

ISSN 2707-7241
EISSN 2957-5702



Қазақстан Республикасы
Денсаулық сақтау министрлігі
«Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының
ғылыми-зерттеу институты»
шаруашылық жүргізу құқығындағы
республикалық мемлекеттік кәсіпорыны

Республиканское государственное предприятие
на праве хозяйственного ведения
«Научно-исследовательский институт проблем
биологической безопасности»
Министерство здравоохранения
Республики Казахстан

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

Ғылыми журнал
**БИОҚАУІПСІЗДІК
ЖӘНЕ БИОТЕХНОЛОГИЯ**

Научный журнал
**БИОБЕЗОПАСНОСТЬ
И БИОТЕХНОЛОГИЯ**

The scientific journal
**BIOSAFETY AND
BIOTECHNOLOGY**

2020 ЖЫЛДАН ШЫҒА БАСТАҒАН
ИЗДАЕТСЯ С 2020 ГОДА
PUBLISHED SINCE 2020

2022 • 10

Бас редакторы

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

Редакция алқасы:

Абдураимов Е.О. в.ғ.д., проф. (Қазақстан),
бас ред. орынбасары, *h-index: WoS – 5, Scopus – 4*

Биологиялық қауіпсіздік және биологиялық қорғау
Faez Awad, PhD (Ливия), *h-index: Scopus – 3*

Орынбаев М.Б. в.ғ.к., проф., ҚР ҰҒА корр.-мүшесі
(Қазақстан), *h-index: WoS – 7, Scopus – 8*

**Эпидемиология эпизоотология, микробиология,
вирусология, иммунология, микология**

Еспембетов Б.А., в.ғ.д., проф. (Қазақстан),
h-index: WoS – 6, Scopus – 6

Жүгүнісов Қ.Д., PhD (Қазақстан),
h-index: WoS – 3, Scopus – 4

Нұрғазиев Р.З., в.ғ.д., проф. (Қырғызстан),
h-index: Scopus – 4

Ветеринариялық биотехнология

Risatti G., PhD, проф. (АҚШ),
h-index: WoS – 27, Scopus – 27

Қошеметов Ж.Қ., б.ғ.д., проф. (Қазақстан),
h-index: WoS – 2, Scopus – 3

Медициналық биотехнология

Olivier G., PhD, (Франция), *h-index: WoS – 3, Scopus – 3*

Айқымбаев А.М., м.ғ.д., проф. (Қазақстан),
h-index: WoS – 7, Scopus – 5

Червякова О.В., б.ғ.к., проф. (Қазақстан),
h-index: WoS – 4, Scopus – 5

Стукова М.А., м.ғ.к. (Ресей), *h-index: WoS – 9, Scopus – 11*

Фитопатология және өсімдіктер биотехнологиясы

Рсалиев А.С., а-ш.ғ.к., проф. (Қазақстан),
h-index: WoS – 4, Scopus – 5

Гультяева Е.И., б.ғ.д., доцент (Ресей),
h-index: WoS – 8, Scopus – 9

Молекулалық генетика

Айтназаров Р.Б., б.ғ.к., (Ресей),
h-index: WoS – 6, Scopus – 6

Сұлтанқұлова К.Т., б.ғ.к., проф. (Қазақстан),
h-index: WoS – 7, Scopus – 7

Корректор: **Әмірханова Н.Т.**, б.ғ.к. (Қазақстан),
h-index: Scopus – 1

Ғылыми журнал «Биоқауіпсіздік және Биотехнология»
ISSN 2707-7241 **eISSN 2957-5702**

Құрылтайшы: ҚР ДСМ «Биологиялық қауіпсіздік
проблемаларының ғылыми-зерттеу институты»
Қазақстан Республикасының Ақпарат және қоғамдық
даму министрлігінің Ақпарат комитетінде 20.11.2019 ж.
№KZ33V00017380 куәлікпен тіркелген
Мерзімділігі: жылына 4 рет. Тиражы: 200 дана
Редакцияның мекен-жайы: 080409, Жамбыл облысы,
Қордай ауданы, Гвардейский қтк., Б. Момышұлы к-сі, 15.
тел. (726-36) 7-22-28
www: biosafety.kz, e-mail: unots@biosafety.kz

© Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының
ғылыми-зерттеу институты, 2022

Главный редактор

д.б.н., проф., академик АН РК **К.Д. Закария**

Редакционная коллегия:

Абдураимов Е.О., д.в.н., проф. (Казахстан),

заместитель гл. ред., *h-index: WoS – 5, Scopus – 4*

Биологическая безопасность и биологическая защита

Faez Awad, PhD (Ливия), *h-index: Scopus – 3*

Орынбаев М.Б., к.в.н., проф., член корр.-НАН РК

(Казахстан), *h-index: WoS – 7, Scopus – 8*

Эпидемиология эпизоотология, микробиология,

вирусология, иммунология, микология

Еспембетов Б.А., д.в.н., проф. (Казахстан),

h-index: WoS – 6, Scopus – 6

Жугунусов К.Д., PhD (Казахстан),

h-index: WoS – 3, Scopus – 4

Нургазиев Р.З., д.в.н., проф. (Кыргызстан),

h-index: Scopus – 4

Ветеринарная биотехнология

Risatti G., PhD, проф. (США),

h-index: WoS – 27, Scopus – 27

Кошметов Ж.К., д.б.н., проф. (Казахстан),

h-index: WoS – 2, Scopus – 3

Медицинская биотехнология

Olivier G., PhD, (Франция), *h-index: WoS – 3, Scopus – 3*

Айкимбаев А.М., д.м.н., проф. (Казахстан),

h-index: WoS – 7, Scopus – 5

Червякова О.В., к. б. н., проф. (Казахстан),

h-index: WoS – 4, Scopus – 5

Стукова М.А., к.м.н. (Россия),

h-index: WoS – 9, Scopus – 11

Фитопатология и биотехнология растений

Рсалиев А.С., к.с.-х. н., проф. (Казахстан),

h-index: WoS – 4, Scopus – 5

Гультяева Е.И., д.б.н., доцент (Россия),

h-index: WoS – 8, Scopus – 9

Молекулярная генетика

Айтназаров Р.Б., к.б.н. (Россия),

h-index: WoS – 6, Scopus – 6

Султанкулова К.Т., к.б.н., проф. (Казахстан),

h-index: WoS – 7, Scopus – 7

Корректор: **Амирханова Н.Т.**, к.б.н. (Казахстан),

h-index: Scopus – 1

Научный журнал «Биобезопасность и Биотехнология»

ISSN 2707-7241

eISSN 2957-5702

Учредитель: «Научно-исследовательский институт

проблем биологической безопасности» МЗ РК

Зарегистрирован в Комитете информации

Министерства информации и общественного

развития Республики Казахстан свидетельством

№KZ33V00017380 от 20.11.2019 г.

Периодичность: 4 раза в год. Тираж: 200 экз.

Адрес редакции: 080409, Жамбылская область,

Кордайский район, пгт Гвардейский, ул. Б. Момышулы,

15. тел. (726-36) 7-22-28

www: biosafety.kz, e-mail: unots@biosafety.kz

© Научно-исследовательский институт проблем
биологической безопасности, 2022

Editor-in-chief

d.b.s., prof., academician of the Academy of Sciences
of the RK **K.D. Zakaria**

Editorial board:

Abduraimov E.O., d.v.s., prof. (Kazakhstan),

chief ed. deputy, *h-index: WoS – 5, Scopus – 4*

Biosafety and biological protection

Faez Awad, PhD (Libya), *h-index: Scopus – 3*

Orynbayev M.B., c.v.s., prof., corr.-member of the

NAS RK. (Kazakhstan), *h-index: WoS – 7, Scopus – 8*

Epidemiology epizootology, microbiology,

viusology, immunology, mycology

Espembetov B.A. c.v.s., prof. (Kazakhstan),

h-index: WoS – 6, Scopus – 6

Zhugunusov K.D., PhD (Kazakhstan),

h-index: WoS – 3, Scopus – 4

Nurgaziev R.S., d.v.s., prof. (Kyrgyzstan),

h-index: Scopus – 4

Veterinary biotechnology

Risatti G., PhD, prof. (USA),

h-index: WoS – 27, Scopus – 27

Koshemetov Zh.K., d.b.s., prof. (Kazakhstan),

h-index: WoS – 2, Scopus – 3

Medical biotechnology

Olivier G., PhD, (France), *h-index: WoS – 3, Scopus – 3*

Aikimbayev A.M., d.m.s., prof. (Kazakhstan),

h-index: WoS – 7, Scopus – 5

Chervyakova O.V., c.b.s., prof. (Kazakhstan),

h-index: WoS – 4, Scopus – 5

Stukova M.A., c.m.s., (Russia),

h-index: WoS – 9, Scopus – 11

Phytopathology and plant biotechnology

Rsaliev A.S., c.a.-c.s., prof. (Kazakhstan),

h-index: WoS – 4, Scopus – 5

Gulyaeva E.I., d.b.s., prof. (Russia),

h-index: WoS – 8, Scopus – 9

Molecular genetics

Aitnazarov R.B., c.b.s., (Russia),

h-index: WoS – 6, Scopus – 6

Sultankulova K.T., c.b.s., prof. (Kazakhstan),

h-index: WoS – 7, Scopus – 7

Proofreader: **Amirkhanova N.T.**, c.b.s., (Kazakhstan),

h-index: Scopus – 1

Scientific journal “Biosafety and Biotechnology”

ISSN 2707-7241

eISSN 2957-5702

Founder: “Research Institute of biosafety problems”

of the Ministry of health of the RK

Registered with the Information Committee of the

Ministry of Information and public development of

the Republic of Kazakhstan with the Certificate

No. KZ33V00017380 dated 20.11.2019

Frequency: 4 times a year. Circulation: 200 copies

Address of the editorial office 080409,

Zhambyl region, Kordai district, Gvardeysky.

15 B. Momysuly str., tel. (726-36) 7-22-28

www: biosafety.kz, e-mail: unots@biosafety.kz

© Research institute of biosafety problems, 2022

МАЗМҰНЫ

<i>М.К. Исакеев, Ж.Ч. Орозов, М.А. Ахмеджанов, С.А. Джээнбаева</i> ПРОВЕДЕНИЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ С ПРИМЕНЕНИЕМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО КРАСИТЕЛЯ SYBR GREEN I ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ЧУМЫ ПЛОТОЯДНЫХ.....	6
<i>Ж.Ж. Бименова, В.П. Терлецкий, А. Багдат, Е.С. Усенбеков</i> ІРІ ҚАРА МАЛЫНДА НН3, НН5 ҰРЫҚТАНҒЫШТЫҚ ГАПЛОТИПТЕРІН БАЛАУ ЖАСАУҒА TETRA-PRIMER ARMS-PCR РЕАКЦИЯ ӘДІСІН ҚОЛДАНУДЫҢ АРТЫҚШЫЛЫҚТАРЫ.....	14
<i>А.К. Бопи, З.Д. Омарова, Р.А. Рыстаева, А.Б. Тулендибаев, Т.У. Аргимбаева, Д.Ә. Әлібекова, Н.А. Әубәкір, Т.Т. Ермекбай, А.А. Серикбай, М.Б. Орынбаев, Х.Б. Абеуов</i> ҚАЗАҚСТАНДАҒЫ ЖОҒАРЫ ПАТОГЕНДІ ҚҰС ТҰМАУЫНЫҢ МОНИТОРИНГІ.....	24
<i>А. Жунусова, А. Сарбаев</i> АРПА СОРТ-ҮЛГІЛЕРІНІҢ НЕГІЗГІ САҢЫРАУҚҰЛАҚ АУРУЛАРЫНА ТӨЗІМДІЛІГІ	31
<i>Б.С. Усербаев, Н.С. Кожабергенов, А.М. Мелисбек, М.Ж. Ширинбеков, А.И. Тагайев, Е.Д. Бурашев</i> SARS-CoV-2 ВИРУСЫ В.1.1.7 ВАРИАНТЫНЫҢ ORF3a ГЕНІН СЕКВЕНИРЛЕУ ЖӘНЕ ФИЛОГЕНЕТИКАЛЫҚ ТАЛДАУ	44
<i>Э.Ж. Калимолда, С.О. Садиқалиева, С.У. Молдагулова, Ж.С. Абсатова, З.Ж. Ершебулов, К.А. Шораева</i> БИОПРЕПАРАТТАР ӨНДІРУ ҮШІН СУ САПАСЫН МИКРОБИОЛОГИЯЛЫҚ БАҚЫЛАУ.....	55
ЖУРНАЛДА ЖАРИЯЛАУ ҮШІН МАҚАЛАЛАРҒА ҚОЙЫЛАТЫН ТАЛАПТАР	65

СОДЕРЖАНИЕ

<i>М.К. Исакеев, Ж.Ч. Орозов, М.А. Ахмеджанов, С.А. Джээнбаева</i> ПРОВЕДЕНИЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ С ПРИМЕНЕНИЕМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО КРАСИТЕЛЯ SYBR GREEN I ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ЧУМЫ ПЛОТояДНЫХ.....	6
<i>Ж.Ж. Бименова, В.П. Терлецкий, А. Багдат, Е.С. Усенбеков</i> ПРЕИМУЩЕСТВА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПОСОБА TETRA-PRIMER ARMS-PCR Р ЕАКЦИИ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ НОСИТЕЛЕЙ ГАПЛОТИПОВ ФЕРТИЛЬНОСТИ HНЗ, HН5 У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА.....	14
<i>А.К. Бопи, З.Д. Омарова, Р.А. Рыстаева, А.Б. Тулендибаев, Т.У. Аргимбаева, Д.Ә. Әлібекова, Н.А. Әубәкір, Т.Т. Ермекбай, А.А. Серикбай, М.Б. Орынбаев, Х.Б. Абеуов</i> МОНИТОРИНГ ВЫСОКОПАТОГЕННОГО ГРИППА ПТИЦ В КАЗАХСТАНЕ	24
<i>А. Жунусова, А. Сарбаев</i> УСТОЙЧИВОСТЬ СОРТООБРАЗЦОВ ЯЧМЕНЯ К ОСНОВНЫМ ГРИБНЫМ БОЛЕЗНЯМ.....	31
<i>Б.С. Усербаев, Н.С. Кожаберженов, А.М. Мелисбек, М.Ж. Ширинбеков, А.И. Тагайев, Е.Д. Бурашев</i> СЕКВЕНИРОВАНИЕ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГЕНА ORF3а варианта В.1.1.7 ВИРУСА SARS-CoV-2	44
<i>Э.Ж. Калимолда, С.О. Садикалиева, С.У. Молдагулова, Ж.С. Абсатова, З.Ж. Ершебулов, К.А. Шораева</i> МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ВОДЫ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА БИОПРЕПАРАТОВ.....	55
ТРЕБОВАНИЯ К НАУЧНЫМ СТАТЬЯМ ДЛЯ ПУБЛИКАЦИИ В ЖУРНАЛЕ.....	65

CONTENTS

<i>M.K. Isakeev, Zh.Ch. Orozov, M.A. Ahmedjanov, S.A. Dzheenbaeva</i> REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION USING SYBR GREEN I FLUORESCENT DYE TO DIAGNOSE CANINE DISTEMPER VIRUS.....	6
<i>Zh.Zh.Bimenova, V.P. Terlestky, A.B. Bagdat, Y.S. Ussenbekov</i> ADVANTAGES OF USING TETRA-PRIMER ARMS-PCR REACTION METHOD FOR DETECTING CARRIERS OF HH3, HH5 FERTILITY HAPLOTYPES IN CATTLE.....	14
<i>A.K. Bopi, Z.D. Omarova, R.A. Rystayeva, A.B. Tulendibayev, T.U. Argimbayeva, D.A. Alibekova, N.A. Aubakir, T.T. Ermekbay, A.A. Serikbay, M.B. Orynbayev, Kh.B. Abeuov</i> MONITORING OF HIGHLY PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA IN KAZAKHSTAN	24
<i>A. Zhunusova, A. Sarbaev</i> RESISTANCE OF BARLEY VARIETIES TO MAJOR FUNGAL DISEASES.....	31
<i>B.S. Usseybayev, N.S. Kozhabergenov, A.M. Melisbek, M.Zh. Shirinbekov, A.I. Tagayev, Ye.D. Burashev</i> SEQUENCING AND PHYLOGENETIC ANALYSIS OF THE ORF3a GENE VARIANT B.1.1.7 SARS-CoV-2 VIRUS	44
<i>E.Zh. Kalimolda, S.O. Sadikaliyeva, S.U. Moldagulova, Zh.S. Absatova, Z.Zh. Yershebulov, K.A. Shorayeva</i> MICROBIOLOGICAL CONTROL OF WATER QUALITY FOR THE PRODUCTION OF BIOLOGICAL PRODUCTS	55
AUTHOR INSTRUCTIONS TO THE JOURNAL	65

ПРОВЕДЕНИЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ С ПРИМЕНЕНИЕМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО КРАСИТЕЛЯ SYBR GREEN I ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ЧУМЫ ПЛОТОЯДНЫХ

М.К. Исакеев , Ж.Ч. Орозов , М.А. Ахмеджанов , С. А. Джээнбаева 

Кыргызский научно-исследовательский институт им. А. Дуйшеева,
 г. Бишкек, Кыргызстан

Аннотация: Проведена диагностика чумы плотоядных с применением полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ). Для проведения ПЦР-РВ применялся флуоресцентный краситель SYBR Green I. С помощью ПЦР-РВ проверяли 106 собак в окрестностях города Бишкек. Из 106 собак, 10 были здоровыми и использовались в качестве контроля. Из 96 собак получены клинические образцы, из 87 выявлен возбудитель чумы плотоядных и 9 дали отрицательный результат. Метод ПЦР в последние годы успешно применяется в ветеринарной практике и в научных центрах страны для диагностирования инфекционных заболеваний сельскохозяйственных и домашних животных. В ветеринарной практике и науке при определении инфекционных заболеваний ПЦР является стандартной процедурой, которая позволяет определить наличие гена возбудителя. При чуме плотоядных применение метода ПЦР, считается необходимой процедурой, так как другие методы менее чувствительны и мало эффективны. Применение ПЦР-РВ упрощает диагностику, и экономит время проведения анализа, чем ПЦР в классическом варианте. Поэтому на сегодня, в нашей стране считается актуальной внедрение ПЦР-РВ в практическую ветеринарную диагностику.

Ключевые слова: чума плотоядных; диагностика; ПЦР-РВ; SYBR Green I; вирус; собака.

Введение

Вирус чумы плотоядных относится к семейству парамиксовирусов (*Paramyxoviridae* от греческого *para* – около и *myxo* – слизь). В семействе выделено два подсемейства: *Paramyxovirinae* и *Pneumovirinae*. В свою очередь *Paramyxovirinae* состоит из трех родов: *Paramyxovirus*, *Morbillivirus* и *Rubulavirus*. Возбудитель болезни чумы плотоядных относится к роду *Morbillivirus* (от лат. *Morbillus* – корь), к этой же группе относится вирус кори человека, вирус чумы крупного рогатого скота и вирус чумы мелких жвачных животных. Морбилливирусы имеют антигенное родство между собой и могут давать перекрестный иммунитет [1, с. 268; 272; 274].

Геном морбилливирусов представлен единой односпиральной линейной молекулой минус-РНК, состоящей из 15-16 тыс. нуклеотидов. РНК этих видов не обладает инфекционностью и составляет всего 0,5% массы вириона. В геноме содержится 6 основных генов (N, P, M, F, H и L), которые синтезируют 7 (P ген синтезирует два разных полипептида, функция одного из них не известна) полипептидов, три из которых связаны с нуклеокапсидом, а 3 входят в состав липопротеидной оболочки, причем 2 из последних являются гликопротеинами. Гликопротеины образуют выступы наружной оболочки и отвечают за адсорбцию вирионов на клеточной поверхности и слияние клеток [2, с. 411; 3, с. 155; 156].

Чума плотоядных – остропротекающая заразная болезнь домашних собак и многих следующих видов животных: *Canidae*, *Mustelidae*, *Ursidae*, *Felidae*, *Viverridae*, *Ailuridae*, *Hyaididae* и *Procyonidae* (гималайский енот, куница, барсук, хорьки, ласка, шакалы, красная лисица, американская карликовая лисица, австралийский динго, енотовидные собаки, европейские и американские барсуки, горностаи и др.). В последние годы присоединился к этой группе еще один вид – обезьяны [4, с. 442; 5, с. 501]. Еще один случай зарегистрирован в 1987-1988 году на Байкале, где пало несколько тысяч тюленей. Вначале было загадочное явление массовой гибели этих животных, но изучив все возможные варианты гибели тюленей, ученые обнаружили у них вирус, генетически принадлежащий к роду *Morbillivirus*. Генетические анализы показали, что вирус, найденный в трупах тюленей, генетически на 84% совпадал с вирусом чумы плотоядных. По белку М вирус чумы плотоядных и вирус, найденный в трупах тюленей, были идентичны на 90%, так как М ген, считается самым консервативным геном морбилливирусов. Соответственно М ген отвечает за синтез М белка. Сравнительные анализы М гена с другими представителями морбилливирусов дали совпадение всего на 73-77%. Еще один случай зарегистрирован в 1994 году, когда вирус чумы плотоядных нанес значительный ущерб экологии Национального парка Серенгети (Танзания). В результате эпизоотии поголовье львов сократилось на 35% [1, с. 274]. Вероятным источником инфекции, исследователи считали домашних собак, обитающих по соседству с дикими животными. В литературных источниках, отмечают, что почти все плотоядные животные подвержены патогенности вируса чумы плотоядных. Однако, доказать это сложно, так как почти все виды плотоядных животных дикие. Однако вирус чумы плотоядных в эпизоотологическом плане не для всех животных одинаково патогенен. Для некоторых видов плотоядных животных летальность при чуме плотоядных очень высока, у других животных инфекция проходит только с повышением температуры тела и легким ослаблением организма [4, с. 441]. Кроме видовой патогенности вирус чумы плотоядных имеет и возрастные отличия течения болезни. Так, у домашних собак щенки в возрасте 1-3 месяцев более устойчивы к заражению, что связано с иммунитетом, полученным с молоком матери; в возрасте 4-6 месяцев заболевают в 74% случаев, при этом летальность очень высокая, в возрасте 6-12 месяцев восприимчивость 50-60%, с одного года до двух лет около 40%. Собаки среднего возраста более устойчивы и летальность низкая. Однако с возрастом (от 7 лет) собаки становятся более чувствительными. У многих чувствительных видов животных высокий уровень заболеваемости и заражение обычно происходит в более молодом возрасте, от 2,5 до 12 месяцев [1, с. 276]. С древних времен по настоящее время вирус чумы плотоядных циркулирует во всех странах мира.

Многообразие симптомов болезни затрудняет своевременную и достоверную постановку диагноза. Поэтому при диагностировании чумы плотоядных, в первую очередь, надо выяснить эпизоотологическую ситуацию в данном регионе, где обнаружился очаг инфекции. Если животное пало, проводят патологоанатомическое вскрытие. Наиболее надежным для постановки точного диагноза является лабораторное исследование [6, с. 162].

Для постановки диагноза, предварительного диагноза ветеринарный врач должен изучить у больного животного пораженные респираторные органы, так как в первую очередь поражаются именно дыхательные органы; температуру, есть ли признаки катарального гастроэнтерита, катаракты слизистых оболочек глаз и носа с серозными или гнойными истечениями, гиперкератоз подушечек лап, образования большого количества перхоти на коже, эпилепсия, парез, поражение центральной нервной системы с судорогами, менингит и менингоэнцефалит. Если любые три или четыре из указанных признаков присутствуют у больных животных, можно подозревать чуму плотоядных.

У домашних собак надо исключить следующие схожие признаки заболевания: болезни дыхательных органов простудного характера, вызванные патогенными бактериями,

инфекционный гепатит, парвовирусный гастроэнтерит, бешенство, лептоспироз, пироплазмоз, глистные заболевания [1, с. 280].

Инфекционный период у собак протекает преимущественно с поражением печени и желудочно-кишечного тракта. Симптомы поражения органов дыхания и центральной нервной системы проявляются редко и только в запущенных случаях.

При парвовирусном энтерите воспаление органов дыхания отсутствует, нет поражений центральной нервной системы. На первый план выступает геморрагическое воспаление желудка и кишечника, обезвоживание и воспаление сердечной мышцы [7, с. 451].

При бешенстве выраженный паралич мышц глотки, нижней челюсти и всех конечностей.

Сальмонеллез протекает без гнойных ринитов и конъюнктивитов, сопровождается обильным поносом. При вскрытии селезенка увеличена в 3-5 раз против нормы.

При остром течении пироплазмоза наблюдается потеря аппетита, температура тела достигает 40-42°C, появляется кровавая моча, все видимые слизистые оболочки желтушны [8, с. 411].

Своевременная и точная диагностика при любых инфекционных заболеваний стоит в приоритете, в том числе в обнаружении вируса чумы плотоядных. Своевременность диагностирования инфекционных заболеваний дает возможность контроля эпизоотии в местностях. Особенно важно проведение лабораторного диагностирования, когда клинические симптомы изменчивы. Возбудитель чумы плотоядных имеет мультисимптомность, затрудняющую диагностику при клинических исследованиях. Мультисимптомный характер заболевания чумой плотоядных часто принимается за другое заболевание. Обычно опытные ветеринарные врачи, замечают заболевание чумой опираясь на эпизоотологические показатели местности и направляют материал в лабораторию для подтверждения. Из лабораторных методов диагностирования при чуме плотоядных самым эффективным методом диагностирования является ПЦР анализ [9, с. 158]. На сегодняшний день ПЦР анализы в нашей стране являются достаточно распространенными для диагностирования различных видов заболеваний. В финансовом плане стоимость ПЦР анализов равноценно серологическим исследованиям. При равноценной стоимости серологическими и другими видами диагностических средств метод ПЦР имеет ряд преимуществ по чувствительности, чем остальные методы диагностики.

Материалы и методы

Исследуемые материалы были собраны от животных в течение последних двух лет, проживающих в г. Бишкек и в окрестностях города. Для диагностирования использовали 200 мкл или 100 мкл жидкости, содержащий биологические материалы, взятые от подозреваемых собак на чуму плотоядных. Выделения РНК и обратную транскрипцию проводили в соответствии с инструкциями наборов для выделения РНК «РИБО-сорб». Для каждой серии анализов использовали положительные (К+) и отрицательные (К-) контроли. В качестве положительного контроля использовали вакцину и деионизированную воду в качестве отрицательного контроля. Контроли использовались для выделения РНК и для обратной транскрипции. Для этапа проведения полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) также использовались контроли. Таким образом, в конце получения результатов проверяли 4 контрольных образца для каждой серии анализа.

Результаты и обсуждение

При определении чумы плотоядных используются различные диагностические методы: клинические, гистологические, серологические и молекулярно биологические. Последний метод, считается самым эффективным и чувствительным методом при определении возбудителя чумы плотоядных в различных стадиях и течениях болезни [9, с. 160]. Кроме

этого, молекулярно-биологический метод в нашем случае ПЦР-РВ, способен обнаружить возбудителя у носителей вируса, до появления у животных клинических симптомов [9, с. 157]. Обнаружение вируса на ранних стадиях позволит контролировать распространение вируса в местах появления эпизоотии.

Учитывая преимущества метода диагностики ПЦР-РВ, нашей целью стало применение ПЦР-РВ при диагностике чумы плотоядных. Для достижения цели, мы решили применить флуоресцентный краситель SYBR Green I для детекции результатов ПЦР в режиме реального времени. Так как, ПЦР-РВ является относительно чувствительным методом по сравнению с классическим методом ПЦР (классический метод ПЦР – условно обозначили метод ПЦР считывающие конечные результаты в агарозном геле) [10, с. 60]. Еще одна немаловажная особенность ПЦР-РВ является в экономии времени, то есть предварительные результаты, можно увидеть до окончания процесса амплификации. Это дает возможность сэкономить время оператора, проводящего лабораторное исследование. Кроме этого, он является безопасным методом для здоровья, работающего оператора, чем классический вариант этого вида реакций. В классическом ПЦР для детекции полученных результатов необходимо в конечном итоге проводить электрофорез в агарозном геле содержащий краситель. В большинстве случаев используется бромистый этидий. Как правило, бромистый этидий является сильным мутагеном для организма человека и животных. ПЦР-РВ исключает этот момент, и используются другие красители и для детекции результатов не происходит контактов с работающим персоналом, так как аппарат, предназначенный для проведения ПЦР-РВ, считывает в закрытых пробирках в процессе амплификации. Читка результатов, прямо в процессе и закрытом положении уменьшает случаи контаминации многократно. Таким образом, ПЦР-РВ имеет много преимуществ, относительно классическому виду этого метода. Учитывая все преимущества этого метода, мы решили адаптировать классический ПЦР на ПЦР-РВ. При проведении ПЦР-РВ также необходимо найти температуру отжига праймеров. Для определения отжига праймеров, мы проводили градиент температуры для проведения ПЦР-РВ. На классическом ПЦР отжиг праймеров был при 55°C, однако для отжига праймеров сильно влияет используемый буферный раствор. При использовании ПЦР смеси с красителем используется специальный буферный раствор, позволяющий давать хорошее свечение и одновременно создающий хорошие условия для работы фермента. Обычно ПЦР-РВ температура отжига используется выше, чем в классическом ПЦР. В виду использования температуры отжига ближе к температуре элонгации, шаг элонгации 72°C не используется. Учитывая все моменты, заранее определенная температура отжига для классического ПЦР 55°C, мы решили градиент температуры начать с 55°C и выше до 62°C. для этого использовалась следующая реакционная смесь:

Для постановки ПЦР-РВ с подобранным праймерами нами использованы следующие реактивы с объемом реакционной смеси 25мкл:

- 5,25 мкл деионизированной воды
- 5мкл 5х буфера+ краситель SYBR Green I
- 0,5мкл 10x dNTPmix
- 1,5мкл 25 mM MgCl₂
- 3,75мкл 0,6 μM смеси праймеров прямого
- 3,75мкл 0,6 μM смеси праймеров обратного
- 0,25мкл Taq ДНК полимеразы
- 5мкл ДНК образца

и градиент температуры отжига: 55°C, 56°C, 57°C, 58°C, 59°C, 60°C, 61°C и 62°C. Так как у нас ПЦР продукт 681 п.н. и это считается для ПЦР-РВ длинным, поэтому, мы также использовали стадии элонгации 72°C. Итого у нас получился следующие температурные режимы:

- 95°C – 20 сек. денатурация;
- 55°C, 56°C, 57°C, 58°C, 59°C, 60°C, 61°C – 30 сек. температуры отжига
- 72°C – 15 сек. элонгация

Итого 40 циклов.

В конце экспериментов, мы получили, оптимальную температуру отжига праймеров 60°C. Результаты эксперимента показаны на рис. 1.

