

«С. Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық зерттеу университеті» КеАҚ

ӘОЖ 619. 993-07:578.824.11(574) (043.3)

Қолжазба құқығында

ӘБЕНОВА ӘСЕМ ЖАНДАРБЕКҚЫЗЫ

**Қазақстанда таралатын құтыру вирусының штамдарын молекулярлық-
генетикалық талдау**

Философия докторы (PhD)
дәрежесін алу үшін дайындалған диссертация

Отандық ғылыми кеңесші
ҚР ҰҒА академигі
ветеринария ғылымдарының докторы,
Абдрахманов С.К.

Шетелдік ғылыми кеңесші
Қытай Ауылшаруашылық ғылымдары
академиясының (CAAS) Харбин
ветеринарлық ғылыми-зерттеу
институтының (HVRI) профессоры
доктор, Bu Zhigao,

Қазақстан Республикасы
Астана 2026

МАЗМҰНЫ

НОРМАТИВТІК СІЛТЕМЕЛЕР.....	4
АНЫҚТАМАЛАР.....	5
БЕЛГІЛЕУЛЕР МЕН ҚЫСҚАРТУЛАР.....	8
КІРІСПЕ.....	11
1 ӘДЕБИЕТКЕ ШОЛУ.....	18
1.1 Құтырық вирусының таксономиясы, құрылысы және биологиялық қасиеттері.....	18
1.2 Әлемнің түрлі өңірлеріндегі құтырық жағдайы.....	20
1.2.1 Әлемде құтырық ауруының таралуы.....	20
1.2.2 Қазақстандағы құтырық бойынша індеттік жағдай.....	21
1.3 Құтырық кезіндегі патогенез, клиникалық белгілер және патологиялық-анатомиялық өзгерістер.....	27
1.4 Құтырық ауруын зертханалық балау әдістері.....	29
1.5 Құтырықтың алдын алу және оған қарсы күрес шаралары.....	31
1.5.1 Құтырыққа қарсы вакциналардың эволюциясы және вакциналық штамдар.....	32
1.6 Құтыру вирусының молекулалық-генетикалық талдауы бойынша әдеби шолу.....	35
2 ЗЕРТТЕУ МАТЕРИАЛДАРЫ МЕН ӘДІСТЕРІ.....	39
2.1 Зерттеу нысаналары және материалдары.....	39
2.2 Зерттеу әдістері.....	43
2.2.1 Патологиялық материалдардан ми тіндерінің суспензиясын дайындау және РНҚ-ны бөліп алу.....	43
2.2.2 Кері транскрипция жүргізу.....	44
2.2.3 Құтырық вирусын нақты уақыт режиміндегі ПТР әдісімен анықтау.....	44
2.2.4 Құтырық вирусы геномын амплификациялауға арналған праймерлерді in silico таңдау және олардың амплификация тиімділігін бағалау.....	45
2.2.5 Секвенирлеуге арналған ДНҚ кітапханаларын дайындау.....	49
2.2.6 Құтырық вирусының толық геномын секвенирлеу.....	52
2.2.7 Секвенирлеу нәтижелерін бастапқы өңдеу және деректерді жинақтау.....	53
2.2.8 Құтырық вирусы изоляттарының генотиптік және филогенетикалық талдауы.....	56
2.2.8.1 Генотиптеу және салыстырмалы референттік тізбектерді іріктеу.....	56
2.2.8.2 Нуклеотидтік тізбектерді туралау және деректерді талдауға дайындау.....	58
2.2.8.3 Neighbor-Joining әдісімен филогенетикалық ағаш құру.....	58
2.2.8.4 Филогенетикалық ағаштарды визуализациялау және экспорттау.....	58
2.2.8.5 Байес әдісіне негізделген эволюциялық талдау (BEAST).....	58

2.2.8.6 Генетикалық қашықтықты Байес тәсілімен бағалау.....	59
3 ЗЕРТТЕУ НӘТИЖЕЛЕРІ.....	60
3.1 Патологиялық материалдардан алынған суспензиялар, РНҚ-ны бөліп алу, кері транскрипция және нақты уақыт режиміндегі ПТР нәтижелері.....	60
3.2 Құтырық вирусы геномын амплификациялауға арналған праймерлерді іріктеу және олардың тиімділігін бағалау нәтижелері...	63
3.3 Құтырық вирусының толық геномын амплификациялау нәтижелері.....	64
3.4 Құтырық вирусы изоляттарының толық геномдық секвенирлеу нәтижелері.....	66
3.5 Секвенирлеу деректерін бастапқы өңдеу және жинақтау нәтижелері.....	70
3.6 Құтырық вирусы изоляттарының генотиптік және филогенетикалық талдау нәтижелері.....	72
3.6.1 Генотиптеу нәтижелері.....	72
3.6.2 Құтырық вирусы изоляттарының жалпы филогенетикалық құрылымы.....	75
3.6.3 Шығыс Қазақстан облысы аумағында бөлініп алынған құтырық вирусы изоляттарының филогенетикалық талдау нәтижелері.....	77
3.6.4 Атырау облысы аумағында бөлініп алынған құтырық вирусы изоляттарының филогенетикалық талдау нәтижелері.....	78
3.6.5 Байес әдісіне негізделген талдау бойынша құтырық вирусы штамдарының уақыттық дивергенциясын бағалау нәтижелері.....	83
3.6.6 Байес әдісімен бағаланған генетикалық қашықтық және филогенетикалық ағаштар.....	86
3.7 Қазақстан аумағында бөлініп алынған құтырық вирусы изоляттарының нуклеотидтік тізбектерінің деректер қорын қалыптастыру нәтижелері.....	87
ЗЕРТТЕУ НӘТИЖЕЛЕРІН ТАЛҚЫЛАУ.....	89
ҚОРЫТЫНДЫ.....	91
ПАЙДАЛАНЫЛҒАН ӘДЕБИЕТТЕР ТІЗІМІ.....	93
ҚОСЫМША А – Scopus (Скопус)/ Web of Science деректер базасында халықаралық рецензияланатын ғылыми журналдарда жарияланған еңбектер.....	101
ҚОСЫМША Ә – ҚР Ғылым және жоғары білім саласындағы сапаны қамтамасыз ету Комитетінің (КОКСОН) дерекқорында рецензияланатын ғылыми журналдарда жарияланған еңбектер	103
ҚОСЫМША Б – Методикалық нұсқама.....	106
ҚОСЫМША В – Енгізу актісі.....	107
ҚОСЫМША Г – Халықаралық ғылыми-тәжірибелік конференция материалдарында жарияланған еңбектер.....	110
ҚОСЫМША Ғ – Сертификаттар.....	113
ҚОСЫМША Д – Филогенетикалық талдау кезеңдерінің иллюстрациялары.....	115

НОРМАТИВТІК СІЛТЕМЕЛЕР

Диссертациялық жұмыста келесідей мемлекеттік үлгі қалыптарға сілтемелер жасалды:

MEMСТ ISO/IEC 17025 «Сынақ және калибрлеу зертханаларының құзыреттілігіне қойылатын жалпы талаптар» мемлекетаралық стандарты.

ГОСТ 26075-2013. Животные. Методы лабораторной диагностики бешенства.

Қазақстан Республикасы Ауыл шаруашылығы министрінің Бұйрығы. Ветеринариялық (ветеринариялық-санитариялық) қағидаларды бекіту туралы: 2015 жылдың 29 маусымда, №7-1/587 бекітілген.

Қазақстан Республикасы Ауыл шаруашылығы министрінің Бұйрығы. Орны ауыстырылатын (тасымалданатын) объектілердің және биологиялық материалдың сынамаларын алу қағидаларын бекіту туралы: 2015 жылдың 30 сәуіресі, №7-1/393 бекітілген.

WOAH (World Organisation for Animal Health). Terrestrial Animal Health Code. Chapter 8.15. Infection with rabies virus (infection with rabies virus and other lyssaviruses). – Paris: WOAH, 2024

WOAH (World Organisation for Animal Health). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Terrestrial Manual). Chapter 3.1.18. Rabies (infection with rabies virus and other lyssaviruses).

World Health Organization. WHO Laboratory Techniques in Rabies. Fifth edition. Volume 1 & Volume 2. – Geneva: WHO, 2018.

АНЫҚТАМАЛАР

Диссертациялық жұмыста төмендегідей анықтамаларға сәйкес терминдер қолданылды:

Амплификация – ПТР барысында мақсатты нуклеотидтік фрагменттің көп мәрте (экспоненциалды) көшірмесін алу үдерісі.

Амплификат – ПТР нәтижесінде алынған ДНҚ өнімі (көшірілген фрагмент).

Ампликондық тәсіл – геномның белгілі аймақтарын праймерлермен ПТР арқылы көбейтуге негізделген әдіс.

Аннелинг – ПТР кезінде праймерлердің матрицаға байланысу кезеңі.

Аннотация – филогенетикалық ағашта үлгі туралы мәліметті (иесі, өңірі, жылы т.б.) тармақ/ұштарға белгілеу.

