире (Kassenov M.M. и соавт., 2010; Patapios A.P. et al, 2022).

В настоящее время отмечается осложнение эпизоотической ситуации по птичьему гриппу во многих странах мира (Кожухметова Т.Е. и соавт., 2021; ВОЗ., 2021). Учитывая географическое расположение территории республики, казахстанские водоемы являются важнейшими в Азии резерватами, производителями водных и околотоводных видов птиц (Кожухметова Т.Е. и соавт., 2021; Нурпейсова А.С., 2020).

По данным Международного эпизоотического бюро на территории Республики Казахстан ежегодно регистрируется грипп птиц типа А, нанося огромный экономический ущерб (Kassenov M.M. и соавт., 2010; Кожухметова Т.Е. и соавт., 2021; Нурпейсова А.С., 2020).

Таким образом, в современном мире ни одно государство с развитой птицеводческой промышленностью не застраховано от внезапного возникновения гриппа птиц. Важность проблемы подчеркивается не только колоссальным экономическим ущербом от данного заболевания, но и потенциально высокой антропогенной опасностью возбудителя (Li Y. et al, 2019).

На сегодняшний день ПЦР-анализ является одной из наиболее распространенных и динамично развивающихся технологий лабораторной диагностики (Fouchier A.M. et al, 2000; Lisa F.P. et al, 2006; Tripathi A. et al, 2021).

В связи с этим, задачей наших исследований являлась разработка тест-системы для выявления вируса гриппа птиц типа А методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) для мониторинга гриппа птиц на территории Республики Казахстан.

**Связь темы диссертации с научными программами (проектами) и основными научно-исследовательскими работами.** Диссертационная работа выполнена в РГП НИИПББ МЗ РК в рамках проектов грантового финансирования АР05132659 «Молекулярно-эпизоотологический мониторинг гриппа птиц в Казахстане» 2018–2020 гг. и программа 0002/ПЦФ-ДСП-21 «Биологическая безопасность Республики Казахстан: оценка угроз, научно-технические основы их предупреждения и ликвидации» на 2021 - 2023 гг.

**Цель исследования.** Разработка диагностической ПЦР тест-системы для мониторинга гриппа птиц на территории Республики Казахстан.

**Задачи исследования:**

1. Разработка ПЦР тест-системы для выявления вируса гриппа птиц;
2. Определение специфичности и чувствительности разработанной ПЦР тест системы. Проведение комиссионных лабораторных испытаний;
3. Мониторинг гриппа птиц на территории Республики Казахстан, выделение вируса и изучение их биологических свойств;
4. Электронно-микроскопический анализ вируса гриппа птиц;
5. Молекулярно-генетический анализ генов гемагглютинина (НА) и нейраминидазы (НА) новых штаммов вируса гриппа птиц в сравнении с данными GenBank.

**Научная новизна работы:**

Впервые с использованием последних достижений молекулярной биологии разработана тест-система для диагностики вируса гриппа птиц типа А методом ПЦР. Разработанная тест-система используется в выявлении РНК вируса гриппа птиц.

Изучены молекулярно-генетические характеристики штаммов вируса гриппа птиц типа А, циркулирующих в Республике Казахстан. В результате проведенных исследований определен эпизоотический статус гриппа птиц в Казахстане.

Собрана и анализирована информация о путях миграций и скоплений как перелетных, так и зимующих птиц на территории Республики Казахстан.

Выделен эпизоотический вирус *А/серая утка/СКО/5/2018* (H3N8), который депонирован в Коллекции микроорганизмов Республиканского государственного предприятия «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» Министерства здравоохранения Республики Казахстан под регистрационным номером М-12-19/D.

Новизна исследований подтверждена 2 патентами на полезную модель, под номерами № 8365 и № 8366 РГП «Национальный институт интеллектуальной собственности» МЮ РК.

**Практическая значимость полученных результатов.** По результатам проведенных исследований разработана чувствительная, специфичная и пригодная к практическому применению тест-система для выявления вируса гриппа птиц типа А методом ПЦР. Оформлена и утверждена нормативно-техническая документация (НТД) на диагностический препарат (тест-система).

Проведены детекции вируса гриппа А с использованием разработанной тест-системы для обнаружения вируса гриппа А методом ПЦР в производственной деятельности НИИПББ и в ПК «Ижевский».

**Экономическая значимость полученных результатов.** Внедрение тест-системы для диагностики вируса гриппа птиц типа А методом ПЦР в практику позволит эффективно и достоверно выявлять вирус гриппа типа А на ранней стадии инфекционного процесса, вследствие чего ставить полноценный диагноз, а также принимать необходимые ветеринарно-санитарные и специфические меры борьбы, значительно сокращающие урон, причиняемый птицеводству страны. Себестоимость 1 набора тест-системы по данной технологии в разы меньше зарубежных аналогов.

**Основные положения диссертации, выносимые на защиту:**

1. Разработка ПЦР тест-системы для выявления вируса гриппа птиц.
2. Определение специфичности и чувствительности разработанной ПЦР тест системы.
3. Мониторинг гриппа птиц на территории Республики Казахстан, выделение вируса и изучение их биологических свойств.
4. Электронно-микроскопический анализ вируса гриппа птиц новых штаммов вируса гриппа птиц.
5. Молекулярно-генетический анализ генов гемагглютинина (НА) и нейраминидазы (NA) новых штаммов вируса гриппа птиц в сравнении с данными GenBank.

**Личный вклад соискателя.** Все разделы диссертационной работы выполнены при личном участии автора.

**Апробация результатов исследований.** Основные материалы диссертации доложены на VI международной научной конференции молодых ученых «OpenBio — 2019» (Россия, Научоград Кольцово, 2019 г.), международной научно-практической конференции «Современные вызовы для биотехнологии, ветеринарии и медицины» РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической - безопасности» (пгт.Гвардейский 2020 г.).

**Полнота отражения результатов диссертации в публикациях.** Результаты исследований опубликованы в 10 научных работах, из них 2 статьи в рецензируемых журналах, индексируемых в базе данных Scopus, 1

статья в Перечне рецензируемых научных изданий, утвержденных президиумом ВАК Кыргызской Республики.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 173 страницах и содержит следующие разделы: Введение, Обзор литературы, Результаты собственных исследований и их обсуждение, Выводы и Приложения. Список использованной литературы включает 209 источников, в том числе 150 работ зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 21 рисунками и 10 таблицами. В 14 приложениях представлены документы, подтверждающие достоверность проведенных исследований.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ**

**Во введении** представлена актуальность работы и необходимость разработки специфичной и чувствительной диагностической ПЦР тест-системы для мониторинга вируса гриппа птиц типа А.

**В главе 1 «Обзор литературы»** представлены и проанализированы отечественные и зарубежные литературные источники по распространению болезни, экономического ущерба, биологические свойства вируса, эпизоотическая ситуация, молекулярно-генетические методы в диагностике вируса гриппа птиц, а также применение ОТ-ПЦР в диагностике вируса гриппа птиц типа А.