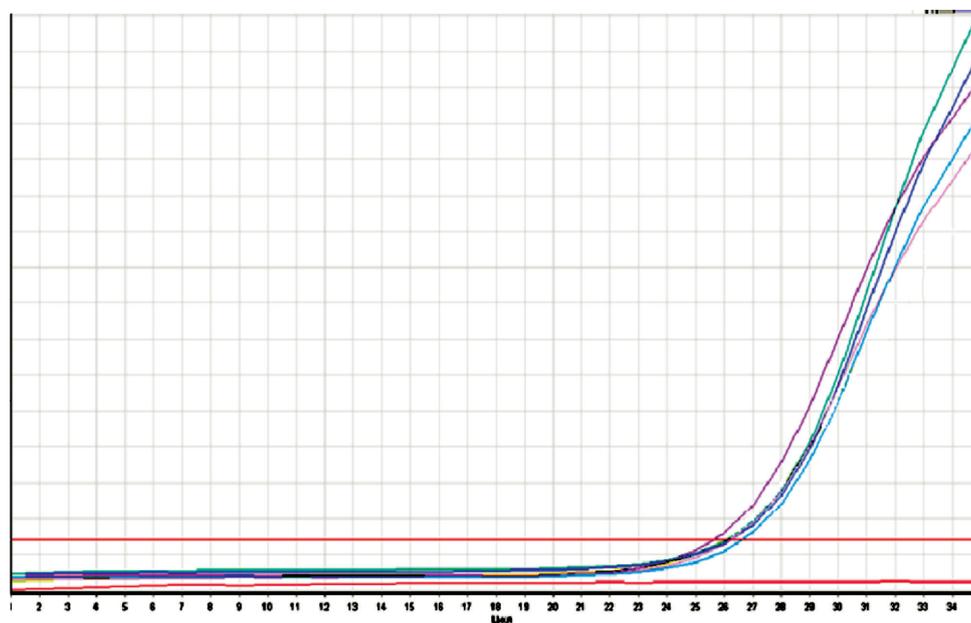


Рисунок 1 – Результаты ПЦР-РВ

Как видно на рисунке 1 постановка ПЦР-РВ при температуре отжига праймеров прошла успешно, все положительные образцы пересекли пороговую линию после 25 циклов, контрольный отрицательный образец остался под пороговой линией. Результаты считались положительными, если пороговая линия была, ниже 35 циклов. Если пороговая линия оказалась, больше 35 и график флуоресценции образовался S образную форму, то образцы анализировались повторно, в остальных случаях считались отрицательными. В нашей работе мы принимали в качестве красителя SYBR Green I. Использование красителя SYBR Green I является самым простым методом среди методов ПЦР-РВ, так как в реакцию кроме красителя больше ничего не требуется. Однако у этого метода есть недостатки, относительно к другим методам ПЦР-РВ. Например, TaqMan включает себя меченый зонд с красителем и в другом конце гасителем. Этот метод, считается более точным методом, так как зонды также как праймеры специфичны, и они прикрепляются только к комплементарному участку исследуемого материала. Без комплементарности флуоресценция происходить не будет. Таким образом, TaqMan метод работает точнее, но стоимость меченых зондов стоит дороже, чем красителя SYBR Green I. В случае SYBR Green I принцип работы отличается. SYBR Green I флуоресцирует, связываясь с любой двухцепочечной молекулой ДНК. По этой причине, краситель SYBR Green I может давать свечение даже с побочным продуктом, образовавшимся во время реакции. Чтобы исключить такие моменты, мы проводили эксперименты, используя различные концентрации кДНК, а также РНК. Кроме этого, мы добавляли большое количество ДНК других микроорганизмов. После каждой реакции проверяли достоверность результатов в агарозном геле рис. 2.

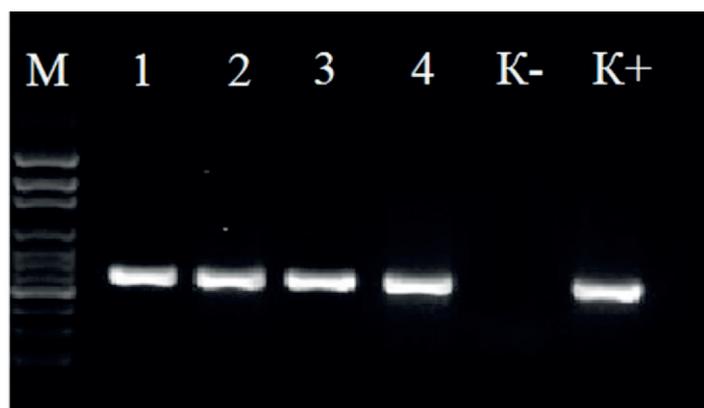


Рисунок 2 – ПЦР продукты после амплификации методом ПЦР-РВ.
М – молекулярный маркер 100 п.н., № – 1 по 4 образцы,
К- отрицательный контроль и К+ положительный контроль.

Как видно, на рисунке 2 все образцы получились чистыми, без каких либо загрязнений. Отрицательный образец не показал образования продуктов, хотя, мы туда добавляли молекулы ДНК различных других вирусов. В ходе экспериментов с красителем SYBR Green I мы, получили чистый ПЦР продукт и достоверные результаты. Таким образом, можно сказать, что разработанный ПЦР-РВ с красителем SYBR Green I работает достаточно успешно. Применяя ПЦР-РВ, мы обработали 96 образцов полученных от клинически подозреваемых на чуму плотоядных и образцы от 10 здоровых собак для контроля. В качестве положительного контроля использовали вакцинный штамм Onderstepoort. В конце исследований из 96 собак 87 показали положительные результаты, остальные 9 показали отрицательные результаты. Для достоверности результатов отрицательные образцы также проверяли на агарозном геле, их результаты также оказались отрицательными.

Заключение

В настоящее время быстрота и точность диагностики играет очень важную роль при контроле эпизоотической ситуации в стране. И одним из наиболее востребованных и массово эксплуатируемых молекулярных методов диагностирования инфекционных заболеваний является ПЦР с применением красителя SYBR Green I и TaqMan-системой. TaqMan-система более специфична, чем SYBR Green. Однако SYBR Green, считается универсальным методом и более простым и самым дешевым методом среди метода ПЦР-РВ [10, с. 61]. Разработанный нами ПЦР с использованием флуоресцентного красителя SYBR Green может использоваться как замена классического ПЦР метода, и может применяться при массовом тестировании вируса чумы плотоядных.

№10
2022

Литература

- 1 Сюрин В.Н., Самуйленко А.Я., Соловьев Б.В., Фомин Н.В. Вирусные болезни животных // – Москва: ВНИТИВП, 2001. – 928 с.
- 2 Murphy F.A. Veterinary Virology. / E.P.J Gibbs, M.C. Horzinek, M.J. Studdert, San Diego, Calif: Academic Press, 1999.
- 3 Diallo A. Morbillivirus group: genome organization and proteins // Veterinary Microbiology. – 1990. – Vol. 23. – P. 155-163.
- 4 Appel M., Sheffy B.E., Percy D.H., Gaskin J.M. Canine distemper virus in domesticated cats and pigs // American Journal of Veterinary Research, – 1974. – Vol. 35. – P. 803-806.
- 5 Deem S.L., Spelman L.H., Yates R.A., Montali R.J. Canine distemper in terrestrial carnivores: a review // Journal of Zoo and Wildlife Medicine. – 2000. – Vol. 31(4). – P. 441-451.

- 6 Thulin J.D., Granstrom D.E., Gelberg H.B., Morton D.G., French R.A., Giles R.C. Concurrent protozoal encephalitis and canine distemper virus infection in a raccoon (*Procyon lotor*) // *Vet. Rec.* – 1992. – Vol. 130(8). – P.162-164. doi: 10.1136/vr.130.8.162. PMID: 1566543.
- 7 Реутская Д.И. Парвовирусный энтерит собак: Эпизоотология, иммунология, профилактика и меры борьбы : дис. кандидата ветеринарных наук – Барнаул, 2003.
- 8 Михалишин В.В., Рыбаков С.С., Домский И.А., Борисов А.В., Метлин А.Е., Чепуркин А.В., Егоров А.А., Рябоконт А.А. Испытание иммуногенности и безвредности вирусвакцины против бешенства орального применения // *Нейроинфекции: бешенство, губкообразная энцефалопатия КРС, Крейтцфельда-Якоба и другие прионные болезни, листериоз, болезнь Ауески, болезнь Тешена* : Мат. межд. науч. практ. конф. – Покров, 2001. – С. 33-36.
- 9 Gröne A., Groeters S., Koutinas A., Saridomichelakis M., Baumgärtner W. Non-cytocidal infection of keratinocytes by canine distemper virus in the so-called hard pad disease of canine distemper // *Vet Microbiol.* – 2003. – Vol. 96(2). – P.157-63. doi: 10.1016/s0378-1135(03)00214-1. PMID: 14519333.
- 10 Бикбулатова С.М., Чемерис Д.А., Никоноров Ю.М., Машков О.И., Гарафутдинов Р.Р., Чемерис А.В., Вахитов В.А. Способы детекции результатов полимеразной цепной реакции в режиме реального времени // *Вестник Башкирск. ун-та.* – 2012. – №1. – С. 59-60.

References

- 1 Syurin V.N., Samujlenko A.Ya., Solov'ev B.V., Fomin N.V. (2001) *Virusnye bolezni zhivotnyh* // Moskva: VNITIVP, 928 pp.
- 2 Murphy F.A., Gibbs E.P.J., Horzinek M.C., Studdert M.J. (1999) *Veterinary Virology*. San Diego, Calif: Academic Press, 1999.
- 3 Diallo A. (1990) Morbillivirus group: genome organization and proteins // *Veterinary Microbiology*, vol. 23, pp.155-163.
- 4 Appel M., Sheffy B.E., Percy D.H., Gaskin J.M. (1974) Canine distemper virus in domesticated cats and pigs // *American Journal of Veterinary Research*, vol. 35, pp. 803-806.
- 5 Deem S.L., Spelman L.H., Yates R.A., Montali R.J. (2000) Canine distemper in terrestrial carnivores: a review // *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, vol. 31, no. 4, pp. 441-451.
- 6 Thulin J.D., Granstrom D.E., Gelberg H.B., Morton D.G., French R.A., Giles R.C. (1992) Concurrent protozoal encephalitis and canine distemper virus infection in a raccoon (*Procyon lotor*). *Vet. Rec.*, vol. 130(8), pp. 162-164. doi: 10.1136/vr.130.8.162. PMID: 1566543.
- 7 Reutskaya D.I. (2003) *Parvovirusnyj enterit sobak: Epizootologiya, immunologiya, profilaktika i mery bor'by: diss. kandidata veterinarnykh nauk [Parvovirus enteritis in dogs: Epizootology, immunology, prevention and control measures: diss. candidate of veterinary sciences]* – Barnaul
- 8 Mihalishin V.V., Rybakov S.S., Domsnij I.A., Borisov A.V., Metlin A.E., Chepurkin A.V., Egorov A.A., Ryabokon' A.A. (2001) *Ispytanie immunogennosti i bezvrednosti virusvakciny protiv beshenstva oral'nogo primeneniya // Neiroinfekcii: beshenstvo, gubkoobraznaya encefalopatiya KRS, Krejtcfel'da-Yakoba i drugie prionnye bolezni, listerioz, bolezni' Aueski, bolezni' Teshena: Mat. mezhd. nauch. prakt. konf. [Testing the immunogenicity and safety of the oral rabies virus vaccine // Neuroinfections: rabies, bovine spongiform encephalopathy, Creutzfeldt-Jakob and other prion diseases, listeriosis, Aujeszky's disease, Teschen's disease: Mat. intl. scientific practical conf.]* Pokrov, pp. 33-36.
- 9 Gröne A., Groeters S., Koutinas A., Saridomichelakis M., Baumgärtner W. (2003) Non-cytocidal infection of keratinocytes by canine distemper virus in the so-called hard pad disease of canine distemper // *Vet Microbiol.*, vol. 96(2), pp.157-63. doi: 10.1016/s0378-1135(03)00214-1. PMID: 14519333.
- 10 Bikbulatova S.M., Chemeris D.A., Nikonorov Yu.M., Mashkov O.I., Garafutdinov R.R., Chemeris A.V., Vahitov V.A. (2012) *Sposoby detekcii rezul'tatov polimeraznoj cepnoj reakcii v rezhime real'nogo vremeni [Methods for real-time detection of polymerase chain reaction results]* *Vestnik Bashkirsk. un-ta*, no.1, pp. 59-60.

ИТ АУРУЫ ВИРУСЫН ДИАГНОСТИКАЛАУ ҮШІН SYBR GREEN I ФЛУОРЕСЦЕНТТІ БОЯҒЫШТЫ ҚОЛДАНАТЫН НАҚТЫ УАҚЫТТАҒЫ ПОЛИМЕРАЗДЫ ТІЗБЕКТІ РЕАКЦИЯ

М.К. Исакеев , Ж.Ч. Орозов , М.А. Ахмеджанов , С. А. Джээнбаева 

Қырғыз ғылыми-зерттеу институты. А. Дүйшеева, Бішкек қ., Қырғызстан

Аннотация: Нақты уақыттағы полимеразды тізбекті реакцияны (ПТР-РВ) қолдана отырып, жыртқыш оба диагнозы қойылды. ПТР-РВ жүргізу үшін sybr green I флуоресцентті бояғыш қолданылды, Бішкек қаласының маңында 106 ит ПТР-РВ көмегімен тексерілді. 106 иттің 10-ы сау және бақылау ретінде пайдаланылды. 96 иттен клиникалық үлгілер алынды, 87-ден етқоректілер обасының қоздырғышы анықталды және 9-ы теріс нәтиже берді. ПТР әдісі соңғы жылдары ауылшаруашылық және үй жануарларының жұқпалы ауруларын диагностикалау үшін ветеринарлық тәжірибеде және елдің ғылыми орталықтарында сәтті қолданылды. Ветеринарлық тәжірибеде және ғылымда жұқпалы ауруларды анықтауда ПТР қоздырғыш генінің болуын анықтауға мүмкіндік беретін стандартты процедура болып табылады. Жыртқыш оба кезінде ПТР әдісін қолдану қажетті процедура болып саналады, өйткені басқа әдістер аз сезімтал және аз тиімді. ПТР-РВ қолдану диагностиканы жеңілдетеді және классикалық нұсқадағы ПТР-ге қарағанда талдау уақытын үнемдейді. Сондықтан бүгінгі таңда біздің елімізде практикалық ветеринарлық диагностикаға ПТР-РВ енгізу өзекті болып саналады.

Түйін сөздер: жыртқыш оба; диагностика; ПТР-РВ; SYBR Green I; вирус; ит.

REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION USING SYBR GREEN I FLUORESCENT DYE TO DIAGNOSE CANINE DISTEMPER VIRUS

М.К. Isakeev , Zh.Ch. Orozov , M.A. Ahmedjanov , S.A. Dzheenbaeva 

Kyrgyz Scientific-Research Institute of Veterinary Medicine named after A. Duisheeva,
Bishkek city, Kyrgyzstan

Abstract: The canine distemper virus was diagnosed using real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). For diagnostics with RT-PCR, the fluorescent dye SYBR Green I was used. Using RT-PCR, 106 dogs were tested in the vicinity of Bishkek and c. Bishkek. Of 106 dogs, 10 healthy dogs were used for controls. Clinical samples were obtained from 96 dogs, from 87 the causative agent of canine distemper virus was identified and 9 gave a negative result. In recent years, the PCR method has been successfully used in veterinary practice and in scientific centers of the our country to diagnose infectious diseases of agricultural and domestic animals. In veterinary practice and science, when determining infectious diseases, PCR is a standard procedure that allows you to determine the presence of the pathogen gene. With canine distemper virus, the use of the PCR method is considered a necessary procedure, since other methods are less sensitive and not very effective. The use of RT-PCR simplifies diagnostics and saves time for the analysis than PCR in the classic version. Therefore, today, the introduction of RT-PCR into practical veterinary medicine is considered relevant in our country.

Keywords: canine distemper virus; diagnostics; RT-PCR; SYBR Green I; virus; dog.

ПРЕИМУЩЕСТВА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПОСОБА TETRA-PRIMER ARMS-PCR РЕАКЦИИ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ НОСИТЕЛЕЙ ГАПЛОТИПОВ ФЕРТИЛЬНОСТИ HH3, HH5 У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Ж.Ж. Бименова¹ , В.П. Терлецкий² , А. Багдат¹ , Е.С. Усенбеков¹ *

¹ НАО «Казахский национальный аграрный исследовательский университет»,
 Казахстан, usen03@mail.ru

² Ленинградский государственный университет им А.С. Пушкина,
 Российская Федерация, Санкт-Петербург-Пушкин, valeriter@mail.ru

Аннотация: стратегия элиминации вредных мутации у голштинской породы включает проведение генетического мониторинга распространенности скрытых наследственных аномалии с помощью молекулярно-генетических методов. В настоящее время существует тенденция увеличения количества наследственных заболеваний у высокопродуктивных племенных животных вследствие интенсивной селекции и инбридинга. Целью настоящего исследования были разработка новых и совершенствование существующих молекулярно-генетических способов диагностики носителей гаплотипов фертильности HH3, HH5 у коров голштинской породы и изучение уровня встречаемости указанных заболеваний. Диагностика гетерозиготных носителей мутации в кодирующей части гена SMC2 проведена методом tetra-primer ARMS-PCR реакции, последовательности внешних и внутренних праймеров определены с помощью программы Primer 1. Для детекции носителей делеции в составе гена TFB1M использованы аллельспецифические праймеры, размеры ПЦР продукта у гомозиготных здоровых животных 442 п.н., у гетерозиготных носителей 442 п.н. и 256 п.н. По результатам генетического мониторинга у исследуемой популяции частота гетерозиготных носителей гаплотипа фертильности HH3 была – 3,23%, HH5 – 8,35%. Рекомендуются с целью контроля риска заболеваемости племенного поголовья наследственными аномалиями проводить генетический скрининг племенного поголовья молочных хозяйств с охватом диагностических исследований в пределах от 10% до 20% от общего поголовья.

Ключевые слова: гаплотипы фертильности HH3; HH5; гены SMC2; TFB1M; tetra-primer; ARMS-PCR реакция; дизайн праймеров; программа Primer 1.

Введение

В настоящее время у крупного рогатого скота зарегистрированы 608 наследственных аномалии, из которых более 50 генетических дефектов идентифицируются с помощью молекулярно-генетических методов диагностики. Известно, наследственные аномалии являются следствием хромосомных нарушений, абберации, изменений в составе соответствующих генов, в виде точечной мутации, инсерции или делеции. Учеными была выявлена новая мутация ARMC3, связанная с морфологическим нарушением в области хвоста спермиев быков производителей. Установлена, что пропорция спермиев с дефектами головки варьировалась от 47% до 62%, данный показатель в десять раз выше, чем в сперме у здоровых животных [1].

Генотипирование образцов ДНК для детекции носителей гаплотипа фертильности HH3 проводится с помощью STAS PCR метода. Используются внешние праймеры: F 5'-TTAGTGGCTCTGTCAATTAATCCTG-3' и R 5'-ATACTGACCATTACTAAAGAATAG-3' и внутренние праймеры F 5'-TGGACATATGCTACGTAATCCTG-3' и R 5'-TTGGTTCTTACCTGAGAATGTGTGA-3'. Использование внешних праймеров позволяет амплифицировать фрагмент гена SMC2 (structural maintenance of chromosomes 2) длиной 219 п.н., детекция аллелей мутантного и дикого типов осуществляются с помощью внутренних праймеров (дикий тип аллели – 155 п.н., мутантный тип аллели – 112 п.н.) [2].

Первые сообщения об использовании tetra-primer ARMS-PCR реакции для детекции гетерозиготных носителей точечной мутации в медицинской практике, в ветеринарии, также для ДНК паспортизации племенных животных появились в 2013 году. Так, ученые для идентификации аллелей гена каппа казеина крупного рогатого скота использовали эффективную методику – способ tetra-primer ARMS-PCR реакции, которая имеет некоторые преимущества, по сравнению с существующими классическими ПЦР-ПДРФ способами: не применяются эндонуклеазы, сокращается длительность ДНК анализа, снижается себестоимость исследования, так как нет необходимости проведения рестрикции амплификата. Следует отметить, что дизайн праймеров для tetra-primer ARMS-PCR реакции осуществляется с помощью программы Primer 1: (<http://primer1.soton.ac.uk/primer1.html>) [3].

Учеными проводится работа по оптимизации и модификации условий проведения tetra-primer ARMS-PCR, так как в составе реакционной смеси в течение 35-40 циклов работают одновременное три пары праймеров: прямой внешний и обратный внешний праймеры, прямой внешний и обратный внутренний праймеры, прямой внутренний и обратный внешний праймеры [4].

Таким образом, этап оптимизации реакции является достаточно сложным процессом и требует много времени. Важными факторами являются: методы изоляции ДНК, температура отжига праймеров, ПЦР протоколы, реагенты и концентрация праймеров. Температура плавления считалась важным фактором амплификации, однако небольшие изменения концентрации реагентов также существенно влияют на ПЦР, особенно концентрация $MgCl_2$. Необходимо каждый раз оптимизировать концентрацию внутренних и внешних праймеров в составе реакционной смеси [5].

Другими исследователями для tetra-primer ARMS-PCR реакции праймеры были подобраны с помощью http://primer1.soton.ac.uk/public_html/primer1.html и специфичность разработанных праймеров были проверены с помощью <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>. Определяющими факторами для оптимизации метода tetra-primer ARMS-PCR были: необходимая концентрация реагентов ПЦР, соотношение внешнего и внутреннего праймеров, а также температура отжига [6].

Точные и недорогие методы генетического исследования SNP полиморфизмов актуальны в ветеринарной практике, особенно когда нужно проанализировать большое поголовье животных на генетические аномалии. Дефицит адгезии лейкоцитов крупного рогатого скота (BLAD) является важным генетическим заболеванием и для ПЦР диагностики разработаны специальные праймеры, позволяющие выявить гетерозиготных носителей BLAD [7]. Для выявления носителей мутации SVM применяется в основном аллельспецифическая реакция, так как отсутствуют рестриктазы для распознавания SNP полиморфизма (SNP rs438228855). Следует отметить, что существующий способ сложный, в некоторых случаях неточный, длительный. У гомозиготных здоровых животных появляются фрагменты: 389 п.н. и 199 п.н., у гетерозиготных носителей 389 п.н., 241 п.н. и 199 п.н. [8]. Гаплотипы фертильности HH3, HH5 у коров голштинской породы сопровождается эмбриональной смертностью, ранними абортами и соответственно, разработка способов диагностики имеет большое практическое значение. Целью настоящего исследования

является разработка и внедрение для выявления точечной мутации способа tetra-primer ARMS-PCR реакции при генетических дефектах, гаплотипах фертильности HH3, HH5 у крупного рогатого скота.

Материалы и методы

В качестве материала для ДНК тестирования коров были использованы 207 образцов замороженной крови крупного рогатого скота голштинской породы племенного хозяйства №1 и 164 образца крови племенного хозяйства №2 Алматинской области. Экстракция ДНК из замороженной крови проводилась в лаборатории «Зеленой биотехнологии и клеточной инженерии» Казахстанско-Японского инновационного центра КазНАИУ согласно инструкции производителя коммерческого набора. Количество изолированной геномной ДНК и степень очистки ДНК определяли с помощью микроспектрофотометрического анализа (NanoDrop™ 2000). Для анализа последовательностей генов SMC2, TFB1M использовалась информация, имеющаяся на Американском сайте NCBI в форматах FASTA и GenBank, последовательности праймеров для tetra-primer ARMS-PCR реакции определяли с помощью программы Primer 1: Forward inner primer (T allele): 885 TTGGACATATGCTACGTA CTCA GTT 909, Reverse inner primer (C allele): 930 GTTCTTACCTGAGAATGTGGGG 909, Forward outer primer (5' – 3'): 773 AGGTCTTTAGTGGCTCTGTCATTAAT 798, Reverse outer primer (5' – 3'): 1125 TTGTAATTCCAGGCTCTTTCTTTAA 1101, температура отжига 59 (54) °C, Product size for T allele: 242 bp, Product size for C allele: 158 bp и Product size of two outer primers: 353 bp.

Детекция аллелей гена TFB1M (гаплотип HH5) у коров проводилась с помощью следующих пар праймеров: прямого праймера для дикого типа F-WD: 5'-CAGCATCCAGAAGCATCATTGTA AAA-3' и прямого праймера для мутантного типа аллели F-MT: 5'-CAGAAGCATCATKGTAATTGTAATCAT-3', обратного праймера для дикого типа аллели R-R-WD: 5'-AAGGCAGCTGTCAAATTTATTGTTGTTT-3', обратного праймера для мутантного типа аллели R-MT: 5'-CTATGAATTTTGTGAATGGTATGGTGTA-3'. Использование вышеуказанной пары праймеров позволяет амплифицировать участок гена длиной 90 п.н., реакция проводится в двух отдельных пробирках одновременно и где идет амплификация, идентифицируется как гетерозиготные носители гаплотипа фертильности HH5.

Также, для выявления инсерции в части гена TFB1M был использован другой способ: F: 5'-AGATATGCTAAAGTTTACCTAGAAGAA-3', Wild R: 5'-CTGAAGCTCCATTCTGAGTCAT-3', Mutant R: 5'-TGCTCTATGAATTTTGTGAATGGT-3'. В зависимости от генотипа животных в результате амплификации образуются фрагменты: 442 п.н. и 256 п.н., первый фрагмент соответствует дикому типу аллели, второй мутантному типу аллели гена TFB1M. Разделение фрагментов ДНК, амплификата осуществлялось в 3% агарозном геле с помощью горизонтального электрофореза.

Результаты

Проведено ДНК тестирование 371 образца крови коров голштинской породы зарубежной селекции племенных хозяйств Алматинской области на генетические дефекты, гаплотипы фертильности HH3, HH5 с помощью tetra-primer ARMS-PCR реакции. Компьютерная программа Primer 1 позволяет осуществлять дизайн внешних и внутренних праймеров: Forward outer primer 5'-AGGTCTTTAGTGGCTCTGTCATTAAT 3', Reverse outer primer 5'-TTGTAATTCCAGGCTCTTTCTTTAA 3', Forward inner primer (T allele): прямой 5 TTGGACATATGCTACGTA CTCA GTT и обратный Reverse inner primer (C allele): обратный GTTCTTACCTGAGAATGTGGGG. Прямые и обратные внешние праймеры позволяют амплифицировать фрагмент гена SMC2 длиной 353 п.н., который не имеет диагностическое значение (рисунок 1).

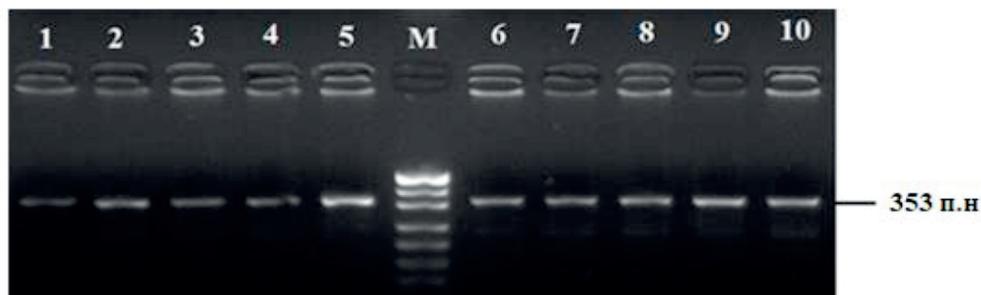


Рисунок 1. Электрофореграмма амплификата гена SMC2 (гаплотип НН3), 3% агароза, 1-10 лунки ампликат размером 353 п.н., М – ДНК маркер рUC19/MspI



Рисунок 2. Электрофореграмма результата tetra-primer ARMS-PCR реакции, амплификат гена SMC2 характерный для дикого типа аллели Т, 4% агароза, 1-10 лунки здоровые гомозиготные животные, фрагмент 242 п.н., М – ДНК маркер рUC19/MspI

Идентификация гомозиготных здоровых особей и гетерозиготных носителей мутации гаплотипа фертильности НН3 нами осуществлялась с помощью tetra-primer ARMS-PCR реакции, с помощью внутреннего прямого и внешнего обратного праймеров были синтезированы фрагменты, длиной 242 п.н., характерные для гомозиготных здоровых животных (рисунок 2). На электрофореграмме (рисунок 3) продемонстрированы образцы ДНК гетерозиготных носителей, амплифицированные с использованием специфичных для мутантного типа С аллели праймеров, внешнего прямого и внутреннего обратного праймеров, на электрофореграмме хорошо видны фрагменты размером 158 п.н., оптимальной температурой отжига праймеров составила 54 °С.



Рисунок 3. Электрофореграмма tetra-primer ARMS-PCR реакции с праймерами для мутантного типа аллели С гена SMC2, 4% агароза, 1, 2-6 лунки гетерозиготные носители НН3, амплификат 158 п.н., М – ДНК маркер рUC19/MspI

В наших экспериментах на первом этапе работы для диагностики носителей делеции в составе гена TFB1M (гаплотип фертильности HH5) был использован способ амплификации участка гена с помощью аллель специфических праймеров, одновременно в двух разных пробирках, размер полученного амплификата 90 п.н. (рисунок 4).

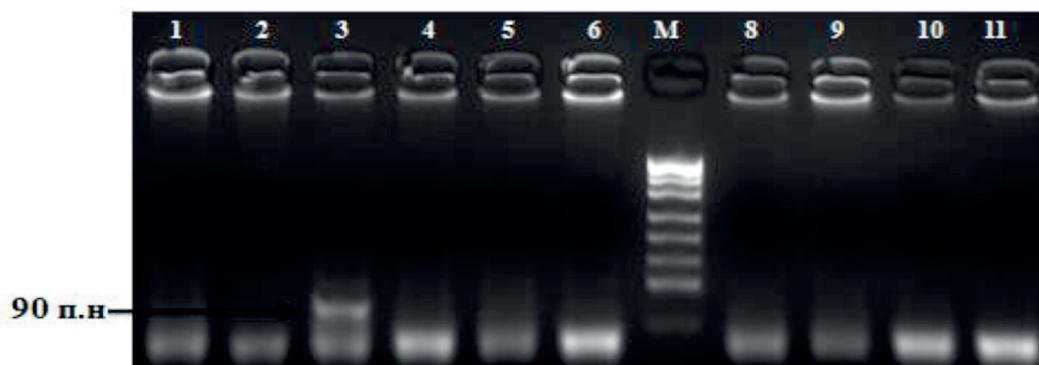


Рисунок 4. Электрофореграмма амплификата гена TFB1M, 4,0% агароза, 1-2, 4-11 лунки отрицательный результат, здоровые гомозиготные, 3-лунка гетерозиготный носитель гаплотипа HH5, длина фрагмента 90 п.н., М – ДНК маркер pUC19/MspI

Следует отметить, что прямые праймеры для дикого и мутантного типов аллелей имеют одинаковую последовательность, идентифицировать гомозиготных здоровых особей и гетерозиготных носителей позволяет применение специфических обратных праймеров, которые комплементарны к дикому и мутантному типам аллелей гена TFB1M. Методологическая сущность метода заключается в том, что при одновременной амплификации образцов ДНК, в двух разных пробирках идет амплификация во всех образцах, если животные являются гомозиготными здоровыми, во второй пробирке, с обратными праймерами для мутантного типа аллелей идет амплификация фрагмента гена только, у гетерозиготных носителей. Амплификация проводится параллельно в двух разных пробирках, так как ПЦР продукт имеет одинаковый размер – 90 п.н., визуализация результатов амплификации осуществляется в 4,0% агарозном геле (рисунок 4).

Таким образом, с помощью вышеизложенного способа идентифицирует гетерозиготных носителей гаплотипа фертильности HH5, однако данный способ трудоемкий, затратный, одновременно необходимо поставить ПЦР в двух разных пробирках, размер полученного амплификата небольшой (90 п.н.), который слабо визуализируется на электрофореграмме. Поэтому, нами на следующем этапе работы был использован альтернативный способ детекции носителей гаплотипа фертильности HH5 с помощью следующих праймеров: F: 5'-AGATATGCTAAAGTTTACCTAGAAGAA-3', R: 5'-CTGAAGCTCCATTCTGAGTCAT-3', R: 5'-TGCTCTATGAATTTTGTGAATGGT-3'. В состав реакционной смеси входят три праймера, общий прямой и два обратных, специфичных для дикого (442 п.н.) и мутантного типов аллелей (256 п.н.) (рис 4).

