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

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

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

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

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

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

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

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

Введение

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Материалы и методы исследования

Материалы, реактивы и буферы

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

Оборудование

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

Вирусы

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

Выравнивание последовательностей и подбор праймеров

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

Синтез праймеров и зондов

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

Выделение РНК

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

Конструирование рекомбинантной ДНК-плазмиды

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

Проведение ОТ-ПЦР и ОТ-ПЦР в реальном времени

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

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

Статистическая обработка данных.

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

Результаты

Подбор праймеров и зондов для диагностики вирусов ВГА и БН

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

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

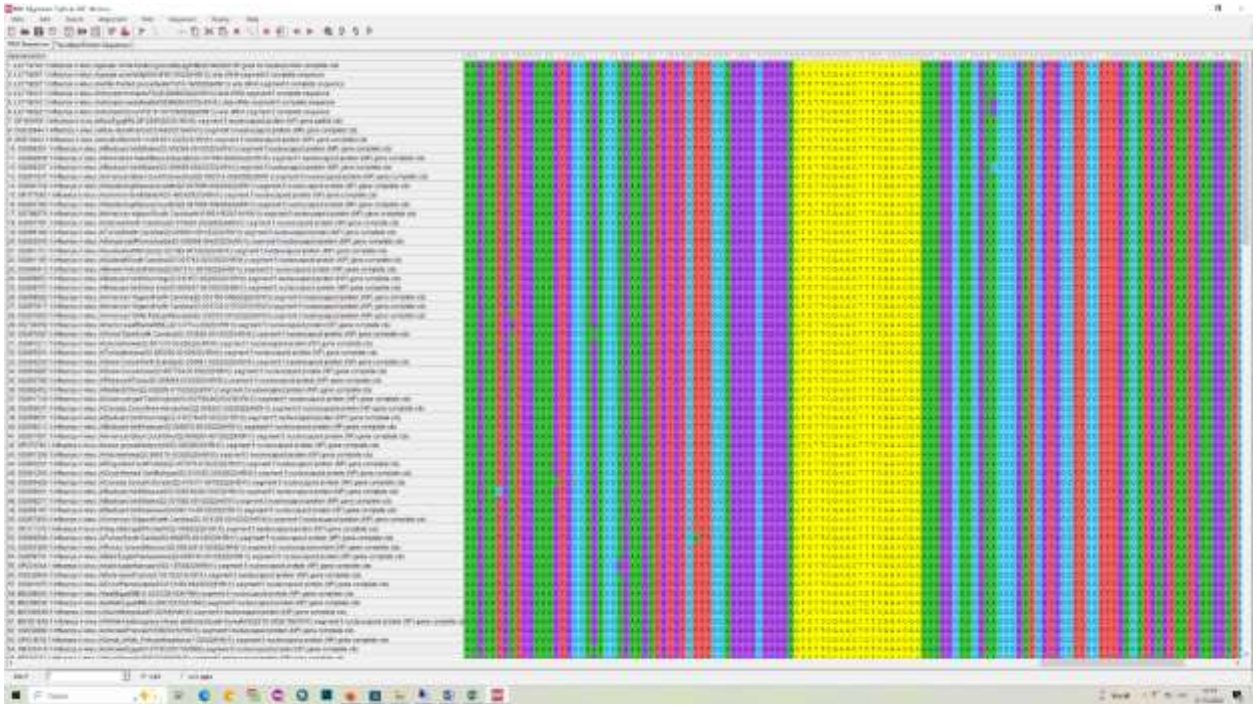


Рисунок 1- Фрагмент множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей гена NP вируса *гриппа А*