**В главе 2 «Материалы и методы исследований»** дана характеристика объектов исследования и методического подхода к выполнению исследований. В работе были использованы эпизоотические штаммы ВГП типа А.

**Объектами исследования являлись** разработанная специфичная, чувствительная тест-система для диагностики вируса гриппа птиц типа А методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и мониторинг гриппа птиц с применением разработанной тест-системы.

### **Предмет исследования.**

1. Выбор и дизайн специфических праймеров на М ген.
2. Оптимизация параметров постановки и компонентов ПЦР тест-системы.
3. Специфичность и чувствительность тест-системы.
4. Мониторинг: анализ биологических материалов от диких и домашних птиц.

**Методы исследования. Выбор и дизайн специфических праймеров** на М ген проводили при помощи компьютерной программы VectorNTI с использованием референтных последовательностей М гена вируса гриппа птиц типа А. Синтез целевых праймеров проводили на синтезаторе олигонуклеотидов Synthesizer H-16 согласно инструкции производителя.

Очистку проводили путем переосаждения этиловым спиртом в присутствии ацетата натрия. Олигонуклеотиды ресуспендировали в дистиллированной воде, определяли концентрацию. Готовили растворы олигонуклеотидов с рабочими концентрациями 20 пкм.

**Выделение нуклеиновой кислоты** проводили с использованием тризоля.

**Для синтеза кДНК** был разработан и использован набор реагентов, который включал следующие растворы: ОТ-смесь 1, ОТ-смесь 2 (0,03 см<sup>3</sup>): 20 пкм праймер Uni12 для синтеза кДНК вируса гриппа, Ревертаза (М-MLV) (0,03 мл): 200 е.а./мкл.

Синтез кДНК проводили в микроцентрифужных пробирках 0,2 см<sup>3</sup>.

**Детекцию продуктов амплификации в агарозном геле** проводили методом горизонтального электрофореза.

**Определение специфичности тест-системы** проводили методом ОТ-ПЦР. Для оценки специфичности использовали штаммы и изоляты вирусов – возбудителей инфекционных заболеваний птиц. Тест-система при выявлении РНК вируса гриппа А не должна выявлять РНК других видов вирусов и других гетерологичных видов вирусов.

Контроль специфичности тест-системы проводили с использованием специфических положительных контролей - плазмидные ДНК, содержащие фрагмент гена М вируса гриппа.

**Определение чувствительности тест-системы** проводили методом ОТ-ПЦР. Для оценки чувствительности тест-системы использовали десятикратные разведения вируса гриппа А с исходной активностью 5,0 lg ЭИД<sub>50</sub>/мл. В результате тест-система должна амплифицировать РНК вируса гриппа А (ВГА) с титром 5,0 lg ЭИД<sub>50</sub>/мл в разведений  $1 \times 10^{-2}$ . Для оценки специфичности использовали штаммы и изоляты вирусов – возбудителей инфекционных заболеваний птиц. Тест-система при выявлении РНК вируса гриппа А не должна выявлять РНК других видов вирусов и других гетерологичных видов вирусов.

**Для проведения молекулярно-биологических и вирусологических исследований** от птиц отбирали трахеальные и клоачные смывы. Отбор проб проводили в соответствии с руководством FAO по отбору проб для гриппа.

**В главе 3 представлены результаты собственных исследований.**

**3.1 Разработка ПЦР тест-системы для выявления вируса гриппа птиц.** Дизайн и синтез праймеров для постановки ОТ-ПЦР. В ходе экспериментов были подобраны 5 пар специфических праймеров для выявления вируса гриппа А. После первичной постановки ПЦР с полученными праймерами, результаты наработки ПЦР-продукта были достигнуты с использованием праймеров №1 - InfA\_780\_1F – ACT GGG CAC

GGT GAG CGT GA, (прямой) и InfA\_944\_1R – CCC GTC AGG CCC CCT CAA AGC (обратный) для выявления вируса гриппа А. Размер покрытия праймеров составляет 164 пар оснований (п.о.).

Оптимизация параметров постановки и компонентов ПЦР тест-системы. Реакция проводилась в два этапа. Первым этапом была наработана кДНК с использованием универсальных праймеров Uni-12 в концентрации 20 пкм. Реакционная смесь состояла из ОТ-смеси с добавлением ревертазы и тотальной РНК вируса гриппа птиц А. Реакционную смесь инкубировали в амплификаторе при 420С в течение 1 часа, далее температуру повышали до 650С и инкубировали еще 20 минут. Охлаждали до 40С.

Полученная кДНК была непосредственно сразу же использована для постановки ПЦР и ее оптимизации для наработки ПЦР-продуктов с кДНК.

Были сравнены разные температуры отжига праймеров, также различные концентрации компонентов реакционной смеси ПЦР.

Выбор температурного режима. Температура отжига праймеров является основным фактором, повышающим специфичность продуктов, при проведении ПЦР. У праймеров двух белков разная концентрация ГЦ связей, соответственно разная температура отжига праймеров. Для выбора оптимальной температуры отжига были выбраны следующие градусы: 50<sup>0</sup>С, 52<sup>0</sup>С, 54<sup>0</sup>С, 55<sup>0</sup>С, 57<sup>0</sup>С, 59<sup>0</sup>С, 61<sup>0</sup>С, 63<sup>0</sup>С. Для дальнейших постановок ПЦР выбрана температура – 55 <sup>0</sup>С, которые приведены на Рис. 1.

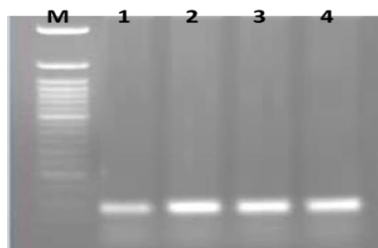


М – 1kb маркер, Qiagen;  
ок – отрицательный контроль;  
1 – 50 <sup>0</sup>С;  
2 – 52 <sup>0</sup>С;  
3 – 54 <sup>0</sup>С;  
4 – 55 <sup>0</sup>С;  
5 – 57 <sup>0</sup>С;  
6 – 59 <sup>0</sup>С;  
7 – 61 <sup>0</sup>С;  
8 – 63 <sup>0</sup>С

Рис. 1. Амплификация при различных температурах отжига

Оптимизация концентрации смеси dNTP. Также провели ПЦР для определения оптимального расхода dNTP на одну реакцию. Как видно из электрофореграммы, различные концентрации смеси dNTP в пределах 5-20 мМ влияют на выход ПЦР-продукта. Для дальнейших постановок ПЦР в реакционной смеси использовали 10 мМ смеси dNTP, которые приведены на Рис. 2.