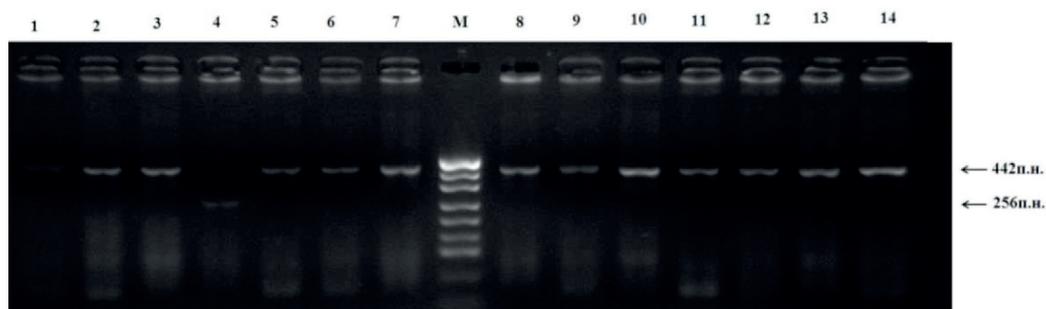


Рисунок 5. Электрофореграмма амплификата гена TFB1M, 3% агароза, 1-3, 5-14 лунки здоровые гомозиготные, 4-лунка – гетерозиготный носитель гаплотипа HH5, длина фрагментов 442 п.н., 256 п.н., М – ДНК маркер pUC19/MspI

ПЦР диагностика носителей гаплотипа фертильности HH5 проводится в двух вариантах, где в состав реакционной смеси входят все три праймера и позволяет определить гомозиготных здоровых животных и гетерозиготных носителей. Другой вариант, в состав реакционной смеси входят общий прямой праймер и обратный праймер для мутантного типа аллели и в результате амплификации образуется ПЦР продукт размером 256 п.н., характерный для гетерозиготных носителей (рисунок 5).

В результате генетического скрининга 371 коров были выявлены гетерозиготные носители мутации гаплотипа фертильности HH3 у 7 коров (3,38%) голштинской породы Канадской селекции в племенном хозяйстве №1 и у 5 коров (3,04%) в племенном хозяйстве №2. Распространенность другого гаплотипа HH5 у коров племенного хозяйства №1 была высокой и составила 11,59% (24 животные), у коров племенного хозяйства №2 – 4,26% (7 голов).

Обсуждение

Известно, что ген SMC2 (гаплотип HH3) локализован на хромосоме 8, данный генетический дефект появился в результате точечной мутации T→C в позиции F1135S (95410507) [9]. Российские ученые для детекции носителей гаплотипа фертильности HH3 используют три праймера, специфичные для дикого и мутантного типов аллелей, идентификация генотипов животных осуществляется путем рестрикции полученного ПЦР продукта рестриктазой SspMI с сайтом узнавания C↑TAG, на электрофореграмме у здоровых гомозиготных животных появляются два фрагмента: 219 п.н. и 155 п.н., у гетерозиготных носителей три фрагмента: 219 п.н., 155 п.н. и 112 п.н. [10]. Установлена локализация точечной мутации в составе гена SMC2, выделена красным цветом в квадратной скобке: GCCCTGGATCTTTCT CATACTCAGAATATTGGACATATGCTACGTA**CTCA**[T/C]

TTACACATTCTCAGGTAAGAACCAAAA. Нами, с помощью программы Primer 1 были определены последовательности двух внешних и двух внутренних праймеров, у гетерозиготных носителей гаплотипа фертильности на электрофореграмме были обнаружены фрагменты размером 158 п.н. (рисунок 3). Разработанный способ tetra-primer ARMS-PCR реакции отличается от существующего способа тем, что исключается применение рестриктазы, что снижает себестоимость диагностических исследований. Также важным фактором являются оптимальные размеры полученных с помощью tetra-primer ARMS-PCR реакции фрагментов: 353 п.н., 242 п.н. и 158 п.н., которые хорошо визуализируются в 3,0% агарозном геле при горизонтальном электрофорезе.

Согласно стратегии снижения распространения летальных вредных мутации у крупного рогатого скота голштинской породы предусмотрено проведение генетического мониторинга поголовья племенных животных с охватом не менее 10-20% от общего поголовья.

В племенном хозяйстве №1 количество крупного рогатого скота разной половозрастной группы составило 800 голов, в племенном хозяйстве №2 600 голов, уровень охвата диагностическим исследованием на генетические дефекты HH3, HH5, составил 25,8% и 27,3%, соответственно.

Заклучение

Существуют три варианта возникновения генетических дефектов у крупного рогатого скота, в результате точечной мутации, (замена одного нуклеотида, SNP полиморфизм), инсерции (вставка в кодирующей части гена) и делеции (удаление участка гена). В работе для выявления точечной мутации в позиции F1135S T→C гена SMC2 был использован способ tetra-primer ARMS-PCR реакции, последовательности праймеров определены программой Primer 1, так как нет соответствующей рестриктазы для идентификации мутантного и дикого типов аллелей. Таким образом, разработанный способ является быстрым, точным и позволяет проводить генетический мониторинг животных в большом количестве. Причиной возникновения гаплотипа фертильности HH5 у голштинской породы скота является делеция участка гена TFB1M, длиной 138 347 п.н., соответственно для детекции носителей данного гаплотипа были использованы три праймера: прямой общий и обратный праймер для дикого типа аллели, обратный праймер для мутантного типа аллели. Полученные в результате амплификации фрагменты ДНК достаточного размера, 442 п.н. и 256 п.н., хорошо визуализируются на электрофореграмме. Частота гетерозиготных носителей гаплотипа HH3 и HH5 у исследуемой популяции составила 3,23% и 8,35%, соответственно.

Финансирование. Работа выполнена в рамках проекта: «Разработка молекулярно-генетических способов детекции скрытых мутации у крупного рогатого скота и управление процессом элиминации наследственных аномалии» на 2021-2023 годы.

Благодарности. Авторы выражают благодарность руководству и сотрудникам Казахстанско-Японского инновационного центра КазНАИУ за оказанную помощь в проведении данных исследований.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

- 1 Hubert Pausch, Heli Venhoranta, Christine Wurmser, Kalle Hakala, Terhi Iso-Touru, Anu Sironen, Rikke K. Vingborg, Hannes Lohi, Lennart Söderquist, Ruedi Fries and Magnus Andersson. A frameshift mutation in ARMC3 is associated with a tail stump sperm defect in Swedish Red (Bos taurus) cattle // BMC Genetics. – 2016. – P. 17-49.
- 2 Бағдат А.Б., Усенбеков Е.С. Модификация способа диагностики носителей гаплотипа фертильности HH3 у коров голштинской породы с помощью STAS PCR метода //Материалы международной научной конференции студентов и молодых ученых «ФАРАБИ ЭЛЕМИ» Алматы, Казахстан, 6-9 апреля 2020. – С. 227
- 3 P.A.S. Fonseca, I.C. Rosse, M. DeMiranda, M.A. Machado, R.S. Verneque, M.G.C.D. Peixoto and M.R.S. Carvalho. A new tetra-primer ARMS-PCR for genotyping bovine kappa-casein polymorphisms// – 2013. – Vol. 12. – P. 6521-6526.
- 4 Hamzeh Mesrian Tanha, Marjan Mojtavavi Naeini, Soheila Rahgozar, Seyed Mohammad Mahdi Rasa, and Sadeq Vallian. Modified Tetra-Primer ARMS PCR as a Single-Nucleotide Polymorphism Genotyping Tool // GENETIC TESTING AND MOLECULAR BIOMARKERS. – 2015. – Vol. 19, №3. – P. 1-6
- 5 Ruan Felipe Vieira Medrano, Camila Andre´a de Oliveira. Guidelines for the Tetra-Primer ARMS-PCR Technique Development. Mol Biotechnol. – 2014. – Vol. 56, P. 599–608, DOI 10.1007/s12033-014-9734-4

- 6 Ana Sofia Zabala, Miriam Ester Vasquez Gomez, Micaela Fernanda Álvarez, Susana Siewert. Tetra Primer ARMS PCR Optimization to Detect Single Nucleotide Polymorphism of the KLF14 Gene // Open Access Library Journal – 2017. – Vol. 4.
- 7 Rafeeqe R. Alyethodi, Umesh Singh, Sushil Kumar, Rajib Deb, Rani Alex, Sheetal Sharma, Gyanendra S. Sengar and B. Prakash. Development of a fast and economical genotyping protocol for bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) in cattle // SpringerPlus – 2016. – Vol. 5. – P.1442.
- 8 Alyethodi R. R., Singh U., Kumar S., Alex R., Sengar G. S., Raja T. V., Deb R. and Prakash B. Designing, optimization, and validation of whole blood direct T-ARMS PCR for precise and rapid genotyping of complex vertebral malformation in cattle // Alyethodi et al. BMC Biotechnology. – 2021. – P. 21-36.
- 9 Hayes B, Daetwyler HD, Fries R, Guldbandsen B, Lund MS, et al. The 1000 Bull Genomes Project – Toward Genomic Selection From Whole Genome Sequence Data In Dairy and Beef Cattle // Plant Anim Genome XXI Conf. San Diego, CA: Abstr. – 2013. – Vol.150.
- 10 Романенкова О.В., Гладырь Е.А., Костюнина О.В., Зиновьева Н.А. Разработка тест-системы для диагностики гаплотипа фертильности крупного рогатого скота HH3, ассоциированного с ранней эмбриональной смертностью // Достижения науки и техники АПК. – 2015. – Т. 29. № 11.

References

- 1 Hubert Pausch, Heli Venhoranta, Christine Wurmser, Kalle Hakala, Terhi Iso-Touru, Anu Sironen, Rikke K. Vingborg, Hannes Lohi, Lennart Söderquist, Ruedi Fries and Magnus Andersson. A frameshift mutation in ARMC3 is associated with a tail stump sperm defect in Swedish Red (Bos taurus) cattle // BMC Genetics. – 2016. – P. 17-49.
- 2 Bagdat A.B., Usenbekov E.S. Модификация способа диагностики носителей гаплотипа фертильности HH3 у коров голштинской породы с помощью STAS PCR метода // Материалы международной научной конференции студентов и молодых ученых «FARABI ALEMI» Алматы, Казахстан, 6-9 апреля 2020. – С. 227.
- 3 P.A.S. Fonseca, I.C. Rosse, M. DeMiranda, M.A. Machado, R.S. Verneque, M.G.C.D. Peixoto and M.R.S. Carvalho. A new tetra-primer ARMS-PCR for genotyping bovine kappa-casein polymorphisms// – 2013. – Vol.12. – P. 6521-6526.
- 4 Hamzeh Mesrian Tanha, Marjan Mojtavavi Naeini, Soheila Rahgozar, Seyed Mohammad Mahdi Rasa, and Sadeq Vallian. Modified Tetra-Primer ARMS PCR as a Single-Nucleotide Polymorphism Genotyping Tool // GENETIC TESTING AND MOLECULAR BIOMARKERS. – 2015. – Vol.19, №3. – P. 1-6
- 5 Ruan Felipe Vieira Medrano, Camila Andre'a de Oliveira. Guidelines for the Tetra-Primer ARMS-PCR Technique Development. Mol Biotechnol. – 2014. – Vol. 56, P. 599-608, DOI 10.1007/s12033-014-9734-4
- 6 Ana Sofia Zabala, Miriam Ester Vasquez Gomez, Micaela Fernanda Álvarez, Susana Siewert. Tetra Primer ARMS PCR Optimization to Detect Single Nucleotide Polymorphism of the KLF14 Gene // Open Access Library Journal – 2017. – Vol. 4.
- 7 Rafeeqe R. Alyethodi, Umesh Singh, Sushil Kumar, Rajib Deb, Rani Alex, Sheetal Sharma, Gyanendra S. Sengar and B. Prakash. Development of a fast and economical genotyping protocol for bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) in cattle // SpringerPlus – 2016. – Vol. 5. – P.1442.
- 8 Alyethodi R.R., Singh U., Kumar S., Alex R., Sengar G.S., Raja T.V., Deb R. and Prakash B. Designing, optimization, and validation of whole blood direct T-ARMS PCR for precise and rapid genotyping of complex vertebral malformation in cattle // Alyethodi et al. BMC Biotechnology. -2021.- P.21-36.
- 9 Hayes B, Daetwyler HD, Fries R, Guldbandsen B, Lund MS, et al. The 1000 Bull Genomes Project – Toward Genomic Selection From Whole Genome Sequence Data In Dairy and Beef Cattle // Plant Anim Genome XXI Conf. San Diego, CA: Abstr. – 2013. – Vol. 150.
- 10 Romanenkova O.V., Gladyr E.A., Kostyunina O.V., Zinoveva N.A. Razrabotka test-sistemy dlya diagnostiki gaplotipa fertiľnosti krupnogo roगतogo skota HH3, associirovannogo s rannej embrional'noj smertnost'yu // Dostizheniya nauki i tekhniki APK. – 2015. – Т. 29. № 11.

ІРІ ҚАРА МАЛЫНДА НН3, НН5 ҰРЫҚТАНҒЫШТЫҚ ГАПЛОТИПТЕРІН БАЛАУ ЖАСАУҒА TETRA-PRIMER ARMS-PCR РЕАКЦИЯ ӘДІСІН ҚОЛДАНУДЫҢ АРТЫҚШЫЛЫҚТАРЫ

Ж.Ж. Бименова¹ , В.П. Терлецкий² , А. Багдат¹ , Е.С. Усенбеков¹ *

¹ КЕАҚ «Қазақ ұлттық аграрлық зерттеу университеті»,
 Қазақстан, usen03@mail.ru

² А.С. Пушкин атындағы Ленинград мемлекеттік университеті,
 Ресей Федерациясы, Санкт-Петербург-Пушкин valeriter@mail.ru

Аңдатпа: Голштейн тұқымындағы зиянды мутацияны жою стратегиясы молекулалық-генетикалық әдістерді қолдана отырып, жасырын тұқым қуалайтын ауытқулардың таралуына генетикалық мониторинг жүргізуді қамтиды. Қазіргі уақытта қарқынды селекция және инбридинг бір популяция аумағындағы жақын түрлердің будандасуы салдарынан жоғары өнімді асыл тұқымды жануарлардағы тұқым қуалайтын аурулар санының ұлғаюуы байқалады. Осы зерттеудің мақсаты голштейн тұқымдас сиырлардағы НН3, НН5 ұрықтанғыштық гаплотиптерінің тасымалдаушыларын диагностикалаудың жаңа және қолданыстағы молекулалық-генетикалық әдістерін жасау және осы аурулардың пайда болу деңгейін зерттеу болып табылды. SMN2 генінің кодтау бөлігіндегі гетерозиготалы мутация тасымалдаушыларын диагностикалау tetra-primer ARMS-PCR реакциясы арқылы жүзеге асырылады, сыртқы және ішкі праймерлердің тізбектері Primer 1 бағдарламасының көмегімен анықталады. TFB1M генінің құрамындағы делеция тасымалдаушыларын анықтау үшін аллельді арнайы праймерлер қолданылды, гомозиготалы сау жануарлардағы ПТР өнімінің мөлшері 442 ж. н., гетерозиготалы тасымалдаушыларда 442 ж.н. және 256 ж.н. анықталды. Генетикалық мониторинг нәтижелері бойынша зерттелген популяцияда НН3 ұрықтанғыштық гаплотипінің гетерозиготалы тасымалдаушыларының жиілігі – 3,23%, НН5 – 8,35% құрады. Асыл тұқымды мал басының тұқым қуалайтын ауытқулармен ауру қаупін бақылау мақсатында диагностикалық зерттеулерді қамти отырып, жалпы мал басының 10%-дан 20%-ға дейінгі ауқымын асыл тұқымды сүт шаруашылықтарының мал басына генетикалық скрининг жүргізу ұсынылады.

Түйін сөздер: НН3; НН5 ұрықтанғыштық гаплотиптері; SMC2; TFB1M гендері; tetra-primer; ARMS-PCR реакциясы; праймер дизайны; Primer 1 бағдарламасы.

ADVANTAGES OF USING TETRA-PRIMER ARMS-PCR REACTION METHOD FOR DETECTING CARRIERS OF NN3, NN5 FERTILITY HAPLOTYPES IN CATTLE

Zh.Zh. Bimenova¹ , V.P. Terlestky² , A.B. Bagdat¹ , Y.S. Ussenbekov¹ *

¹ NJSC «Kazakh National Agrarian Research University», Kazakhstan, usen03@mail.ru

² Leningrad State University named after A.S. Pushkin, Russian Federation,
 St. Petersburg-Pushkin, valeriter@mail.ru

Abstract: the strategy for eliminating harmful mutations in the Holstein breed includes genetic monitoring of the prevalence of hidden hereditary anomalies using molecular genetic methods. Currently, there is a tendency to increase the number of hereditary diseases in

highly productive breeding animals due to intensive selection and inbreeding. The aim of this study was to develop new and improve existing molecular genetic methods for diagnosing carriers of fertility haplotypes HH3, HH5 in Holstein cows and to study the incidence of these diseases. Diagnosis of heterozygous carriers of the mutation in the coding part of the SMC2 gene was carried out using the tetra-primer ARMS-PCR reaction, the sequences of external and internal primers were determined using the Primer 1 program. Allele-specific primers were used to detect carriers of the deletion in the TFB1M gene, the sizes of the PCR product in homozygous healthy animals 442 bp, in heterozygous carriers 442 bp. and 256 b.p. According to the results of genetic monitoring in the study population, the frequency of heterozygous carriers of the HH3 fertility haplotype was 3.23%, HH5 – 8.35%. It is recommended, in order to control the risk of morbidity of breeding stock with hereditary anomalies, to carry out genetic screening of breeding stock of dairy farms with the coverage of diagnostic tests ranging from 10% to 20% of the total livestock.

Key words: fertility haplotypes HH3; HH5; SMC2 genes; TFB1M; tetra-primer; ARMS-PCR reaction; primer design; Primer 1 program.

МОНИТОРИНГ ВЫСОКОПАТОГЕННОГО ГРИППА ПТИЦ В КАЗАХСТАНЕ

А.К. Бопи^{1,2} , З.Д. Омарова¹ , Р.А. Рыстаева¹ , А.Б. Тулендибаев¹ ,
 Т.У. Аргимбаева¹ , Д.Ә. Әлібекова¹ , Н.А. Әубәкір¹ , Т.Т. Ермекбай¹ ,
 А.А. Серикбай³ , М.Б. Орынбаев¹ , Х.Б. Абеуов¹ *

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

² Кыргызский государственный университет им. И. Арабаева, г. Бишкек

³ Казахский национальный университет им. аль-Фараби, г. Алматы
 abeuov_khairulla@mail.ru

Аннотация. В данной статье представлены данные мониторинговых исследований по гриппу птиц в северных регионах Казахстана. Сбор образцов от домашней и дикой птицы проводили в северных регионах региона Казахстана. Обнаружение и типирование вируса гриппа проводили методом ПЦР и секвенированием. Биологическую активность выделенных вирусов определяли на 9-10-ти суточных развивающихся куриных эмбрионах. В результате исследований установлено, что причиной заболевания и гибели домашних птиц в хозяйствах Акмолинской и Северо-Казахстанской области в 2021 году является грипп птиц. Вирус гриппа А/Н5N8 был обнаружен в образцах от домашних птиц, доставленных из хозяйств Акмолинской (53,8%) и Северо-Казахстанской (16,7%) областей, а также в образце от дикого гуся, обитавшей на озере Койбагар Костанайской области. Выделенные от диких и домашних птиц вирусы гриппа отнесены к субтипу А/Н5N8 к Кладе 2.3.4.4b по Евразийской линии II (Eurasian HPAIV H5N8 Lineage II). Распространение гриппа птиц в популяции дикой и домашней птицы в северных районах Казахстана требует от ветеринарных служб принятия мер по разработке эффективных мер контроля с учетом данных молекулярной эпидемиологии.

Ключевые слова: вирус; грипп птиц; субтип; ПЦР; изолят; активность

Введение

Среди инфекционных болезней, грипп занимает особое положение, что обусловлено чрезвычайной изменчивостью возбудителя [1]. Грипп типа А заразен как для людей, так и для животных, включая птиц, свиней, лошадей, китов и тюленей. Естественным хозяином и природным резервуаром большинства подтипов вируса гриппа А являются дикие птицы, преимущественно водоплавающие или околотовные.

Вирус гриппа типа А принадлежит семейству *Orthomyxoviridae*. Вирусы гриппа подразделяются на субтипы на основании антигенных различий в поверхностных гликопротеинах. На сегодняшний день известно 18 субтипов гемагглютинина и 11 субтипов нейраминидазы, из них у птиц идентифицировано шестнадцать подтипов HA (H1-H16) и девять NA (N1-N9). Вирусы гриппа подтипов А/Н17N10 и А/Н18N11 выделены от летучих мышей и до настоящего времени от других видов хозяев не выделялись [2, 3]. Наиболее часто у них встречаются 24 комбинации гемагглютинина и нейраминидазы: H1N1-H2N2-H2N3-H3N2-H3N8-H4N2-H4N4-H4N6-H4N8-H5N1-H5N2-H5N9-H6N1-H6N2-H6N5-H6N9

–H7N1–H7N2–H7N3–H7N7–H9N2–H9N8–H10N7–H11N9. 15 подтипов гриппа распространяются на птиц, одним из самых опасных подтипов является H5N1.

В настоящее время в природе высокопатогенные вирусы гриппа, которые приводят к острым клиническим заболеваниям у кур, индеек и других видов птиц, были связаны только с такими антигенными вариантами, как H5 и H7. Поскольку существует риск трансформации вирусов гриппа птиц низкой патогенности (НПГП) в высокопатогенный (ВПГП) в результате мутаций, все типы вирусов ВПГП H5/H7, выделенные от птиц, подлежат регистрации во Всемирной организации здравоохранения животных (ВОЗЖ).

Анализ данных по высокопатогенному гриппу птиц в соседних странах показывает, что за последние 3 года на Евразийском континенте в странах имеющих контакты с Республикой Казахстан через перелетных птиц было зарегистрировано 1402 лабораторно подтвержденных случая гриппа среди птиц. 1131 из 1402 был вызван вирусом гриппа А/Н5N8. Также были зарегистрированы случаи гриппа А/Н5N1 (37), А/Н5N2 (113), А/Н5N4 (1), А/Н5N5 (84), А/Н5N6 (6), А/Н7N7 (3), также 39 случаев А/Н5 с неидентифицированной N. Наличие в регионе нескольких вариантов гриппа птиц с различной антигенной формулой угрожает птицеводству нашей страны.

Через территорию Казахстана проходят несколько миграционных путей, что может способствовать распространению вируса гриппа с пролетных путей Юго-Восточной Азии на европейский и североафриканский пролетные пути и наоборот. Дикие птицы, мигрирующие из Африки, Европы, Центральной и Юго-Восточной Азии были обнаружены в небольших озерах, расположенных на севере Казахстана [4]. Существует высокий риск заноса и распространения вируса гриппа дикими перелетными птицами.

Цель нашей работы – мониторинг гриппа птиц в Казахстане, выделение и изучение биологических свойств выделенных изолятов вируса.

Материалы и методы

В работе использовали биологические пробы от больных и павших птиц, доставленных из различных регионов Республики Казахстан с целью выяснения причины заболевания и гибели животных. Было проведено эпизоотологическое обследование хозяйств и отбор биологических образцов от больных и павших птиц. От диких птиц образцы собраны во время сезонной охоты.

Кровь отбирали из подкрыльцовой вены при помощи вакутайнера. Пробирки с кровью промаркировав отстаивали для свертывания крови, сыворотку отделяли в условиях ветеринарной лаборатории. Затем отстоявшиеся сыворотки сливали в криопробирки, маркировали и погружали в емкость с жидким азотом. Носоглоточные смывы отбирали тампонами. Затем, кончик тампона помещали в криопробирку и промаркировав переносили непосредственно в емкость с жидким азотом. У павших птиц отбирали кусочки легких и трахеи, помещали в криопробирки, которые после маркировки закладывали в жидкий азот. Транспортировку проб до НИИПББ осуществляли в жидком азоте.

Доставленные в НИИПБ пробы были подвергнуты комплексному вирусологическому исследованию.

Для этого использовали 9-10-дневные развивающиеся куриные эмбрионы (РКЭ). Выделение вируса гриппа из суспензии образца проводили, согласно протоколам ВОЗЖ.

Для выделения РНК вируса гриппа птиц из биоматериалов использованы наборы “Viral RNA MiniKit” фирмы «QIAGEN», согласно инструкции изготовителя.

Обнаружение вируса гриппа птиц субтипа А/Н5 проводили постановкой ОТ-ПЦР-РВ набором OneStep RT-PCR Kit фирмы «QIAGEN». Типирование по нейраминидазе проводили в ОТ-ПЦР.

Биологическую активность вируса гриппа птиц определяли с использованием эмбрионов 9-суточного возраста, методом титрования аллантаоисной жидкости, собранной после 4-го пассажа изолята А/Н5N8 вируса гриппа птиц в РКЭ. Определение наличия вируса гриппа птиц в РКЭ проводили при помощи реакции гемагглютинации (РГА) путем титрации пассажной вирусосодержащей аллантаоисной жидкости (ВАЖ).

Наработанные ПЦР-продукты очищали с использованием набора QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Germany), согласно инструкции изготовителя.

Секвенирование ПЦР-продуктов проводили с использованием набора BigDye terminator v.3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, USA) на автоматическом анализаторе 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems/HITACHI, Japan).

Результаты исследований

В июле-октябре 2021 года для исследований в РГП НИИПББ были доставлены образцы от домашних птиц собранные в хозяйствах Акмолинской, Северо-Казахстанской и Восточно-Казахстанской областях, а также смывы от диких птиц, отобранные в Костанайской области. Все доставленные образцы были исследованы на наличие вируса гриппа А. В результате, проведенных исследований вирус гриппа А/Н5N8 был обнаружен в образцах от домашних птиц, доставленных из хозяйств Акмолинской (53,8%) и Северо-Казахстанской (16,7%) областей, а также вирус в образце дикого гуся, отстреленного на озере Койбагар Костанайской области (табл.1). Полученные данные свидетельствуют, что в 2021 году среди домашних и диких птиц в северных регионах нашей страны циркулировал высокопатогенный грипп птиц А/Н5N8.

Таблица 1 – Результаты ПЦР-исследований биологических образцов птиц доставленных из регионов РК

Место отбора образцов	Дата отбора	Вид птиц	Количество исследованных / количество положительных / % положительных	Субтип
Костанайская область	октябрь 2021	гусь дикий	10/1/10	А/Н5N8
Северо-Казахстанская область	октябрь 2021	курица	12/2/16,7	А/Н5N8
Восточно-Казахстанская область	октябрь 2021	курица	10/0/0	-
Акмолинская область	октябрь 2021	гусь домашний	1/1/100	А/Н5N8
	июль-октябрь 2021	курица	10/6/60	А/Н5N8
	октябрь 2021	индюк	2/0/0	-

Заражением 10-ти суточных развивающихся куриных эмбрионов из ПЦР положительных образцов кур доставленных из Акмолинской области были выделены гемагглютинирующие агенты, идентифицированные как вирус гриппа А/Н5N8. Биологические характеристики выделенных вирусов представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Молекулярно-биологические характеристики вируса А/Н5N8

Название штамма	Дата выделения	Место выделения	Вид птицы	Биологическая активность AID50/см ³	Гемагглютинирующая активность, ГАЕ	Сайт расщепления	Генетическая линия
А/кураца/ Акмола/62/21 (H5N8)	07. 2021 г	Акмолинская область	Курица	9,45	1:128	PLREKRRKR/G	2.3.4.4b
А/дикий гусь/ Костанай/83/21 (H5N8)	10. 2021 г	Костанайская область	Дикий гусь	8,45	1:32	PLREKRRKR/G	2.3.4.4b
А/домашний гусь/ Акмола/65/21 (H5N8)	10. 2021 г	Акмолинская область	Домашний гусь	8,95	1:64	PLREKRRKR/G	2.3.4.4b
А/кураца/ СКО/97/21 (H5N8)	10. 2021 г	Северо-Казахстанская область	Курица	8,2	1:128	PLREKRRKR/G	2.3.4.4b

В результате анализа все выделенные вирусы по сайту расщепления с последовательностью PLREKRRKR/G были отнесены к высокопатогенному вирусу гриппа птиц (ВПГП). Филогенетический анализ выделенных изолятов по гемагглютинуину, позволил отнести их к Кладе 2.3.4.4b по Евразийской линии II (Eurasian HPAIV H5N8 Lineage II).

Обсуждение

Первые вспышки высокопатогенного гриппа птиц в Казахстане были зарегистрированы в 2005 году [5, 6]. Последние 15 лет в птицеводческих хозяйствах нашей страны вспышки высокопатогенного гриппа птиц не регистрировали. Эпизоотическое благополучие в птицеводческих хозяйствах Республики Казахстан поддерживалось благодаря интенсивной вакцинации птиц. Во многих хозяйствах отработаны схемы вакцинации для поддержания высокого количества поствакцинальных антител, которое требуется для обеспечения невосприимчивости птиц к вирусу гриппа А. Однако, несмотря на все проводимые мероприятия, в 2020 году вспышки гриппа птиц нанесли огромный ущерб птицеводству Казахстана. По данным КВКиН МСХ РК в 2020 году в нашей стране было зарегистрировано 98 случаев высокопатогенного гриппа птиц. В результате вспышек, ветеринарной службой нашей страны в Алматинской, Акмолинской, Северо-Казахстанской, Костанайской, Павлодарской, Карагандинской областях было вынуждено убито более 1,5 млн птиц. Очевидно, что эти вспышки связаны со вспышками гриппа птиц регистрируемых на Евразийском континенте. Анализ данных распространения гриппа А/Н5N8 на Евразийском континенте показывает, что вирус гриппа данного субтипа в 2019 г. был зарегистрирован в Афганистане (2 очага) и Иране (8), в 2020 г. в 6 странах было зарегистрировано 256 вспышек, в том числе в России 80 вспышек. В 2021 г. количество вспышек вызванных вирусом гриппа достигло 865 и охватило практически всю восточную и северную Европу, а также страны Азии. Вспышки регистрировались в течение всего года и нанесли серьезный экономический ущерб.

Данные полученные нами по результатам настоящих исследований показывают, что эпизоотия вируса гриппа птиц начавшаяся в 2020 г. до сих пор продолжается. Проведенными исследованиями было установлено, что вспышки гриппа в 2021 г. в Северо-Казахстанской и Акмолинской областях среди домашних птиц вызваны вирусом гриппа птиц А/Н5N8, который относится к кладе 2.3.4.4b по Евразийской линии II (Eurasian HPAIV H5N8 Lineage II). Ранее было показано, что основное количество вспышек в странах Европы, на Ближнем

Востоке и в Юго-Восточной Азии среди дикой и домашней птицы было вызвано вирусами гриппа подтипа А/Н5N8 клады 2.3.4.4b [7]. На основании полученных данных можно заключить, что вирус гриппа А/Н5N8 клады 2.3.4.4b в 2021 году циркулировал в популяции домашней и дикой птицы северных районов нашей страны. Обнаружение вируса гриппа А/Н5N8 у дикого гуся в Костанайской области позволяет предположить, что дикие птицы действуют как резервуары гриппа птиц и вспышки болезни среди домашней птицы в северных регионах Казахстана, возможно, связаны с миграциями диких птиц.

Заклучение

Таким образом, результаты нашего исследования дают важные сведения об эпидемиологии гриппа у диких и домашних птиц в Казахстане. Эти данные расширят наши знания эпидемиологии, экологии и генетических взаимоотношений вирусов гриппа и помогут нам оценить риск передачи между домашней птицей и дикой птицей. Полученные данные подчеркивают необходимость постоянного наблюдения за основными миграционными путями в этом регионе. Мониторинг вирусов гриппа птиц и секвенирование генома идентифицированных вирусов могут сыграть важную роль для лучшего понимания межконтинентальной передачи вирусов гриппа и для раннего выявления новых появляющихся реассортантных штаммов. Выявление гриппа птиц в популяции дикой и домашней птицы в северных районах Казахстана требует от ветеринарных служб принятия мер по разработке эффективных мер контроля с учетом данных молекулярной эпидемиологии.

Финансирование: Работа выполнена в в рамках научно-технической программы «Биологическая безопасность Республики Казахстан: оценка угроз, научно-технические основы их предупреждения и ликвидации» на 2021-2023 годы, при финансовой поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан.

Конфликт интересов: Авторы заявляют, что нет конфликта интересов.