Аннотациялау – геномдық тізбекте гендер мен функционалдық аймақтардың орналасуын анықтау үдерісі.

Антигендік кросс-реактивтілік – туыстас вирустар антигендерінің иммундық жүйеде ұқсас реакция беру қабілеті.

Вирион – жасушадан тыс ортадағы, инфекциялық қабілеті бар толыққанды вирус бөлшегі.

Геном – вирустың тұқымқуалаушы ақпаратын тасымалдайтын нуклеин қышқылы (құтырықта – біржіпшелі теріс РНҚ).

Генотиптеу – тізбек деректеріне сүйеніп изоляттың белгілі генетикалық топқа/кладаға тиесілігін анықтау.

Генетикалық қашықтық – тізбектер арасындағы айырмашылықты нуклеотидтік ауысулар саны/үлесі арқылы сипаттайтын көрсеткіш.

Гликопротеин – вирион бетінде орналасқан, жасушалық рецепторлармен байланысып енуге қатысатын негізгі беткі антиген ақуыз.

Гомологиялық аймақ – әртүрлі изоляттарда ұқсастығы жоғары сақталған тізбек бөлігі.

Декапсидация – вирус жасушаға енгеннен кейін нуклеокапсидтің ашылып, геномның босап шығу кезеңі.

Денатурация – қос тізбекті ДНҚ-ның біртізбекті күйге ауысуы.

Депонирлеу – алынған тізбектерді ашық дерекқорға тіркеп, инвентарлық нөмір (accession) алу арқылы жариялау.

ДНҚ кітапханасы – секвенирлеуге бейімделген (адаптермен таңбаланған, индекстелген) ДНҚ фрагменттерінің жиынтығы.

Элонгация – ПТР кезінде ДНҚ-полимераза жаңа тізбекті синтездейтін кезең.

Электрофореграмма – электрофорез нәтижесінің көрінісі (жолақтар арқылы өнімнің болуы мен мөлшері бағаланады).

Элюция – нуклеин қышқылын сорбенттен/қатты фазадан ерітіндіге шығару үдерісі.

Жабын – геномның қандай бөлігі оқылымдармен қамтылғанын көрсететін көрсеткіш.

Изолят – нақты үлгіден бөлініп алынған, зертханада сипатталған вирустың жеке нұсқасы.

Кластер – филогенетикалық ағашта бір-біріне генетикалық жақын тізбектердің топтасуы.

Клада – ортақ эволюциялық ата-бабадан тараған тізбектердің филогенетикалық тобы.

Консенсус тізбек – оқылымдар негізінде әр позиция үшін ең ықтимал нуклеотид таңдалып алынған қорытынды тізбек.

Консервативті аймақ – әртүрлі изоляттарда өзгерісі аз, тұрақты сақталатын геном бөлігі.

Контиг – de novo жинақтау нәтижесінде алынған үздіксіз геномдық фрагмент.

Көптік туралау – бірнеше тізбекті гомологиялық позициялар бойынша қатарластырып теңестіру үдерісі.

Кері транскрипция – РНҚ матрицасынан комплементарлы ДНҚ синтездеу процесі.

Қабаттасу – көршілес ампликондардың ортақ аймақпен бірін-бірі жабуы (жинақтау дәлдігін арттырады).

Құтырық вирусы – орталық жүйке жүйесін зақымдайтын, өліммен аяқталатын нейротропты инфекция қоздырғышы; Lyssavirus туысына жататын біржіпшелі теріс РНҚ-вирус.

Матрицалық ақуыз – нуклеокапсид пен липидті қабықша арасындағы байланысты қамтамасыз ететін құрылымдық ақуыз.

Мультиплексті амплификация – бір реакцияда бірнеше нысаналы фрагментті қатар көбейту.

Нуклеокапсид – вирустың геномы мен нуклеопротеиннен құралған ішкі құрылымы.

Нуклеопротеин – вирустық РНҚ-ны қаптайтын негізгі құрылымдық ақуыз. Транскрипция/репликацияға қатысады.

Нуклеотидтік тізбек – ДНҚ/РНҚ-дағы нуклеотидтердің реттілігі.

Оқылым – секвенирлеу нәтижесінде алынған ДНҚ фрагментінің нуклеотидтік тізбегі.

Оқылымдарды туралау (карталау) – оқылымдарды референттік геномға сәйкестендіріп орналастыру үдерісі.

Праймер – ДНҚ синтезін бастауға арналған, нысанаға комплементарлы қысқа олигонуклеотид.

Праймер жұбы – нысаналы аймақтың екі шетін шектейтін алдыңғы және кері праймерлер жиынтығы.

Фосфопротеин – полимераза кешенінің кофакторы. Транскрипция мен репликацияның басталуына қатысады.

Репликация – вирустық геномның толық көшірмесін синтездеу процесі.

Референстік геном – салыстыру, туралау және варианттарды анықтау үшін эталон ретінде қолданылатын геномдық тізбек.

РНҚ – құтырық вирусының генетикалық ақпаратын тасымалдайтын нуклеин қышқылы.

Сапалық сүзгілеу – төмен сапалы нуклеотидтер мен қысқа/сенімсіз оқылымдарды алып тастау кезеңі.

Секвенирлеу тереңдігі – геном позициясын қамтыған оқылымдар саны. Деректер сенімділігін сипаттайды.

Супернатант – центрифугалаудан кейін тұнбаның үстінде қалған сұйық фракция.

Стоп-кодон – трансляцияны тоқтататын кодон. Өзгеруі ақуыздың ұзаруына әкелуі мүмкін.

Сэнгер секвенирлеуі – қысқа ДНҚ фрагменттерін капиллярлық әдіспен тізбектеудің классикалық тәсілі.

Тагментация – транспозаза арқылы ДНҚ-ны бір мезетте фрагменттеп, адаптерлік тізбектерді қосу үдерісі.

Транскрипция – вирустық РНҚ-дан ақпараттық РНҚ синтездеу процесі.

Термиялық циклдеу – ПТР барысында температура сатыларының қайталанып ауысуы.

Трансшекаралық таралу – қоздырғыштың шекара арқылы таралуы (миграция, тасымал, табиғи қозғалыстар арқылы).

Табиғи-ошақтық – инфекцияның жабайы жануарлар популяциясында табиғи түрде сақталып, айналымда болуы.

Шикі оқылымдар – секвенирлеу құрылғысынан алынған бастапқы (өңделмеген) деректер.

Эпизоотиялық мониторинг – жануарлар ауруларын жүйелі бақылау, зертханалық растау және ошақтарды қадағалау.

Эпизоотиялық желі – уақыт пен кеңістікте өзара байланысты жағдайлар тізбегі (ортақ көз/таралуды көрсетуі мүмкін).

БЕЛГІЛЕУЛЕР МЕН ҚЫСҚАРТУЛАР

кДа	– килодальтон
мкл/ μ L	– микролитр
мкм	– микрометр
мМ	– миллимоль
МЕ/мл	– миллилитрдегі халықаралық бірлік
н.ж.	– нуклеотид жұбы
нМ	– наномоль
нг	– нанограмм
пг	– пикограмм
пМ	– пикомоль
T ₀	– матрица–праймер кешенінің балқу температурасы
ВНК-21	– №21 вирусоневральді культура
ДДҰ	– Дүниежүзілік денсаулық сақтау ұйымы
ДЖДСҰ	– Дүниежүзілік жануарлар денсаулығын сақтау ұйымы
ДНҚ	– дезоксирибонуклеин қышқылы
ДМСО	– диметилсульфоксид
ДЭПК	– диэтилпирикарбонат
дНТФ	– дезоксинуклеозидтрифосфаттар
ИФР	– иммунофлуоресценция реакциясы
ИФТ	– иммуноферменттік талдау
КТ-ПТР	– кері транскрипциялы полимеразды тізбекті реакция
кДНҚ	– комплементарлы дезоксирибонуклеин қышқылы
МФА	– моноклоналды флуоресцентті антиденелер әдісі
мРНҚ	– ақпараттық (матрицалық) рибонуклеин қышқылы
ПТР	– полимеразды тізбекті реакция
ҚФ-ИФТ	– қатты фазалы иммуноферменттік талдау
РМК	– республикалық мемлекеттік кәсіпорын
РНҚ	– рибонуклеин қышқылы
ТМД	– Тәуелсіз Мемлекеттер Достастығы
ҰВРО	– Ұлттық ветеринариялық референттік орталық
ФАО	– Біріккен Ұлттар Ұйымының азық-түлік және ауыл шаруашылығы ұйымы
ШЖҚ	– шаруашылық жүргізу құқығындағы
ШҚО	– Шығыс Қазақстан облысы
СҚО	– Солтүстік Қазақстан облысы
БҚО	– Батыс Қазақстан облысы
ЭДТА	– этилендиаминтетраацет қышқылы
BEAST	– Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees/Байес эволюциялық талдау бағдарламасы
BLAST	– Basic Local Alignment Search Tool/негізгі жергілікті туралау іздеу құралы
CA1	– Central Asia 1/Орталық Азия 1
CER –	– Cell Engineering Research/зертханалық жасуша зерттеуі