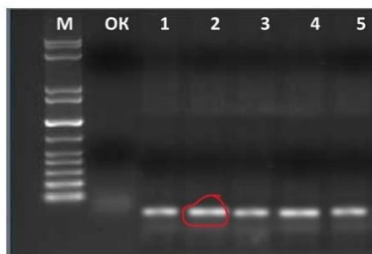




М - 1kb маркер, Qiagen;  
 1 – 5 mM дНТФ,  
 2 – 10 mM дНТФ,  
 3 – 15 mM дНТФ,  
 4 – 20 mM дНТФ

Рис. 2. Амплификация при различных концентрациях dNTP

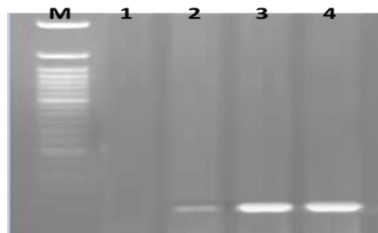
Оптимизация концентрации Taq ДНК-полимеразы. Фермент ДНК-полимераза играет основную роль при проведении ПЦР. Концентрация Taq ДНК-полимеразы влияет на выход конечного продукта (целевого гена). Для сравнения использовались 0.25, 0,5, 1, 1,5 и 2 мкл ДНК-полимеразы, содержащую в составе  $MgCl_2$ . Как видно, все единицы ДНК-полимеразы активные по отношению выхода продукта. Учитывая ее стоимость, для дальнейших работ выбрано 0.5 ед концентрации ДНК-полимеразы, которые приведены на Рис. 3.



М – 1kb маркер, Qiagen;  
 1 – 0,25ед;  
 2 – 0,5 ед;  
 3 – 1 ед;  
 4 – 1,5 ед;  
 5 – 2 ед.

Рис. 3. Амплификация при различных концентрации Taq ДНК полимеразы

Для выбора концентрации праймера были использованы 5, 10 и 20 пкм концентрации праймеров. Как видно, достаточно праймеров в концентрации 10 пкм для наработки продукта, которые приведены на Рис. 4.



М - 1kb маркер, Qiagen;  
 1 – отрицательный контроль;  
 2 – 5 пкм;  
 3 - 10 пкм;  
 4 –20 пкм.

Рис. 4. Амплификация при различных концентрациях праймеров

**3.2 Определение специфичности и чувствительности разработанной ПЦР тест системы.** Для проведения исследований по оценке специфичности тест-системы использовали вирусы: штамм *A/grey duck/ Nort-Kazakhstan/5/2018 (H3N8)*, штамм *A/Greylag goose/Nort-Kazakhstan/62/2019 (H3N8)*, штамм *В/Санкт-Петербург/30/09*, линия *В(V)*, штамм *С/Улан-Уде/34/86*, штамм “*Майкудукский*” (вирус ИЛТ). В качестве отрицательного контроля использован деионизированная вода. Полученные результаты представлены на Рис. 5.

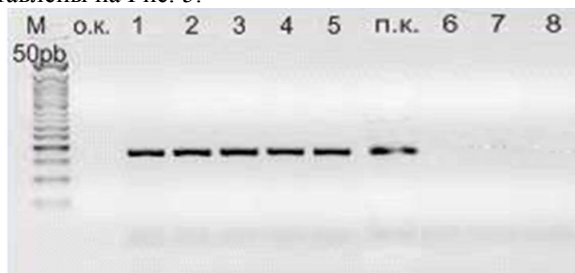


Рис. 5. Определение специфичности ОТ-ПЦР анализа с использованием вируса гриппа птиц.

Примечание: М – Маркер 50 bp, BioLabs; о.к. – отрицательный контроль, деионизированная вода; п.к. – положительный контроль: кДНК вируса гриппа типа А; (1-5) – РНК пробы вируса гриппа типа А: 1 – штамм *A/grey duck/ Nort-Kazakhstan/5/2018 (H3N8)*; 2 – штамм *A/утка/Калифорния/72 (H3N8)*; 3 – штамм *А/чирок трескунок/Коргалжын/865/04 (H3N6)*; 4 – штамм *A/Greylag goose/Nort-Kazakhstan/62/2019 (H3N8)*; 5 – штамм. *А/чирок свистунок/Коргалжын/1797/06 (H3N8)*; 6 – штамм *В/Санкт-Петербург/30/09*, линия *В(V)*; 7 – штамм *С/Улан-Уде/34/86*; 8 – штамм *Майкудукский* вируса ИЛТ.

Подобранная и синтезированная пара праймеров *InfA\_780\_1F* и *InfA\_944\_1R* пригодна для идентификации вируса гриппа птиц и специфична для данной инфекции. Размер полученных фрагментов при гриппе А соответствовал расчетному значению 164 п.о. Отрицательные результаты были получены при использовании штаммов, не относящиеся к гриппу типа А, т.е. штамм *В/Санкт-Петербург/30/09*, линия *В(V)* вируса гриппа В, штамм *С/Улан-Уде/34/86* к типу С, штамм *Майкудукский* вируса ИЛТ.

При определении специфичности ОТ-ПЦР тест-системы для диагностики гриппа птиц выявлено, что во всех пробах, содержащих РНК вируса гриппа А нарабатывались специфические ПЦР продукты реакции размером 164 п.о. Отрицательные результаты были получены при использовании вирусов гриппа типа В, штамм *В/Санкт-Петербург/30/09*, линия *В(V)*; штамма *С/Улан-Уде/34/86*. Также отрицательный результат был получен при использовании ДНК штамма *Майкудукский* вируса ИЛТ,

вызывающий респираторное заболевание. Отсутствие каких-либо продуктов амплификации наблюдается и в деионизированной воде (ОК - отрицательный контроль).

Как видно из рис. 5, разработанная тест-система специфически выявляет вирусы гриппа типа А. При использовании в качестве матрицы РНК/ДНК других вирусов продукты амплификации не образуются.

Таким образом, была определена специфичность разработанной опытной серии тест-системы для лабораторной диагностики гриппа типа А методом ОТ-ПЦР, путем амплификации вирусов гриппа птиц и других вирусов птиц. В результате наработан ПЦР продукт в образцах вируса гриппа типа А, а в остальных пробах не нарабатывался продукт, что показывает специфичность тест-системы.

При определении чувствительности ОТ-ПЦР тест-системы использованы отработанные оптимальные температурно-временные условия реакции и были взяты 10-кратные разведения РНК вирусов гриппа А от 100 нг ( $1 \times 10^8$  копий РНК) до 0,01 пг ( $1 \times 10$  копий РНК). Полученные результаты представлены на Рис. 6.

Для испытания использована РНК штамма *A/grey duck/ Nort-Kazakhstan/5/2018 (H3N8)* вируса гриппа птиц в следующих разведениях 1:10; 1:100; 1:1000; 1:10 000; 1:100 000; 1: 1 000 000; 1: 10 000 000; 1: 10 000 0000 (Рис. 6.).