Литература

- 1 Webster R.G., Govorkova E.A. Continuing challenges in influenza // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2014. – 1323(1). – P.115–39.
- 2 Tong S., Li Y., Rivailler P., Conrardy C., Castillo D.A., Chen L.M., Recuenco S., Ellison J.A., Davis C.T., York I.A., Turmelle A.S., Moran D., Rogers S., Shi M., Tao Y., Weil M.R., Tang K., Rowe L.A., Sammons S., Xu X., Frace M., Lindblade K.A., Cox N.J., Anderson L.J., Rupprecht C.E., Donis R.O. A distinct lineage of influenza A virus from bats // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2012. – 109(11). – P. 4269–74. DOI: 10.1073/pnas.1116200109.;
- 3 Tong S., Zhu X., Li Y., Shi M., Zhang J., Bourgeois M., Yang H., Chen X., Recuenco S., Gomez J., Chen L.M., Johnson A., Tao Y., Dreyfus C., Yu W., McBride R., Carney P.J., Gilbert A.T., Chang J., Guo Z., Davis C.T., Paulson J.C., Stevens J., Rupprecht C.E., Holmes E.C., Wilson I.A., Donis R.O. New world bats harbor diverse influenza A viruses // *PLoS Pathog.* – 2013. – 9(10):e1003657. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003657
- 4 Wang G., Zhan D., Li L., et al. H5N1 avian influenza re-emergence of Lake Qinghai: phylogenetic and antigenic analyses of the newly isolated viruses and roles of migratory birds in virus circulation // *J. Gen Virol.* – 2008. – 89(Pt 3). – P. 697-702.
- 5 Burashev Y., Strochkov V., Sultankulova K., Orynbayev M., Kassenov M., Kozhabergenov N., Shorayeva K., Sadikaliyeva S., Issabek A., Almezhanova M., Nakhanov A., Savitskaya I., Zakarya K. Near-complete genome sequence of an H5N1 avian influenza virus strain isolated from a swan in Southwest Kazakhstan in 2006 // *Microbiol Resour Announc.* – 2020. – 9(13) e00016-20.
- 6 Issabek A., Burashev Y., Chervyakova O., Orynbayev M., Kydyrbayev Z., Kassenov M., Zakarya K., Sultankulova K. Complete genome sequence of the highly pathogenic strain A/domestic goose/Pavlodar/1/05 (H5N1) of the avian influenza virus, isolated in Kazakhstan in 2005 // *Microbiol Resour Announc.* – 2020. – 9(10):e00109-20.

- 7 Marchenko V.Yu., Goncharova N.I., Gavrilova E.V., Maksyutov R.A., Ryzhikov A.B. Overview of the Epizootiological Situation on Highly Pathogenic Avian Influenza in Russia in 2020 // Problems of Particularly Dangerous Infections. – 2021. – Vol.2. – P.33–40.

ҚАЗАҚСТАНДАҒЫ ЖОҒАРЫ ПАТОГЕНДІ ҚҰС ТҰМАУЫНЫҢ МОНИТОРИНГІ

А.К. Бопи^{1,2} , З.Д. Омарова¹ , Р.А. Рыстаева¹ , А.Б. Тулендибаев¹ ,
Т.У. Аргимбаева¹ , Д.Ә. Әлібекова¹ , Н.А. Әубәкір¹ , Т.Т. Ермекбай¹ ,
А.А. Серикбай³ , М.Б. Орынбаев¹ , Х.Б. Абеуов¹ *

¹ ҚР ДСМ «Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты» РМК,
Гвардейск құк

² И.Арабаев атындағы Қырғыз мемлекеттік университеті, Бішкек қ.

³ әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Алматы қ.

Аннотация. Бұл мақалада Қазақстанның солтүстік өңірлеріндегі құс тұмауы бойынша жүргізілген мониторингтік зерттеулердің нәтижелері ұсынылған. Үй және жабайы құстардан сынамалар алу Қазақстан облысының солтүстік аймақтарында жүргізілді. Тұмау вирусын анықтау және типтеу ПТР және секвенирлеу арқылы жүзеге асырылды. Бөлінген вирустардың биологиялық белсенділігі 9-10 күндік дамып келе жатқан тауық эмбриондарында анықталды. Жүргізілген зерттеулер нәтижесінде 2021 жылы Ақмола және Солтүстік Қазақстан облыстарының шаруашылықтарында құстардың ауруға шалдығулары мен өлімдерінің себепкері құс тұмауы екені анықталды. А/Н5N8 тұмауының вирусы Ақмола (53,8%) және Солтүстік Қазақстан (16,7%) облыстарының шаруашылықтарынан жеткізілген құстардың сынамаларынан, және де Қостанай облысындағы Қойбағар көлінде мекендеген жабайы қаздың сынамасынан табылды. Жабайы және үй құстарынан оқшауланған тұмау вирустары еуразиялық II (Eurasian HPAIV H5N8 Lineage II) бойынша 2.3.4.4b Кладасына А/Н5N8 қосалқы түрі ретінде жіктеледі. Қазақстанның солтүстік облыстарындағы жабайы және үй құстары популяциясы арасында құс тұмауының таралуы ветеринариялық қызметтерден молекулярлық эпидемиологиялық деректер негізінде тиімді күрес шараларын әзірлеу бойынша шаралар қабылдауды талап етеді.

Кілт сөздер: вирус; құс тұмауы; субтип; ПТР; изолят; белсенділік

MONITORING OF HIGHLY PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA IN KAZAKHSTAN

А.К. Бопи^{1,2} , З.Д. Омарова¹ , Р.А. Рыстаева¹ , А.Б. Тулендибаев¹ ,
Т.У. Аргимбаева¹ , Д.А. Алібекова¹ , Н.А. Аубакір¹ , Т.Т. Ермекбай¹ ,
А.А. Серикбай³ , М.Б. Орынбаев¹ , Х.Б. Абеуов¹ *

¹ Research Institute for Biological Safety Problems, Ministry of Healthcare of the Republic of
Kazakhstan, Gvardeisky

² Kyrgyz State University named after I. Arabaeva, Bishkek

³ Kazakh National University named after al-Farabi, Almaty

Annotation. This article presents data from monitoring studies on avian influenza in the northern regions of Kazakhstan. Collection of samples from domestic and wild birds was carried out in the northern regions of the Kazakhstan. Detection and typing of the influenza

virus was carried out by PCR and sequencing. The biological activity of the isolated viruses was determined on 9-10 day old developing chicken embryos. As a result of the research, it was found that the cause of illness and death of birds in the farms of the Akmola and North Kazakhstan regions in 2021 is an avian influenza. Influenza A/H5N8 virus was found in samples from poultry delivered from farms in Akmola (53.8%) and North Kazakhstan (16.7%) regions, as well as in a sample from a wild goose that lived on Lake Koybagar in Kostanay region. Influenza viruses isolated from wild and domestic birds are classified as subtype A/H5N8 to Clade 2.3.4.4b along the Eurasian line II (Eurasian HPAIV H5N8 Lineage II). The spread of avian influenza in the population of wild and domestic birds in the northern regions of Kazakhstan requires the veterinary services to take measures for developing effective control measures based on molecular epidemiology data.

Key words: virus; avian influenza; subtype; PCR; isolate; activity

АРПА СОРТ-ҮЛГІЛЕРІНІҢ НЕГІЗГІ САҢЫРАУҚҰЛАҚ АУРУЛАРЫНА ТӨЗІМДІЛІГІ

А. Жунусова¹ *, А. Сарбаев² 

¹ Қазақ ұлттық аграрлық зерттеу университеті, jmarikoza@mail.ru

² Қазақ егіншілік және өсімдік шаруашылығы ғылыми-зерттеу институты, kizamans2@mail.ru

Аннотация: Арпа дүние жүзіндегі ең кең тараған дәнді-дақылдардың бірі болып табылады, ал Қазақстан аумағында күрделі климаттық жағдайға талғамы аз болғандықтан бұл дақылдың ауылшаруашылық маңызы зор. Ауыл шаруашылығындағы болашағы зор бағыттардың бірі саңырауқұлақ ауруларына төзімді сорт-үлгілерін анықтау. Арпаның ауруға төзімді сорттарын пайдаланудағы негізгі аспект химиялық өңдеуден ішінара немесе толық бас тарту есебінен өнім сапасын жақсарту болып табылады. Қазақ егіншілік және өсімдік шаруашылығы ғылыми-зерттеу институтының тәжірибелік алқабында 2021-2022 жылдары отандық күздік және жаздық арпаның 46 сорт-үлгілерінің Қазақстанда жиі кездесетін саңырауқұлақ ауруларына (теңбіл дақ, кара-қоңыр дақ, ринхоспориоз және ақ ұнтақ) төзімділігіне танаптық баға берілді. Фитопатологиялық бағалау нәтижелері бойынша арпа сорт-үлгілері арасынан негізгі саңырауқұлақ ауруларына төзімділік көздері сұрыпталды. Бірнеше саңырауқұлақ ауруларына төзімді күздік және жаздық арпаның 7 сорты табылды. Бір және екі немесе одан да көп қоздырғыштарға төзімді болып табылған арпа сорттары мен үлгілері ауруларға төзімді арпа сорттарды шығару үшін селекциялық бағдарламаларда мақсатты түрде пайдаланылуы мүмкін.

Түйін сөздер: арпа; сорт; үлгі; саңырауқұлақ аурулары; төзімділік.

Өзектілігі

Арпа (*Hordeum vulgare* L.) – таралуы және ауылшаруашылығы өндірісінде қолданылуы бойынша әмбебап дақыл. Біріккен Ұлттар Ұйымы жанындағы ауылшаруашылық және азық-түлік мекемесінің мәліметі бойынша әлемдік егіншілікте арпаның егіс көлемі 60 млн. гектарға жетеді, бұл бидай, күріш және жүгеріден кейінгі төртінші орынды құрайды [1]. Жергілікті атқарушы органдардың мәліметтері бойынша, 2022 жылы Қазақстанда арпа егіс көлемі 2,3 млн. гектарды құрады, бұл өткен жылмен салыстырғанда 9 пайызға артық [2]. Өндірілген арпаның жалпы көлемінің 78% ішкі тұтынуға, оның 65% мал азығына жұмсалады. Арпа дәнінің экспорттық үлесі 9,4% құрайды. Қазақстанда негізгі арпа өндіруші республиканың солтүстік өңірі болып табылады, оның құрамына Ақмола, Солтүстік Қазақстан және Қостанай облыстары кіреді. Арпа егіс көлемінің ұлғаюына қарамастан, республикада дақылдың өнімділігі төмен деңгейде және өсіру жағдайына байланысты 12-17 ц/га дейін ауытқиды [3].

Қазіргі уақытқа дейін Қазақстанда арпа дақылын зерттеу бойынша біршама жетістіктерге қол жеткізілді, тиісінше мал азықтық және сыра қайнату бағыттары бойынша арпа сорттары шығарылды және аудандастырылды, әртүрлі аймақтар үшін сорттардың теориялық моделі жасалынды [4]. Арпаның гаплоидты әдістерін жетілдіру бойынша зерттеулер жүргізілді және бірқатар дигаплоидты линиялар шығарылды [5]. Өсімдіктің генетикалық ресурсы жинақталды [6], арпа дәніндегі Fe және Zn, β-глюкандарды анықтау үшін

биохимиялық скрининг жүргізілді [7]. Арпа дәні қаттылығының генетикасы зерттелді, клейстогамии гендері жіктелінді және құрғақшылық пен сортаңдану төзімділігіне жауапты, жаңа гендер анықталды [8].

Арпа өсірудің тиімділігі кейбір жылдары оның саңырауқұлақ қоздыратын аурулардың қарқынды дамуына байланысты төмендейді, олар өсімдіктің өніп шығуынан бастап жинағанға дейін бүкіл вегетациялық кезеңде әсер етеді және өнімділікті айтарлықтай кемітеді [9]. Саңырауқұлақ қоздыратын аурулар арасынан арпа дақылы үшін ең қауіптісі және кең таралғаны жапырақ дақтары және ақ ұнтақ індеті [5, 6].

Арпаның теңбіл дақ ауруы (қоздырғышы *Pyrenophora teres* Drechsler (анаморф: *Drechslera teres* (Sacc.) Shoem.) әлемнің көптеген елдерінде экономикалық маңызы бар патоген. Қоздырғыштың екі формасы бар: *P. teres* f. *maculata* және *P. teres* f. *teres* [10-12]. Саңырауқұлақтың бұл екі формасы морфологиялық жағынан бірдей, бірақ генетикалық және симптоматикалық жағынан әртүрлі. Теңбіл дақ ауруы арпа жапырағының ауданы мен дәнінің көлемін және сапасын төмендетеді, бұл өнімділіктің айтарлықтай жоғалуына әкеледі [10-12].

Ринхоспориоз немесе жолақты жапырақ дағы ауруы (қоздырғышы *Rhynchosporium commune*) Азия, Еуропа, Африка, Солтүстік және Латын Америкасының 50 астам елінде тіркелген [13, 14]. Жалпы бұл ауру арпа өндіретін жерлерде байқалады, ал салқын және жартылай ылғалды аймақтарда жиі кездеседі, нәтижесінде өнімділік 35-40% көлемінде кемиді [13]. *Rhynchosporium commune* қоздырғышының популяциялары генетикалық және фенотиптік жағынан әртүрлі болып келеді [15-18].

Арпаның жапырақ дағы ауруларының келесі түрі қара-қоңыр дақ індеті, оның қоздырғышы *Cochliobolus sativus* (анаморф: *Bipolaris sorokiniana*) саңырауқұлағы болып табылады. Сонымен қатар бұл ауру қоздырғышы өсімдік тамырының шіріп кетуіне және өскіндердің күйіп қалуына себеп болады [19]. Саңырауқұлақтың тіршілік ету ортасы кең, яғни ол арпа, жұмсақ және қатты бидай, тритикале, қара бидай, жүгері, күріш және кейбір өсімдік түрлеріне патогенді болып табылады [20]. Бұл ауру ыстық және ылғалды жағдайларда дәнді дақылдар өсіретін аймақтарда көбірек таралған [21]. Өнімділікті жоғалту территориялық жағдайға және өсімдік түріне байланысты әртүрлі болғанымен, қысқа ауыспалы егістікте немесе негізінен дәнді дақылдардың ауыспалы егістігінде өнімділік жоғалуы 70-100% дейін болуы мүмкін [22].

Қоздырғышы *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (син. *Erysiphe graminis* DC) аскомицеттік саңырауқұлағы болып табылатын ақ ұнтақ ауруы әлемнің көптеген аймақтарында арпа дақылының ең зиянды патогендерінің бірі болып есептеледі [23, 24]. Бұл ауру негізінен жапырақта дамиды, бірақ саңырауқұлақ өсімдіктің жер бетіндегі мүшелерінің барлығын зақымдайды. Қолайлы климаттық жағдайда бүкіл өсімдік вегетациясында ауру гаплоидты конидиялардың жыныссыз көбеюі арқылы 10 генерацияға дейін береді [25]. Сонымен қатар, ауру жапырақтың ассимиляторлық ауданын кемітеді, хлорофилді ыдыратады, өсімдік түптенуін төмендетеді және масақтануды кешіктіреді. Ақ ұнтақ ауруынан өнімділіктің төмендеуі негізінен 13-20% аралығында болады, ал егістік қатты зақымданғанда бұл көрсеткіш 40% дейін өседі [26, 27].

Арпа дақылының жоғарыда аталған ауруларының барлығы Қазақстанның астықты аймақтарында кездеседі және олардың даму қарқыны мен таралуы климаттық жағдайларға, патоген популяцияларының ішкі құрылымы мен расалық құрамына, өндірісте өсірілетін арпа сорттарының аурулардан қорғану мүмкіндігіне байланысты өзгеріп отырады. Қазақстанда өсірілетін жаздық және күздік арпаның көптеген коммерциялық сорттары саңырауқұлақ қоздыратын теңбіл дақ, ринхоспориоз, қара-қоңыр дақ және ақ ұнтақ ауруларынан қатты зардап шегеді. Сондықтан жаздық арпаның осы ауруларға төзімді сорттары мен линияларын анықтауға бағытталған зерттеу жұмыстарын күшейту қажет [28-31].

Зерттеу жұмысының негізгі мақсаты арпаның жаңа және коллекциялық сорт-үлгілерінің саңырауқұлақ қоздыратын негізгі ауруларға төзімділігін бағалау.

Материалдар және әдістер

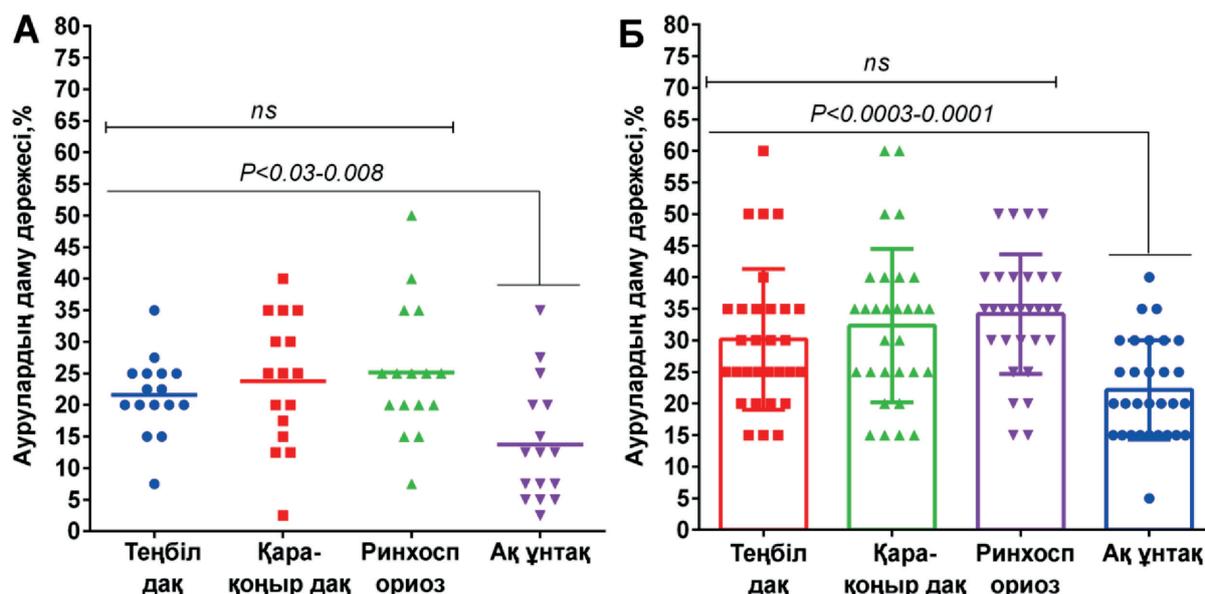
Зерттеу материалдары ретінде күздік және жаздық арпаның конкурстық сорт сынақ көшеттігіндегі сорт-үлгілері және коллекциялық сорттары пайдаланылды. Иммунологиялық бағалауға қолданылған арпа сорт-үлгілерінің жалпы саны 46, оның ішінде 30 жаздық арпа сорт-үлгілері және 16 – күздік арпа сорт-үлгілері болып табылады.

Тәжірибелер 2021-2022 жылдары Алматы облысы Қарасай ауданы Алмалыбақ ауылында орналасқан Қазақ егіншілік және өсімдік шаруашылығы ғылыми-зерттеу институтының суармалы танап алқабында жүргізілді. Арпа сорт-үлгілерінің дәндері қатар аралығы 15 см болатын әрбір мөлдекке 25 дәннен қолмен себу арқылы егілді. Тәжірибеде бақылау сорты ретінде Қазақстан территориясында өсіруге рұқсат етілген Береке 54 (күздік арпа) және Арна (жаздық арпа) сорттары пайдаланылды. Зерттеу жұмыстарын жүргізу барысында арпа мен сұлы дақылдарын танаптық жағдайда сынаудың әдістемелік нұсқаулығы пайдаланылды [32]. Далалық жағдайда зерттеуге пайдаланылған арпа сорт-үлгілерінің саңырауқұлақ қоздыратын ауруларға ересек өсімдік төзімділігі, яғни олардың даму дәрежесін есепке алу дақылдың сүттеніп және балаузданып пісу кезеңдерінде жүргізілді (Цадокс шкаласы бойынша GS75 және GS85 даму фазалары) [33]. Арпа сорт-үлгілерінің теңбіл дақ, ринхоспориоз, қара қоңыр дақ және ақ ұнтақ ауруларымен зақымдану деңгейі халықаралық талаптарға сай келетін әдістемелер мен шкалаларды қолдану арқылы анықталды. Аурулармен зақымдану деңгейі 0% көрсеткен өсімдіктер – иммунды, 1-20% – төзімді, 21-30% – орташа төзімді, 31-50% – орташа төзімсіз, 51-100% – төзімсіз болып табылды [34-36].

Арпаның ауруларға төзімділігі туралы деректердің статистикалық және корреляциялық талдауы GraphPadPrism 8 бағдарламалық пакеттерін (GraphPad Software, Inc., LaJolla, CA, АҚШ) қолдану арқылы жүргізілді. Бұл ретте айнымалылар арасындағы байланысты анықтау үшін Пирсонның сызықтық корреляция коэффициенті (r) пайдаланылды. $P < 0,05$ кезінде айырмашылықтар статистикалық маңызды деп саналды.

Нәтижелер

Далалық жағдайда арпа сорт-үлгілерінде аурулардың даму дәрежесі патоген түрі мен өсімдіктің даму формасына сай әрүрлі болды. Күздік арпа сорт-үлгілерінде теңбіл дақ, қара-қоңыр дақ және ринхоспориоз ауруларымен ақ ұнтақ індетінің даму дәрежесі арасында айтарлықтай айырмашылық бар ($p < 0.03-0.008$) (сурет 1А). Яғни, зерттеу жүргізген жылдары күздік арпа сорт-үлгілерінде ақ ұнтақтың даму дәрежесі негізінен 0-30% (орташа көрсеткіші 8,44-19,06%) аралығында болды, ал басқа саңырауқұлақ ауруларының бұл көрсеткіші 5-50% (орташа 13,44-26,69%) құрады.



Сурет 1 – Күздік (А) және жаздық (Б) арпа сорт-үлгілерінде саңырауқұлақ қоздыратын аурулардың даму дәрежесі

Салыстырмалы түрде теңбіл дақ, қара-қоңыр дақ және ринхоспороз ауруларының ақ ұнтақ індетіне қарағанда жоғары дамуы жаздық арпа сорт-үлгілерінде де байқалды (сурет 1Б), тиісінше олардың арасындағы дәлдік деңгейі $p < 0.0003-0.0001$ шамасына тең. Тәжірибеде теңбіл дақ, қара-қоңыр дақ, ринхоспориоз және ақ ұнтақ аурулары күздік формадағы селекциялық материалдарға қарағанда жаздық арпа сорт-үлгілерінде мейілінше қарқынды дамыды, яғни олардың орташа даму дәрежесі 22,17-34,17% аралығында болды (сурет 1Б). Дегенмен, алынған мәліметтерді статистикалық өңдеу нәтижелері арпа жапырақ дақтары індеттерінің (теңбіл дақ, қара-қоңыр дақ, ринхоспориоз) даму дәрежесі арасында елеулі айырмашылық болмағанын (ns – not significant) көрсетті.

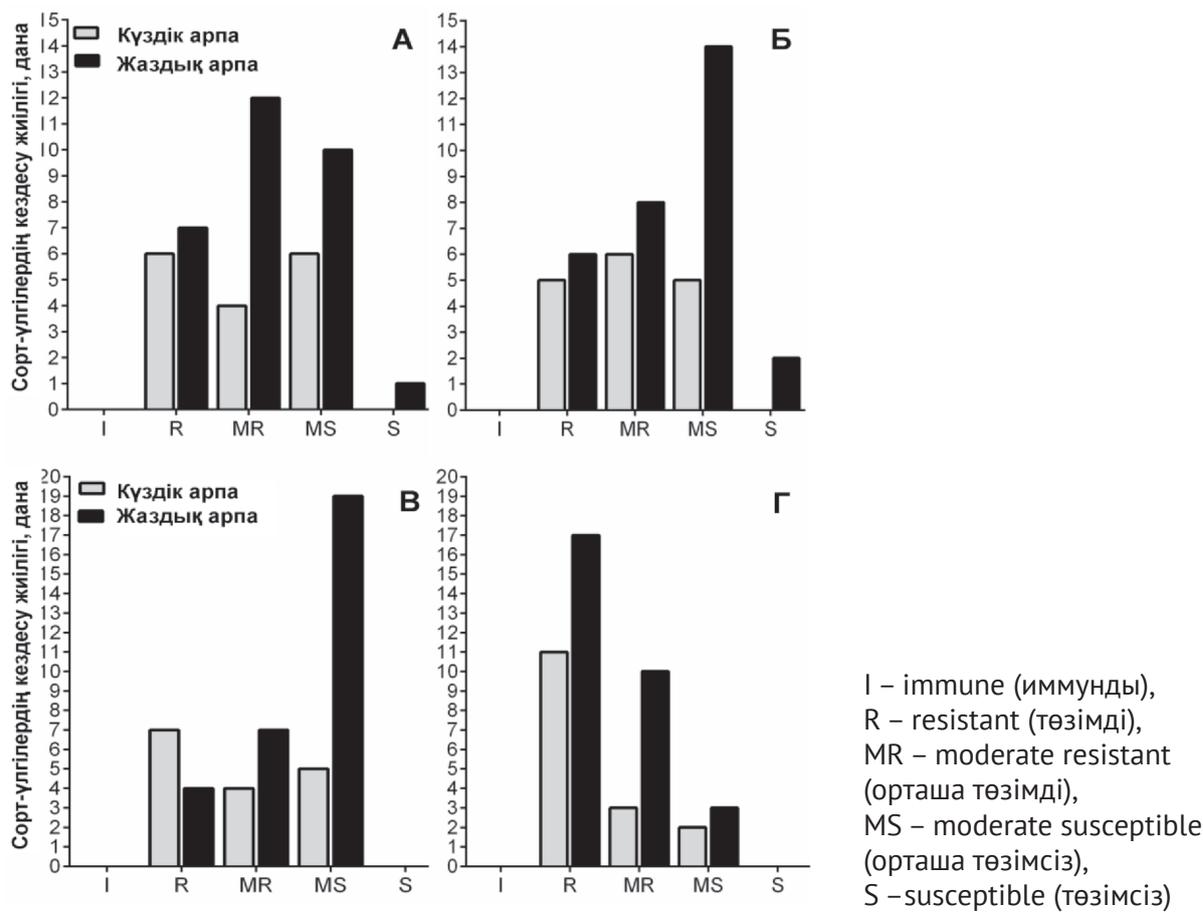
Корреляциялық талдау күздік арпада анықталған барлық аурулардың даму дәрежесі арасында орташа және жоғарғы оң корреляция бар екенін көрсетті ($r=0,326-0,818$, $p < 0,001-0.0001$). Сол сияқты жаздық арпада кездескен аурулардың басым бөлігінде де даму деңгейі бойынша өзара күшті корреляциялық байланыс болды ($r=0,512-0,753$, $p < 0.0001$), тек бұл дақылда *Rhynchosporium commune* және *Cochliobolus sativus* қоздырғыштары арасында ғана әлсіз оң корреляция анықталды ($r=0,205$, $p < 0.05$). Жаздық арпа сорт-үлгілерінде қара қоңыр дақ және ринхоспориоз ауруларының даму деңгейімен күздік арпа сорт-үлгілерінде бұл індеттердің даму дәрежесі арасында теріс корреляция болды ($r = -0,098-0,196$). Ақ ұнтақ және теңбіл дақ ауруларымен жаздық және күздік арпа сорт-үлгілерінің зақымдану деңгейі арасында да теріс корреляциялық байланыс байқалды ($r=0,042-0,106$) (кесте 1).

Кесте 1 – Күздік және жаздық арпа сорт-үлгілерінде аурулардың даму дәрежесі арасындағы корреляциялық байланыс

Дақыл-патоген қоздырғышы	WB-PT	WB-CS	WB-RC	WB-BG	SB-PT	SB-CS	SB-RC	SB-BG
WB-PT	1	0,511***	0,448**	0,818***	0,356**	0,196 ns	-0,189 ns	0,042 ns
WB-CS	0,511***	1	0,570***	0,326**	0,272*	0,363**	-0,137 ns	0,355**
WB-RC	0,448**	0,570***	1	0,590***	0,440**	0,164 ns	-0,321 ns	0,252*
WB-BG	0,818***	0,326**	0,590***	1	0,337**	0,058	-0,098 ns	0,106 ns
SB-PT	0,356**	0,272*	0,440**	0,337**	1	0,523***	0,514***	0,753***
SB-CS	0,196 ns	0,363**	0,164 ns	0,058 ns	0,523***	1	0,205*	0,641***
SB-RC	-0,189 ns	-0,137 ns	-0,321 ns	-0,098 ns	0,514***	0,205*	1	0,512***
SB-BG	0,042 ns	0,355**	0,252*	0,106 ns	0,753***	0,641***	0,512***	1

Ескертулер: WB – winter barley (күздік арпа),
SB – spring barley (жаздық арпа),
PT – Pyrenophora teres,
CS – Cochliobolus sativus,
RC – Rhynchosporium commune,
BG – Blumeria graminis,
* – $p < 0.05$, ** – $p < 0.001$, *** – $p < 0.0001$, ns – not significant (елеулі айырмашылық жоқ)

Далалық жағдайда зерттелген күздік және жаздық арпа сорт-үлгілерінің арасынан жапырақ дақтары және ақ ұнтақ ауруларына иммунды формалар кездеспеді (сурет 2). Арпа дақылы үшін қауіпті болып табылатын теңбіл даққа күздік арпаның 6 сорт-үлгісі төзімділік, 4 – орташа төзімділік, 6 – орташа қабылдағыштық танытты, ал жаздық арпа сорт-үлгілерінің бұл ауруға 7 – төзімді, 12 – орташа төзімді, 10 – орташа төзімсіз және 1 – төзімсіз болып табылды (сурет 2А). Қара-қоңыр дақ ауруына төзімділік белгісі бойынша күздік арпа сорт-үлгілерінің кездесу жиілігі біркелкі болды, яғни олардың 5 – төзімді, 6 – орташа төзімді және 5 орташа төзімсіз формалар категориясына жатады. Бұл ауруға аталған иммунологиялық белгілері бойынша жаздық арпа сорт-үлгілерінің үлесі жоғары болды, тиісінше 6 сорт-үлгі төзімді, 8 – орташа төзімді, 14 – орташа төзімсіз, 2 – төзімсіз (сурет 2Б). Ринхоспориоз ауруына төзімді күздік және жаздық арпа сорт-үлгілерінің кездесу жиілігінің жалпы қосындысы 11, ал ақ ұнтақ ауруына – 18 болды. Бұл ауруларға орташа төзімді және орташа төзімсіз сорт-үлгілер әр түрлі жиілікпен кездесті (сурет 2В, 2Г).



Сурет 2 – Күздік және жаздық арпа сорт-үлгілерінің теңбіл дақ (А), қара-қоңыр дақ (Б), ринхоспориоз (В) және ақ ұнтақ (Г) ауруларына төзімділік қасиеттері бойынша кездесу жиілігі

Қазақстанның астықты алқабында кеңінен қолданылып жүрген күздік арпаның Береке 54 және жаздық арпаның Арна бақылау сорттарына қарағанда ауруларға біршама төзімділік реакцияларын көрсеткен үлгілер сұрыпталып алынды (кесте 2).

Кесте 2 – Саңырауқұлақ ауруларына төзімділігі бойынша сұрыпталған арпа сорт-үлгілерінің фитопатологиялық сипаттамасы

Өсімдіктің даму формасы	Сорт-үлгілер атауы	Аурулардың даму дәрежесі, %			
		теңбіл дақ	қара-қоңыр дақ	ринхоспориоз	ақ ұнтақ
Күздік арпа	Береке 54, бақылау	40	40	40	35
	75/12-3	20	20	20	10
	414x34-1	10	5	10	5
	64/12-3	20	20	20	10
Жаздық арпа	Арна, бақылау	35	25	20	15
	1/12-9	30	15	35	15
	36/10-3	15	35	15	20
	51/80-4	20	25	25	15
	64/11-6	20	15	30	15

Жалпы зерттеуге пайдаланған күздік арпа сорт-үлгілерінің арасынан тек 3 үлгі ғана (75/12-3, 414x34-1, 64/12-3) теңбіл дақ, қара-қоңыр дақ, ринхоспороз және ақ ұнтақ ауруларымен әлсіз зақымданды, яғни оларда аурудың даму дәрежесі 5-20% аралығында болды. Ал, жаздық арпа сорт-үлгілерінің бірде-бірі саңырауқұлақ қоздыратын аурулардан кешенді қорғана алмады, бірақ олардың арасында зерттеу жылдары есепке алынған төрт аурудың екеуіне (1/12-9, 36/10-3, 51/80-4) және үшеуіне (64/11-6) төзімді болған үлгілер кездесті.