ClustalW	– Clustal Weighted/салмақталған Clustal
DNA	– Deoxyribonucleic Acid/дезоксирибонуклеин қышқылы
dsDNA	– double-stranded deoxyribonucleic acid/қос тізбекті дезоксирибонуклеин қышқылы
FastQC	– Fast Quality Control/жылдам сапа бақылауы
GC%	– Гуанин-цитозин пайызы
G	– Glycoprotein/гликопротеин
HS	– High Sensitivity/жоғары сезімталдық
L	– Large protein/үлкен ақуыз
MAFFT	– Multiple Alignment using Fast Fourier Transform/Жылдам Фурье түрлендіруін қолданатын көптік туралау
MCC	– Maximum Clade Credibility/Кладаның ең жоғары сенімділігі
MEGA	– Molecular Evolutionary Genetics/Analysis молекулалық эволюциялық - генетикалық талдау
MNA	– mouse neuroblastoma/тышқан нейробластомасы жасушалары
MRCA	– Most Recent Common Ancestor/Ең соңғы ортақ ата-баба
MCMC	– Markov Chain Monte Carlo/Марков тізбекті Монте-Карло
NaOH	– натрий гидроксиді
NCBI	– National Center for Biotechnology Information /Ұлттық биотехнологиялық ақпарат орталығы
NGS	– Next Generation Sequencing/Келесі буын секвенирлеуі
NTC	– No Template Control/матрицасыз бақылау
N	– Normality/ерітіндінің нормалдылығы және нуклеопротеин
PV	– Pasteur Virus/Пастер вирусы
Q30	– quality score 30/сапа көрсеткіші 30
QC	– Quality Control/сапаны бақылау
RABV- GLUE	– Rabies virus Genes Linked by Underlying Evolution/Эволюциялық негізде байланыстырылған құтырық вирусы гендері
RT-qPCR	– Reverse Transcription quantitative PCR/Кері транскрипциялы сандық полимеразды тізбекті реакция
SPAdes	– St. Petersburg genome assembler/Санкт-Петербург геном жинақтаушы
SPRI	– Solid Phase Reversible Immobilization/Қатты фазадағы қайтымды иммобилизация
ST	– Steppe Type /далалық тип
TAE	– Tris-Acetate-Ethylenediaminetetraaceticacid/трис-ацетат- этилендиаминтетраацет қышқылы
TMRCА	– Time to Most Recent Common Ancestor/Соңғы ортақ ата-баба уақыты
Tris-HCl	– трис (гидроксиметил) аминометанның тұз қышқылы
VADR	– Viral Annotation DefineR/Вирустық аннотация анықтаушысы
WAHIS	– World Animal Health Information System/Әлемдік жануарлар денсаулығы туралы ақпараттық жүйе

КІРІСПЕ

Тақырыптың өзектілігі. Қазақстан Республикасының аймақтарында жануарлардың инфекциялық аурулары бойынша эпизоотологиялық жағдай біркелкі емес, әр өңірдің табиғи-климаттық және шаруашылық ерекшеліктерімен айқындалады. Алдын алу және қарсы індеттік іс-шаралар ветеринариялық бақылаудың сапасына, зертханаларда жүргізілетін диагностикалық зерттеулердің нәтижелеріне және санитарлық-профилактикалық талаптардың толық орындалуына тәуелді.

Инфекциялық аурулар кезінде індеттік тізбекті ұзу ветеринариялық-санитариялық кешенді шаралардың уақтылы орындалуына, қолайсыз пункттерде жүргізілетін жұмыстардың жүйелілігіне және арнайы алдын алу құралдарының (вакцина, сарысу) тиімді қолданылуына байланысты. Мұндай шаралар мал өлімін азайтып, шаруашылыққа экономикалық тұрғыдан елеулі пайда әкеледі. Әлемнің көптеген елдерінде зооноздық инфекциялардың таралуы жануарлар денсаулығын бақылаудың күшейтілген бағдарламалары нәтижесінде төмендегенімен, қазіргі мал шаруашылығы жағдайында Қазақстан аумағына аса қауіпті, оның ішінде карантиндік аурулардың ену және таралу қаупі әлі де жоғары деңгейде сақталып келеді.

Сол себепті мал шаруашылығының, үй және жабайы жануарлардың аса қауіпті аурулардан қорғалуы мен эпизоотологиялық қауіпсіздігін қамтамасыз ету ветеринария ғылымы мен практикасының негізгі міндеттерінің бірі болып саналады. Бұл бағыт адам денсаулығын қорғау, халықты қауіпсіз азық - түлікпен қамтамасыз ету және өнеркәсіпті сапалы шикізатпен жабдықтау үшін де маңызды.

Құтыру – *Lyssavirus* туысына, *Rhabdoviridae* тұқымдасына жататын *Rabies virus* құтыру вирусымен қоздырылатын, табиғи ошақты, аса қауіпті, өлімге әкелетін жұқпалы ауру [1].

Құтырық әлемнің 150-ден астам елдері мен аймақтарында кездесетін вирустық ауру. Біріккен Ұлттар Ұйымының Азық-түлік және ауыл шаруашылығы ұйымы (ФАО) келтірген мәлімет бойынша, жыл сайын шамамен 55 мың адамның өліміне себепкер болады, оның 95 пайызы Африка мен Азия елдеріне тиесілі. Статистикалық деректердің жеткіліксіздігі бұл көрсеткіштің нақты көлемі бұдан жоғары болуы мүмкін екенін аңғартады.

Құтыру – жұқтырған жануарлардың тістеуі арқылы адамдарға негізінен берілетін өлімге әкелетін вирустық зооноздық ауру. Ауру клиникалық белгілер пайда болғаннан кейін 100% өлім көрсеткішімен сипатталатын нейроэнцефалитпен өтеді. Жыл сайын әлем бойынша құтырудан 55 000-нан астам адам және 1 миллионнан астам жануар қаза табады. Құтырудан болатын тікелей шығындар жыл сайын 4 миллиард еуродан асады.

Көптеген эндемиялық елдер сияқты, Қазақстан аумағында да жануарлар арасындағы құтыру жыл сайын тіркеледі. Сонымен қатар, үй иттері мен мысықтарын, сондай-ақ ауыл шаруашылығы жануарларын вакцинациялау бағдарламасы және вакцинамен сіндірілген жемдерді тарату арқылы түлкілерді вакцинациялаудың шектеулі бағдарламасы жүргізіледі. Алайда жануарлар

арасындағы аурушандықтың төмендеуі байқалмай отыр. Осыған байланысты аталған зерттеудің мақсаттарының бірі ел аумағында жануарлар арасындағы құтырудың географиялық таралуын зерттеу арқылы оның эпидемиологиясын тереңірек түсіну және күрес шараларын бағалау болды [2].

Қазақстандағы құтырықтың эпизоотологиялық жағдайы әлеуметтік және экономикалық тұрғыдан маңызды мәселе ретінде қалып отыр. 2019 жылы 58 ошақ, 2020 жылы 124 ошақ, ал 2021 жылдың алғашқы сегіз айында 71 ошақ анықталған. 2020 жылғы 31 желтоқсанға дейін жалпы 131 ошақ тіркеліп, олардың жетеуі 2019 жылдан бері жойылмай сақталған. Индет ошақтарының 65 пайызы 15 облыстың төртеуіне тиесілі: Түркістан (38), Шығыс Қазақстан (22), Павлодар (14) және Батыс Қазақстан облыстары (11). Бұл өңірлер ондаған жылдар бойы эпизоотологиялық тұрғыда құтырық бойынша тұрақсыз аймақ болып келеді: 2013–2020 жылдар аралығында республикадағы барлық құтырық ошақтарының 45 пайызы дәл осы өңірлерде тіркелген.

Құтырықтың әлеуметтік қауіптілігі эпизоотологиялық жағдайды тұрақты бақылау мен нақты мониторинг жүргізуді қажет етеді. Шұғыл алдын алу шараларын қабылдау үшін толыққанды эпизоотологиялық деректер маңызды. Әртүрлі ошақтардағы ауру таралуының өзіндік ерекшеліктері көп жағдайда вирус изоляттарының қасиеттерімен байланысты болғандықтан, ветеринариялық шаралардың тиімділігі эпизоотологиялық мониторинг пен вирус изоляттарының қасиеттерін терең талдауға тәуелді.

Алайда эпизоотиялық көрсеткіштер аурудың таралу қарқынын сипаттағанымен, індеттің шығу тегі мен таралу жолдарын нақты анықтау үшін молекулалық-генетикалық зерттеулер қажет.

Қазақстанда құтырық вирусының молекулалық-генетикалық және антигендік ерекшеліктері жүйелі түрде толық геномдық масштабы зерттелмеген. Алғаш рет Қазақстан аумағындағы жануарлардан бөлініп алынған құтырық вирусы изоляттарының бірқатары үшін толық геномдық нуклеотидтік тізбектер анықталды. Бұған дейін жүргізілген зерттеулер негізінен алдын алу шаралары мен диагностикалық тест - жүйелерді жетілдіруге бағытталған болатын. Бұл зерттеулердің маңыздылығы жоғары, себебі вирус генотиптеу әдістері құтырықтың алдын алу стратегиясын жетілдірудің негізгі элементіне айналып отыр.