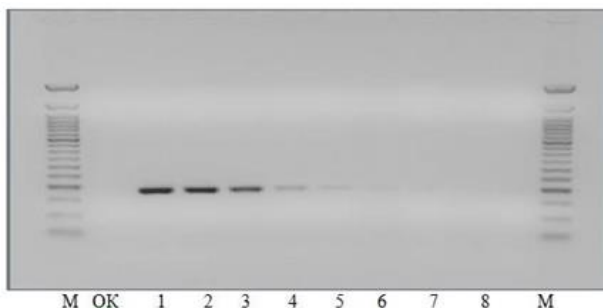


Рис. 6. – Определение чувствительности ОТ-ПЦР тест-системы для диагностики вируса гриппа птиц.

Примечание: М – Маркер 50 bp, BioLabs; 1 – РНК  $1 \times 10^8$  нг; 2 – РНК  $1 \times 10^7$  нг; 3 – РНК  $1 \times 10^6$ ; 4 – РНК  $1 \times 10^5$ ; 5 – РНК  $1 \times 10^4$ ; 6 – РНК  $1 \times 10^3$ ; 7 – РНК  $1 \times 10^2$ ; 8 – РНК  $1 \times 10$ .

Как показали исследования, порог чувствительности тест-системы составляет  $1 \times 10^2$  копий РНК вирусов в пробе. Данный метод постановки ПЦР при выявлении вируса гриппа типа А позволяет проводить диагностику вируса при содержании в исследуемом материале  $1 \times 10^2$  копий геномной

вирусной РНК, это говорит о том, что отработанный метод ПЦР обладает высокой чувствительностью.

**3.3 Мониторинг гриппа птиц на территории Республики Казахстан, выделение вируса и изучение их биологических свойств.** Через территорию Казахстана проходят 4 смешанных пути миграции птиц: восточноафриканский-евразийский, центральноазиатский-индийский, восточноазиатский-австралийский и западно-тихоокеанский. Наибольшее значение имеют центральноазиатский-индийский и восточноазиатский-австралийский пути миграции.

В рамках диссертационной работы был проведен сезонный мониторинг околотовдных птиц на Сорбулакском озере (Илийский район Алматинская обл), на орнитологической станции «Шакпак» в Жамбылской области, также проведен мониторинг гриппа птиц среди водоплавающих и околотовдных птиц озер Северо-Казахстанской области. Собраны пробы от 135 голов домашних птиц в виде клоачных смывов.

Анализ биологических образцов, отобранных от птиц, посредством разработанной ПЦР тест-системы для мониторинга. Полевые пробы от диких и домашних птиц были анализированы посредством метода ОТ-ПЦР. В результате проведенных исследований биологических материалов от птиц, собранных в весенний период 2018 года в 7 пробах, был выявлен вирус гриппа типа А. Результаты лабораторного анализа представлены в Табл. 1.

По результатам исследования вирус гриппа типа А идентифицирован в пробах от серой утки (*Anas strepera*), кряквы (*Anas platyrhynchos*), чирка свистунка (*Anas crecca*), широконоски (*Anas clypeata*), чирка-трескунка (*Anas querquedula*), серого гуся (*Greylag goose*), лысухи (*Fulica atra*) из мелких озер Северо-Казахстанской области. В 8,5 % случаев в исследованных пробах от птиц идентифицирован вирус гриппа типа А.

В дальнейшем были выделены изоляты вируса гриппа птиц от диких птиц серая утка (*Anas strepera*) и от серого гуся (*Greylag goose*) путем последовательных пассажей в РКЭ 10 суточного возраста. Вирусы агглютинируют эритроциты петуха. Гемагглютинирующая активность составила 1:64. Выделенный вирус гриппа птиц репродуцируется в РКЭ 10-суточного возраста при заражении в аллантоисную полость эмбриона в объеме 0,2 см<sup>3</sup> и температуре инкубирования (37±0,5)°C с относительной влажности воздуха 60% в течение 72 час.

**Таблица 1 – Результаты ОТ-ПЦР анализа на грипп типа А проб собранных в весенний период 2018 года**

Рег. г. №	Вид птицы	Место взятия пробы	Местополо- жение	ОТ-ПЦР анализ на грипп типа А
1	2	3	4	5
12	Испанский воробей ( <i>Passer hispaniolensis</i> )	орнитологическая станция "Шакпак" (Жамбылская обл.)	N42° 57,095 E070° 64,366	+
21	Садовая камышевка ( <i>Acrocephalus dumetorum</i> )	озеро Сорбулак (Илийский район Алматинская обл.)	N43° 66,766 E076° 52,453	+
28	Садовая камышевка ( <i>Acrocephalus dumetorum</i> )	озеро Сорбулак (Илийский район Алматинская обл.)	N43° 66,766 E076° 52,453	+
30	Садовая камышевка ( <i>Acrocephalus dumetorum</i> )	озеро Сорбулак (Илийский район Алматинская обл.)	N43° 66,766 E076° 52,453	+
31	Садовая камышевка ( <i>Acrocephalus dumetorum</i> )	озеро Сорбулак (Илийский район Алматинская обл.)	N43° 66,766 E076° 52,453	+
34	Садовая камышевка ( <i>Acrocephalus dumetorum</i> )	озеро Сорбулак (Илийский район Алматинская обл.)	N43° 66,766 E076° 52,453	+
36	Садовая камышевка ( <i>Acrocephalus dumetorum</i> )	озеро Сорбулак (Илийский район Алматинская обл.)	N43° 66,766 E076° 52,453	+

По результатам исследования наибольшее количество вирусов гриппа типа А идентифицировано в пробах от садовой камышевки (*Acrocephalus dumetorum*) из Сорбулакского озера Алматинской области. В 17 % случаев в исследованных пробах от садовой камышевки идентифицирован вирус гриппа типа А.

В осенний период 2018 года для лабораторных исследований были доставлены 90 проб клоачных смывов от диких птиц из Северо-Казахстанской области и 80 проб клоачных смывов от домашних птиц Алматинской области. Для обнаружения вируса гриппа типа А в клоачных смывах использовали ОТ-ПЦР.

В результате проведенных исследований биологических материалов от диких птиц, собранных в осенний период 2018 года в 8 пробах, был выявлен вирус гриппа типа А. Результаты представлены в Табл. 2.