Талқылау

Қазіргі уақытқа дейін Қазақстан территориясында дәстүрлі фитопатологиялық әдістер және заманауи геномдық технологиялар негізінде арпа дақылының жекелеген сорттар жиынтығы сабақ татына, теңбіл даққа, қара-қоңыр даққа және ақ ұнтаққа төзімділігі бойынша бағаланды [28, 31, 37, 38]. Сондай-ақ, еліміздің әр түрлі аймақтарында *Pyrenophora teres* және *Blumeria graminis* қоздырғыштарының популяциялық құрылымы, расалық құрамы және аталған аурулардың төзімділік гендерінің тиімділігін анықтау мақсатында кешенді зерттеулер жүргізілді [29, 30]. Соңғы уақыттары Қазақстан Республикасының ауыл шаруашылығында жемге, тамақ және сыра қайнату өнеркәсібінің шикізатына сұраныс артып келе жатыр, сондықтан елімізде кең таралған ауруларға төзімді, жоғары және сапалы өнімді қалыптастыруға қабілетті арпа сорттарын анықтауға бағытталған зерттеулерді жалғастыру қажет. Осыны ескере отырып бұл зерттеу жұмысында күздік және жаздық арпаның 46 сорт-үлгісі саңырауқұлақ қоздыратын ауруларға төзімділігі бойынша сипатталды.

Жалпы зерттеуге пайдаланған күздік арпа сорт-үлгілерінің арасынан тек 3 үлгі ғана (тәжірибеге пайдаланған селекциялық материалдардың 18,7%) теңбіл дақ, қара-қоңыр дақ, ринхоспороз және ақ ұнтақ ауруларына төзімділік танытты, сол сияқты жаздық арпа сорт-үлгілерінің 4 ғана (13,3%) есепке алынған төрт аурудың екеуіне және үшеуіне төзімді болып табылды. Қарабалық ауылшаруашылық тәжірибе станциясы шығарған 48 арпа сорт-үлгісі 2015-2016 жылдары теңбіл дақ және ақ ұнтақ ауруларының жасанды індет аясында зерттеліп, олардың арасынан аталған ауруларға ересек өсімдік кезеңінде 6 үлгі ғана кешенді төзімділік байқатқан болатын [28]. Сонымен қатар сол жылдары Қазақстанға шет елдерден интродукцияланған 116 арпа сорт-үлгінің 45 немесе 38,8 % теңбіл даққа және 43 (37,1 %) ақ ұнтаққа төзімділік көрсетті [38]. Демек отандық арпа селекциясына қарағанда халықаралық селекциялық орталықтарда саңырауқұлақ қоздыратын аурулардан тиімді қорғанатын арпа үлгілерінің айтарлықтай мол екенін байқатады.

Бұл жұмыста жүргізілген корреляциялық талдау арпада анықталған барлық аурулардың даму дәрежесі арасында көп жағдайда оң корреляциялық байланыс бар екенін көрсетті. Бұл нәтижелер бидай дақылының саңырауқұлақ ауруларына көрсеткен төзімділік қасиеттерімен сәйкес келеді. Яғни, 2018-2019 жылдары Қазақстан жағдайында бидай сорттарының *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* және *P. tritici* қоздырғыштарына төзімділігі арасында да оң корреляция байқалды [39, 40].

Еліміздің Қостанай және Жамбыл облыстарында 2013-2014 жылдары жаздық арпа дақылының 700 жуық селекциялық материалы, оның ішінде Қазақстанның 96 линиясы қара-қоңыр даққа төзімділігі бойынша бағаланды. Нәтижесінде, ассоциациялық карталау тәсілі негізінде қара-қоңыр дақ төзімділігімен байланысқан арпаның 7 QTL анықталды, оның 4 өскіндік төзімділікке және 3 QTL ересек өсімдік кезеңіндегі төзімділікке жауапты [31]. Бұл қара-қоңыр дақтан генетикалық тұрғыда қорғана алатын қазақстандық арпа сорт-үлгілері бар екенін көрсетеді. Ал, осы мақалада фитопатологиялық әдістер бойынша сипатталған арпа сорт-үлгілерінің ауруларға генетикалық төзімділігін анықтау үшін қосымша зерттеулер жүргізу керек.

Сондай-ақ, далалық жағдайда саңырауқұлақ қоздыратын ауруларға төзімділік танытқан арпа сорт-үлгілерінің басым бөлігі өскіндік фазада қоздырғыштардың жекелеген расаларына немесе патотиптеріне төзімсіз болып табылады [28]. Себебі Қазақстанның астықты аймақтарында вируленттілігі өте жоғары *Pyrenophora teres* және *Blumeria graminis* патотиптері кездеседі [29, 30], олардың дамуына қажетті қолайлы жағдай туындағанда көптеген арпа сорттары мен үлгілері қатты зақымданады. Жалпы арпаның ауруларға төзімділігі полигендік (көлденең төзімділік) және олигендік (тік төзімділік) жүйелермен бақыланады. Сондықтан, далалық жағдайда ауруларға төзімділігі бойынша сұрыпталған арпа сорт-үлгілерін болашақта өскіндік фазада сынап, олардың саңырауқұлақ қоздырғыштарының аса вирулентті расалары мен патотиптерінен қорғану мүмкіндігін анықтау қажет.

Қорытынды

Ғылыми жұмыстың мақсатына сай арпаның жаңа және коллекциялық сорт-үлгілерінің саңырауқұлақ қоздыратын негізгі ауруларға төзімділігі бағаланды. Сұрыпталған үлгілер арпа селекциясы үшін аса құнды алғашқы материал болып табылады, бірақ оларды Қазақстанда кең таралған саңырауқұлақ қоздыратын ауруларға бағытталған селекциялық бағдарламаларда тиімді пайдалану үшін әлі де қосымша зерттеулер жүргізу керек. Оған арпа сорт-үлгілерінің аса қауіпті патоген расаларына төзімділігін зерттеу, молекулалық маркерлердің көмегімен генетикалық скрининг жүргізу және шаруашылықтық құнды белгілерін анықтау жатады.

Әдебиеттер

- 1 Репко Н.В., Подоляк К.В., Смирнова Е.В., Острожная Ю.В. Статистические исследования мирового производства зерна ячменя // Научный журнал КубГАУ. – 2015. – 106(02). – С. 1-9.
- 2 Площади ячменя в Казахстане увеличили на 187 тыс. га [Электрон.ресурс]. - URL: <https://eldala.kz/novosti/zerno/9728-ploshchadi-yachmenya-v-kazahstane-velichili-na-187-tys-ga> (дата обращения 13 июня 2022 г).
- 3 Чудинов В.А. Приоритетные направления и результаты селекции ярового ячменя на Карабалыкской СХОС. Чудинов В.А. – URL: https://agrobilim.kz/articles_item/prioritetnie-napravlenija-i-rezultati-seleksii-jarovogo-jachmenja-na-karabalikskoy-shos? (дата обращения 13 ноября 2019 г).
- 4 Сариев Б.С., Перуанский Ю.В. Теоретические и прикладные аспекты селекции ячменя в Казахстане. – Алматы. – 2002. – 115 с.
- 5 Искаков А.Р., Орозалиева Ж., Мукашев А. Использование гаплоидии в селекции ячменя. Особенности получения гаплоидов ячменя с помощью гаплопродюссера *Hordeum bulbosum* L. // Вестник сельскохозяйственной науки Казахстана. – 1996. №7. – С. 28-31.
- 6 Уразалиев Р.А., Алимгазинова Б.Ш., Кененбаев С.Б., Есимбекова М.А., Мукин К.Б. Второй Национальный отчет о состоянии генетических ресурсов для продовольствия и сельского хозяйства в Казахстане. – Алматы: – «Асыл Кітап». – 2007. – 106 с.
- 7 Савин Т.В., Абугалиева А.И., Чакмак И., Савин Э.В. Характеристика сортовых ресурсов ячменя по содержанию Fe в зерне // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2013. –Т. 171. – С. 81-85.
- 8 Turuspekov Y., Mano Y., Honda I., Kawada N., Watanabe Y., Komatsuda T. Identification and mapping of cleistogamy genes in barley // Theoretical and Applied Genetics. 2004. – V. 109. – P. 480-487.
- 9 Койшибаев М. Болезни зерновых культур. – «Алматы: Бастау». – 2002. – 368 с.
- 10 McLean M., Howlett B., Hollaway G. Epidemiology and control of spot form of net blotch (*Pyrenophora teres* f. *maculata*) of barley: A review // Crop Pasture Sci. – 2009. – Vol. 60. – P. 303–315.
- 11 Liu Z., Ellwood S.R., Oliver R.P., Friesen T.L. *Pyrenophora teres*: Profile of an increasingly damaging barley pathogen // Mol. Plant Pathol. – 2011. – Vol. 12. – P. 1–19.

- 12 Akhavan A., Turkington T.K., Askarian H., Tekauz A., Xi K., Tucker J.R., Kutcher H.R., Strelkov S.E. Virulence of *Pyrenophora teres* populations in western Canada // Can. J. Plant Pathol. – 2016. – Vol. 38. – P. 183–196.
- 13 Avrova A., Knogge W. *Rhynchosporium commune*: A persistent threat to barley cultivation // Mol. Plant Pathol. – 2012. – Vol.13. – P. 986–997.
- 14 Shipton W., Boyd W., Ali S. Scald of barley. // Rev. Plant Pathol. – 1974. – Vol.53. – P. 839–861.
- 15 McDonald B.A., Zhan J., Burdon J.J. Genetic structure of *Rhynchosporium secalis* in Australia // Phytopathology. – 1999. – Vol. 89. – P. 639–645.
- 16 Bouajila A., Abang M.M., Haouas S., Udupa S., Rezgui S., Baum M., Yahyaoui A. Genetic diversity of *Rhynchosporium secalis* in Tunisia as revealed by pathotype, AFLP, and microsatellite analyses // Mycopathologia. – 2007. – Vol. 163. – P. 281–294.
- 17 Stefansson T.S., Willi Y., Croll D., McDonald B.A. An assay for quantitative virulence in *Rhynchosporium commune* reveals an association between effector genotype and virulence // Plant Pathol. – 2014. – Vol. 63. – P.405–414.
- 18 Azamparsa M.R., Karakaya A. Determination of the pathotypes of *Rhynchosporium commune* (Zaffarona, McDonald & Linde) in some regions of Turkey. // Bitki Koruma Bülteni (Plant Prot. Bull.). – 2020. – Vol. 60. – P. 5–14.
- 19 Kumar J., Schäfer P., Hückelhoven R., Langen G., Baltruschat H., Stein E., Nagarajan S., Kogel K.H. *Bipolaris sorokiniana*, a cereal pathogen of global concern: Cytological and molecular approaches towards better control // Mol. Plant Pathol. – 2002. – Vol.3. – P. 185–195.
- 20 Acharya K., Dutta A.K., Pradhan P. '*Bipolaris sorokiniana*' (Sacc.) Shoem.: The most destructive wheat fungal pathogen in the warmer areas // Aust. J. Crop Sci. – 2011. – Vol.5. – P. 1064.
- 21 Gupta P., Chand R., Vasistha N., Pandey S., Kumar U., Mishra V., Joshi A. Spot blotch disease of wheat: The current status of research on genetics and breeding // Plant Pathol. – 2018. – Vol.67. – P. 508–531.
- 22 Sharma R., Duveiller E. Advancement toward new spot blotch resistant wheats in South Asia // Crop Sci. – 2007. – Vol.47. – P. 961–968.
- 23 Jørgensen J.H., Wolfe M. Genetics of powdery mildew resistance in barley // Crit. Rev. Plant Sci. – 1994. – Vol.13. – P. 97–119. 16.
- 24 Dreiseitl A., Kosman E. Virulence phenotypes of *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* in South Africa // Eur. J. Plant Pathol. – 2013. – Vol. 136. – P. 113–121.
- 25 Limpert E. Barley mildew in Europe: Evidence of wind-dispersal of the pathogen and its implications for improved use of host resistance and of fungicides for mildew control // Integrated Control of Cereal Mildews: Monitoring the Pathogen. – 1987. – P. 31–33.
- 26 Conry M., Dunne B. Influence of number and timing of fungicide applications on the yield and quality of early and later-sown spring malting barley grown in the south-east of Ireland. // J. Agric. Sci. – 2001. – Vol. 136. – P. 159–167.
- 27 Zhang Z., Henderson C., Perfect E., Carver T., Thomas B., Skamnioti P., Gurr S. Of genes and genomes, needles and haystacks: *Blumeria graminis* and functionality // Mol. Plant Pathol. – 2005. – Vol. 6. – P. 561–575.
- 28 Рсалиев А.С., Чудинов В.А., Амирханова Н.Т. Устойчивость селекционных материалов ячменя Карабалыкской сельскохозяйственной опытной станции к сетчатой пятнистости и мучнистой росе // Доклады НАН РК. – 2016. - №4. – С. 79-87.
- 29 Рсалиев А.С., Амирханова Н.Т., Пахратдинова Ж.У. Внутривидовая дифференциация популяций *Pyrenophora teres* в Казахстане и Омской области России // Микология и фитопатология. – 2018. – Т. 52. Вып. 1. – С. 55-65.
- 30 Rsaliyev A., Pahratdinova Zh., Rsaliyev Sh. Characterizing the pathotype structure of barley powdery mildew and effectiveness of resistance genes to this pathogen in Kazakhstan // BMC Plant biology. – 2017. – Vol. 17. – P. 39-49.
- 31 Turuspekov Y., Rsaliyev A., Chudinov V., Sarbayev A., Abugalieva S. Identification of QTLs associated with spot blotch resistance of barley // The 3d International Conference "Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics and Biotechnology" PlantGen 2015 Abstract book. Новосибирск, ИЦиГ СО РАН. – С. 59-60.

- 32 Лоскутов И.Г., Ковалева О.Н., Блинова Е.В. Методические указания по изучению мировой коллекции ячменя и овса // СПб.: ВИР. – 2012. – 63 с.
- 33 Zadoks J.C., Chang T.T., Konzak C.F. A decimal code for the growth stages of cereals // Weed Res. – 1974. – Vol.14. – P. 415–421.
- 34 Афанасенко О.С. Методическое указания по диагностике и методам полевой оценки устойчивости ячменя к возбудителям пятнистостей листьев. Л.: ВИЗР. – 1987. – 20 с.
- 35 Saari E.E., Prescott J.M. A scale for appraising the foliar intensity of wheat disease // Plant disease reporter. – 1975. – Vol. 59. – № 5. – P. 377–380.
- 36 James W.C. A manual of disease assessment keys for plant diseases. // Can. Dep. Agric. Publ. – 1971. – No. 1458. – 88 pp.
- 37 Turuspekov Y., Ormanbekova D., Rsaliev A., Abugaliev S. Genome-wide association study on stem rust resistance in Kazakh spring barley lines // BMC Plant Biology. – 2016. – Vol. 16. – P. 13–21.
- 38 Рсалиев А.С., Амирханова Н.Т. Теңбіл дақ және ақ ұнтақ ауруларына арпаның төзімділік көздерін табу // Ізденістер, нәтижелер. – 2016. - №3. – С. 199–205.
- 39 Genievskaya Y., Turuspekov Y., Rsaliev A., Abugaliev S. Genome-wide association mapping for resistance to leaf, stem, and yellow rusts of bread wheat in conditions of South Kazakhstan // Peer J. – 2020. – Vol. 8. DOI 10.7717/peerj.9820.
- 40 Genievskaya Y., Abugaliev S., Rsaliev A., Yskakova G., Turuspekov Y. QTL Mapping for Seedling and Adult Plant Resistance to Leaf and Stem Rusts in Pamyati Azieva × Paragon Mapping Population of Bread Wheat // Agronomy. – 2020. – Vol. 10. – P. 1–18.

References

- 1 Repko N.V., Podolyak K.V., Smirnova Ye.V., Ostrozhnaya YU.V. Statisticheskoye issledovaniya mirovogo proizvodstva zerna yachmenya. // Nauchnyy zhurnal KubGAU. – 2015. – 106(02). – С. 1–9.
- 2 Ploshchadi yachmenya v Kazakhstane uvelichili na 187 tys. ga [Elektron.resurs]. – URL: <https://eldala.kz/novosti/zerno/9728-ploshchadi-yachmenya-v-kazahstane-uvelichili-na-187-tys-ga> (дата обращения 13 июня 2022 г).
- 3 Chudinov V.A. Priority directions and results of spring barley breeding at the Karabalyk SHOS [Electronic resource]. – URL: https://agrobilim.kz/articles_item/prioritetnie-napravleniya-i-rezultati-selektcii-jarovogo-jachmenya-na-karabalikskoy-shos (дата обращения 13 ноября 2019 г).
- 4 Sariyev B.S., Peruanskiy YU.V. Teoreticheskiye i prikladnyye aspekty selektcii yachmenya v Kazakhstane. – Almaty. – 2002. – 115 с.
- 5 Iskakov A.R., Orozaliyeva ZH., Mukashev A. Ispol'zovaniye gaploidii v selektcii yachmenya. Osobennosti polucheniya gaploidov yachmenya s pomoshch'yu gaploprodyussera *Hordeum bulbosum* L. // Vestnik sel'skokhozyaystvennoy nauki. – 1996. №7. – С. 28–31.
- 6 Urazaliyev R.A., Alimgazinova B.SH., Kenenbayev S.B., Yesimbekova M.A., Mukin K.B. Vtoroy Natsional'nyy otchet o sostoyanii geneticheskikh resursov dlya prodovol'stviya i sel'skogo khozyaystva v Kazakhstane. – Almaty: Asyl Kitap, 2007. – 106 с.
- 7 Savin T.V., Abugaliyeva A.I., Chakmak I., Savin E.V. Kharakteristika sortovykh resursov yachmenya po sodержaniyu Fe v zerne. // Trudy po prikladnoy botanike, genetike i selektcii. – 2013. – T.171. – С. 81–85.
- 8 Turuspekov Y, Mano Y, Honda I, Kawada N, Watanabe Y, Komatsuda T. Identification and mapping of cleistogamy genes in barley // Theoretical and Applied Genetics. 2004. – V.109. – P. 480–487.
- 9 Koyshibayev M. Bolezni zernovykh kul'tur. – Almaty: Bastau, 2002. – 368 с.
- 10 McLean M., Howlett B., Hollaway G. Epidemiology and control of spot form of net blotch (*Pyrenophora teres* f. *maculata*) of barley: A review. // Crop Pasture Sci. – 2009. – Vol. 60. – P. 303–315.
- 11 Liu Z., Ellwood S.R., Oliver R.P., Friesen T.L. *Pyrenophora teres*: Profile of an increasingly damaging barley pathogen. // Mol. Plant Pathol. – 2011. – Vol.12. – P. 1–19.
- 12 Akhavan A., Turkington T.K., Askarian H., Tekauz A., Xi K., Tucker J.R., Kutcher H.R., Strelkov S.E. Virulence of *Pyrenophora teres* populations in western Canada. // Can. J. Plant Pathol. – 2016. – Vol. 38. – P. 183–196.
- 13 Avrova A., Knogge W. *Rhynchosporium commune*: A persistent threat to barley cultivation. // Mol. Plant Pathol. – 2012. – Vol.13. – P. 986–997.

- 14 Shipton W., Boyd W., Ali S. Scald of barley. // Rev. Plant Pathol. – 1974. – Vol.53. – P. 839–861.
- 15 McDonald B.A., Zhan J., Burdon J.J. Genetic structure of *Rhynchosporium secalis* in Australia. // Phytopathology. – 1999. – Vol. 89. – P. 639–645.
- 16 Bouajila A., Abang M.M., Haouas S., Udupa S., Rezgui S., Baum M., Yahyaoui A. Genetic diversity of *Rhynchosporium secalis* in Tunisia as revealed by pathotype, AFLP, and microsatellite analyses. // Mycopathologia. – 2007. – Vol. 163. – P. 281–294.
- 17 Stefansson T.S., Willi Y., Croll D., McDonald B.A. An assay for quantitative virulence in *Rhynchosporium commune* reveals an association between effector genotype and virulence. // Plant Pathol. – 2014. – Vol. 63. – P.405–414.
- 18 Azamparsa M.R., Karakaya A. Determination of the pathotypes of *Rhynchosporium commune* (Zaffarona, McDonald & Linde) in some regions of Turkey. // Bitki Koruma Bülteni (Plant Prot. Bull.). – 2020. – Vol. 60. – P. 5–14.
- 19 Kumar J., Schäfer P., Hückelhoven R., Langen G., Baltrusch H., Stein E., Nagarajan S., Kogel K.H. *Bipolaris sorokiniana*, a cereal pathogen of global concern: Cytological and molecular approaches towards better control. // Mol. Plant Pathol. – 2002. – Vol.3. – P. 185–195.
- 20 Acharya K., Dutta A.K., Pradhan P. '*Bipolaris sorokiniana*' (Sacc.) Shoem.: The most destructive wheat fungal pathogen in the warmer areas. // Aust. J. Crop Sci. – 2011. – Vol.5. – P. 1064.
- 21 Gupta P., Chand R., Vasistha N., Pandey S., Kumar U., Mishra V., Joshi A. Spot blotch disease of wheat: The current status of research on genetics and breeding. // Plant Pathol. – 2018. – Vol.67. – P. 508–531.
- 22 Sharma R., Duveiller E. Advancement toward new spot blotch resistant wheats in South Asia. // Crop Sci. – 2007. – Vol.47. – P. 961–968.
- 23 Jørgensen J.H., Wolfe M. Genetics of powdery mildew resistance in barley. // Crit. Rev. Plant Sci. – 1994. – Vol.13. – P. 97–119. 16.
- 24 Dreiseitl A., Kosman E. Virulence phenotypes of *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* in South Africa. // Eur. J. Plant Pathol. – 2013. – Vol. 136. – P. 113–121.
- 25 Limpert E. Barley mildew in Europe: Evidence of wind-dispersal of the pathogen and its implications for improved use of host resistance and of fungicides for mildew control. // Integrated Control of Cereal Mildews: Monitoring the Pathogen. – 1987. – P. 31–33.
- 26 Conry M., Dunne B. Influence of number and timing of fungicide applications on the yield and quality of early and later-sown spring malting barley grown in the south-east of Ireland. // J. Agric. Sci. – 2001. – Vol. 136. – P. 159–167.
- 27 Zhang Z., Henderson C., Perfect E., Carver T., Thomas B., Skamnioti P., Gurr S. Of genes and genomes, needles and haystacks: *Blumeria graminis* and functionality. // Mol. Plant Pathol. – 2005. – Vol. 6. – P. 561–575.
- 28 Rsaliyev A.S., Chudinov V.A., Amirkhanova N.T. Ustoychivost' selektsionnykh materialov yachmenya Karabalykskoy sel'skokhozyaystvennoy opytной stantsii k setchatoy pyatnistosti i muchnistoy rose // Doklady NAN RK. – 2016. - №4. – C.79-87.
- 29 Rsaliyev A.S., Amirkhanova N.T., Pakhratdinova ZH.U. Vnutrividovaya differentsiatsiya populyatsiy *Ryrenophora teres* v Kazakhstane i Omskoy oblasti Rossii. // Mikologiya i fitopatologiya. – 2018. – T. 52. Vyp. 1. – C.55-65.
- 30 Rsaliyev A., Pakhratdinova Zh., Rsaliyev Sh. Characterizing the pathotype structure of barley powdery mildew and effectiveness of resistance genes to this pathogen in Kazakhstan. // BMC Plant biology. – 2017. – Vol.17. – P.39-49.
- 31 Turuspekov Y., Rsaliyev A., Chudinov V., Sarbayev A., Abugalieva S. Identification of QTLs associated with spot blotch resistance of barley // The 3d International Conference "Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics and Biotechnology" PlantGen 2015 Abstract book. Новосибирск, ИЦиГ СО РАН. – C.59-60.
- 32 Loskutov I.G., Kovaleva O.N., Blinova Ye.V. Metodicheskiye ukazaniya po izucheniyu mirovoy kolleksii yachmenya i ovsa // SPb.: VIR. – 2012. – 63 c.
- 33 Zadoks J.C., Chang T.T., Konzak C.F. A decimal code for the growth stages of cereals. // Weed Res. – 1974. – Vol. 14. – P. 415–421.
- 34 Afanasenko O.S. Metodicheskoye ukazaniya po diagnostike i metodam polevoy otsenki ustoychivosti yachmenya k vzbudityam pyatnistostey list'yev. L.: VIZR. – 1987. – 20 c.

- 35 Saari E.E., Prescott J.M. A scale for appraising the foliar intensity of wheat disease //Plant disease reporter. – 1975. – Vol. 59. – № 5. – P. 377-380.
- 36 James W.C. A manual of disease assessment keys for plant diseases. // Can. Dep. Agric. Publ. – 1971. – No. 1458. – 88 pp.
- 37 Turuspekov Y., Ormanbekova D., Rsaliev A., Abugalieva S. Genome-wide association study on stem rust resistance in Kazakh spring barley lines // BMC Plant Biology. – 2016. – Vol. 16. – P. 13-21.
- 38 Rsaliev A.S., Ämirxanova N.T. Теңбил дақ және ақ ұнтақ аурларына арпаның төзімділік көздерін табу // Izdenister, nätijeler. – 2016. – №3. – С. 199-205.
- 39 Genievskaya Y., Turuspekov Y., Rsaliyev A., Abugalieva S. Genome-wide association mapping for resistance to leaf, stem, and yellow rusts of bread wheat in conditions of South Kazakhstan // Peer J. – 2020. – Vol. 8. DOI 10.7717/peerj.9820.
- 40 Genievskaya Y., Abugalieva S., Rsaliyev A., Yskakova G., Turuspekov Y. QTL Mapping for Seedling and Adult Plant Resistance to Leaf and Stem Rusts in Pamyati Azieva × Paragon Mapping Population of Bread Wheat // Agronomy. – 2020. – Vol. 10. – P. 1-18.

УСТОЙЧИВОСТЬ СОРТООБРАЗЦОВ ЯЧМЕНЯ К ОСНОВНЫМ ГРИБНЫМ БОЛЕЗНЯМ

А. Жунусова¹ *, А. Сарбаев² 

¹ Казахский национальный аграрный исследовательский университет, jmarikoza@mail.ru

² Казахский научно-исследовательский институт земледелия и растениеводства, kizamans2@mail.ru

Аннотация: Ячмень является одной из наиболее часто встречающихся зерновых культур в мире, а на территории Казахстана культура приобрела огромное сельскохозяйственное значение в связи с неприхотливостью в производстве в условиях сложного климата. Одним из перспективных направлений в сельском хозяйстве является выявление устойчивых к грибным заболеваниям сортов образцов. Главным же аспектом при использовании устойчивых сортов ячменя является улучшение качества продукции за счет частичного или полного отказа от химической обработки. В 2021-2022 гг. на опытном поле Казахского научно-исследовательского института земледелия и растениеводства была проведена полевая оценка устойчивости 46 сортов образцов озимого и ярового ячменя отечественного происхождения к наиболее распространенным в Казахстане грибным болезням (сетчатая пятнистость, темно-бурая пятнистость, ринхоспориоз и мучнистая роса). По результатам фитопатологической оценки среди сортов образцов ячменя отобраны источники устойчивости к основным грибным болезням. Обнаружено 7 сортов образцов озимого и ярового ячменя, устойчивых к нескольким грибным болезням. Выявленные образцы и сорта ячменя, устойчивые как к одному, так и к двум и более патогенам, могут быть использованы в селекционных программах по созданию устойчивых сортов ячменя.

Ключевые слова: ячмень; сорт; образец; грибные болезни; устойчивость.

RESISTANCE OF BARLEY VARIETIES TO MAJOR FUNGAL DISEASES

Zhunosova¹ *, A. Sarbaev² 

¹ Kazakh national agrarian research university, jmarikoza@mail.ru

² Kazakh scientific research institute of agriculture and plant growing, kizamans2@mail.ru

Annotation: Barley is one of the most common grain crops in the world, but on the territory of Kazakhstan, the culture has acquired great agricultural importance due to its unpretentiousness in production in a difficult climate. One of the promising areas in agriculture is the identification of varieties resistant to fungal diseases. The main aspect when using resistant varieties of barley is to improve the quality of products due to the partial or complete rejection of chemical processing. In 2021-2022 On the experimental field of the Kazakh Research Institute of Agriculture and Crop Production, a field assessment was made of the resistance of 46 varieties of winter and spring barley of domestic origin to the most common fungal diseases in Kazakhstan (net spot, brown spot, rhynchosporia and powdery mildew). According to the results of phytopathological assessment, sources of resistance to major fungal diseases were selected among barley varieties. 7 varieties of winter and spring barley were found, resistant to several fungal diseases. The identified accessions and varieties of barley, resistant to both one and two or more pathogens, can be purposefully used in breeding programs to create resistant varieties of barley.

Keywords: barley; grade; sample; fungal diseases; resistance.

SEQUENCING AND PHYLOGENETIC ANALYSIS OF THE ORF3A GENE VARIANT B.1.1.7 SARS-COV-2 VIRUS

B.S. Usserbayev ^{ORCID}*, N.S. Kozhabergenov ^{ORCID}, A.M. Melisbek ^{ORCID},
 M.Zh. Shirinbekov ^{ORCID}, A.I. Tagayev ^{ORCID}, Ye.D. Burashev ^{ORCID}

«Research Institute for Biological Safety Problems», MH RK, Gvardeyskiy uts
 usserbayev.bekbolat@mail.ru

Abstract. The problem of «new» infectious diseases has now acquired particular relevance for national and international health systems. One of these infections is the SARS-CoV-2 coronavirus. Due to the rapid spread of a new type of coronavirus in the world, molecular genetic studies of this virus are of great importance. This will help to understand the nature of the virus and develop antiviral drugs to prevent the disease. The aim is to identify a missense mutation in the ORF3 gene of the studied coronavirus strain SARS-CoV-2/human/KAZ/Britain. This paper presents the results of the development and sequencing of the ORF3 gene of the coronavirus strain SARS-Cov-2/human/KAZ/Britain. For the development and sequencing by the Sanger method of the ORF3 gene, 4 pairs of primers were developed, with an overlap of 100-150 bp. The changes in the ORF3 gene compared to other strains whose data were obtained from the GISAID database were analyzed. As a result, the obtained amino acid sequences of the ORF3a gene of variant B.1.1.7 were compared with the reference strain HCoV-19/Wuhan/Hu-1/2019, where one mutation was determined at position 149: W (tryptophan) → L (leucine). The phylogenetic affiliation of the studied virus strain was also determined, where the genetic distance between the studied strains of the SARS-CoV-2 virus was determined. Thus, the greatest similarity with the studied strain were:

HCoV-19/Wuhan/Hu-1/2019,

HCoV-19/England/MILK-9E05B3/2020,

HCoV-19/Japan/IC-0446/2020,

HCoV-19/Germany/NI-IOV-MHH15/2020,

and the strain *HCoV-19/Argentina/PAIS-F0418/*

2021 significantly distanced itself from the SARS-CoV-2/human/KAZ/Britain strain.