Нуклеотидтік тізбектерді талдау вирустың эволюциялық тарихын, генетикалық нұсқаларын және таралу мерзімін анықтауға мүмкіндік береді. Мұндай тәсіл індеттік бақылауды күшейтіп, аурудың таралу динамикасын терең түсінуге жол ашады.

2020 – 2022 жылдар аралығында жүргізілген зерттеу Қазақстандағы құтырыққа шалдыққан жануарлардан алынған үлгілердің географиялық таралуы, вирус изоляттарының нуклеотидтік тізбектері және олардың генетикалық айырмашылықтары туралы толық дерек берді. Сонымен қатар көршілес елдердегі изоляттармен филогенетикалық байланысы да анықталды.

Осылайша, Қазақстан аумағында құтырық вирусының генетикалық әртүрлілігін сипаттайтын деректердің жеткіліксіздігі бұл бағыттағы зерттеулердің өзектілігін айқындайды. Алынған генетикалық мәліметтер

эпизоотологиялық мониторингті жетілдіруге, аурудың таралу жолдарын нақтылауға және құтырыққа қарсы профилактикалық бағдарламаларды ғылыми негізде оңтайландыруға мүмкіндік береді.

Зерттеудің негізгі мақсаты. Қазақстан аумағынан оқшауланған *Rabies lyssavirus* штамдарын молекулалық - генетикалық тұрғыдан сипаттау және олардың айналымдағы штамдармен генетикалық сәйкестігін бағалау.

Қойылған мақсатқа жету үшін төмендегідей ғылыми **міндеттер** айқындалды:

1. *Rabies lyssavirus* штамдарының кДНК үлгілерін жинақтау.
2. Құтырық вирусының N және G гендеріне тиесілі фрагменттердің нуклеотидтік тізбектерін анықтау.
3. Қазақстанның әртүрлі өңірлерінен алынған вирус изоляттарының нуклеотидтік тізбектеріне генотиптік және филогенетикалық талдау жүргізу, өзара генетикалық байланысын анықтау және дендрограммалар құрастыру.
4. Алынған геномдық және жартылай геномдық нуклеотидтік тізбектер негізінде *Rabies lyssavirus* изоляттарын қамтитын деректер қорын қалыптастыру.

Зерттеу материалдары: Зерттеу жұмысы 2020–2022 жылдары «Қазақстан Республикасының аумағында айналымдағы құтырық вирусын молекулярлық-биологиялық талдау» (AP08053353), 2023-2025 жылдары AP19679670 «Ақпараттық-коммуникациялық технологияларды қолдану негізінде жануарлардың инфекциялық ауруларына қарсы дауалау шараларын жетілдіру (құтырық үлгісінде)» атты ғылыми жоба аясында жүргізілді. Зерттеу материалы ретінде Қазақстанның әртүрлі өңірлерінен 2020–2022 жылдар аралығында жиналған құтырыққа клиникалық күдік тудырған жануарлардан алынған 117 ми үлгісі пайдаланылды. Үлгілер түлкі, қасқыр, ит, мысық, ірі қара мал, ұсақ мал және жылқыдан алынды.

Инфекциялық жағдайды эпизоотологиялық бағалау, картографиялық және статистикалық талдау жұмыстары С.Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық зерттеу университетінің «Ветеринариялық санитария» кафедрасында орындалды. Вирустық РНҚ-ны бөліп алу Қазақстан Республикасы Ауыл шаруашылығы министрлігінің «Ветеринария бойынша ұлттық референттік орталығы» базасында (Астана қ., «Инфекциялық ауруларды диагностикалау» зертханасы) жүргізілді. Кері транскрипцияланған кДНК үлгілерімен жұмыс және молекулалық-генетикалық зерттеулер «Ұлттық биотехнология орталығы» ЖШС-нің қолданбалы генетика зертханасында жүзеге асырылды.

Зерттеу әдістері: Зерттеу барысында құтырық вирусын анықтау және молекулалық-генетикалық сипаттау үшін молекулалық - биологиялық, жоғары өнімді секвенирлеу (NGS), биоинформатикалық, филогенетикалық және эпизоотологиялық әдістер кешені қолданылды.

Вирустық РНҚ-ны бөліп алу «Фрактал Био» ЖШС өндірген коммерциялық тест - жүйелерді пайдалана отырып, өндіруші ұсынған нұсқаулыққа сәйкес жүргізілді. Бөліп алынған РНҚ негізінде кері транскрипция әдісімен комплементарлы ДНҚ (кДНК) синтезделді. Құтырық вирусының

бастапқы анықталуы нақты уақыт режиміндегі полимеразалық тізбекті реакция (RT - qPCR) әдісімен Rotor - Gene амплификаторында орындалды.

Құтырық вирусының геномын толық ампликондық жабуға арналған праймерлер *NCBI Virus* деректер қорындағы тізбектерге сүйене отырып, *MAFFT* және *Primer3* бағдарламалары арқылы *in silico* жобаланды. Праймерлердің жұмысқа қабілеттілігі тәжірибелік амплификация арқылы тексерілді.

Тиімді праймерлер негізінде алынған ампликондардан ДНҚ кітапханалары *Illumina DNA Prep* (Nextera XT қағидасы) бойынша дайындалып, толық геномдық секвенирлеу *Illumina MiSeq* платформасында жүргізілді. Жекелеген фрагменттерді растау үшін *Сэнгер* секвенирлеу әдісі қолданылды.

Секвенирлеуден алынған бастапқы деректерді сапалық бақылау оқылым сапасын бағалау әдісі арқылы *FastQC* бағдарламасында жүргізілді. Оқылымдарды алдын ала өңдеу және сапалық сүзгілеу *read trimming* және *filtering* әдістері негізінде *Seqtk* және *Sickle* бағдарламаларын қолдану арқылы жүзеге асырылды. Вирустың толық геномдық тізбектерін қалпына келтіру *de novo* жинақтау әдісімен *SPAdes* бағдарламасында орындалды.

Алынған геномдық тізбектерді референстік геноммен салыстыру оқылымдарды туралау әдісі арқылы *BWA* бағдарламасында жүргізілді, ал нуклеотидтік варианттарды анықтау және консенсус тізбектерін қалыптастыру *variant calling* әдісі негізінде *FreeBayes*, *BCFtools* және *SAMtools* құралдарын пайдалану арқылы жүзеге асырылды.

Құтырық вирусы изоляттарының генотиптік тиесілігі генотиптеу әдісімен *RABV - GLUE* платформасында анықталды. Филогенетикалық қатынастарды бағалау *Neighbor - Joining* және Байес әдістеріне негізделген филогенетикалық талдау арқылы *MEGA X* және *BEAST* бағдарламаларында жүргізілді. Филогенетикалық ағаштарды визуализациялау және аннотациялау графикалық интерпретация әдісімен *iTOL* веб - платформасында жүзеге асырылды.

Эпизоотологиялық көрсеткіштерді есептеу және картографиялық талдау үшін стандартты статистикалық әдістер қолданылды. Молекулалық-генетикалық деректерді өңдеу кезінде филогенетикалық ағаштардың сенімділігі 1000 *bootstrap* репликациясы арқылы тексерілді. Барлық статистикалық есептеулер *Microsoft Excel* бағдарламалық жасақтамасы және мамандандырылған *MEGA X*, *BEAST* биоинформатикалық пакеттерінің ішкі алгоритмдері көмегімен жүзеге асырылды.

Зерттеу объектісі. Қазақстанның әртүрлі өңірлерінде құтырыққа клиникалық күдік туғызған жануарлардан алынған патологиялық материалдар мен олардан оқшауланған *Rabies lyssavirus* штамдары.

Зерттеу пәні. Құтырық вирусы изоляттарының молекулалық-генетикалық ерекшеліктері, генотиптік және филогенетикалық сипаттамалары, сондай-ақ олардың Қазақстан аумағында таралу заңдылықтары.

Зерттеудің ғылыми жаңалығы. Осы зерттеу барысында Қазақстан аумағында 2020–2022 жылдары айналымда болған құтырық вирусы изоляттарының генетикалық құрылымы алғаш рет толық геномдық нуклеотидтік тізбектер негізінде сипатталды. Алынған деректер вирустың

космополиттік мажор кладаға және CA1 минор класына жататынын, сондай - ақ жекелеген изоляттардың генетикалық тұрғыдан ерекшеленетін тармақтар түзетінін көрсетті.

Зерттеу аясында N, P, M және G гендерінің толық кодтайтын аймақтарын амплификациялауға және секвенирлеуге мүмкіндік беретін зертханалық хаттама алғаш рет апробацияланды. Ұсынылған хаттама құтырық вирусының молекулалық-генетикалық мониторингін жүргізу үшін қолданбалы маңызға ие.