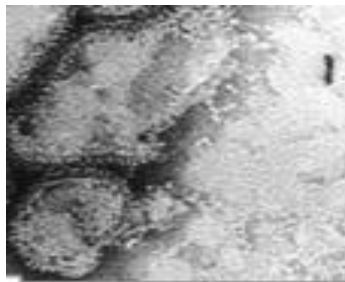
**Таблица 2 – Результаты ОТ-ПЦР анализа на грипп типа А проб, собранных в осенний период 2018 год**

Рег. №	Вид птицы	Место взятия пробы	Координаты	ОТ-ПЦР на ВГП типа А
1	2	3	4	5
5	Серая утка ( <i>Anas strepera</i> )	Озеро Алуа, п. Явленка, Есильский район, Северо-Казахстанская область	54°22' 50,6" 68°17' 06,6"	+
8	Кряква ( <i>Anas platyrhynchos</i> )	Озеро Алуа, п. Явленка, Есильский район, Северо-Казахстанская область	54°22' 50,6" 68°17' 06,6"	+
9	Чирок свистунок ( <i>Anas crecca</i> )	Озеро Алуа, п. Явленка, Есильский район, Северо-Казахстанская область	54°22' 50,6" 68°17' 06,6"	+
13	Кряква ( <i>Anas platyrhynchos</i> )	Озеро Алуа, п. Явленка, Есильский район, Северо-Казахстанская область	54°22' 50,6" 68°17' 06,6"	+
20	Широконоска ( <i>Anas clypeata</i> )	Озеро Алуа, п. Явленка, Есильский район, Северо-Казахстанская область	54°22' 50,6" 68°17' 06,6"	+
45	Чирок-трескунок ( <i>Anas querquedula</i> )	Озеро Займище, Пресновка, Жамбылский район, Северо-Казахстанская область	54°42' 40,6" 67°20' 50,6"	+
62	Серый гусь ( <i>Greylag goose</i> )	Озеро Займище, Пресновка, Жамбылский район, Северо-Казахстанская область	54°42' 40,6" 67°20' 50,6"	+
59	Лысуха ( <i>Fulica atra</i> )	Озеро Займище, Пресновка, Жамбылский район, Северо-Казахстанская область	54°42' 40,6" 67°20' 50,6"	+

**3.4 Электронно-микроскопический анализ положительных проб на ВГП типа А.** Для подтверждения полученных результатов положительные на грипп птиц пробы - № 5 (озеро Алуа, Северо-Казахстанской обл.) и № 62 (озеро Займище, Северо-Казахстанской обл.) дополнительно подверглись электронно-микроскопическим исследованиям (Рис.7.).



Вирусосодержащий материал № 62 от серого гуся (*Greylag goose*), озеро Займище, п. Пресновка, Жамбылский район, Северо-Казахстанская область



Вирусосодержащий материал № 5 от Серой утки (*Anas strepera*), озеро Алуа, п. Явленко, Северо-Казахстанская область

Рис. 7. – Электронные микрофотографии биопроб ВГП типа А.

В вирусосодержащих материалах № 5 и № 62 были обнаружены вирусные частицы округлой и удлинённой формы размерами от 80 до 200 нм, поверхность вирионов покрыты шипиками длиной 7-9 нм, что полностью совпадает с описанием вируса гриппа в научной литературе.

### **3.5 Молекулярно-генетический анализ генов гемагглютинаина (HA) и нейраминидазы (NA) новых штаммов вируса гриппа птиц в сравнении с данными GenBank.**

**Сравнительный анализ нуклеотидной последовательности поверхностных генов различных штаммов вируса гриппа птиц.** Проведено секвенирование и определена первичная нуклеотидная последовательность генов HA и NA 2 изолятов вируса гриппа птиц подтипа H3N8 из ПЦР положительных проб. Установленные нуклеотидные последовательности генов HA и NA казахстанских изолятов ВГА депонированы в электронную международную базу данных GenBank: *A/grey duck/North-Kazakhstan/5/2018(H3N8)* - HA (MN945305), NA (MN945306); *A/greylag goose/North-Kazakhstan/62/2018(H3N8)* - HA (MN945304), NA (MN945303).

**Филогенетический анализ генов HA и NA новых штаммов ВГП, выделенных в Казахстане с данными GenBank.** Определение генетических вариаций посредством сравнения поверхностных генов вируса гриппа птиц с другими штаммами вируса гриппа птиц, находящимися в базе данных генетического банка.

Филогенетический анализ по генам HA показал, что казахстанские изоляты вируса гриппа птиц подтипа H3N8 входят в группы азиатских и европейских вирусов. Отличия нуклеотидных последовательностей

гемагглютинация между казахстанскими представителями вируса гриппа птиц подтипа H3N8 этих двух генетических линий достигают значений 5,75 %.

Анализ нуклеотидных последовательностей нейраминидазы показал, что казахстанские изоляты ВГА H3N8, выделенные от диких птиц, относятся к Евроазиатской эволюционной ветви. Выделенные изоляты входят в один субклайд с вирусами, выделенными в Монголии в 2010, 2011, 2015, 2018 гг., Швеции в 2013 г. и Норвегии в 2003 г. Оценка эволюционной дивергенции показала, что выборки из популяций казахстанских изолятов ВГА H3N8 дистанцируются от Азиатских и Европейских штаммов представленных в GenBank.

**Оценка генетической связи штаммов ВГА/H3N8.** Проведена оценка эволюционной дивергенции между последовательностями казахстанских штаммов и данными GenBank в программе MEGA7.0. Анализированы количество базовых различий между нуклеотидными последовательностями казахстанских штаммов ВГА/H3N8 и Азиатских, Европейских штаммов из GenBank.

Выделенные штаммы ВГА/H3N8 и штаммы Евроазиатской генетической ветки также продемонстрировали филогенетическую близость по нуклеотидным последовательностям нейраминидазы. При этом генетическая дистанция между казахстанскими штаммами ВГА/H3N8 и самым близким азиатским штаммом A/duck/Mongolia/566/2018(H3N8) MK978954 составила  $D \geq 0.015$ . Казахстанские штаммы дистанцируются от европейских штаммов, как A/mallard/Sweden/141811/2013 (H3N8) KT725427 со значением  $D \geq 0.027$ .

Во время сезонных миграций дикие птицы, являющиеся естественным резервуаром вируса гриппа птиц в природе, способны переносить вирус на значительные расстояния.

Одновременная циркуляция азиатской и европейской двух генетических линий ВГА/H3N8 у диких птиц в одной местности обусловлена занесением их из разных географических мест. Генетические расстояния, выявленные с помощью нуклеотидных последовательностей поверхностных генов ВГА/H3N8, показывают, что казахстанские штаммы дистанцируются от Азиатских и Европейских штаммов ВГА/H3N8 и образуют отдельную ветвь, отличающуюся от прототипных штаммов.

## **ВЫВОДЫ**

1. Разработано 6 опытных серий тест-системы для обнаружения вируса гриппа типа А методом ПЦР. Для этого были сконструированы и синтезированы специфические олигонуклеотидные праймеры: InfA\_780\_1F – АСТ GGG CAC GGT GAG CGT GA, InfA\_944\_1R – CCC GTC AGG CCC CCT CAA AGC на М ген с размером амплифицированного продукта 164 п.о.