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



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

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

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

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

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

Определение специфичности наборов праймеров и зондов

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

Таблица 2 - Программа для ОТ-ПЦР РВ анализа

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

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

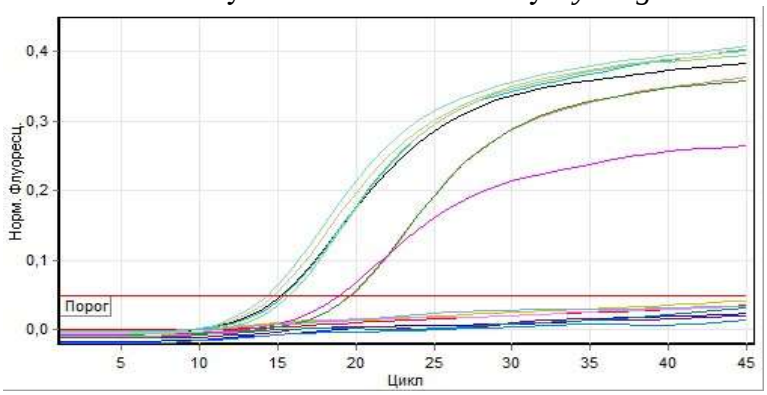


Рисунок 3 – Определение специфичности праймеров и зондов на ВГА

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

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

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

Количественные учитывались по каналу *Cycling A.Orange*

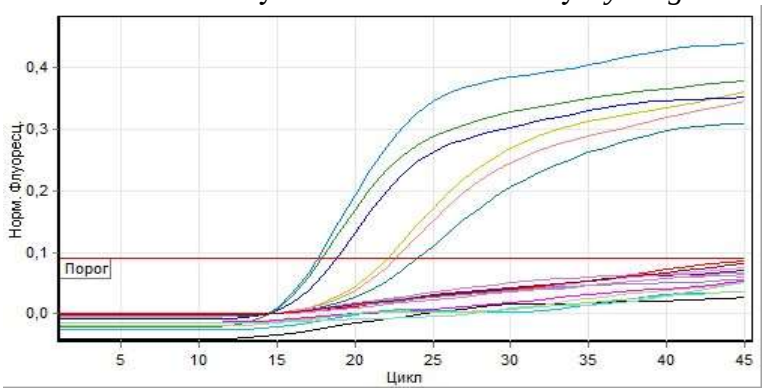


Рисунок 4 – Результаты ОТ-ПЦР РВ анализа с набором ПЦР-ГРИПП-А-ФАКТОР

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

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

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

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

Количественные учитывались по каналу *Cycling A.Orange.*

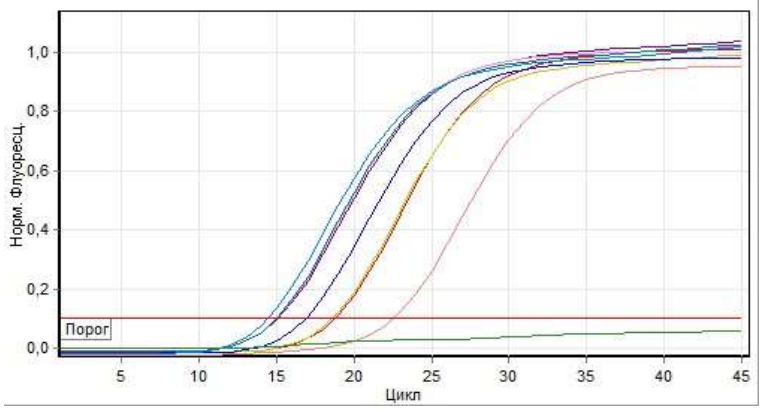


Рисунок 5 – Результаты ОТ-ПЦР РВ анализа с набором ПЦР-ГРИПП-А-ФАКТОР

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

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

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

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

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

Количественные учитывались по каналу *Cycling A.Yellow.*

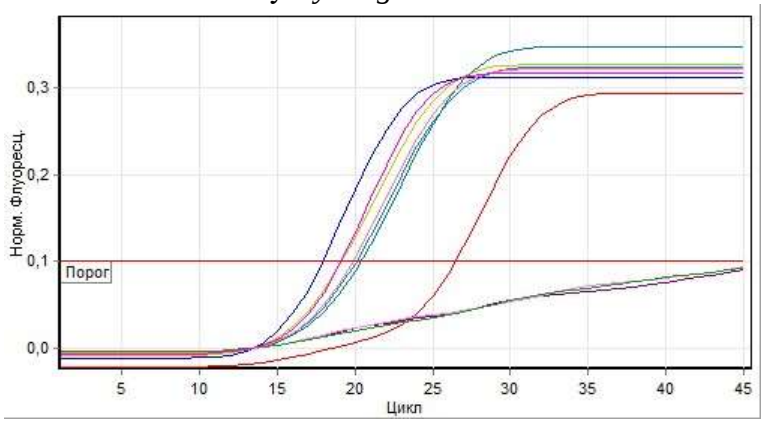


Рисунок 6 – Результаты ОТ-ПЦР РВ анализа с набором ПЦР-НЬЮКАСЛА-ФАКТОР

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

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

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

Обсуждение

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

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

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

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

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

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

потенциал для использования в эпизоотическом контроле и мониторинге вспышек заболеваний.

Заключение

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

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

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

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

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

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

References

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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