Зерттеу нәтижесінде құтырық вирусының 31 толық және жартылай геномдық нуклеотидтік тізбегі алғаш рет анықталып, халықаралық GenBank дерекқорына тіркелді. Аталған тізбектер PRJNA832888 BioProject шеңберінде жүйеленіп, OP477379–OP477391 және ON366706–ON366710 тіркеу нөмірлерімен жарияланды. Нәтижесінде Қазақстан аумағында айналымдағы *Rabies lyssavirus* штамдарының молекулалық-генетикалық сипаттамаларын қамтитын құрылымданған ұлттық деңгейдегі деректер жиынтығы алғаш рет қалыптастырылды.

Жұмыстың тәжірибелік маңыздылығы: Бұл зерттеу құтырықты диагностикалауда қолданылатын молекулалық-генетикалық әдістерді тиімді пайдалануды ғылыми тұрғыдан негіздейді. Құтырық вирусының генетикалық құрылымын сипаттау айналымда жүрген аймақтық штамдарды ажыратуға және олардың эпизоотиялық маңызын бағалауға мүмкіндік береді.

Молекулалық - генетикалық талдау нәтижелері үй және жабайы жануарлар популяцияларындағы вирус айналымының ерекшеліктерін анықтауға, инфекцияның таралу бағыттарын нақтылауға жағдай жасайды.

Алынған деректер Қазақстан Республикасында құтырыққа қарсы профилактикалық шараларды жоспарлау барысында, соның ішінде вакцинацияны ұйымдастыруды ғылыми негіздеу, эпизоотиялық ошақтарда жедел әрекет ету алгоритмдерін жетілдіру және тәуекел аймақтарын айқындау кезінде тікелей қолданылуы мүмкін.

Қорғауға шығарылатын негізгі қағидалар:

1 Зерттеу барысында Қазақстан аумағында айналымда жүрген құтырық вирусының генетикалық әртүрлілігі мен эволюциялық ерекшеліктері алғаш рет кешенді түрде сипатталды, бұл аймақтық штамдардың молекулалық-эпидемиологиялық мониторингін жетілдіруге негіз болады.

2 Құтырық вирусының филогенетикалық құрылымы мен географиялық таралуы арасындағы өзара байланыс анықталып, вирус циркуляциясының негізгі ошақтары мен таралу бағыттары айқындалды.

3 Зерттеу нәтижесінде алынған нуклеотидтік тізбектер халықаралық дерекқорларға (GenBank және т.б.) енгізіліп, жаһандық ғылыми қауымдастық үшін қолжетімді референстік база қалыптастырылды.

4 Құтырық вирусының анықталған генетикалық варианттары диагностикалық жүйелердің сезімталдығы мен нақтылығын арттыру үшін қолданылуы мүмкін екендігі негізделді.

5 Жүргізілген зерттеулер нәтижелері Қазақстан аумағында құтырыққа қарсы вакциналардың тиімділігін бағалау және қажет болған жағдайда оларды жаңарту стратегиясын ғылыми тұрғыдан негіздеуге мүмкіндік береді.

6 Құтырық вирусының циркуляция ерекшеліктерін ескере отырып, эпизоотиялық қадағалау мен тәуекел аймақтарын болжаудың ғылыми негіздері ұсынылды.

Диссертация нәтижелерінің жариялануы мен апробациядан өтуі. Диссертацияның негізгі ғылыми нәтижелері 11 жарияланымда жарияланды. Олардың ішінде 2 мақала *Web of Science* және *Scopus* базаларына тіркелген журналда жарық көрді [3, 4] (Қосымша А). 3 мақаланы Қазақстан Республикасы Ғылым және жоғары білім министрлігі ұсынған журналдар қабылдады [5, 6] (Қосымша Ә), 1 методикалық нұсқаулық (Қосымша Б) жарық көрді. Оқу үрдісіне ғылыми-зерттеу жұмыс нәтижелерін енгізу бойынша 2 акт енгізілді (Қосымша В).

Диссертациялық жұмыстың негізгі нәтижелері жыл сайын С. Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық зерттеу университетінің Ғылыми кеңесінде 2020–2023 жылдары ұсынылып, есептерде талқыланды. Сонымен қатар зерттеу материалдарының бір бөлігі 3 халықаралық ғылыми конференцияларда (Қосымша Г), 2 форумдарда баяндалды:

- международной научно-практической конференции «Сейфуллинские чтения – 18: «Молодежь и наука – взгляд в будущее» - 2022 [7].

- Международной научно-практической конференции «Сейфуллинские чтения - 18(2): «Наука XXI века – эпоха трансформации» 2022 [8].

- 12-й международной научно-практической конференции «Сибирская деревня: 200 лет развития Омской области – от реформ М.М. Сперанского до агропромышленного центра Сибири» проходившей на базе ФГБОУ ВО Омский ГАУ 21 - 23 сентября 2022 года [9] (Қосымша Ғ).

- The 1st China Kazakhstan Veterinary Medicine Science and Technology Postgraduate Academic Forum Co - organized by Harbin Veterinary Research Institute, Seifullin Kazakh Agro Technical University, China-Kazakhstan Belt and Road Joint Laboratory on Agricultural Sciences, Belt and Road Joint Center for Animal Infectious Diseases Prevention and Control. 28 May 2022 (Қосымша Ғ).

- Международной научно-практической конференции посвященной 120-летию со дня основания казахского научно исследовательского ветеринарного института, 2025 г. [10].

Автордың жеке үлесі. Диссертация тақырыбы аясында орындалған жұмыстардың басым бөлігі автордың тікелей қатысуымен жүзеге асырылды. Әдеби деректерді жинау және талдау, зерттеу бағытын қалыптастыру, мақсат пен міндеттерді анықтау, тәжірибелік зерттеулерді жүргізу, алынған нәтижелерді өңдеу мен интерпретациялау, ғылыми мақалаларды әзірлеу және диссертация мәтінін дайындау автордың жеке үлесі болып табылады. Қолжазбаны рәсімдеу және алынған нәтижелерді ғылыми айналымға енгізу де автордың жауапкершілігінде болды.

Диссертациялық жұмыстың құрылымы мен көлемі. Жұмыс жалпы көлемі 100 беттен тұрады. Құрамына нормативтік сілтемелер, анықтамалар, белгілеулер мен қысқартулар, кіріспе, әдебиеттерге шолу, материалдар мен әдістер, зерттеу нәтижелері және олардың талқылануы, қорытынды және қолданылған 118 әдебиеттен тұратын тізім кіреді.

Диссертацияның негізгі мәтінінде 31 сурет пен 16 кесте берілген, ал қосымшаларда 29 сурет келтірілген. Барлық иллюстрациялық материалдар мәтінде жүргізілген талдауларды толық ашуға және алынған нәтижелерді көрнекі түрде көрсетуге мүмкіндік береді.

1 ӘДЕБИЕТКЕ ШОЛУ

1.1 Құтырық вирусының таксономиясы, құрылысы және биологиялық қасиеттері

Вирустарды таксономиялау жөніндегі халықаралық комитеттің жіктемесіне сәйкес, құтырық ауруының қоздырушысы *Lyssavirus* туысына, *Rhabdoviridae* тұқымдасына және *Mononegavirales* қатарына жатады. *Lyssavirus* туысы филогенетикалық ерекшеліктеріне қарай үш негізгі топқа бөлінеді. Бірінші топқа *Rabies virus* және онымен генетикалық жақын бірқатар лиссавирустар, екінші топқа *Mokola virus*, *Lagos bat virus* және *Shimoni bat virus*, ал үшінші топқа *West Caucasian bat virus* кіреді. Лиссавирустардың көпшілігі нуклеопротеин деңгейінде кросс - антигендік ұқсастық көрсетеді [11].

Құтырық вирусының вириондары оқ тәрізді пішінді, ұзындығы шамамен 180 нм, диаметрі орта есеппен 75 нм. Вирион екі қабатты липидті мембранамен қапталған, оның сыртқы бетінде гликопротеинді тікенек тәрізді өсінділер орналасқан. Геномы спиральді симметриялы, бір жіпшелі теріс РНҚ-дан тұрады және рибонуклеопротеин кешеніне оралған [12-14].

Натрий додецилсульфаты арқылы өңдегеннен кейін құтырық вирусының құрамында бес негізгі құрылымдық ақуыз анықталған: нуклеопротеин (N), фосфопротеин (P), матрицалық ақуыз (M), гликопротеин (G) және РНҚ - тәуелді РНҚ - полимераза (L) [15].

Нуклеопротеин (N) – 450 аминқышқылынан тұратын фосфорланған полипептид. Ол РНҚ-мен, P фосфопротеинмен және L ақуызымен бірлесіп рибонуклеопротеин кешенін құрайды. N ақуызы бірнеше маңызды қызмет атқарады: вириондық РНҚ-ны рибонуклеазалардан қорғайды, оң және теріс РНҚ - кешендерінің түзілуіне қатысады, вирус капсидінің негізгі ішкі ақуызының рөлін атқарады, репликация мен транскрипция процестерін реттейді.

Матрицалық ақуыз (M) – 202 аминқышқылынан құралған құрылымдық, фосфорланбаған ақуыз. Ол спиральді нуклеокапсидті плазмалық мембранамен жалғастырып, нуклеокапсид пен гликопротеин арасындағы байланысты камтамасыз етеді.