Keywords: SARS-CoV-2; mutation; PCR; primer; sequencing

Introduction

At the end of 2019, the republican office of the World Health Organization (WHO) in the People's Republic of China (PRC) was informed by the health authorities of the city of Wuhan about the registration of cases of pneumonia of unknown etiology [1, 2]. At the beginning of January 2020, 44 patients with pneumonia of unknown etiology were registered in China. The causative agent of the infection was not detected, and therefore WHO requested additional information from the national authorities of China to assess the risk [3]. Epidemiological studies conducted by the Chinese Center for Disease Control and Prevention (CDC China) and the Wuhan City Health Authority showed that the outbreak was associated with the seafood market, and with the help of genome-wide sequencing, a new (2019-nCoV) type of

coronavirus was identified, whose genome was about 29.9 bp. (GenBank NC_045512.2) [4, 5]. At the 5' end of the genome, 2019-nCoV encodes a replicase gene containing two open reading frames (ORF) ORF1 and ORF1b. The ORF gene contains 15 nonstructural proteins (NSP), including from NSP 1 to NCP10 and from NSP 12 to NSP 16 [5, 6]. At the 3' end, the genome contains the genes S, ORF3a, E, membrane protein (M), ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, N and protein ORF10 [7, 8]. Among the proteins listed above, ORF3a, ORF8 and ORF10 are unique for a new coronavirus infection [9].

In this work, attention is focused on the ORF3a protein, since it participates in important aspects of the pathogenicity of the virus [10] and includes various functional domains depending on virulence, infectivity [11]. The ORF3a protein is located between the loci of the S and E genes, which forms the N-terminal transmembrane and C-terminal domains. The ORF3a - protein is viroporin, a viral transmembrane protein that exhibits the properties of ion channels in cell membranes [12, 13]. The ORF3a protein interacts with caveolin, which regulates various phases of the viral cycle [14]. It should be noted that a significant reaction of CD4+ and CD8+T cells to SARS-CoV-2 in infected people was directed against ORF3a [15].

The ORF3a protein was initially found in the coronavirus family, and then described under various names, such as protein X1 [16], protein 3a [17], U274 [18] and ORF3a [14]. At the beginning of the COVID-19 pandemic in 2019, we learned about the pathogenic property of the ORF3a gene of the SARS-CoV-2 virus [19]. Some studies have shown that many recovering patients with atypical pneumonia produce antibodies to ORF3a and the serum of patients with COVID-19 also demonstrates a high level of IgG and IgA reactivity to ORF3a, in addition to structural proteins [20]. The analysis of nucleotide and protein sequences of infection of a new variant of the coronavirus SARS-CoV-2 provides important data on the biology of the virus. Therefore, molecular genetic studies are important for monitoring the evolution of the virus.

The aim of this work is to identify changes in the ORF3a gene of the studied coronavirus strain SARS-CoV-2/human/KAZ/Britain.

Materials and methods

Research material. The coronavirus strain SARS-CoV-2/human/KAZ/Britain from the laboratory of the collection of microorganisms of the Research Institute of Biological Safety Problems was used as the object of the study.

Isolation of RNA. Virus RNA was extracted from a virus-containing liquid with the QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen, Germany) in accordance with the manufacturer's instructions in the BSL-3 laboratory.

cDNA synthesis. Reverse transcription (RT) was performed using the SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA) in a Mastercycler X50s thermal cycler at 25°C for 10 min; 42°C for 60 min; 85°C for 5 min.

Selection and synthesis of primers. The search and selection of specific primers for the development and sequencing of the ORF3a gene of the SARS-CoV-2 virus was carried out using the online program Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>). The synthesis of oligonucleotides was carried out on an automatic DNA/RNA Synthesizer H16 oligonucleotide synthesizer (K&A Laborgeraete, Germany) by the amidophosphite method.

Setting up PCR. Amplification was performed on a Mastercycler X50s thermal cycler using a Platinum Super Fi PCR Master Mix kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA) in accordance with the manufacturer's instructions. The operating time of PCR products was carried out according to the following temperature regime: initial denaturation 95°C-0.5 min; followed by 35 cycles of amplification at denaturation 95°C-0.1 min, annealing 57°C-0.5 min, elongation 72°C-0.5 min; final elongation 72°C-5 min.

Gel electrophoresis. Horizontal gel electrophoresis was performed in 1.5% agarose gel (Sigma, USA), stained with ethidium bromide, in a tris-acetate buffer at a voltage of 100 volts / cm of gel length, for 30 minutes with further detection on the MiniBIS Pro transilluminator (DNR Bio Imaging Systems, Israel). Visualization and documentation of the results of gel electrophoresis was carried out using the «GelCapture» program 1 kb DNA Ladder ready-to-use (Bioron, Germany) was used as a marker of molecular weights.

Purification of the PCR product. The PCR purification of the product was carried out with the GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) according to the manufacturer's instructions.

Sequencing by the Sanger method. Sequencing of the ORF3a gene of the SARS-CoV-2 virus after purification of the PCR product was carried out using cyclic sequencing by the Sanger method with a set of AB BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) and sequencing primers (Table 1), which were used at the production stage. The products were purified with a set of BigDye Xterminator (Thermo Fisher Scientific, USA) and sequenced using a 3130 XL genetic analyzer (Applied Biosystems).

Bioinformatic analysis and algorithm. After sequencing, the obtained nucleotide sequence data were processed using the Sequencher v.5.4 program (Gene Codes Corporation, USA). Comparison of the amino acid sequence of the ORF3 gene with the reference strain was carried out using the Protein BLAST program (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) based on NCBI. Multiple alignment, phylogenetic analysis and calculation of genetic distances of the gene were carried out using the MEGA 11 program [21, 22].

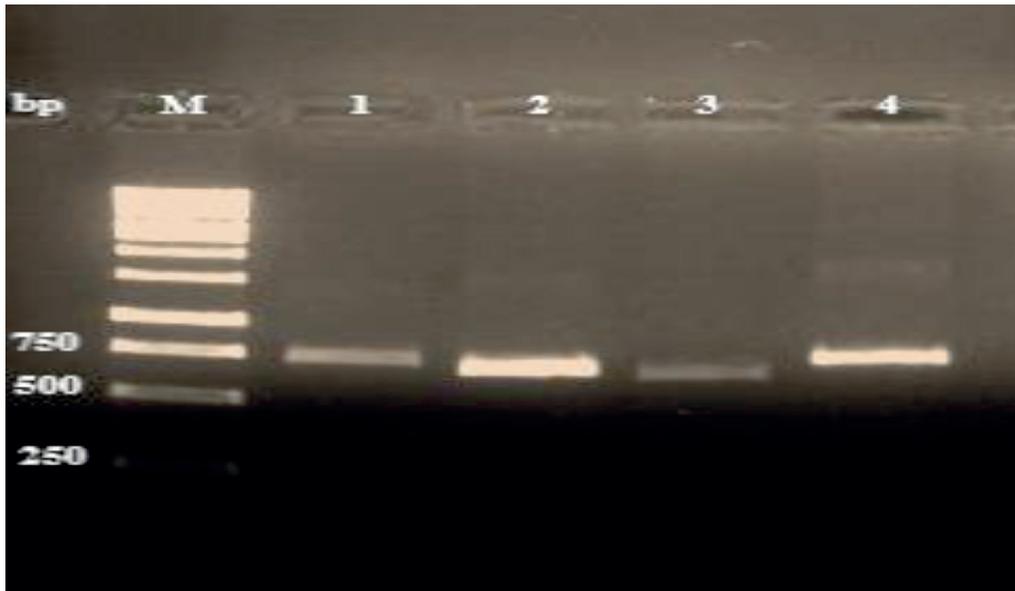
The main results of the research. The sequence of nucleotides of specific primers was selected based on the ORF3 gene of the reference strain *Wuhan-Hu-1*. Primers were selected in such a way that each pair of primers overlapped each other. As a result, 4 pairs of sequencing primers were selected (Table.1) to develop the complete ORF3a gene of the SARS-CoV-2 virus with an overlap of about 100 bp.

Table 1 – Parameters of sequencing primers

№	Sequence 5' – 3'	Length	Tm	GC%	Position	Product size, bp
f	Forward primer TGA CTTATG TCCCTGCACAA	20	56.76	45.00	24756-24775	731
r	Reverse primer GTAGCGCGAACAAAATCTGA	20	56.85	45.00	25487-25468	
f	Forward primer TGTGTCTGGTAACTGTGATGT	21	56.88	42.86	24925-24945	686
r	Reverse primer GAGTGCTAGTTGCCATCTCT	20	57.02	50.00	25611-25592	
f	Forward primer CGATACCGATACAAGCCTCA	20	56.92	50.00	25493-25512	654
r	Reverse primer GAACCGTCGATTGTGTGAAT	20	56.47	45.00	26147-26128	
f	Forward primer GCCGTTCCAAAACCCATTA	20	56.89	45.00	25790-25809	743
r	Reverse primer GAACCTGCCATGGCTAAAAT	20	56.35	45.00	26533-26514	

Selected primers (Table.1) allow to fully develop the ORF3a gene of the SARS-CoV-2 virus, the length of which is 825 bp [19].

Thus, with the selected primers (Table 1), 4 fragments of the ORF3a gene of the SARS-CoV-2 virus were developed (Fig.1).



M – marker; 1–4 test samples

Figure 1 – Electrophoregram of PCR products of the *ORF3a* gene strain *SARS-CoV-2/human/KAZ/Britain*.

As can be seen from Figure 1, after carrying out standard PCR with a set of specific primers (Table 1), fragments of PCR products were developed in appropriate sizes.

As a result, the amino acid sequences of the obtained *ORF3a* gene were compared with the reference strain, where one mutation was detected at position 149 (Fig.2).

[Download](#) [Graphics](#)

unnamed protein product

Sequence ID: Query_16105 Length: 275 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 275 [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
565 bits(1456)	0.0	Compositional matrix adjust.	274/275(99%)	274/275(99%)	0/275(0%)
Query 1	MDLFMRIFTIGTVTLKQGEIKDATPSDFVRATATIPIQASLPFGWLIVGVALLAVFQSAS				60
Sbjct 1				60
Query 61	KIITLKKRWQLALSkgVHFVCNLLLLFVTVYSHLLLVAAGLEAPFLYLYALVYFLQSINF				120
Sbjct 61				120
Query 121	VRIIMRLWLCWKCRSKNPLLYDANYFLCLHTNCYDYCIPYNSVTSSIVITSGDGTTSPIIS				180
Sbjct 121W				180
Query 181	EHDYQIGGYTEKWESGVKDCVWLHSYFTSDYYQLYSTQLSTDTGVEHVTFEYFNKIVDEP				240
Sbjct 181				240
Query 241	EEHVQIHTIDGSSGVVNPVMEPIYDEPTTTTSVPL		275		
Sbjct 241		275		

Figure 2 – Comparison of the amino acid sequence of the analyzed *ORF3a* gene with the reference strain Wuhan-Hu-1.

As a result of the data obtained, a variation was determined that led to a corresponding change in the amino acid from W (Tryptophan) to L (Leucine) at the amino acid position 149.

Next, a phylogenetic analysis of the studied viral strain by the ORF3a gene was performed in order to determine the most phylogenetically close to it viral strains of SARS-CoV-2 (Fig.3). The analysis used 12 other global strains obtained from the database of the Global Initiative for the Exchange of All Influenza Data (GISAID) (<https://www.gisaid.org>).

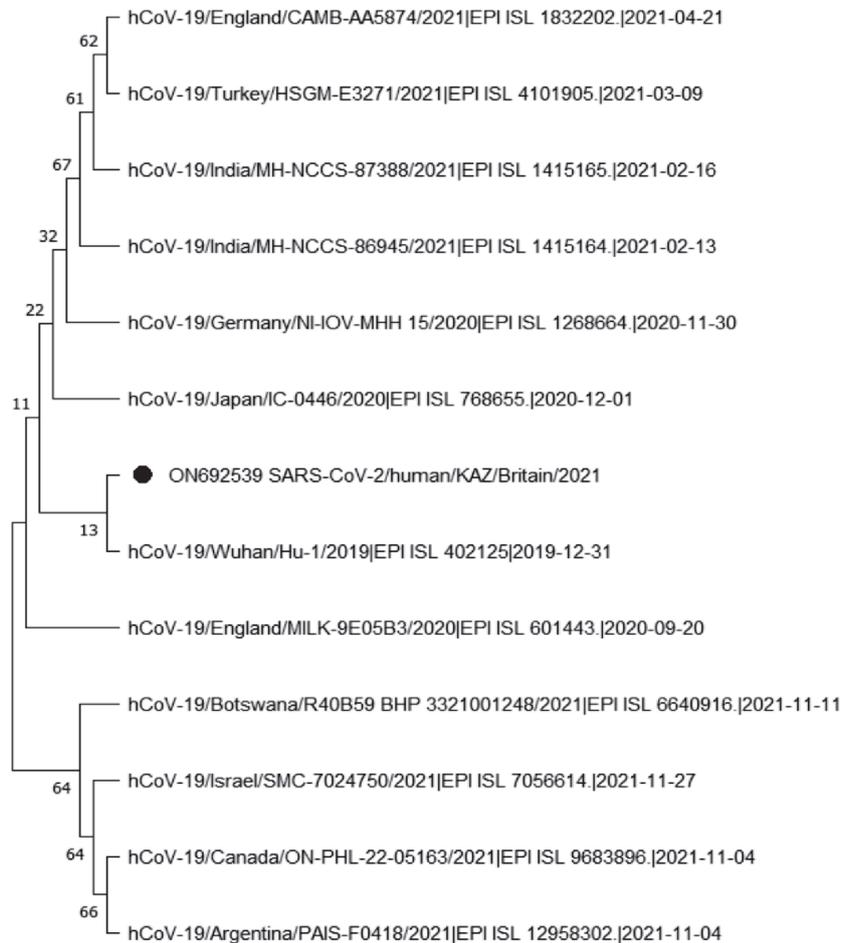


Figure 3 – Phylogenetic tree of the *SARS-CoV-2/human/KAZ/Britain* strain and other *SARS-CoV-2* strains by the ORF3a gene.

Phylogenetic analysis showed that the viral strains *SARS-CoV-2/human/KAZ/Britain* and *HCoV-19/Wuhan/Hu-1/2019* are identical to each other in this part of the genome.

When analyzing the assessment of the evolutionary divergence between the sequences of the ORF3 gene of the strain under study and the data (Fig.2) of GISAID, the number of basic differences between the nucleotide sequences of the gene was determined (Table 2).

Table 2 – Genetic differentiation of the ORF3a gene of the SARS-CoV2/human/KAZ/Britain strain and other strains obtained from the GISAID database

№	Name of strains	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	SARS-CoV-2/human/KAZ/ Britain		0,00120	0,00120	0,00120	0,00120	0,00124	0,00124	0,00162	0,00216	0,00178	0,00178	0,00178	0,00255
2	hCoV-19/Wuhan/Hu-1/2019	0,00121		0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00115	0,00179	0,00130	0,00130	0,00130	0,00215
3	hCoV-19/England/ MILK-9E05B3/2020	0,00121	0,00000		0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00115	0,00179	0,00130	0,00130	0,00130	0,00215
4	hCoV-19/Japan/IC-0446/2020	0,00121	0,00000	0,00000		0,00000	0,00000	0,00000	0,00115	0,00179	0,00130	0,00130	0,00130	0,00215
5	hCoV-19/Germany/ NI-IOV-MHH15/2020	0,00121	0,00000	0,00000	0,00000		0,00000	0,00000	0,00115	0,00179	0,00130	0,00130	0,00130	0,00215
6	hCoV-19/India/ MH-NCCS86945/2021	0,00126	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000		0,00000	0,00000	0,00132	0,00134	0,00134	0,00134	0,00223
7	hCoV-19/India/ MH-NCCS87388/2021	0,00126	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000		0,00000	0,00132	0,00134	0,00134	0,00134	0,00223
8	hCoV-19/England/ CAMB-AA5874/2021	0,00243	0,00121	0,00121	0,00121	0,00121	0,00000	0,00000		0,00127	0,00178	0,00178	0,00178	0,00244
9	hCoV-19/Turkey/ HSGM-E3271/2021	0,00365	0,00243	0,00243	0,00243	0,00243	0,00126	0,00126	0,00121		0,00221	0,00221	0,00221	0,00275
10	hCoV-19/ Botswana /R40659 BHP 3321001248 /2021	0,00243	0,00121	0,00121	0,00121	0,00121	0,00125	0,00125	0,00242	0,00364		0,00000	0,00000	0,00175
11	hCoV-19/Israel/ SMC-7024750/2021	0,00243	0,00121	0,00121	0,00121	0,00121	0,00125	0,00125	0,00242	0,00364	0,00000		0,00000	0,00175
12	hCoV-19/Canada/ ON-PHL-22-05163/2021	0,00243	0,00121	0,00121	0,00121	0,00121	0,00125	0,00125	0,00242	0,00364	0,00000	0,00000		0,00175
13	hCoV-19/Argentina/ PAIS-F0418/2021	0,00486	0,00364	0,00364	0,00364	0,00364	0,00377	0,00377	0,00485	0,00609	0,00242	0,00242	0,00242	

From the data obtained, it can be seen that the nucleotide sequence of the ORF3a gene showed the greatest similarity between the strains *SARS-CoV-2/human/KAZ/Britain* and *HCoV-19/Wuhan/Hu-1/2019*, *HCoV-19/England/MILK-9E05B3/2020*, *HCoV-19/Japan/IC-0446/2020*, *HCoV-19/Germany/NI-IOV-MHH15/2020*, the divergence coefficient of which is $D \geq 0.00121$. Pairwise values of genetic differentiation (Table 2) based on the ORF3a gene showed that the strain *SARS-CoV-2/human/KAZ/Britain* significantly distances itself from the strain *HCoV-19/Argentina/PAIS-F0418/2021* ($D \geq 0.00486$).

Discussion of the results obtained. According to data from *GISAID*, there are currently 12 different clades of the *SARS-CoV-2* virus in the world (www.gisaid.org). A significant place for the evolutionary control and differentiation of mutational variability of microorganisms is occupied by molecular genetic studies. Sanger sequencing is a reference sequencing method in which the probability of incorrect reading is very low compared to other next-generation sequencing methods.

In this research paper, we presented data on the sequencing of the ORF3a gene of the *SARS-CoV-2* virus. For these purposes, we have developed 4 pairs of sequencing primers, which together develop the whole ORF3a gene of the *SARS-CoV-2* coronavirus (Fig.1). During the research, the optimal parameters of the PCR formulation were determined, which corresponds to the following values: the annealing temperature is 57°C, and the concentration of each primer is 400 mM in the reaction mixture. According to the WHO classification, mutations in the ORF3a gene were detected in the groups of virus of interest (VOI) and virus of concern (VOC) (Table 3) [19].

Table 3 – Brief description of new mutant variants for the *ORF3a* gene of the *SARS-CoV-2* virus [19]

Вирусные варианты	Pango lineage	First detection and location detection	ORF3a mutations
Virus of Interest (VOI)			
<i>Lambda</i>	C.37	Peru, December - 2020	No
<i>Mu</i>	B.1.621	Colombia, January - 2021	Q57H, del256/257
<i>Epsilon</i>	B.1.427	California, USA, June - 2020	Q57H
Virus of Concern (VOC)			
<i>Alpha</i>	B.1.1.7	United Kingdom, September - 2020	No
<i>Beta</i>	B.1.351	South Africa, May - 2020	Q57H, S171L
<i>Gamma</i>	P.1	Brazil, November - 2020	S253P, D155Y
<i>Delta</i>	B.1.617.2	India, October - 2020	S26L
<i>Omicron</i>	BA.1/B.1.1.529	South Africa November - 2021	No
	BA.2/B.1.1.529.2	South Africa November - 2021	T223I
	BA.3/B.1.1.529.3	South Africa November - 2021	T223I

As can be seen from Table 3, the Q57H mutation is present in the «Epsilon» and Q57H/S171L «Beta» variants [23]. The appearance of the Q57H mutation is associated with the 4th wave of the revival of *SARS-CoV-2* in Hong Kong [24]. In the «Gamma» variant, only a single S253P change or combined S253P/D155Y mutations were detected. Among the sarbecovirus group, D155 and S253 residues are considered to be the most conservative regions, and these mutations cause a change in the activity of the ORF3a protein [19]. The S26L mutation found in the «Delta» variant does not affect the nature of the virus, since this region is very diverse among the sarbecovirus family [25]. Currently, there is no evidence that the T223I mutation found in the «Omicron» variant affects the virulence of the virus [26, 27].

In this work, we identified a change in one amino acid in the ORF3a gene of the *SARS-CoV-2/human/KAZ/Britain* strain. Davarynejad et.al [28] showed that replacing just one

amino acid in one protein is crucial for cell division. This requires regular genomic and epidemiological studies to identify new variants of viral pathogens. Since the amino acid sequence was detected, it was found only in the strain under study compared to other strains of *SARS-CoV-2* variants (https://cov-lineages.org/global_report_B.1.1.7.html). This identified amino acid sequence requires effective research in the future, since it is unknown whether this affects the virulence and functional nature of the virus.

Phylogenetic analysis showed that the studied strain is close to the reference strain compared to other variants of *SARS-CoV-2* strains.

However, social distancing of the population, non-compliance with personal protective measures and low vaccination rates also play a significant role in the spread of coronavirus infection. Thus, molecular genetic analysis further activates the need for genomic studies to identify new changes in the genes of *SARS-CoV-2* variants.

Conclusion. As a result of research work, four pairs of primers were selected for the development and sequencing by the Sanger method of the ORF3a gene of variant B.1.1.7, with a 100-150 bp overlap. The results of the study showed that PCR products fully correspond to the length of the developed primers.

The obtained amino acid sequences of the ORF3a gene were compared with a reference strain (GenBank inventory number NC_045512.2) where one mutation was determined at position 149: W→L. Comparative genetic analysis showed that the nucleotide sequences of the ORF3a gene of the coronavirus strain *SARS-CoV-2/human/KAZ/Britain* are highly identical to the ORF3a gene of the *HCoV-19/Wuhan/Hu-1/2019* strain.

The analysis of the nucleotide sequence of the ORF3a gene of the *SARS-CoV-2/human/KAZ/Britain* strain showed the greatest similarity with *HCoV-19/Wuhan/Hu-1/2019*, *HCoV-19/England/MILK-9E05B3/2020*, *HCoV-19/Japan/IC-0446/2020*, *HCoV-19/Germany/NI-IOV-MHH15/2020*. The genetic distances revealed by the nucleotide sequences of the ORF3a gene are significantly distanced from *HCoV-19/Argentina/PAIS-F0418/2021*.

The work was carried out within the framework of the grant funding project AP09058338 «Study of antiviral activity of drugs in relation to the SARS-COV-2 virus in vitro and molecular epidemiological analysis of circulating COVID-19 strains».

The authors of this article declare that there is no conflict of interest.

References

- 1 Lu H., Stratton C.W., Tang Y.W. Outbreak of pneumonia of unknown etiology in Wuhan, China: The mystery and the miracle. // *J Med Virol.* – 2020. 92(4). - P.401-402. doi:10.1002/jmv.25678
- 2 Lam S., Lombardi A., Ouanounou A. COVID-19: A review of the proposed pharmacological treatments. // *Eur J Pharmacol.* – 2020. - 886 (5) 173451. doi:10.1016/j.ejphar.2020.173451
- 3 COVID-19 – China. Pneumonia of unknown cause – China (who.int)
- 4 Zhu N., Zhang D., Wang W., Li X., Yang B., Song J., Zhao X., Huang B., Shi W., Lu R., Niu P., Zhan F., Ma X., Wang D., Xu W., Wu G., Gao G.F., Tan W; China Novel Coronavirus Investigating and Research Team. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. // *N Engl J Med.* – 2020. 382(8). – P. 727-733. doi:10.1056/NEJMoa2001017
- 5 Wu F., Zhao S., Yu B., Chen Y.M., Wang W., Song Z.G., Hu Y., Tao Z.W., Tian J.H., Pei Y.Y., Yuan M.L., Zhang Y.L., Dai F.H., Liu Y., Wang Q.M., Zheng J.J., Xu L., Holmes E.C., Zhang Y.Z. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. // *Nature.* – 2020. 579 (7798). – P. 265-269. doi:10.1038/s41586-020-2202-3
- 6 Emam M., Oweda M., Antunes A., El-Hadidi M. Positive selection as a key player for SARS-CoV-2 pathogenicity: Insights into ORF1ab, S and E genes. // *Virus Res.* – 2021. 302:198472. doi:10.1016/j.virusres.2021.198472
- 7 SeyedAlinaghi S., Mirzapour P., Dadras O. et al. Characterization of SARS-CoV-2 different variants and related morbidity and mortality: a systematic review. // *Eur J Med Res.* - 2021. 26(1). 51. doi:10.1186/s40001-021-00524-8

- 8 Wu A., Peng Y., Huang B., Ding X., Wang X., Niu P., Meng J., Zhu Z., Zhang Z., Wang J., Sheng J., Quan L., Xia Z., Tan W., Cheng G., Jiang T. Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China. // *Cell Host Microbe*. – 2020. 27(3). – P.325-328. doi:10.1016/j.chom.2020.02.001
- 9 Gordon, D. E., Jang, G. M., Bouhaddou, M., Xu, J., Obernier, K., White, K. M., et al. A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. // *Nature*. – 2020. 583. – P. 459–468. doi:10.1038/s41586-020-2286-9
- 10 Ren, Y., Shu, T., Wu, D. et al. The ORF3a protein of SARS-CoV-2 induces apoptosis in cells. // *Cell Mol Immunol*. – 2020. 17. – P. 881–883. doi:10.1038/s41423-020-0485-9
- 11 Issa E, Merhi G, Panossian B, Salloum T, Tokajian S. SARS-CoV-2 and ORF3a: nonsynonymous mutations, functional domains, and viral pathogenesis.” // *mSystems*. – 2020. 5(3). doi:10.1128/mSystems.00266-20
- 12 Scott C., Griffin S. Viroporins: structure, function and potential as antiviral targets. // *J Gen Virol*. – 2015 96(8). – P. 2000-2027. <https://doi.org/10.1099/vir.0.000201>
- 13 Bianchi M., Borsetti A., Ciccozzi M., Pascarella S. SARS-CoV-2 ORF3a: Mutability and function. // *Int J Biol Macromol*. – 2021. 170. – P. 820-826. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.12.142
- 14 Padhan K., Tanwar C., Hussain A., Hui P.Y., Lee M.Y., Cheung C.Y., Peiris J.S.M., Jameel S. Severe acute respiratory syndrome coronavirus Orf3a protein interacts with caveolin. // *J Gen Virol*. – 2007. 88(11). – P. 3067-3077. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82856-0>
- 15 Grifoni A., Weiskopf D., Ramirez S.I., Mateus J., Dan J.M., Moderbacher C.R., Rawlings S.A., Sutherland A., Premkumar L., Jardi R.S., Marrama D., de Silva A.M., Frazier A., Carlin A.F., Greenbaum J.A., Peters B., Krammer F., Smith D.M., Crotty S., Sette A. Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. // *Cell*. – 2020. 181(7). – P.1489-1501. doi:10.1016/j.cell.2020.05.015
- 16 Rota P.A., Oberste M.S., Monroe S.S., Nix W.A., Campagnoli R., Icenogle J.P., Peñaranda S., Bankamp B., Maher K., Chen M.H., Tong S., Tamin A., Lowe L., Frace M., DeRisi J.L., Chen Q., Wang D., Erdman D.D., Peret T.C, Burns C., Ksiazek T.G., Rollin P.E., Sanchez A., Liffick S., Holloway B., Limor J., McCaustland K., Olsen-Rasmussen M., Fouchier R., Günther S., Osterhaus A.D., Drosten C., Pallansch M.A., Anderson L.J., Bellini W.J. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. // *Science*. – 2003. 300(5624). –P.1394-9. doi:10.1126/science.1085952
- 17 Marra M.A., Jones S.J., Astell C.R., Holt R.A., Brooks-Wilson A., Butterfield Y.S., Khattra J., Asano J.K., Barber S.A., Chan S.Y., Cloutier A., Coughlin S.M., Freeman D., Girn N., Griffith O.L., Leach S.R., Mayo M., McDonald H., Montgomery S.B., Pandoh P.K., Petrescu A.S., Robertson A.G., Schein J.E., Siddiqui A., Smailus D.E., Stott J.M., Yang G.S., Plummer F., Andonov A., Artsob H., Bastien N., Bernard K., Booth T.F., Bowness D., Czub M., Drebot M., Fernando L., Flick R., Garbutt M., Gray M., Grolla A., Jones S., Feldmann H., Meyers A., Kabani A., Li Y., Normand S., Stroher U., Tipples G.A., Tyler S., Vogrig R., Ward D., Watson B., Brunham R.C., Kraiden M., Petric M., Skowronski D.M., Upton C., Roper R.L.. The Genome sequence of the SARS-associated coronavirus. // *Science*. – 2003. 300(5624). –P.1399-404. doi:10.1126/science.1085953
- 18 Tan Y.J., Teng E., Shen S., Tan T.H., Goh P.Y., Fielding B.C., Ooi E.E., Tan H.C., Lim S.G., Hong W. A novel severe acute respiratory syndrome coronavirus protein, U274, is transported to the cell surface and undergoes endocytosis. // *J Virol*. – 2004. 78(13). – P.6723-34. doi:10.1128/JVI.78.13.6723-6734.2004
- 19 Zhang J., Ejikemeuwa A., Gerzanich V., Nasr M., Tang Q., Simard J.M., Zhao R.Y. Understanding the Role of SARS-CoV-2 ORF3a in Viral Pathogenesis and COVID-19. // *Front Microbiol*. – 2022. 13:854567. doi:10.3389/fmicb.2022.854567
- 20 Zhong X., Guo Z., Yang H., Peng L., Xie Y., Wong T.Y., Lai S.T., Guo Z. Amino terminus of the SARS coronavirus protein 3a elicits strong, potentially protective humoral responses in infected patients. // *J Gen Virol*. – 2006. 87(Pt 2). –P.369-373. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81078-0>
- 21 Tamura K., Stecher G., and Kumar S. (2021). MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. // *Molecular Biology and Evolution*. – 2021. 38(7). – P.3022-3027. doi:10.1093/molbev/msab120

- 22 Tamura K., Nei M., Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. // Proc Natl Acad Sci USA. – 2004. 101(30). – P.11030-5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404206101>
- 23 Tzou P.L., Tao K., Nouhin J., Rhee S.Y., Hu B.D., Pai S., Parkin N., Shafer R.W. Coronavirus Antiviral Research Database (CoV-RDB): An Online Database Designed to Facilitate Comparisons between Candidate Anti-Coronavirus Compounds. // Viruses. – 2020. 12(9). – P. 1006. doi:10.3390/v12091006
- 24 Chu D.K.W., Hui K.P.Y., Gu H., Ko R.L.W., Krishnan P., Ng D.Y.M., Liu G.Y.Z., Wan C.K.C., Cheung M.C., Ng K.C., Nicholls J.M., Tsang D.N.C., Peiris M., Chan M.C.W., Poon L.L.M. Introduction of ORF3a-Q57H SARS-CoV-2 Variant Causing Fourth Epidemic Wave of COVID-19, Hong Kong, China. // Emerg Infect Dis. – 2021. 27(5). – P.1492-1495. doi:10.3201/eid2705.210015
- 25 Kern D.M., Sorum B., Mali S.S., Hoel C.M., Sridharan S., Remis J.P., Toso D.B., Kotecha A., Bautista D.M., Brohawn S.G. Cryo-EM structure of SARS-CoV-2 ORF3a in lipid nanodiscs. // Nat Struct Mol Biol. – 2021. 28(8). – P.702. doi:10.1101/2020.06.17.156554
- 26 Desingu P.A., Nagarajan K., Dhama K. Emergence of Omicron third lineage BA.3 and its importance. // J Med Virol. – 2022. 94(5). – P.1808-1810. doi:10.1002/jmv.27601
- 27 Abdullah F., Myers J., Basu D., Tintinger G., Ueckermann V., Mathebula M., Ramlall R., Spoor S., de Villiers T., Van der Walt Z., Cloete J., Soma-Pillay P., Rheeder P., Paruk F., Engelbrecht A., Lalloo V., Myburg M., Kistan J., van Houghenouck-Tulleken W., Boswell M.T., Gray G., Welch R., Blumberg L., Jassat W. Decreased severity of disease during the first global omicron variant covid-19 outbreak in a large hospital in tshwane, south africa. // Int J Infect Dis. – 2022. – P.116:38-42. doi:10.1016/j.ijid.2021.12.357
- 28 Davarinejad H., Huang Y.C., Mermaz B., LeBlanc C., Poulet A., Thomson G., Joly V., Muñoz M., Arvanitis-Vigneault A., Valsakumar D., Villarino G., Ross A., Rotstein B.H., Alarcon E.I., Brunzelle J.S., Voigt P., Dong J., Couture J.F., Jacob Y. The histone H3.1 variant regulates TONSOKU-mediated DNA repair during replication. // Science. – 2022. 375(6586). – P.1281-1286. doi:10.1126/science.abm5320

СЕКВЕНИРОВАНИЕ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГЕНА ORF3A ВАРИАНТА B.1.1.7 ВИРУСА SARS-COV-2

Б.С. Усербаев *, Н.С. Кожабергенов , А.М. Мелисбек ,
М.Ж. Ширинбеков , А.И. Тагайев , Е.Д. Бурашев 

«Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», МЗ РК
пгт. Гвардейский

Аннотация: Проблема «новых» инфекционных болезней в настоящее время приобрела особую актуальность для национальных и международных систем здравоохранения. Одной из таких инфекций является коронавирус SARS-CoV-2. В связи с быстрым распространением нового типа коронавируса в мире, важное место занимает проведение молекулярно-генетических исследований данного вируса. Это поможет понять природу вируса и разработать противовирусные препараты с целью профилактики заболевания. Цель - идентификация миссенс-мутации в гене ORF3a исследуемого коронавирусного штамма SARS-CoV-2/human/KAZ/Britain. В данной работе представлены результаты наработки и секвенирования гена ORF3a коронавирусного штамма SARS-CoV-2/human/KAZ/Britain. Для наработки и секвенирования методом Сэнгера гена ORF3a было разработано 4 пары праймеров, с перекрытием 100-150 п.о. Анализированы изменения в гене ORF3a по сравнению с другими штаммами, данные которых получены из базы данных GISAID. В результате полученные последовательности аминокислот гена ORF3a варианта B.1.1.7

были сравнены с эталонным штаммом *hCoV-19/Wuhan/Hu-1/2019*, где была определена одна мутация в позиции 149: W (триптофан) → L (лейцин). Также определена филогенетическая принадлежность исследуемого штамма вируса, где определена генетическая дистанция между исследованными штаммами вируса *SARS-CoV-2*. Таким образом, наибольшее сходство с исследуемым штаммом были:

hCoV-19/Wuhan/Hu-1/2019,
hCoV-19/England/MILK-9E05B3/2020,
hCoV-19/Japan/IC-0446/2020,
hCoV-19/Germany/NI-IOV-MHH15/2020,

а штамм *hCoV-19/Argentina/PAIS-F0418/2021* значительно дистанцировал от штамма *SARS-CoV-2/human/KAZ/Britain*.