Оптимизированы параметры постановки ОТ-ПЦР. Температура отжига – 55 °С. Определен оптимальный расход смеси dNTP на одну реакцию – 10 мМ. Концентрация ДНК-полимеразы составляет – 0,5 мкл. Для наработки продукта достаточно праймеров в концентрации 10 пкм.

2. Определены специфичность и чувствительность тест-системы. Разработанная тест-система для обнаружения вируса гриппа А методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в биоматериале от птиц (смывы со слизистых оболочек), сыворотке крови и в инфицированных культурах клеток является специфичной и чувствительной. Размер полученных фрагментов при гриппе А соответствует расчетному значению 164 п.о. Порог чувствительности тест-системы составляет  $1 \times 10^2$  копий РНК вирусов в пробе.

Проведены комиссионные лабораторные испытания по проверке специфичности и чувствительности тест-системы. По результатам комиссионных испытаний тест-системы составлен Акт и протокол. Разработана нормативно-техническая документация.

3. Проведены мониторинговые исследования основных путей миграции перелетных птиц на территории Казахстана. Собранные пробы от диких и домашних птиц исследованы с применением разработанной тест-системы. Штамм *A/серая утка/СКО/5/2018* (H3N8), паспортизирован и депонирован в лаборатории «Коллекция микроорганизмов» НИИПББ. Результаты мониторинга визуализированы на электронной карте посредством ГИС-технологий.

4. Проведен электронно-микроскопический анализ вирусов гриппа птиц, который показал положительные результаты при постановке ПЦР на наличие М гена ВГП А. Во всех пробах были обнаружены вирусные частицы округлой и удлинённой формы размером от 80 до 200 нм, поверхность вирионов покрыты шипиками длиной 7-9 нм, что полностью совпадает с описанием вируса гриппа в научной литературе.

5. Проведен молекулярно-генетический анализ генов гемагглютинина (НА) и нейраминидазы (НА) новых штаммов вируса гриппа птиц в сравнении с данными GenBank. В результате была секвенирована и определена первичная нуклеотидная последовательность генов НА и НА изолятов вируса гриппа птиц подтипа H3N8, и депонированы в базу данных GenBank следующие последовательности: *A/grey duck/North-Kazakhstan/5/2018(H3N8)* - НА (MN945305), НА (MN945306); *A/greylag goose/North-Kazakhstan/62/2018(H3N8)* - НА (MN945304), НА (MN945303). Также проанализированы изменения в генетической структуре НА и НА, обеих штаммов и их филогенетической принадлежности. Одновременная циркуляция азиатской и европейской двух генетических линий ВГА H3N8 у

диких птиц в одной местности обусловлена занесением их из разных географических мест. Генетические расстояния, выявленные с помощью нуклеотидных последовательностей поверхностных генов ВГА H3N8, показывают, что казахстанские изоляты дистанцируются от Азиатских и Европейских штаммов ВГА H3N8 и образуют отдельную ветвь, отличающуюся от прототипных штаммов. Возможно, данные казахстанские изоляты являются новыми вариантами вируса гриппа А H3N8.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

Изготовленную ПЦР тест-систему предлагается использовать в ветеринарной биотехнологии для мониторинга и выявления вируса гриппа типа А среди диких и домашних птиц.

Разработан и утвержден в установленном порядке комплект НТД на тест-систему, включающий:

- Стандарт организации на тест-систему СТ 405-1919-04 ГП-134-2023 Тест-система для обнаружения вируса гриппа А методом полимеразной цепной реакции (ПЦР);
- Временная инструкция по изготовлению и контролю тест-системы для обнаружения вируса гриппа А методом полимеразной цепной реакции (ПЦР);
- Наставление по применению тест-системы для обнаружения вируса гриппа А методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:**

1. Джекебеков, К.К. Разработка тест-системы для лабораторной диагностики гриппа А методом полимеразной цепной реакции [Текст] / Джекебеков К.К., Акылбаева К.К., Тайлакова Э.Т., Садикалиева С.О., Бурашев Е.Д., Жунушов А.Т., Касенов М.М., Султанкулова К. Т. // Материалы VI Международной конференции молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов -Новосибирск Научоград Кольцово. - 2019. - С. 68-69. [https://openbio.ru/openbio\\_tezis\\_2019.pdf](https://openbio.ru/openbio_tezis_2019.pdf).
2. Джекебеков, К.К. Complete Coding Genome Sequence of an Avian Influenza A/H3N8 Virus Strain Detected in North Kazakhstan in 2018 [Text] / K. Sultankulova, M. Orynbayev, N. Kozhabergenov, K. Akylbayeva, A. Melisbek, K. Jekebekov, A. Zhunushov, K. Zakarya, Y. // J. Microbiol Resour Announc. – 2020. – Vol.9 Issue 29 e00441-20. doi: 10.1128/MRA.00441-20. <https://journals.asm.org/doi/10.1128/MRA.00441-20>.
3. Джекебеков, К.К. Молекулярно-генетический анализ новых изолятов вируса гриппа птиц субтипа H3N8, выделенных в северных регионах

Казахстана [Текст] / Султанкулова К.Т., Акылбаева К.К., Джекебеков К.К., Жунушов А.Т., Мелисбек А.М., Зубань И.А., Орынбаев М.Б., Закарья К.Д. // Вестник КазНУ, серия биологическая. – 2020. - №1(82). - С.120-132. <https://bb.kaznu.kz/index.php/biology/issue/view/77/ISSN%201563-0218>.

4. Джекебеков, К.К. Генетическое разнообразие штаммов вируса гриппа птиц А/Н3N8 [Текст] / Джекебеков К.К., Акылбаева К.К., Мелисбек А.М., Жунушов А.Т., Бурашев Е.Д., Орынбаев М.Б., Султанкулова К.Т. // Вестник КазНУ, серия биологическая. – 2020. - №4(85). - С. 86-95. <https://bb.kaznu.kz/index.php/biology/article/view/1548/1431>.

5. Джекебеков, К.К. Конструирование праймеров для выявления вируса гриппа птиц [Текст] / Джекебеков К.К., Акылбаева К.К., Садикалиева С.О., Бурашев Е.Д., Жунушов А.Т., Султанкулова К.Т. // материалы Международной научно-практической конференции «Современные вызовы для биотехнологии, ветеринарии и медицины» -пгт. Гвардейский. - 2020. – С. 162-165. <https://www.biosafety.kz/wp-content/uploads/2020/06/%D0%A1%D0%91%D0%9E%D0%A0%D0%9D%D0%98%D0%9A-%D0%9C%D0%90%D0%A2%D0%95%D0%A0%D0%98%D0%90%D0%9B%D0%9E%D0%92>.