Фосфопротеин (P) – 297 аминқышқылынан тұратын фосфорланған полипептид, фосфорлану дәрежесіне қарай M1 және M2 формаларымен сипатталады. P - ақуыз нуклеокапсид құрамында РНҚ транскрипциясы мен репликациясының басталуына қатысады.

Жасушалық актин – молекулалық массасы 43 кДа болатын, құтырық вирусының ішкі қабатында жиі анықталатын ақуыз.

Гликопротеин (G) – 505 аминқышқылынан тұратын полипептид. Вирион бетінде шамамен 400-ге жуық үшбұрышты шығынды түзеді. Әр G - молекулада екі олигосахарид тізбегі болады, олар ақуыздың сыртқы гидрофильді бөлігімен байланысады. Ақуыздың гидрофобты бөлігі екі қабатты липидті мембранаға батып орналасады. Гликопротеин үш доменнен тұрады: 1) 1–439 аминқышқылы аралығындағы N - терминалды эктодомен; 2) 440–461 позицияларындағы

трансмембраналық домен; 3) 462–505 аралығындағы С - терминалды эндодомен. Эктодомен мен эндодомен гидрофильді сипатқа ие.

РНҚ - полимераза (L) – 2000-нан астам аминқышқылынан тұратын ірі полипептид, құтырық вирусының бүкіл геномдық ақуыздарының шамамен 54%-ын құрайды. Оның реттік гомологиясы *Mononegavirales* қатарына тән басқа полимеразалармен сәйкес (1-кесте) [16].

Құтырық вирионы құрамында бірқатар минор ақуыздар да кездеседі: рhт, VAP - 21, р43 (жасушалық актин), р73 және бірнеше басқа компоненттер.

Кесте 1 - Құтырық вирусының құрылымдық ақуыздары

Ақуыздың атауы	Өлшемі (а/к)*	Молекулалық салмағы, кДа	Бір вириондағы шамамен саны	Фолдинг/посттрансляциялық өзгерістер
Нуклеопротеин (N - ақуыз)	~450	~55	1700–1800	фосфорлану элементтері байқалады
Фосфопротеин (P - ақуыз)	~297	35–40	~900–1000	тұрақты фосфорлану, конформациясы L - комплексіне тәуелді
Транскриптаза (L - ақуыз)	~2140	~190	20–150	арнайы модификациялар айқындалмаған
Гликопротеин (G - ақуыз)	~505	65–67	~1800	гликозилдену, кейбір штамдарда пальмитацияға ұқсас өзгерістер кездеседі
Матрицалық ақуыз (M - ақуыз)	~202	~25	2000–2500	айқын посттрансляциялық модификация байқалмайды
Ескерту – Әдебиет негізінде құралған [17]				

Гликопротеин вирустың негізгі беткі антигені болып табылады және жасушалық рецепторлармен өзара әрекеттесу арқылы вирустың енуін қамтамасыз етеді. L - ақуыз транскрипция мен репликацияға жауап беретін негізгі ферменттік кешеннің құрамына кіреді.

Құтырық вирусының репродукциялық циклі адсорбциядан, жасушаға енуінен, декапсидациядан, транскрипция мен трансляциядан, геном репликациясынан, вириондардың жиналуынан және жасушадан бүршіктену арқылы бөлінуінен тұрады. Репликация процесі цитоплазмада жүреді және жасушаның ядросын қамтымайды [18].

Құтырық вирусы сыртқы орта факторларына салыстырмалы түрде төзімсіз. Жоғары температура, ультракүлгін сәулелер және көптеген дезинфекциялаушы заттар әсерінен тез инактивацияланады. Сонымен қатар төмен температура мен глицерин жағдайында ұзақ уақыт сақтала алады, ал мұздатылған күйде белсенділігін бірнеше жыл бойы жоғалтпайды. Құтырық вирусы жоғары температураға сезімтал. 70°C-та дереу инактивацияланады, 60°C-та 5–10 минут ішінде, 50°C-та 60 минутта, 35°C-та 20–22 күнде, 23°C-та 28–53 күнде белсенділігін жоғалтады [19].

Салқын орта мен глицерин вирусты ұзақ сақтайды. Мұздатылған материалда вирус бірнеше жылдар бойы белсенді болып қалады. -40°C температурада тұрақты және дала штамдары кемінде 10 жыл бойы өзгеріссіз сақталады. Мида 4°C шамасында бірнеше ай бойы сақталады [20].

Ультракүлгін сәулелер вирусты 5-10 минут ішінде жояды. Формальдегидтің 1-5% ерітіндісі, хлорлы әк, тұз қышқылының 3–5% ерітіндісі, йодтың 5-7% ерітіндісі, 45-70% этил спирті және 1% сабын ерітіндісі вирусқа 5 минут ішінде инактивациялаушы әсер етеді. Күн сәулесі $5-60^{\circ}\text{C}$ температура диапазонында вирусты 5-7 күнде, $16-18^{\circ}\text{C}$ -та 3-4 күнде, 37°C -та 40 сағат ішінде жояды. Вирус бірнеше рет мұздату - еріту цикліне төзімді, рН 5–10 аралығында салыстырмалы тұрақтылық көрсетеді және лиофилизацияланған күйде жақсы сақталады [21, 22].

Вирусты өсіру үшін зертханалық жануарлар мен әртүрлі трансплантацияланған жасуша дақылдары қолданылады. Қазіргі уақытта құтырыққа қарсы вакциналар өндірісінде адам және жануар жасуша желілері кеңінен пайдаланылады, бұл жоғары иммуногенді және қауіпсіз препараттар алуға мүмкіндік береді [23, 24].

1.2 Әлемнің түрлі өңірлеріндегі құтырық жағдайы

1.2.1 Әлемде құтырық ауруының таралуы

Құтырық – жұқпалы вирустық ауру, қоздырғышы зақымдалған тері немесе шырышты қабаттар арқылы, негізінен тістеу кезінде сілекеймен тікелей жанасу нәтижесінде беріледі. Табиғи жағдайда вирус берілуінің негізгі жолы тістеу болып саналады. Вирустың сілекей бездерінде жиналып, сыртқы ортаға сілекей арқылы бөлінуі инфекцияның таралуына мүмкіндік береді [25].

Тері арқылы жұғу мүмкін емес, алайда теріде микрожарақаттар болған жағдайда вирус сілекеймен енуі мүмкін. Сонымен қатар көз, мұрын және ауыз қуысының шырышты қабаттары арқылы жұғу ықтималдығы эксперименттік және эпидемиологиялық деректермен расталған [26]. Трансплацентарлық берілу және көру нерві бойымен таралу мүмкіндігі сипатталғанымен, бұл жолдардың эпизоотологиялық маңызы мардымсыз.

Аэрогендік жолмен жұқтыру мүмкіндігі XX ғасырдың ортасында зертханалық жағдайда көрсетілген, алайда табиғи эпизоотиялық процесте бұл механизм жетекші рөл атқармайды [27].

Құтырық вирусының негізгі көзі – ауру жануарлар. Барлық сүтқоректілер вирусқа сезімтал болғанымен, табиғи резервуар және негізгі таратушы ретінде жыртқыш жануарлар мен иттер жетекші орын алады. Солтүстік жарты шарда құтырық көбіне орманды және орманды - дала аймақтарындағы жабайы жануарлар арасында таралса, оңтүстік өңірлерде қаңғыбас иттер популяциясы негізгі рөл атқарады [28].

Құтырық Австралия, Ұлыбритания, Ирландия, Жаңа Зеландия, Жапония және Антарктиданы қоспағанда, әлемнің барлық өңірлерінде тіркеледі. Жыл сайын бұл аурудан шамамен 50 мың адам және бір миллионға жуық жануар

өледі. Адам өлімінің басым бөлігі Азия құрлығында, әсіресе Үндістанда байқалады. Науқастардың елеулі үлесін балалар құрайды.

Құтырықтың географиялық таралуы жаһандық нозоареал ретінде сипатталады. Әлем халқының шамамен жартысы эндемиялық аймақтарда өмір сүреді. Өлім - жітімнің негізгі бөлігі ауылдық жерлерде тіркеледі, бұл профилактикалық вакцинацияның жеткіліксіздігімен және медициналық көмектің қолжетімділігінің төмендігімен байланысты [28, с. 3-104].

Еуропалық Одақ елдерінің көпшілігінде, сондай-ақ АҚШ, Канада, Австралия және бірқатар араб мемлекеттерінде құтырықтың эпизоотиялық деңгейі төмен. Жапония мен Жаңа Зеландияда ауру іс жүзінде жойылған. Батыс Еуропада құрлықтағы сүтқоректілер арасында құтырық дерлік жойылғанымен, Шығыс Еуропа мен Ресейдің еуропалық бөлігінде ауру эндемиялық деңгейде сақталып отыр.