Ключевые слова: *SARS-CoV-2*; мутация; ПЦР; праймер; секвенирование

SARS-COV-2 ВИРУСЫ В.1.1.7 ВАРИАНТЫНЫҢ ORF3А ГЕНІН СЕКВЕНИРЛЕУ ЖӘНЕ ФИЛОГЕНЕТИКАЛЫҚ ТАЛДАУ

Б.С. Усербаев *, Н.С. Кожабергенов , А.М. Мелисбек ,
 М.Ж. Ширинбеков , А.И. Тагайев , Е.Д. Бурашев 

«Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты» ДМ ҚР
 Гвардейск құк.

Аннотация: «Жаңа» жұқпалы аурулар проблемасы қазіргі уақытта ұлттық және халықаралық денсаулық сақтау саласы үшін ерекше өзектілікке ие. Осындай инфекциялардың бірі-жаңа *SARS-CoV-2* коронавирусы. Коронавирустың жаңа түрінің әлемде тез таралуына байланысты вирус биологиясына молекулалық - генетикалық зерттеулер жүргізу маңызды орын алады. Бұл вирустың табиғатын түсінуге және аурудың алдын алу үшін вирусқа қарсы препараттарды жасауға көмектеседі. Жұмыстың мақсаты - зерттелетін *SARS-CoV-2/human/KAZ/Britain* коронавирустық штамының ORF3а геніндегі миссенс-мутацияны анықтау. Бұл жұмыста *SARS-CoV-2/human/KAZ/Britain* коронавирус штамының ORF3а генінің амплификациясы мен секвенирлеу нәтижелері ұсынылған. ORF3а генін амплификация және Сэнгера әдісімен секвенирлеу үшін қабаттасуы 100 – 150 ж.н. құрайтын 4 жұп праймер жасалынды. GISAID деректер қорынан алынған басқа штамдармен салыстырғанда ORF3а геніндегі өзгерістер талданды. В.1.1.7 нұсқасы ORF3а генінің аминқышқылдарының тізбегін эталондық *hCoV-19/Wuhan/Hu-1/2019* штамымен салыстырылды, нәтижесінде 149 позициясында бір мутация анықталды: W (триптофан) → L (лейцин). Сондай-ақ зерттелетін вирус штамының филогенетикалық сәйкестілігі мен *SARS-CoV-2* вирустарының зерттелген штамдарының арасындағы генетикалық қашықтығы анықталды. Зерттелген штамға ең үлкен ұқсастық:

hCoV-19/Wuhan/Hu-1/2019,
hCoV-19/England/MILK-9E05B3/2020,
hCoV-19/Japan/IC-0446/2020,
hCoV-19/Germany/NI-IOV-MHH15/2020,

ал *hCoV-19/Argentina/PAIS-F0418/2021* штамы *SARS-CoV-2/human/KAZ/Britain* штамынан айтарлықтай алыстады.

Кілтті сөздер: *SARS-CoV-2*; мутация; ПЦР; праймер; секвенирования

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ВОДЫ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА БИОПРЕПАРАТОВ

Э.Ж. Калимолда *, С.О. Садикалиева , С.У. Молдагулова ,
Ж.С. Абсатова , З.Ж. Ершебулов , К.А. Шораева 

«Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», МЗ РК
пгт. Гвардейский, elina.kalimolda@mail.ru

Аннотация: Одним из главных требований к создаваемым новым вакцинам является их безопасность в применении, в том числе их стерильность, показатель водородных ионов и содержание бактериальных эндотоксинов (БЭ), являющиеся одними из основных показателей качества и безопасности. Соответствие данных параметров к нормам ГФ РК напрямую связано с качеством воды используемой в производственной линии. В данной статье представлены результаты работ по определению одних из основных параметров безопасности биопрепаратов, таких как стерильность, содержание бактериальных эндотоксинов и показатель водородных ионов.

Стерильность биопрепарата определялась методом фильтрации с последующим посевом на специфические бактериальные питательные среды. В результате установлено, что пробы очищенной и инъекционной воды свободны от посторонней микрофлоры, роста колонии не наблюдалось в течении 5-7 суток. В пробах водопроводной и сточной воды наблюдается обильный рост колонии на бактериальных питательных средах, что подтверждает наличие сапрофитных микроорганизмов. Для определения бактериальных эндотоксинов был использован ЛАЛ-тест. В результате проведенных работ по определению содержания БЭ установлено, что в образцах очищенной и инъекционной воды концентрация БЭ составляет 0,15 МЕ/мл, тогда как концентрация БЭ в образцах сточной воды составляет 15 МЕ/мл, а в водопроводной воде 1,5 МЕ/мл, что также не превышает норму. При изучении показателей водородных ионов в испытуемых пробах рН показатель инъекционной воды равен – 7,16, очищенной воды – 6,84, водопроводной воды – 7,93, сточной воды – 7,03. Полученные показатели свидетельствуют о соответствии микробиологических показателей испытуемых проб воды нормам и требованиям ГФ РК.

Ключевые слова: микробиологический контроль; стерильность; мембранная фильтрация; бактериальные эндотоксины; показатель водородных ионов.

Введение

Вода очень широко используется в фармацевтической, биофармацевтической и биологической промышленности как сырье, ингредиент в качестве растворителя, составлении и производстве широкого спектра готовых продуктов. Поэтому нормативные требования к контролю качества различных типов воды на протяжении всего процесса производства, хранения и распределения, включая микробиологическое и химическое качество, очень высоки и важны. Отсутствие контроля за любым из параметров, очищенной или воды для инъекций может привести к экономической потере дорогостоящего лекарственного средства [1].

Вода должна соответствовать требованиям качества, изложенным в принципах, изложенных в Государственной Фармакопее Республики Казахстан. Также многие страны

Соединенных Штатов (USP), Европы (EP) имеют свои фармакопеи и тщательно контролируют качество воды прежде, чем ее использовать в фармацевтическом производстве [2]. Микробиологический контроль качества воды в фармацевтическом производстве очень важен, поскольку вода присутствует во всех этапах производства, каждый сорт воды является потенциальным источником микробиологического загрязнения, особенно при отсутствии надлежащего контроля [3]. Природа охраняемых источников воды может быть разрушена из-за плохого расположения и негигиеничного управления объектами. Вода может быть загрязнена в любой момент между ее сбором и использованием. Несмотря на то, что большинство фармацевтических водных систем контролируются, микроорганизмы время от времени могут обнаруживаться, хотя и в небольшом количестве [4]. Подсчитано, что в сточных водах содержится около 70 различных видов бактерий. Несколько уникальных видов микробов преодолевают барьеры для очистки воды и обнаруживаются в фармацевтической воде. Большинство микробных загрязнителей представляют собой грамотрицательные бактерии, которые представляют дополнительный риск загрязнения воды эндотоксинами, используемой для парентерального производства [5]. Чтобы проверить, загрязнена ли вода микроорганизмами или нет, проводятся различные виды микробиологических тестов для проверки стерильности воды.

Для определения стерильности широко используется метод мембранной фильтрации, который является современным, точным, менее трудоемким и не дорогим в сравнении с потенциометрическим методом. Он удобен и тем, что позволяет концентрировать бактерии, содержащиеся в значительном объеме воды на небольшой поверхности фильтра. Однако одним из самых существенных недостатков метода является то, что этим методом выявляется меньшее количество бактерий в сравнении с потенциометрическим. Для большей точности анализа рекомендуется проводить исследование воды параллельно обоими методами [6].

Бактериальные эндотоксины является микробиологическим показателем и представляет собой липополисахариды (ЛПС) клеточных стенок грамотрицательных бактерий. С учетом опасности бактериальных эндотоксинов и трудности их удаления (химического и физического) из зараженного лекарственного препарата, необходимо принимать меры к минимизированию риска контаминации на фармацевтическом производстве [7].

Водородный показатель pH – также является одним из важнейших показателей качества воды. Величина концентрации ионов водорода имеет большое значение для химических и биологических процессов, происходящих в природных водах. pH воды влияет также на процессы превращения различных форм биогенных элементов, изменяет токсичность загрязняющих веществ [8].

Исходя из вышеизложенных целью настоящего исследования является проведение микробиологического контроля качества воды, предназначенной для производства биопрепаратов.

Материалы и методы

Объекты исследования. Объектами исследования являются пробы воды, используемые в производстве биопрепаратов. Типы проб воды, подлежащих испытанию, приведены ниже (таблица 1).

Таблица 1 – Типы испытываемых проб производственной воды

Наименование	Место отбора проб	Количество воды
Инъекционная вода	Из производственной линии	400 мл
Очищенная вода	Из производственной линии	
Водопроводная вода	Из-под крана	
Сточная вода	Производственные сточная вода	

Пробы воды, используемые для анализа микробиологических показателей, были получены в откалиброванных мерных одноразовых пробоотборниках и проверены с помощью сертифицированных измерительных оборудований.

В качестве отрицательного контроля использована проба стерильной воды, а в качестве положительного контроля для определения ростовых свойств бактериальных сред использованы штаммы из Коллекции микроорганизмов НИИПББ (шт. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, шт. *Bacillus subtilis* ATCC 6633, шт. *Candida albicans* ATCC 10231).

Отбор проб воды для бактериологического испытания.

При сборе необходимого объема воды сначала отбрасывают начальную порцию в течение примерно 1-3 минут перед отбором проб. Далее в пробоотборники собирают приблизительно 100 мл образца и покрываются алюминиевой фольгой, чтобы предотвратить любое внешнее загрязнение. Образцы обрабатываются для тестирования в течение одного часа после сбора, чтобы получить наиболее точный результат [9].

Определение стерильности методом мембранной фильтрации.

Фильтрация воды проводилась через мембранные фильтры с диаметром пор 0,45 мкм, способные эффективно задерживать микроорганизмы. Для воды используют целлюлозно-нитратные мембранные фильтры. Фильтрационную установку и мембранные фильтры стерилизуют подходящим способом. Испытуемые образцы воды переносят на мембранные фильтры. Немедленно фильтруют. После мембранный фильтр переносят в питательную среду. Посевы инкубируют в течение 5 суток при температуре от 30°C до 35°C (питательные среды, предназначенные преимущественно для выявления бактерий) и при температуре от 20°C до 25°C (питательные среды, предназначенные преимущественно для выявления грибов). Посевы просматривают периодически вовремя и по окончании инкубационного периода, отмечая наличие визуально обнаруживаемого роста микроорганизмов.

Определение бактериальных эндотоксинов (БЭ).

Определение БЭ проводилось с использованием ЛАЛ-реактива согласно ГФ РК I, т. 1, 2.6.14. ЛАЛ-тест проводят с использованием КСЭ, разведенный до заявленной чувствительности ЛАЛ-реагента, в качестве положительного стандарта. В пробирки с разведенными образцами воды добавляют по 0,1 мл ЛАЛ-реагента, и оставляют на 60 мин в водяной бане при температуре 37°C. Учет производят по истечении 60 мин, переворачиванием пробирок на 90°. Положительным результатом считается, если образуется плотный гель на дне пробирки, который не разрушается при переворачивании пробирки.

Определение водородных ионов (рН).

Определение концентрации водородных ионов (рН) проводили в трех повторностях с использованием рН-метра согласно ГФ РК I, т. 1, 2.2.3. Перед началом измерения проводят проверку готовности прибора к работе, а именно соответствие показаний прибора значениям рН контрольных буферных растворов, проводят при комнатной температуре: включение, прогрев 30 мин, промывание электродов и измерение контрольных буферов рН. Для измерения испытуемых образцов воды промывают электроды свежей дистиллированной водой, налитой в чистый стаканчик или из флакона с дозатором. Погружают электроды в испытуемые образцы, для испытания используют 20 см³ препарата из общей пробы воды, и через 30 сек отсчитывают значение рН.

Результаты

При определении стерильности испытуемых проб воды методом мембранной фильтрации были получены следующие результаты (рисунок 1, таблица 2).

Сточная вода



Сабуро



Эндо агар



МПА

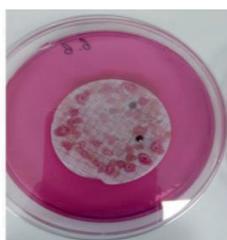


Триптон
соевый агар

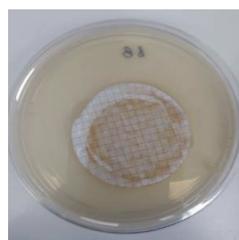
Водопроводная вода



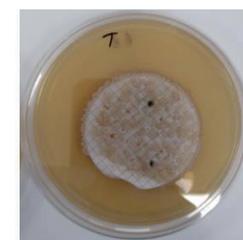
Сабуро



Эндо агар

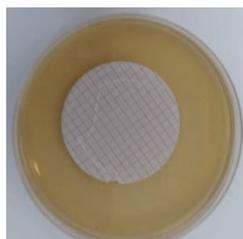


МПА



Триптон
соевый агар

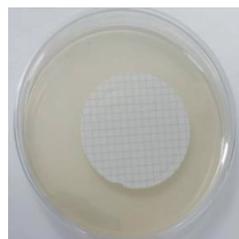
Очищенная вода



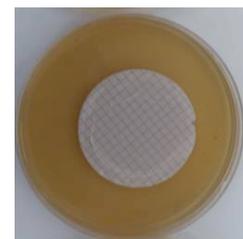
Сабуро



Эндо агар

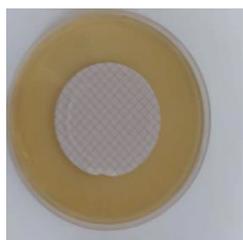


МПА



Триптон
соевый агар

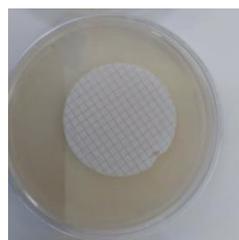
Инъекционная вода



Сабуро



Эндо агар



МПА

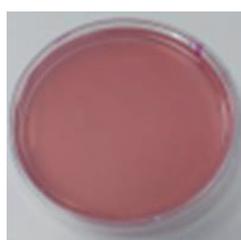


Триптон
соевый агар

Отрицательный контроль



Сабуро



Эндо агар



МПА



Триптон
соевый агар

Рисунок 1. Результаты посева испытуемых образцов воды на бактериологические питательные среды

Таблица 2 – Чувствительность испытуемых образцов воды мембранной фильтрации

Параметры инкубации	Наименование проб воды их трех чашки Петри									Отр. контроль		Полож. контроль				
	Инъекционная вода			Очищенная вода			Водопроводная вода							Сточная вода		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	1	2
МПА при 37 °С	0	0	0	0	0	0	Обильный рост			Сплошной рост			0	0	Сплошной рост	Сплошной рост
Триптон соевый агар при 37 °С	0	0	0	0	0	0	Обильный рост			Сплошной рост			0	0	Обильный рост	Обильный рост
Эндо при 37 °С агар	0	0	0	0	0	0	Обильный рост			Сплошной рост			0	0	Обильный рост	Обильный рост
Сабуро твёрдый при 22 °С	0	0	0	0	0	0	Обильный рост			Сплошной рост			0	0	Обильный рост	Обильный рост
* – Проба стерильной воды																

На рисунке 1 и в таблице 2, представлены результаты посева испытуемых образцов на бактериологические питательные среды методом мембранной фильтрации. Анализируя полученные данные, можно сделать следующие выводы:

- при испытании образцов сточной воды наблюдается сплошной рост колонии, что свидетельствует о наличии большого количества сапрофитной микрофлоры;
- при испытании образцов водопроводной воды наблюдается обильный рост колонии, что также подтверждает наличие накопления сапрофитной микрофлоры;
- при испытании образцов очищенной и инъекционных вод рост колонии на всех бактериальных питательных средах не наблюдается, что доказывает чистоту анализируемых проб воды, используемые в производственной линии.

Следующим этапом исследовании микробиологического анализа проб воды был контроль безопасности с помощью определения количественного содержания БЭ. Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Содержание БЭ в испытуемых пробах воды

Название испытуемых проб	Разведение исследуемого образца на ЛАЛ-воде						Предельно допустимая концентрация	Результаты ЛАЛ-тест
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	МДР		
Инъекционная вода	++	--	--	--	--	-	0,25 МЕ/мл	0,15 МЕ/мл
	++	--	--	--	--	-		
Очищенная вода	++	--	--	--	--	-	0,25 МЕ/мл	0,15 МЕ/мл
	++	--	--	--	--	-		
Сточная вода	++	++	++	++	++	+	5-50 МЕ/мл	15 МЕ/мл
	++	++	++	++	++	+		
Водопроводная вода	++	++	++	++	++	+	5-50 МЕ/мл	1,5 МЕ/мл
	++	++	++	++	++	+		
Отрицательный контроль	--	--	--	--	--	-	--	<0,0015 МЕ/мл
Положительный контроль	++	++	++	++	++	+	++	>100 МЕ/мл
Примечания: «-» – рост микроорганизмов отсутствует – стерильно; «+» – рост микроорганизмов присутствует – не стерильно; МДР – максимально допустимое разведение (не более 100 МЕ/мл); Чувствительность ЛАЛ-реактива составляет 0,0015 МЕ/мл в соответствии со КСЭ стандартом набора.								

В результате проведенных работ по определению содержания БЭ (таблица 3) установлено, что в испытуемых образцах воды содержание БЭ не превышает предельно допустимые концентрации, согласно ГФ РК. В образцах очищенной и инъекционной воды концентрация БЭ составляет 0,15 МЕ/мл, тогда как концентрация БЭ в образцах сточной воды составляет 15 МЕ/мл, а в водопроводной воде 1,5 МЕ/мл, что также не превышает норму в соответствии с ГФ РК.

Так как pH воды является важным параметром качества воды, исследуемые пробы были изучены на показатель водородных ионов (pH) в трехкратной повторности. Результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Показатели водородных ионов (pH) испытуемых проб воды

Наименование	pH	Среднее значение	Неопределённость
Инъекционная вода	7,16	7,16	±0,0002176
	7,18		
	7,15		
Очищенная вода	6,85	6,84	±0,0002276
	6,82		
	6,87		
Водопроводная вода	7,94	7,93	±0,0001965
	7,92		
	7,93		
Сточная вода	7,35	7,03	±0,0002231
	7,39		
	6,37		

Изучение показателей водородных ионов в испытуемых пробах показали следующие результаты: инъекционная вода – 7,16; очищенная вода – 6,84; водопроводная вода – 7,93; сточная вода – 7,03. Все полученные показатели не превышают норму и соответствуют требованиям ГФ РК.

Обсуждение

Одним из главных требований к создаваемым новым вакцинам является их безопасность в применении, в том числе их стерильность, показатель водородных ионов и количество БЭ, и это напрямую связано с качеством воды, используемой в производственной линии.

В данной работе для определения стерильности использовался метод мембранной фильтрации. В результате установлено, что пробы очищенной и инъекционной воды свободны от посторонней микрофлоры, роста колонии не наблюдалось в течении 5-7 суток. По литературным данным известно, что общее число аэробных микроорганизмов (бактерий и грибов) в пробах очищенной и инъекционной воды должна составлять не более 10 колонии в 100 мл. Не допускается наличие *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* в 100 мл [10]. Полученные результаты в данной работе показывают высокую чистоту и стерильность проб очищенной и инъекционной воды, используемых в производственной линии.

В пробах водопроводной и сточной воды наблюдается обильный рост колонии в бактериальных питательных средах, что подтверждает наличие посторонних микроорганизмов, а пробы очищенной и инъекционной воды показали отрицательный результат, что свидетельствует об их пригодности для фармацевтического производства.

Также одним из ключевых параметров оценки чистоты воды используемых в производстве иммунобиологических параметров, является содержания БЭ, определение которого проводится методом ЛАЛ-тест. Согласно литературным данным предельно допустимая концентрация БЭ составляет 0,25 ЕЭ/мл [11].

Экспериментально было показано, что количество БЭ в испытуемых образцах воды не превышает предельно допустимые концентрации, согласно ГФ РК. В образцах очищенной и инъекционной воды концентрация БЭ составляет 0,15 МЕ/мл, тогда как концентрация БЭ в образцах сточной воды составляет 15 МЕ/мл, а в пробе водопроводной воды 1,5 МЕ/мл, что также не превышает норму.

В результате работ по определению концентрации водородных ионов в испытуемых пробах, были получены следующие результаты: инъекционная вода – 7,16; очищенная вода – 6,84; водопроводная вода – 7,93; сточная вода – 7,03. Все полученные показатели не превышают норму и соответствуют требованиям ГФ РК I, т. 1, 2.2.3.

Заключение

Контроль чистоты очищенной и инъекционной воды направлен на обеспечение стабильного микробиологического качества воды. Для производителя фармацевтической продукции получение и хранение очищенной и инъекционной воды обеспечивает постоянный контроль и мониторинг общего количества жизнеспособных аэробных микроорганизмов. По результатам данной статьи, содержание БЭ и водородных ионов (рН) и стерильности испытуемых проб не превышают норму и соответствуют требуемым нормам и показателям ГФ РК.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о соответствии микробиологических показателей испытуемых проб воды нормам и требованиям ГФ РК. Регулярный мониторинг качества фармацевтической и производственной воды для контроля уровня микробного загрязнения играет важную роль для первичной профилактики заболеваний, связанных с водой.

Финансирование: Работа выполнена в рамках программы целевого финансирования, код №О.0927, регистрационный номер 67419/ПЦФ-МОН РК-ОТ-21 комитетом науки Министерства образования и науки Республики Казахстан.

Благодарности: Авторы выражают благодарность Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности (НИИПББ) МЗ РК за проведение настоящего исследования. Данный раздел включает обобщение и подведение итогов работы на текущем этапе. Выводы должны быть точными и использоваться для обобщения результатов исследований в конкретных научных областях с описанием предложений или возможностей дальнейшей работы.

Конфликт интересов: Авторы не имеют потенциальных конфликта интересов.

Литература

- 1 Aulicino F.A., Marranzano M., Mauro L. Surface water pollution and microbiological indicators // Ann Ist Super Sanita. – 2005. – V. 41(3). – P. 359-70. PMID: 16552127.
- 2 Kolpin D.W., Furlong E.T., Meyer M.T., Thurman E.M., Zaugg S.D., Barber L.B. Buxton H.T. Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in US // Environmental Science and Technology. – 2002. – V. 36. – P. 1202-1211. <http://dx.doi.org/10.1021/es011055j>.
- 3 Sandle T. An approach for the reporting of microbiological results from water systems // PDA J Pharm Sci. Technol. – 2004. – V. 58(4). – P. 231-237.
- 4 Jimenez L. (Ed.). (2004). Microbial Contamination Control in the Pharmaceutical Industry (1st ed.) // CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780203026267>.

- 5 Traeger H. Pharmaceuticals, The Presence of Bacteria, Endotoxins, and Biofilms in Pharmaceutical Water, Ultrapure Water // International Journal of Veterinary Sciences and Animal Husbandry. – 2018. – V. 3(4). – P. 24-29. doi: 10.1016/j.biologicals.2020.07.001
- 6 Abdul M.M., Qunxing X.D., Kelly G.P., Erin N.H., Andrew J. Direct injection analysis of per and polyfluoroalkyl substances in surface and drinking water by sample filtration and liquid chromatography-tandem mass spectrometry // J Chromatogr A. – 2021. – V. 1653:462426.
- 7 Marine M., Frédéric V., Thierry B. Comparison of bacterial endotoxin testing methods in purified pharmaceutical water matrices // J Biologicals. – 2020. – V. 67. P. 49-55.
- 8 European medicines agency. Guideline on the quality of water for pharmaceutical use // 2019. P. 10
- 9 Dang T.H., Vu T.C., Vu T.B., Dao T.T., Nguyen T.H., Nguyen P.T., Do T.T., Ta M.H., Chu M.L., Nguyen V.L. Evaluation of Drinking Water Quality in Schools in a District Area in Hanoi, Vietnam // Environ Health Insights. – 2020. – V. 14:1178630220959672. doi: 10.1177/1178630220959672.
- 10 Mottaleb M.A., Ding Q.X., Pennell K.G., Haynes E.N., Morris A.J. Direct injection analysis of per and polyfluoroalkyl substances in surface and drinking water by sample filtration and liquid chromatography-tandem mass spectrometry // J Chromatogr A. Epub. – 2021. – V. 1653. doi: 10.1016/j.chroma.2021.462426.
- 11 Luis A.B., Manmohan S. Acceptable levels of endotoxin in vaccine formulations during preclinical research // J Pharm Sci. – 2011. – V. 100(1). – P. 34-37. doi: 10.1002/jps.22267.

References

- 1 Aulicino F.A., Marranzano M., Mauro L. Surface water pollution and microbiological indicators // Ann Ist Super Sanita. – 2005. – V. 41(3). – P. 359-70. PMID: 16552127.
- 2 Kolpin D.W., Furlong E.T., Meyer M.T., Thurman E.M., Zaugg S.D., Barber L.B. Buxton H.T. Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in US // Environmental Science and Technology. – 2002. – V. 36. – P. 1202-1211. <http://dx.doi.org/10.1021/es011055j>.
- 3 Sandle T. An approach for the reporting of microbiological results from water systems // PDA J Pharm Sci. Technol. – 2004. – V. 58(4). – P. 231-237.
- 4 Jimenez L. (Ed.). (2004). Microbial Contamination Control in the Pharmaceutical Industry (1st ed.) // CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780203026267>.
- 5 Traeger H. Pharmaceuticals, The Presence of Bacteria, Endotoxins, and Biofilms in Pharmaceutical Water, Ultrapure Water // International Journal of Veterinary Sciences and Animal Husbandry. – 2018. – V. 3(4). – P. 24-29. doi: 10.1016/j.biologicals.2020.07.001
- 6 Abdul M.M., Qunxing X.D., Kelly G.P., Erin N.H., Andrew J. Direct injection analysis of per and polyfluoroalkyl substances in surface and drinking water by sample filtration and liquid chromatography-tandem mass spectrometry // J Chromatogr A. – 2021. – V. 1653:462426.
- 7 Marine M., Frédéric V., Thierry B. Comparison of bacterial endotoxin testing methods in purified pharmaceutical water matrices // J Biologicals. – 2020. – V. 67. P. 49-55.
- 8 European medicines agency. Guideline on the quality of water for pharmaceutical use // 2019. P. 10
- 9 Dang T.H., Vu T.C., Vu T.B., Dao T.T., Nguyen T.H., Nguyen P.T., Do T.T., Ta M.H., Chu M.L., Nguyen V.L. Evaluation of Drinking Water Quality in Schools in a District Area in Hanoi, Vietnam // Environ Health Insights. – 2020. – V. 14:1178630220959672. doi: 10.1177/1178630220959672.
- 10 Mottaleb M.A., Ding Q.X., Pennell K.G., Haynes E.N., Morris A.J. Direct injection analysis of per and polyfluoroalkyl substances in surface and drinking water by sample filtration and liquid chromatography-tandem mass spectrometry // J Chromatogr A. Epub. – 2021. – V. 1653. doi: 10.1016/j.chroma.2021.462426.
- 11 Luis A.B., Manmohan S. Acceptable levels of endotoxin in vaccine formulations during preclinical research // J Pharm Sci. – 2011. – V. 100(1). – P. 34-37. doi: 10.1002/jps.22267.

БИОПРЕПАРАТТАР ӨНДІРУ ҮШІН СУ САПАСЫН МИКРОБИОЛОГИЯЛЫҚ БАҚЫЛАУ

Э.Ж.Калимолда ^{ID}*, С.О. Садикалиева ^{ID}, С.У. Молдагулова ^{ID},
Ж.С. Абсатова ^{ID}, З.Ж. Ершебулов ^{ID}, К.А. Шораева ^{ID}

«Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты» ДМ ҚР,
Гвардейск құк.

Аннотация: Жасалатын жаңа вакциналарға қойылатын басты талаптардың бірі олардың қолданудағы қауіпсіздігі, оның ішінде олардың стерильділігі, сутегі иондарының көрсеткіші және сапасы мен қауіпсіздігінің негізгі көрсеткіштерінің бірі болып табылатын бактериялық эндотоксиндердің (БЭ) болуы болып табылады. Осы параметрлердің ҚР МФ нормаларына сәйкестігі өндірістік желіде пайдаланылатын судың сапасына тікелей байланысты. Бұл мақалада стерильділік, бактериялық эндотоксиндердің құрамы және сутегі иондарының көрсеткіші сияқты биологиялық өнімдер қауіпсіздігінің негізгі параметрлерінің бірін анықтау бойынша жұмыстардың нәтижелері келтірілген.

Биологиялық өнімнің стерильділігі сүзу әдісімен анықталды, содан кейін нақты бактериялық қоректік ортаға себілді. Нәтижесінде тазартылған және инъекциялық судың сынамалары бөгде микрофлорадан бос екендігі анықталды, колонияның өсуі 5-7 күн ішінде байқалмады. Ағынды сулар мен ағынды сулардың сынамаларында бактериялық қоректік ортада колонияның мол өсуі байқалады, бұл сопрофитті микроорганизмдердің болуын растайды. Бактериялық эндотоксиндерді анықтау үшін ЛАЛ-тест қолданылды. БЭ құрамын анықтау бойынша жүргізілген жұмыстардың нәтижесінде тазартылған және инъекциялық су үлгілерінде БЭ концентрациясы 0,15 ХБ/мл, ал бэ концентрациясы ағынды су үлгілерінде 15 ХБ/мл, ал ағын суында 1,5 ХБ/мл құрайды, бұл да нормадан аспайды. РН сыналатын сынамаларындағы сутегі иондарының көрсеткіштерін зерделеу кезінде инъекциялық судың көрсеткіші – 7,16, тазартылған судың көрсеткіші – 6,84, су құбыры суының көрсеткіші – 7,93, сарқынды судың көрсеткіші – 7,03. Алынған көрсеткіштер сыналатын су сынамаларының микробиологиялық көрсеткіштерінің ҚР МФ нормалары мен талаптарына сәйкестігін куәландырады.