6. Джекебеков, К.К. Evidence for flock transmission of individual subtypes and strains of avian influenza viruses: A monitoring study of wild birds in Kazakhstan [Text] / K. T. Sultankulova, K. K. Dzhekebekov, M. B. Orynbayev, Y. D. Burashev, A. M. Melisbek, S. M. Barmak, N. S. Kozhabergenov, A. U. Issabek, O. V. Chervyakova, A. M. Namet, K. D. Zakarya, S. Fereidouni // J.Virus Research – 2022. -№320. DOI: 10.1016/j.virusres.2022.198898. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35995240/>.

7. Джекебеков, К.К. ОТ-ПЦР тест-система для диагностики вируса гриппа птиц [Текст] / Джекебеков К.К., Жунушов А.Т., Элина Жакыт кызы, Шыныбекова Г.О., Арай Куралбек кызы, Наханов А. К. // Известия НАН КР. - 2023. - №2. – С. 40-50. <https://ilim.naskr.kg/index.php/main/issue/view/39/41>.

8. Джекебеков, К.К. Биологические и морфологические характеристики штамма А/Серая утка/СКО/5/2018 (H3N8) вируса гриппа птиц, выделенного в Казахстане [Текст] / К. Джекебеков, М. Орынбаев, Н. Кожабергенов, А. Жунушов, Э. Калимолда, К. Султанкулова // Международная научно-практическая конференция «Биотехнология и биологическая безопасность: достижения и перспективы развития», посвященная 65-летию Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности (бывший НИСХИ)» - 2023. - С. 38-39. <https://biosafety.kz/%d1%82%d0%b5%d0%b7%d0%b8%d1%81%d1%8b/>.

9. Джекебеков, К.К. «Тест-система для обнаружения вируса гриппа А методом полимеразной цепной реакции» [Текст] / Джекебеков К.К., Абдураимов Е.О., Орынбаев М.Б., Султанкулова К.Т., Шораева К.А.,

Кожабергенов Н.С., Шыныбекова Г.О. // Пат. на полезную модель № 8365. – 2023. – пер. №2023/0459.2. [http://ebulletin.kazpatent.kz/#/bulletin?timestamp=2023-08-18&bull\\_num=33&data\\_source=bulletin&language=ru](http://ebulletin.kazpatent.kz/#/bulletin?timestamp=2023-08-18&bull_num=33&data_source=bulletin&language=ru)

10. Джекебеков, К.К. «Эпизоотический штамм А/серая утка/СКО/5/2018(Н3N8) вируса гриппа птиц, предназначенный для производства диагностических, профилактических препаратов против гриппа птиц подтипа Н3N8 и изучения биологии вируса» [Текст] / Джекебеков К.К., Орынбаев М.Б., Султанкулова К.Т., Керимбаев А.А., Копеев С.К., Бурашев Е.Д., Акылбава К.К., Исабек А.У., Мелисбек А.М. // Пат. на полезную модель № 8366. – 2023. - пер. №2023/0641.2. [http://ebulletin.kazpatent.kz/#/bulletin?timestamp=2023-08-18&bull\\_num=33&data\\_source=bulletin&language=ru](http://ebulletin.kazpatent.kz/#/bulletin?timestamp=2023-08-18&bull_num=33&data_source=bulletin&language=ru)

**Джекебеков Куаныш Кайратовичтин «Канаттуулар тумоосунун вирусна мониторинг жүргүзүүнүн заманбап методун иштеп чыгуу» темасында 03.01.06 – Биотехнология адистиги боюнча биологиялык илимдердин кандидаты окумуштуулук даражасын изденип алуу үчүн жазылган диссертациясынын**

## **РЕЗЮМЕСИ**

**Негизги сөздөр:** канаттуулардын тумоосу, тест системасы, диагностика, өзгөчөлүк, сезгичтик, мониторинг, вирус, штамм.

**Изилдөөнүн объектиси:** канаттуулар тумоосунун А тибиндеги вирусна, канаттуулар тумоосу вирусна, жапайы жана үй канаттууларына мониторинг жүргүзүү үчүн диагностикалык ПЦР тест системасы иштелип чыккан.

**Изилдөөнүн предмети:** М гени үчүн спецификалык праймерлерди тандоо жана долбоорлоо, ПЦР тест системасынын формулалык параметрлерин жана компоненттерин оптималдаштыруу, тесттик системанын өзгөчөлүгү жана сезгичтиги.

**Иштин максаты:** Казакстан Республикасынын аймагында канаттуулар тумоосуна мониторинг жүргүзүү үчүн диагностикалык ПЦР тест системасын иштеп чыгуу.

**Изилдөөнүн ыкмалары:** молекулярдык генетикалык, вирусологиялык, биотехнологиялык.

**Алынган натыйжалар жана илимий жаңылыгы:** Казакстанда биринчи жолу молекулярдык биологиянын акыркы жетишкендиктерин пайдалануу менен канаттуулар тумоосунун А тибиндеги вирусун ПЦР методу менен диагностикалоонун тесттик системасы иштелип чыкты.

Казакстандын эпидемиялык маанидеги аймактарынан канаттуулардан алынган биологиялык материалдар иштелип чыккан тесттик системанын

жардамы менен чогултулуп, талдоого алынган, анын натыйжасында А/боз өрдөк/Түндүк-Казакстан/5/2018(H3N8) жана А/боз каз/Түндүк жаңы штаммдары табылган. аныкталган жана изоляцияланган - Казакстан/62/2018(H3N8).

AIV изоляциясы электрондук микроскопиянын (ЭМ) натыйжалары менен тастыкталды, анда өлчөмү 80ден 200 нмге чейин тегеректелген жана узун вирустук бөлүкчөлөр табылган; вириондордун бети 7-9 нм узундуктагы тикенектер менен капталган, алар илимий адабияттардагы грипп вирусунун сүрөттөлүшү менен толук дал келет.

Секвенирлөө жолу менен AIV субтипинин H3N8 изоляттарынын HA жана NA гендердин негизги нуклеотиддик ырааттуулугу аныкталып, GenBank маалымат базасына төмөнкү ырааттуулуктар сакталган: A/grey duck/North-Kazakhstan/5/2018(H3N8) - HA ( MN945305), NA (MN945306); - HA (MN945304), NA (MN945303). ГА жана HA эки штаммдын генетикалык структурасындагы өзгөрүүлөр анализденип, алардын филогенетикалык тиешелүүлүгү аныкталган. Жапайы канаттууларда AIV тибиндеги H3N8 эки азиялык жана европалык эки генетикалык линиясынын бир аймакта бир убакта айлануусу алардын ар кайсы географиялык жерлерден интродукцияланышы менен шартталган. Жер үстүндөгү гендердин нуклеотиддик ырааттуулугун пайдалануу менен аныкталган генетикалык аралыктар Казакстан изоляциясынын AIV типтеги H3N8 азиялык жана европалык штаммдарынан алыстап, прототип штаммдарынан айырмаланган өзүнчө бутагы түзөрүн көрсөтүп турат. Бул казакстандык изоляттар H3N8 гриппинин жаңы варианттары болушу мүмкүн.