Ресей Федерациясында XX ғасырдың соңында құтырық бойынша эпизоотиялық жағдайдың күрделенуі байқалды. Соңғы жылдары тіркелген жағдайлардың шамамен жартысы жабайы жануарларға, үштен бірі үй етқоректілеріне тиесілі, олардың ішінде иттердің үлесі басым. Вирус негізінен түлкілер мен жанаттәрізді иттерден бөлініп алынады [29].

Моңғолияда құтырық табиғи ошақтық инфекция ретінде түлкі, қасқыр және құм қасқыры популяцияларында тұрақты айналымда. 2005–2016 жылдары ауру ел аумағының барлық өңірлерінде тіркелгенімен, 1990 жылдан бері өлім - жітім деңгейі айтарлықтай төмендеген [30, 31].

Қытайда құтырық көптеген жануар түрлерінде кең таралған және жоғары эндемиялық ауру ретінде сипатталады. Адамдар арасындағы аурудың негізгі көзі – иттер, бұл елдегі құтырық эпидемиологиясында олардың шешуші рөлін көрсетеді. Кейбір Оңтүстік - Шығыс Азия елдерінде ресми статистика толық емес, алайда жекелеген мемлекеттерде жыл сайын жүздеген адамда құтырық тіркелетіні белгілі [32].

1.2.2 Қазақстандағы құтырық бойынша індеттік жағдай

Қазақстан аумағында құтырық ауруы алғаш рет 1914 жылы Торғай облысында тіркелген. Осы уақыттан бастап ауру жыл сайын анықталып келеді, соған байланысты республика аумағы құтырық бойынша эндемиялық аймақ ретінде бағаланады. Індет әсіресе Ресей, Қытай және Қырғызстанмен шекаралас солтүстік-батыс және оңтүстік-шығыс өңірлерде жиі байқалады. Бұл аймақтарда жыл сайын жануарлар арасында жүздеген құтырық жағдайы тіркеледі [3, р. 1079; 5, с. 138-142].

Құтырықпен ауырған жануарлардың құрылымында негізгі үлесті ауыл шаруашылығы жануарлары құрайды (62,8%), одан кейін үй етқоректілері - иттер мен мысықтар (19,7%), сондай-ақ жабайы етқоректілер - түлкі, қасқыр және шибөрі (16,8%). Бұл деректер аурудың табиғи резервуары ретінде жабайы жануарлардың, ал эпидемиологиялық тұрғыдан үй жануарларының маңызын көрсетеді [2, р. 1-14].

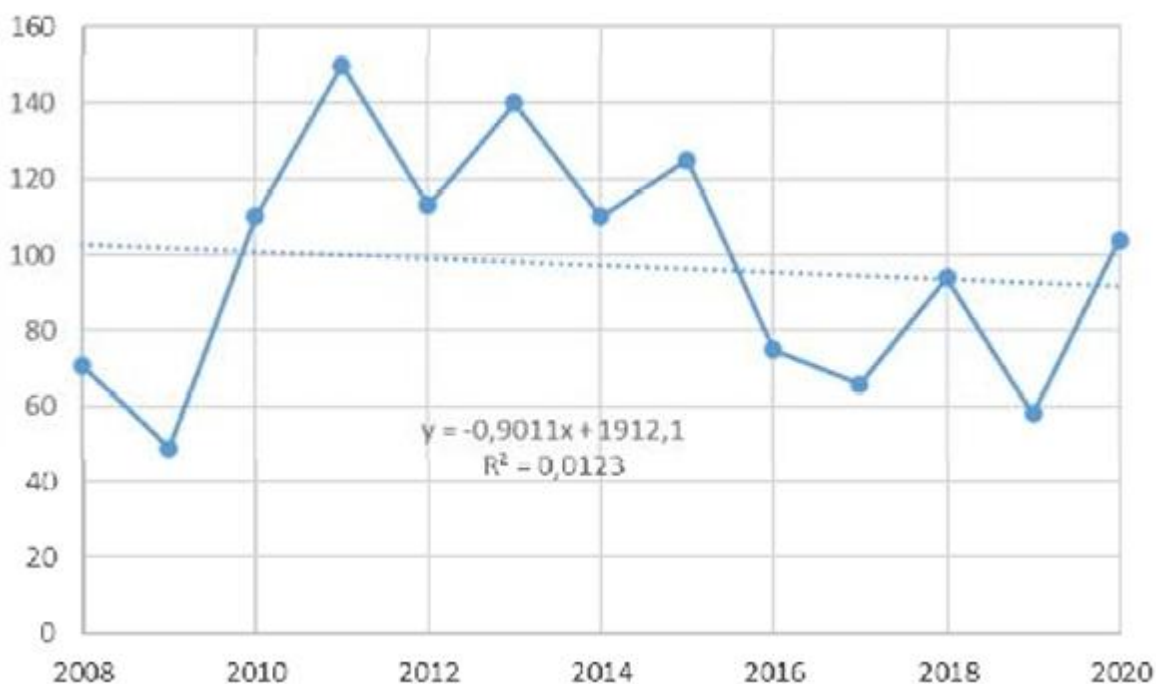
Дүниежүзілік денсаулық сақтау ұйымының мәліметтері бойынша, әлемде жыл сайын құтырықтан 35–50 мың адам қайтыс болады. Қазақстанда 2009–

2015 жылдар аралығында құтырық салдарынан 50 адамның өлімі тіркелген, бұл жылына орта есеппен 7,1 жағдайға сәйкес келеді [2, р. 1-14].

2008 жылдан 2020 жылға дейін жүргізілген эпизоотологиялық мониторинг жекелеген жылдары құтырудың стохастикалық көрінісін анықтады, ең жоғары көрсеткіштер 2010–2015 жылдар аралығында тіркелді: 2010 жылы 110 жағдай және 2015 жылы 141 жағдай. Одан кейін көрсеткіштер айтарлықтай төмендеп, 2016 жылы 68 жағдайға дейін азайды, алайда құтыру ауруын тіркеу бүгінгі күнге дейін жалғасуда, кезең-кезеңімен қайтадан көтерілу және төмендеу байқалады.

Бұрын байқалған үш жылдық секірістер жыл сайынғы динамикалық өзгерістермен ауысты және құтырудың көрінісі барған сайын болжап болмайтын және күтпеген сипат алуда, бұл профилактикалық іс-шаралар жүргізілгеніне қарамастан орын алуда.

Тиісінше, одан әрі болжау қиындай түсуде. Қазіргі уақытта 2020 жылдың қазан айына дейін эпизоотияның 111 жағдайға дейін кезекті көтерілуі байқалады, оған дейін 2019 жылы көрсеткіштердің 60 жағдайға дейін елеулі төмендеуі тіркелген (1-сурет) [33].



Сурет 1 – 2008–2020 жж. аралығындағы құтырудың көпжылдық уақыттық қатары

Ескерту – Әдебиет негізінде құралған [33, с. 133]

«Санитарлық - індеттік сараптама және мониторинг ғылыми-практикалық орталығы» жүргізген талдаулар республикада құтырық бойынша эпизоотологиялық жағдайдың күрделене түскенін көрсетті. 2014-2020 жылдары еліміздің жеті облысында 23 адам гидрофобиямен ауырған: Шығыс Қазақстан, Жамбыл, Қарағанды, Қостанай, Қызылорда, Павлодар және Оңтүстік Қазақстан облыстары. Инфекция көзі ретінде 19 жағдайда иттер, 2

жағдайда түлкі, 1 жағдайда қасқыр және 1 жағдайда мысық анықталған. Аталған жағдайлардың алтауында адамдарды өз иті тістеген, қалғанында жұғу қаңғыбас иттер арқылы болған.

2020 жылы Қазақстан Республикасының Ауыл шаруашылығы министрлігінің ресми ақпаратына сәйкес, Шығыс Қазақстан облысының Ұлан ауданындағы Привольное ауылында құтырықтан 11 бас ірі қара малдың қырылуы тіркелген. Осы кезеңде Павлодар облысында да эпизоотиялық жағдай күрделенді. Қыс мезгілінде қасқырлар мен түлкілердің елді мекендерге жақындауы нәтижесінде Баянауыл, Аққұлы, Ақсу аудандары мен Павлодар қаласында құтырық ошақтары анықталды. Егер 2019 жылы бес күдік жағдайының екеуі ғана расталса, 2020 жылдың басында 36 күдік тіркеліп, оның тоғызы зертханалық түрде дәлелденді [34].

Қазақстан аумағында құтырық бойынша қолайсыз пункттердің динамикасы 2010–2020 жылдар аралығында айқын ауытқулармен сипатталды (2-кесте). Ең жоғары көрсеткіштер 2010-2015 жылдары тіркелді: 2010 жылы - 110, 2011 жылы - 120, 2013 жылы - 140 ошақ. 2016 жылдан бастап ошақтар саны азайып, 2017 жылы 66 - ға дейін төмендеді. Алайда 2018 жылы қайта өсу байқалып, 94 ошақ тіркелді. 2019 жылы ең төмен көрсеткіш - 58 ошақ анықталса, 2020 жылы эпизоотиялық жағдай күрт нашарлап, ошақтар саны 130-ға жетті.