Түйінді сөздер: микробиологиялық бақылау; стерильділік; мембраналық сүзу; бактериялық эндотоксиндер; сутегі иондарының көрсеткіші.

MICROBIOLOGICAL CONTROL OF WATER QUALITY FOR THE PRODUCTION OF BIOLOGICAL PRODUCTS

№10
2022

E.Zh. Kalimolda ^{ID}*, S.O. Sadikaliyeva ^{ID}, S.U. Moldagulova ^{ID},
Zh.S. Absatova ^{ID}, Z.Zh.Yershebulov ^{ID}, K.A. Shorayeva ^{ID}

«Research Institute for Biological Safety Problems», MH RK, Gvardeyskiy uts

Abstract: One of the main requirements for the new vaccines being created is their safety in use, including their sterility, the index of hydrogen ions and the content of bacterial endotoxins (BE), which are among the main indicators of quality and safety. Compliance of these parameters to the standards of the GF RK is directly related to the quality of water used in the production line. This article presents the results of work on determining one of the

main safety parameters of biological products, such as sterility, bacterial endotoxin content and hydrogen ion index.

The sterility of the biological product was determined by filtration with subsequent inoculation on specific bacterial culture media. As a result, it was found that the samples of purified and injected water are free of extraneous microflora, colony growth was not observed for 5-7 days. Abundant colony growth on bacterial nutrient media is observed in tap and wastewater samples, which confirms the presence of coprophytic microorganisms. A LAL test was used to determine bacterial endotoxins. As a result of the work carried out to determine the content of BE, it was found that in samples of purified and injection water, the concentration of BE is 0.15 IU/ml, while the concentration of BE in wastewater samples is 15 IU/ml, and in tap water 1.5 IU/ml, which also does not exceed the norm. When studying the indicators of hydrogen ions in the tested samples, the pH value of injection water is 7.16, purified water – 6.84, tap water – 7.93, wastewater - 7.03. The obtained indicators indicate that the microbiological parameters of the tested water samples comply with the norms and requirements of the GF RK.

Keywords: microbiological control; sterility; membrane filtration; bacterial endotoxins; hydrogen ion index.

ТРЕБОВАНИЯ К НАУЧНЫМ СТАТЬЯМ ДЛЯ ПУБЛИКАЦИИ В ЖУРНАЛЕ

Правила для авторов

Научный журнал «Биобезопасность и Биотехнология» принимает к публикации оригинальные исследовательские статьи, краткие сообщения и обзоры по следующим направлениям науки:

- Биологическая безопасность и биологическая защита
- Эпидемиология и эпизоотология, микробиология, вирусология, иммунология и микология.
- Ветеринарная биотехнология
- Медицинская биотехнология
- Фитопатология и биотехнология растений
- Молекулярная генетика

КАК ПОДГОТОВИТЬ СТАТЬЮ В ЖУРНАЛ

1. Требования к рукописям, направляемым в журнал

Текст должен быть набран в редакторе Microsoft Word, шрифт Times New Roman, размер 12, интервал одинарный, все поля 2 см, абзацный отступ 1 см. Все страницы и строки должны быть пронумерованы и иметь сквозную нумерацию. Выравнивание – по ширине (с автоматической расстановкой переносов).

Объем статей должен составлять 10-15 печатных страниц для оригинальных статей, 15-25 печатных страниц для обзоров, до 5 печатных страниц для кратких сообщений.

Авторы также должны представить каждое изображение в отдельном файле в оригинальном размере (не менее 300 dpi).

2. Язык статьи

К публикации в журнале принимаются рукописи из любых стран на казахском, русском и/или английском языках. Метаданные статьи (название статьи, Ф.И.О. авторов, официальное название учреждений авторов, адреса, резюме статьи, ключевые слова, информация для контакта с ответственным автором) должны быть представлены на трех языках.

Метаданные статьи на другом языке (если статья написана на казахском, то на русском языке или же наоборот) и на английском языке приводят в конце статьи после списка использованной литературы.

Для статей на казахском и русском языках пристатейный список литературы (References) должен быть дополнительно представлен в транслитерированном виде – см. пункт 4).

В случае, если авторы не предоставили метаданные статьи на языках, отличающихся от языка написания статьи или перевод некачественный, то редакция прибегает к услугам переводчика самостоятельно (право выбора переводчика остается за редакцией).

3. Титульный лист (метаданные статьи).

Титульный лист должен включать следующую информацию:

1) код МРНТИ (Международный рубрикатор научно-технической информации; определяется по ссылке <http://grnti.ru/>)

2) название статьи (лаконично и информативно. Заголовки часто используются в информационно-поисковых системах. По возможности избегайте сокращений и формул)

3) инициалы и фамилии авторов (пожалуйста, четко фамилии (имена) каждого автора и проверьте правильность написания всех имен)

4) организация и ее местонахождение для каждого автора (все аффилиации нумеруются надстрочной арабскими цифрами сразу после имени автора и перед соответствующим адресом; укажите адрес каждой организации, включая название населенного пункта и страны), и, если возможно, адрес электронной почты каждого автора. Если все авторы статьи работают в одном учреждении, указывать место работы каждого автора отдельно не нужно, достаточно указать учреждение один раз. Если у автора несколько мест работы, каждое обозначается отдельным цифровым индексом.

5) контактная информация (адрес электронной почты) автора для корреспонденции: (поставьте знак «*» сразу после индекса аффилиации автора для корреспонденции и перед контактной информацией). Если авторов для корреспонденции несколько, укажите инициалы рядом с каждым адресом.

6) при наличии указать для авторов ID номера ORCID с использованием гиперссылки в значке 

7) аннотация (один абзац не более 300 слов, при этом не менее 150 слов). В аннотации должны быть кратко изложены цель исследования, основные результаты и основные выводы. Аннотация часто представляется отдельно от статьи. В связи с этим следует избегать ссылок, нестандартных или необычных сокращений, но, если они необходимы, они должны быть определены при их первом упоминании в самом реферате. Аннотация должна быть объективным изложением статьи, не должна содержать результатов, не представленных и не обоснованных в основном тексте, и не должна преувеличивать основные выводы.

8) ключевые слова (5-10 слов или словосочетаний, должны отражать основное содержание статьи; определить предметную область исследования. Каждое ключевое слово отделяется точкой с запятой).

4. План построения оригинальных статей

Структура оригинальных статей должна соответствовать формату IMRAD (Introduction, Methods, Results, Discussion, Conclusion) и содержать разделы ВВЕДЕНИЕ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ, РЕЗУЛЬТАТЫ, ОБСУЖДЕНИЕ, ЗАКЛЮЧЕНИЕ. В конце статьи размещают информацию о финансовой поддержке работы, гранты, благодарности; указание на конфликт интересов; список цитированной литературы. Оригинальная статья оформляется в соответствии ШАБЛОНА, предложенного редколлекцией журнала journal.biosafety.kz.

Во введении следует изложить текущее состояние области исследований и процитировать основные публикации, обосновать актуальность и значимость проводимых исследований. Необходимо кратко указать цель работы. Насколько это возможно, сделайте введение понятным для ученых, не занимающихся вашей конкретной областью исследований. Ссылки должны быть пронумерованы в порядке их появления и обозначены цифрой или цифрами в квадратных скобках, например, [1] или [2,3], или [4–6]. Дополнительные сведения о ссылках см. в конце документа.

Материалы и методы должны быть описаны достаточно подробно, чтобы другие могли воспроизвести и использовать опубликованные результаты. Новые методы и протоколы должны быть описаны подробно, в то время как хорошо зарекомендовавшие себя методы могут быть кратко описаны и надлежащим образом процитированы.

Исследования с участием животных или людей, а также другие исследования, требующие этического одобрения, должны указывать орган, предоставивший одобрение, и соответствующий кодекс этического одобрения.

Раздел «Результаты» должен содержать точное описание экспериментальных результатов, их интерпретацию, а также экспериментальные выводы, которые можно сделать. При необходимости этот раздел может быть разделен на подразделы.

В разделе «Обсуждение» авторы должны обсудить полученные результаты и то, как их можно интерпретировать с точки зрения предыдущих исследований и рабочих гипотез. В обсуждении можно привести возможные объяснения сходства и противоречий с другими аналогичными исследованиями. В максимально широком контексте следует обсудить выводы и их значение. Также в данном разделе могут быть выделены будущие направления исследований.

Раздел «Заключение» включает обобщение и подведение итогов работы на текущем этапе. Выводы должны быть точными и использоваться для обобщения результатов исследований в конкретных научных областях с описанием предложений или возможностей дальнейшей работы.

Финансирование: Укажите источник финансирования исследований (название финансирующей организации, номер гранта). Внимательно проверьте правильность приведенных данных и используйте стандартное написание названий финансирующих организаций.

Благодарности: В этом разделе вы можете отметить любую оказанную поддержку. Это может включать административную и техническую поддержку или предоставление материалов для экспериментов.

Конфликт интересов: Все авторы должны раскрывать информацию о любых финансовых и личных отношениях с другими людьми или организациями, которые могут ненадлежащим образом повлиять (предвзято) на их работу. Примеры потенциальных конфликтов интересов включают занятость, консультации, владение акциями, гонорары, платные экспертные заключения, патентные заявки/регистрации, а также гранты или другое финансирование. Если нет никаких конфликтов к опубликованию материалов в статье, указать, что авторы не имеют конфликта интересов.

В разделе «Литература» следует привести список цитированной литературы, оформленный согласно ГОСТ 7.1-2003 «Библиографическая запись. Библиографическое описание. Общие требования и правила составления» (требование к изданиям, входящих в перечень КОКСОН). Список литературы должен быть пронумерован в порядке упоминания в тексте (включая цитаты в таблицах и легендах). Включите цифровой идентификатор объекта (DOI) для всех ссылок, где они доступны. В тексте ссылки должны быть заключены в квадратные скобки [...] и поставлены перед знаками препинания; например [1], [1-3] или [1,3].

Примеры оформления ссылок:

Статья в периодическом издании (журнале)

Aspden K., Passmore J.A., Tiedt F., Williamson A.L. Evaluation of lumpy skin disease virus, a capripoxvirus, as a replication-deficient vaccine vector // J. Gen. Virol. – 2003. – Vol. 84 (Pt 8). – P. 1985-1996. doi: ... (при наличии)

Гуненков В.В., Черняк В.П., Кузнецов Г.Д. Сухая живая вакцина против оспы овец из штамма С113/86 // Ветеринария. – 1993. – № 11/12. – С. 23-24.

Книги

Зайцев В.Л. Морфогенез вируса оспы овец в культуре клеток / В.Л. Зайцев, Н.Т. Сандыбаев, К.Т. Султанкулова, В.Ю. Белоусов, О.В. Червякова, В.М. Строчков // Вирус оспы овец: молекулярно-биологические свойства и структура генома. – Алматы, 2011. – С. 73-84. ISBN 978-601-278-599-9

Материалы конференций

Султанкулова К.Т. Токсико-биологическая оценка гриба *Histoplasma farciminosum* – возбудителя эпизоотического лимфангоита лошадей // Ветеринарные и зоотехнические вопросы коневодства: первая науч.-практ. конф. - Алматы, 2003. – С. 26-29

Сансызбай А.Р. Эпизоотическая ситуация лимфангита лошадей, вызванного *Histoplasma farciminosum*, в коневодческих хозяйствах Республики Казахстан // Современное состояние

и актуальные проблемы развития ветеринарной науки и практики: науч.-практ. конф. – Алматы, 2005. – С. 234-237.

Интернет-источники

Вспышка оспы овец на территории Российской Федерации в Ярославской области [Электрон.ресурс]. – URL: <http://www.fsvps.ru/fsvps/news/18142.html> (дата обращения 3 сентября 2016 г).

Далее приводится транслитерированный список использованных источников в разделе REFERENCES. При этом англоязычные источники дублируются из раздела ЛИТЕРАТУРА, казахскоязычные и русскоязычные ссылки должны быть приведены к латинскому алфавиту (латинице) и английскому переводу. Ссылка должна дополнительно содержать DOI (идентификатор цифрового объекта), если таковой имеется. Транслитерация осуществляется с использованием онлайн-платформы <http://translit-online.ru/>. Эта онлайн-платформа не транслитерирует отдельные буквы казахского алфавита. Авторы должны самостоятельно вносить исправления после транслитерации казахского текста.

Транслитерированный список литературы должен выглядеть в следующем виде для источников на кириллице: автор(-ы) (транслитерация) → (год в круглых скобках) → название статьи в транслитерированном варианте [перевод названия статьи на английский язык в квадратных скобках], название русскоязычного источника (транслитерация, либо английское название – если есть), выходные данные с обозначениями на английском языке.

Например: Gokhberg L., Kuznetsova T. (2011) Strategiya-2020: novye kontury rossiiskoi innovatsionnoi politiki [Strategy 2020: New Outlines of Innovation Policy]. *Foresight-Russia*, vol. 5, no 4, pp. 8–30.

5. Оформление обзоров и кратких сообщений

Обзорные статьи должны включать в себя введение, разделы обзора литературы и заключение. Файл шаблона также можно использовать для подготовки первой и заключительной частей обзорной рукописи. Основная часть может содержать разделы и подразделы. Обзоры публикуются по заказу редакции или по инициативе автора.

Краткое сообщение представляет краткий формат информации логически завершеного научного исследования в объёме до 5 страниц, включающее не более 2 рисунков/таблиц/графиков и до 10 ссылок.

6. Особенности оформления таблиц, рисунков

Таблицы должны быть созданы в формате таблицы Microsoft Word. Таблицы должны быть пронумерованы и в тексте должны быть ссылки на каждую таблицу. Заголовок таблицы расположен по центру над таблицей, пояснительные сноски (обозначенные строчными надстрочными буквами) расположены под таблицей. Таблицы не должны дублировать информацию, представленную в тексте.

Все рисунки (фотографии, диаграммы, графики и схемы) должны быть пронумерованы арабскими цифрами (1, 2, ...). Надписи и символы должны быть четко определены либо в подписи, либо в легенде, являющейся частью рисунка.

КАК ПОДАТЬ СТАТЬЮ НА РАССМОТРЕНИЕ

Рукопись статьи направляется в редакцию через форму на сайте журнала journal.biosafety.kz

Загружаемый в систему файл со статьей должен быть представлен в формате Microsoft Word (иметь расширение *.doc или *.docx). Сопроводительное письмо с оригинальными подписями должно быть представлено в формате PDF. Сопроводительное письмо должно

быть кратким с указанием соответствия рукописи тематике журнала. Сопроводительное письмо должно содержать утверждения, что ни рукопись, ни какие-либо части ее содержания в настоящее время не находятся на рассмотрении или опубликованы в другом журнале. Все авторы должны одобрить рукопись и согласиться с ее подачей в журнал.

Перед отправкой рукописи убедитесь, что:

- Рукопись проверена на орфографию и грамматику
- Все ссылки, упомянутые в списке литературы, цитируются в тексте, и наоборот
- Получено разрешение на использование материалов, защищенных авторским правом, из других источников (включая Интернет)
- Правила журнала, подробно описанные в этом руководстве, были изучены
- Убедитесь, что все ссылки на рисунки и таблицы в тексте соответствуют предоставленным файлам

7. К сведению авторов

К статье прилагаются:

- сопроводительное письмо (для сторонних организаций).
- сведения об авторах: фамилия, имя и отчество (полностью), ученая степень, должность, место работы, контактные телефоны, адрес для переписки (e-mail).

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

Вид рецензирования – двойное «слепое» рецензирование, то есть и автор, и рецензент остаются анонимными. Рукопись направляется на отзыв члену редколлегии и рецензенту; в спорных случаях по усмотрению редколлегии привлекаются дополнительные рецензенты; на основании экспертных заключений редколлегия определяет дальнейшую судьбу рукописи: принятие к публикации в представленном виде, необходимость доработки или отклонение. В случае необходимости рукопись направляется авторам на доработку по замечаниям рецензентов и редакторов, после чего она повторно рецензируется, и редколлегия вновь решает вопрос о приемлемости рукописи для публикации. Переработанная рукопись должна быть возвращена в редакцию в течение месяца после получения авторами отзывов; в противном случае рукопись рассматривается как вновь поступившая. Рукопись, получившая недостаточно высокие оценки при рецензировании, отклоняется как не соответствующая уровню или профилю публикаций журнала.

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

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

Наш адрес:

080409, Жамбылская область, Кордайский район, пгт. Гвардейский, ул. Момышулы 15
РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» МЗ РК
Учебный научно-образовательный центр (УНОЦ), тел. (726-36) 7-22-28.

E-mail: unots@biosafety.kz

Публикация в журнале для авторов **бесплатна**.

НАЗВАНИЕ

Имя Фамилия¹ , Имя Фамилия² , Имя Фамилия² *;

¹ Место работы 1; e-mail автора

² Место работы 2; e-mail автора

* Автор корреспондент: e-mail (если авторов-корреспондентов несколько, добавьте инициалы авторов)

Аннотация: один абзац не более 300 слов, при этом не менее 150 слов. В аннотации должны быть кратко изложены цель исследования, основные результаты и основные выводы. Аннотация часто представляется отдельно от статьи. В связи с этим следует избегать ссылок, нестандартных или необычных сокращений, но, если они необходимы, они должны быть определены при их первом упоминании в самом реферате. Аннотация должна быть объективным изложением статьи, не должна содержать результатов, не представленных и не обоснованных в основном тексте, и не должна преувеличивать основные выводы.

Ключевые слова: ключевое слово 1; ключевое слово 2; ключевое слово 3 (5-10 слов или словосочетаний, должны отражать основное содержание статьи; определить предметную область исследования. Каждое ключевое слово отделяется точкой с запятой)

Как использовать данный шаблон

В шаблоне подробно описаны разделы, которые должны быть использованы рукописи. Обратите внимание, что у каждого раздела есть соответствующий стиль, который можно найти в меню «Стили» Word. Разделы, которые не являются обязательными, перечислены как таковые. Названия разделов даны для оригинальных статей. Обзорные статьи и другие типы статей имеют более гибкую структуру.

Удалите этот абзац и начните с раздела «Введение». По всем вопросам обращайтесь в редакцию журнала по адресу unots@biosafety.kz.

Введение

Во введении следует изложить текущее состояние области исследований и процитировать основные публикации, обосновать актуальность и значимость проводимых исследований. Необходимо кратко указать цель работы. Насколько это возможно, сделайте введение понятным для ученых, не занимающихся вашей конкретной областью исследований. Ссылки должны быть пронумерованы в порядке их появления и обозначены цифрой или цифрами в квадратных скобках, например, [1] или [2,3], или [4–6].

Материалы и методы

Данный раздел должен быть описан достаточно подробно, чтобы другие могли воспроизвести и использовать опубликованные результаты. Новые методы и протоколы должны быть описаны подробно, в то время как хорошо зарекомендовавшие себя методы могут быть кратко описаны и надлежащим образом процитированы, например, [1] или [2,3], или [4–6].

Исследования с участием животных или людей, а также другие исследования, требующие этического одобрения, должны указывать орган, предоставивший одобрение, и соответствующий кодекс этического одобрения.

При необходимости этот раздел может быть разделен на подразделы.

Подраздел

Результаты

Данный раздел должен содержать краткое и точное описание экспериментальных результатов, их интерпретацию, а также экспериментальные выводы, которые можно сделать. При необходимости этот раздел может быть разделен на подразделы.

Подраздел

Таблицы и рисунки

Таблицы и рисунки должны быть пронумерованы и в тексте на них должны быть ссылки. Например, Таблица 1, Рисунок 1 и т.п.

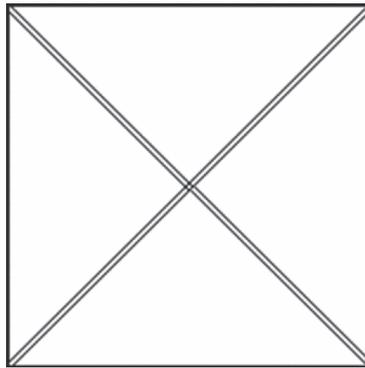


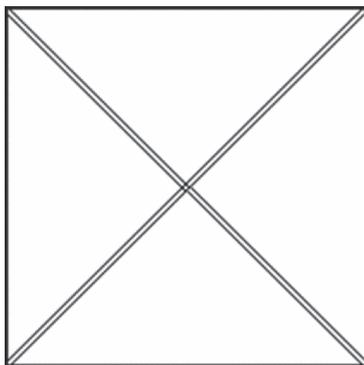
Рисунок 1 – Это рисунок. Схемы имеют такое же форматирование

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

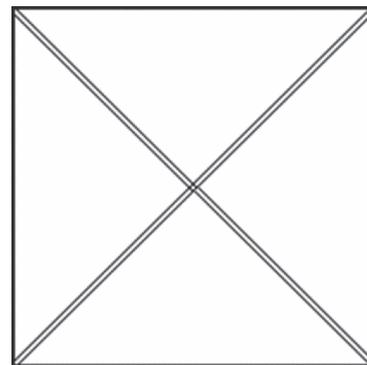
Заголовок 1	Заголовок 2	Заголовок 3
вводные 1	данные	данные
вводные 2	данные	данные ¹

¹ Примечания к данным таблицы разместить под таблицей.

Продолжить текст раздела (Рисунок 2).



(а)



(б)

Если имеется несколько панелей, они должны быть перечислены следующим образом:

- (а) описание того, что содержится в первой панели;
- (б) Описание того, что содержится во второй панели

Рисунок 2 – Это рисунок. Рисунки следует размещать в основном тексте рядом с местом первого упоминания

Обсуждение

Авторы должны обсудить полученные результаты и то, как их можно интерпретировать с точки зрения предыдущих исследований и рабочих гипотез. В обсуждении можно привести возможные объяснения сходства и противоречий с другими аналогичными исследованиями. В максимально широком контексте следует обсудить выводы и их значение. Также в данном разделе могут быть выделены будущие направления исследований.

Заключение

Данный раздел включает обобщение и подведение итогов работы на текущем этапе. Выводы должны быть точными и использоваться для обобщения результатов исследований в конкретных научных областях с описанием предложений или возможностей дальнейшей работы.

Финансирование: Укажите источник финансирования исследований (название финансирующей организации, номер гранта). Внимательно проверьте правильность приведенных данных и используйте стандартное написание названий финансирующих организаций.

Благодарности: В этом разделе вы можете отметить любую оказанную поддержку. Это может включать административную и техническую поддержку или предоставление материалов для экспериментов.

Конфликт интересов: Все авторы должны раскрывать информацию о любых финансовых и личных отношениях с другими людьми или организациями, которые могут ненадлежащим образом повлиять (предвзято) на их работу. Примеры потенциальных конфликтов интересов включают занятость, консультации, владение акциями, гонорары, платные экспертные заключения, патентные заявки/регистрации, а также гранты или другое финансирование. Если нет никаких конфликтов к опубликованию материалов в статье, указать, что авторы не имеют конфликта интересов.

Литература

В данном разделе следует привести список цитированной литературы оформленный согласно ГОСТ 7.1-2003 «Библиографическая запись. Библиографическое описание. Общие требования и правила составления» (требование к изданиям, входящих в перечень КОКСОН). Список литературы должен быть пронумерован в порядке упоминания в тексте (включая цитаты в таблицах и легендах). Включите цифровой идентификатор объекта (DOI) для всех ссылок, где они доступны. В тексте ссылки должны быть заключены в квадратные скобки [...] и поставлены перед знаками препинания; например [1], [1–3] или [1,3].

- 1 Aspden K., Passmore J.A., Tiedt F., Williamson A.L. Evaluation of lumpy skin disease virus, a capripoxvirus, as a replication-deficient vaccine vector // J. Gen. Virol. – 2003. – Vol. 84 (Pt 8). – P. 1985-1996. doi: ... (при наличии)
- 2 Гуненков В.В., Черняк В.П., Кузнецов Г.Д. Сухая живая вакцина против оспы овец из штамма С113/86 // Ветеринария. – 1993. – № 11/12. – С. 23-24.
- 3 Зайцев В.Л. Морфогенез вируса оспы овец в культуре клеток /В.Л. Зайцев, Н.Т. Сандыбаев, К.Т. Султанкулова, В.Ю. Белоусов, О.В. Червякова, В.М. Строчков // Вирус оспы овец: молекулярно-биологические свойства и структура генома. – Алматы, 2011. – С.73-84. ISBN 978-601-278-599-9
- 4 Султанкулова К.Т. Токсико-биологическая оценка гриба *Histoplasma farciminosum* – возбудителя эпизоотического лимфангоита лошадей // Ветеринарные и зоотехнические вопросы коневодства: первая науч.-практ. конф. - Алматы, 2003. – С. 26-29

- 5 Сансызбай А.Р. Эпизоотическая ситуация лимфангита лошадей, вызванного *Histoplasma farciminosum*, в коневодческих хозяйствах Республики Казахстан // Современное состояние и актуальные проблемы развития ветеринарной науки и практики: науч.-практ. конф. – Алматы, 2005. – С. 234-237.
- 6 Вспышка оспы овец на территории Российской Федерации в Ярославской области [Электрон. ресурс]. – URL: <http://www.fsvps.ru/fsvps/news/18142.html> (дата обращения 3 сентября 2016 г).

References

Далее приводится транслитерированный список использованных источников в разделе REFERENCES. При этом англоязычные источники дублируются из раздела ЛИТЕРАТУРА, казахскоязычные и русскоязычные ссылки должны быть приведены к латинскому алфавиту (латинице) и английскому переводу. Ссылка должна дополнительно содержать DOI (идентификатор цифрового объекта), если таковой имеется. Транслитерация осуществляется с использованием онлайн-платформы <http://translit-online.ru/>. Эта онлайн-платформа не транслитерирует отдельные буквы казахского алфавита. Авторы должны самостоятельно вносить исправления после транслитерации казахского текста.

Транслитерированный список литературы должен выглядеть в следующем виде для источников на кириллице: автор(-ы) (транслитерация) → (год в круглых скобках) → название статьи в транслитерированном варианте [перевод названия статьи на английский язык в квадратных скобках], название русскоязычного источника (транслитерация, либо английское название – если есть), выходные данные с обозначениями на английском языке.

Например:

- 1 Gokhberg L., Kuznetsova T. (2011) Strategiya-2020: novye kontury rossiiskoi innovatsionnoi politiki [Strategy 2020: New Outlines of Innovation Policy]. Foresight-Russia, vol. 5, no 4, pp. 8–30.

МАҚАЛА ТАҚЫРЫБЫ

Аты Тегі¹ , Аты Тегі² , Аты Тегі² *

¹ Жұмыс орны 1; автор e-mail

² Жұмыс орны 2; автор e-mail

* Автор-корреспондент: e-mail (егер бірнеше автор-корреспондент болса, авторлардың инициалдарын қосыңыз)

Аннотация: бір абзац 300 сөзден аспайды, 150 сөзден кем емес. Аннотацияда зерттеу мақсаты, негізгі нәтижелер мен негізгі қорытындылар қысқаша көрсетілуі керек. Аннотация көбінесе мақаладан бөлек беріледі. Осыған байланысты сілтемелерден, стандартты емес немесе әдеттен тыс аббревиатуралардан аулақ болу керек, бірақ қажет болған жағдайда олар рефераттың өзінде бірінші рет айтылған кезде анықталуы керек. Аннотация мақаланың объективті баяндалуы болуы керек, негізгі мәтінде көрсетілмеген немесе дәлелденбеген нәтижелерді қамтымауы керек және негізгі қорытындыларды асыра көрсетпеуі керек.

Түйін сөздер: түйінсөз 1; түйінсөз 2; түйінсөз 3 (5-10 сөз немесе сөз тіркестері мақаланың негізгі мазмұнын көрсетуі керек; зерттеудің пәндік саласын анықтау. Әрбір түйінді сөз нүктелі үтірмен бөлінеді)

TITLE

Firstname Lastname¹ , Firstname Lastname² , Firstname Lastname² ,*

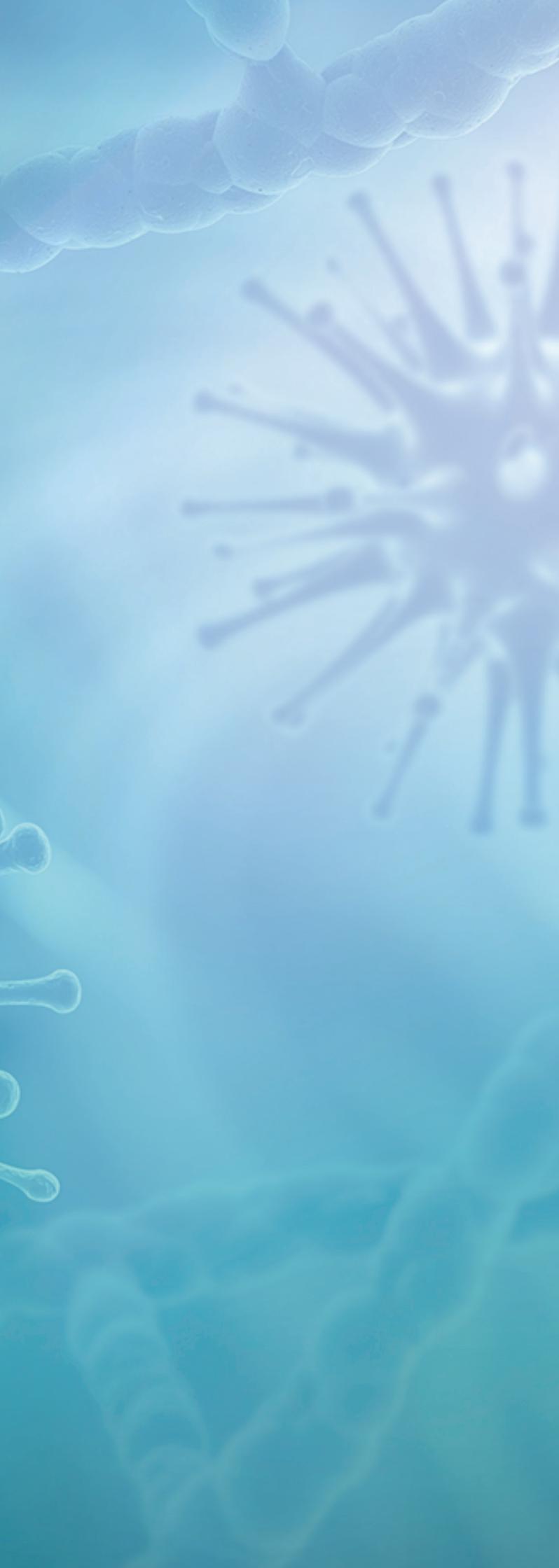
¹ Affiliation 1; author e-mail

² Affiliation 2; author e-mail

*Author correspondent: e-mail (if there are more than one correspondent authors, add the initials of the authors)

Abstract: one paragraph no more than 300 words, with no less than 150 words. The abstract should briefly describe the purpose of the study, the main results and main conclusions. The abstract is often presented separately from the article. In this regard, references, non-standard or unusual abbreviations should be avoided, but, if necessary, they should be identified at their first mention in the abstract itself. The abstract should be an objective presentation of the article, should not contain results that are not presented or substantiated in the main text, and should not exaggerate the main conclusions.

Keywords: keyword 1; keyword 2; keyword 3 (5-10 words or phrases should reflect the main content of the article; define the subject area of the study. Each keyword is separated by a semicolon).



Подписано в печать _____.____.2022 г.
Формат 60x84 1/8. Усл. п.л. 5.
Тираж 200 экз. Заказ № 1122.
Отпечатано в ТОО «Шаңырақ-Медиа».
г. Астана, ул. Кокарал, 2/1, тел. 87077770066.
www.smedia.kz