**Колдонуу боюнча сунуштар:** Канаттуулар тумоосунун А тибиндеги вирусун ПТР ыкмасы менен диагностикалоо үчүн тесттик системаны ишке ашыруу инфекциялык процесстин алгачкы стадиясында А тибиндеги грипптин вирусун натыйжалуу жана ишенимдүү аныктоого мүмкүндүк берет, анын натыйжасында зарыл болгон ветеринардык-санитардык толык бакма канаттууларды багып жаткан елкелерге келтирилген зыянды бир кыйла кыскартууга мумкундук бере турган жана конкреттуу куреш жүргүзүүгө болот.

**Колдонуу тармагы:** биотехнология, вирусология, ветеринардык практика.

## РЕЗЮМЕ

диссертации Джекебекова Куаныша Кайратовича на тему: «Разработка современного метода мониторинга вируса гриппа птиц» на соискание

**кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология**

**Ключевые слова:** грипп птиц, тест-система, диагностика, специфичность, чувствительность, мониторинг, вирус, штамм.

**Объект исследования:** разработанная диагностическая ПЦР тест-система для мониторинга вируса гриппа птиц типа А, вирус гриппа птиц, дикие и домашние птицы.

**Предмет исследования:** выбор и дизайн специфических праймеров на М ген, оптимизация параметров постановки и компонентов ПЦР тест-системы, специфичность и чувствительность тест-системы.

**Цель исследования:** разработка диагностической ПЦР тест-системы для мониторинга гриппа птиц на территории Республики Казахстан.

**Методы исследования:** молекулярно-генетический, вирусологический, биотехнологический.

**Полученные результаты и их новизна:** Впервые в Казахстане с использованием последних достижений молекулярной биологии разработана тест-система для диагностики вируса гриппа птиц типа А методом ПЦР.

Собраны биологические материалы от птиц из эпидемически значимых регионов Казахстана и анализированы с применением разработанной тест-системы, в результате которого были выявлены и выделены новые штаммы A/grey duck/North-Kazakhstan/5/2018(H3N8) и A/greylag goose/North-Kazakhstan/62/2018(H3N8).

Подтверждением выделения ВГП свидетельствовали результаты электронной микроскопии (ЭМ), в которых были обнаружены вирусные частицы округлой и удлинённой формы размером от 80 до 200 нм, поверхность вирионов покрыты шипиками длиной 7-9 нм, что полностью совпадает с описанием вируса гриппа в научной литературе.

Секвенированием были определены первичные нуклеотидные последовательности генов HA и NA изолятов ВГП подтипа H3N8, и депонированы базу данных GenBank следующие последовательности: A/grey duck/North-Kazakhstan/5/2018(H3N8) - HA (MN945305), NA (MN945306); - HA (MN945304), NA (MN945303). Проанализированы изменения в генетической структуре HA и NA, обеих штаммов и определены их филогенетическая принадлежность. Одновременная циркуляция азиатской и европейской двух генетических линий ВГП типа А H3N8 у диких птиц в одной местности обусловлена занесением их из разных географических мест. Генетические расстояния, выявленные с помощью нуклеотидных последовательностей поверхностных генов, свидетельствуют о том, что казахстанские изоляты дистанцируются от Азиатских и Европейских штаммов

ВГП типа А H3N8 и образуют отдельную ветвь, отличающихся от прототипных штаммов. Возможно, данные казахстанские изоляты являются новыми вариантами вируса гриппа А H3N8.

**Рекомендации по использованию:** Разработанная тест-система для диагностики вируса гриппа птиц типа А методом ПЦР позволяет эффективно и достоверно выявлять вирус гриппа типа А на ранней стадии инфекционного процесса, вследствие чего ставить полноценный диагноз, а также принимать необходимые ветеринарно-санитарные и специфические меры борьбы, значительно сокращающие урон, причиняемый птицеводству страны.

**Область применения:** биотехнология, вирусология, ветеринария.

### SUMMARY

**Dissertation of Jekebekov Kuanysh on the title: "Development of a modern method for monitoring the avian influenza virus" for the competition of a candidate of biological sciences in the specialty 03.01.06 – Biotechnology.**

**Key words:** avian influenza, test system, diagnostics, specificity, sensitivity, monitoring, virus, strain.

**Objects of research:** developed diagnostic PCR test system for monitoring avian influenza A virus, avian influenza virus, wild and domestic birds.

**Subject of research:** selection and design of specific primers for the M gene, optimization of setting parameters and components of the PCR test system, specificity and sensitivity of the test system.

**Purpose of the work:** development of a diagnostic PCR test system for monitoring avian influenza in the territory of the Republic of Kazakhstan.

**Research methods:** molecular genetics, virological, biotechnological.

**The results obtained and their novelty:** For the first time in Kazakhstan, using the latest advances in molecular biology, a test system has been developed for diagnosing avian influenza A virus by PCR. For this, specific oligonucleotide primers were designed and synthesized: InfA\_780\_1F—ACT GGG CAC GGT GAG CGT GA, InfA\_944\_1R—CCC GTC AGG CCC CCT CAA AGC per M gene with the amplified product size of 164 bp.

The specificity and sensitivity of the developed test system was determined. The size of the obtained fragments in influenza A corresponds to the calculated value of 164 bp. The sensitivity threshold of the test system is  $1 \times 10^2$  virus RNA copies in the sample.

Biological materials were collected from birds from epidemically significant regions of Kazakhstan and analyzed using the developed test system, which resulted in the identification and isolation of new strains A/grey duck/North-Kazakhstan/5/2018(H3N8) and A/greylag goose/North - Kazakhstan/62/2018(H3N8).

The isolation of AIV was confirmed by the results of electron microscopy (EM), in which rounded and elongated viral particles 80 to 200 nm in size were found, the surface of the virions is covered with spines 7–9 nm long, which fully coincides with the description of the influenza virus in the scientific literature.

Sequencing determined the primary nucleotide sequences of the HA and NA genes of H3N8 subtype AIV isolates, and deposited the following sequences in the GenBank database: A/grey duck/North-Kazakhstan/5/2018(H3N8) - HA (MN945305), NA (MN945306); - HA (MN945304), NA (MN945303). Changes in the genetic structure of HA and NA, both strains, were analyzed and their phylogenetic affiliation was determined. Simultaneous circulation of the Asian and European two genetic lines of AIV type A H3N8 in wild birds in the same area is due to their introduction from different geographical locations. Genetic distances identified using the nucleotide sequences of surface genes indicate that Kazakhstani isolates distance themselves from Asian and European strains of AIV type A H3N8 and form a separate branch that differs from the prototype strains. It is possible that these Kazakh isolates are new variants of the H3N8 influenza A virus.

**Field of application:** **Scope:** biotechnology, virology, veterinary practice.