Кесте 2 - ҚР аумағында тіркелген жануарлардың жылдар бойынша құтырық ошақтарының үлес салмағы

Жылдар	ҚР бойынша құтырық ошақтарының саны	ҚР бойынша жұқпалы аурулардың жалпы саны	Жануарлардың құтырығының үлес салмағы, %
2010	110	395	27
2011	120	549	21,8
2012	113	423	26,7
2013	140	367	38,1
2014	110	349	31,5
2015	141	392	36
2016	78	324	24
2017	68	352	19,3
2018	95	347	27,3
2019	58	353	16,4
2020	130	330	40
Ескерту – Әдебиет негізінде құралған [35]			

Құтырық ошақтарының көп тіркелген жылдары жануарлардың сырқаттанушылық деңгейі де жоғары болды. Мәселен, 2013 жылы тіркелген 140 ошаққа байланысты 275 бас жануар, ал 2015 жылы 206 бас жануар құтырықпен ауырған (2-кесте).

2016–2019 жылдары құтырық ошақтарының азаюы профилактикалық шаралардың кеңеюімен және қаржыландыру көлемінің ұлғаюымен байланысты. 2015 жылы құтырыққа қарсы иммундеумен 3 510,2 мың бас

жануар қамтылса, 2016 жылы бұл көрсеткіш 5 972,6 мың басқа жетті. Осы кезеңде эпизоотияға қарсы іс-шараларды қаржыландыру көлемі де артты. 2018 жылы 7 777 379 теңге, ал 2019 жылы 9 370 924 теңге бөлінді.

Сонымен қатар климаттық факторлардың ықпалы да байқалады. «Қазгидромет» РМК деректеріне сәйкес, 2013 және 2015 жылдар Қазақстан аумағында ең жылы жылдар қатарына кірген. Дәл осы кезеңдерде құтырық бойынша қолайсыз пункттердің саны ең жоғары деңгейге жетті (3-кесте). Бұл ауа температурасының жоғарылауы жабайы жануарлардың белсенділігіне және вирустың табиғи айналымына әсер ететінін көрсетеді [35, с. 10-16].

Кесте 3 – ҚР-дағы құтырық бойынша қолайсыз пункттердің саны және орташа температураның ауытқуы (аномалиялар)

Жылдар	«+» t ауытқулары, °C	Қолайсыз індет ошақтарының саны
2010	- 0,5	110
2011	0	124
2012	- 0,4	113
2013	1,9	140
2014	- 0,2	110
2015	1,66	125
2016	1,49	78
2017	0,8	68
2018	- 0,2	95
2019	1,55	58

2020–2023 жылдар аралығындағы құтырық жағдайларының ресми халықаралық деректері *WAHIS* жүйесі бойынша жинақталған. Бұл мәліметтер Қазақстан аумағында тіркелген нақты ошақтарды, жануар түрлері бойынша таралуын және аурудың аяқталу мәртебесін сипаттайды (4-кесте). Аталған деректердің кеңістіктік және уақыттық таралуы 1-суретте көрсетілген [35, с. 12-13].

Қазақстандағы құтыру ауруы көпжылдық проблема болып табылады және ел экономикасына елеулі шығын келтіреді. Қазіргі экономикалық даму жағдайында инфекцияның таралуының заманауи ерекшеліктеріне сәйкес оны жою бойынша ғылыми негізделген стратегиялық шараларды қабылдау маңызды. Кабжанова А.М. зерттеу нәтижелері бойынша, құтыру ошақтарының елдің 4 облысында (Шығыс Қазақстан, Жамбыл, Батыс Қазақстан және Түркістан облыстары) басым екені анықталды, атап айтқанда, жалпы ошақтардың 58%-ы осы әкімшілік аумақтарға тиесілі. Түрлік көріністе ауру көп жағдайда ауыл шаруашылығы және үй жануарлары арасында тіркелген, алайда 2020–2021 жылдары құтырудың жабайы жануарлар арасында тіркелу санының артуы байқалды. Құтырудың қазіргі эпизоотиясының ерекшеліктеріне бұрын қолайлы болып саналған Павлодар және Солтүстік Қазақстан облыстары аумақтарында жаңа ошақтардың пайда болуын да жатқызуға болады.

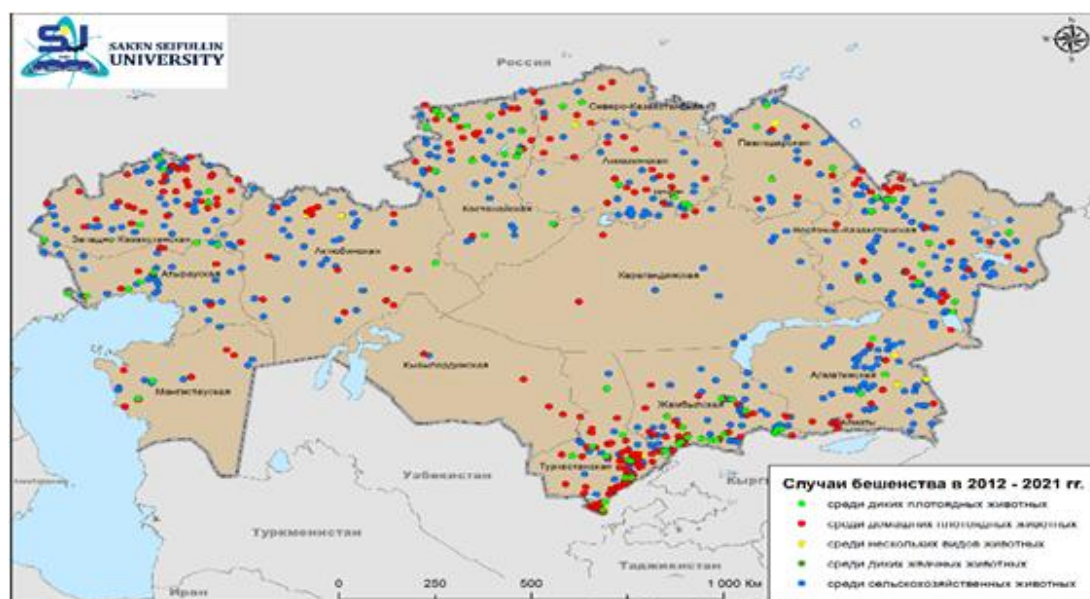
Құтыру ошақтарының аумақтық таралу ерекшеліктері негізінен құтыру ошақтарының Шығыс Қазақстан облысында тіркелуімен сипатталады, мұнда

209 құтыру ошағы тіркелген, Түркістан облысында (2019 жылға дейін – Оңтүстік Қазақстан облысы) – 125 ошақ және Шымкент қаласында 8 ошақ, Жамбыл облысында – 128 ошақ (оның 111-і 2013–2017 жылдар аралығына тиесілі), Батыс Қазақстан облысында – 111 ошақ тіркелген. Жалпы алғанда, аталған 4 облыс осы кезеңдегі барлық тіркелген ошақтардың 58 %-ын құрайды. Қызылорда облысы құтыру бойынша ең қолайлы аймақ болып табылады, мұнда бүкіл кезең ішінде (2012-2021) барлығы 6 ошақ тіркелген, оның 4-і 2020 жылға тиесілі.

Жануарлар арасындағы аурушандықтың түрлік құрылымын бағалау келесі ерекшеліктерді анықтады: Қазақстанның оңтүстік облыстарында (Түркістан, Қызылорда, Жамбыл, Алматы облыстары) үй етқоректілері арасында ошақтардың басымдылығы байқалды, мұнда үй етқоректілері арасында құтырудың 192 жағдайы тіркелген, ал елдің батыс, солтүстік және шығыс облыстарында эпизоотиялық процеске тартылған үй жануарларының саны тиісінше 80, 54 және 48 басты құрады.

Шығыс Қазақстан облысында ауыл шаруашылығы жануарлары арасында құтыру аурушандығының жоғары көрсеткіші атап өтілуі қажет, бұл облысқа құтырумен ауырған барлық жануарлардың 22,1%-ы (287 бас) тиесілі. Жабайы жануарлар арасында құтыру көбіне Қазақстанның батыс өңірінде тіркелген, мұнда 45 зерттелген жабайы жануардың 16-сы (жалпы санының 35%-ы) анықталған.

Айта кету керек, 2021 жылы Қазақстанның солтүстігінде (Қостанай, Ақмола, Солтүстік Қазақстан және Павлодар облыстары) жабайы жануарлар арасында құтыру жағдайларының едәуір өсуі байқалды – 7 ошақ, ал 2012–2020 жылдары жабайы етқоректілер арасында жалпы 4 ошақ қана тіркелген (2-сурет).



Сурет 2 – 2012–2021 жылдар аралығындағы құтыру ошақтарының таралу картасы

Ескерту – Әдебиет негізінде құралған [36]

Құтыру Қазақстанда қоғамдық денсаулық сақтау саласындағы күрделі мәселе болып табылады. 2010–2017 жылдар аралығында тіркелген адам өлімдерінің саны мен 2020 жылы тіркелген халық саны ескеріле отырып есептелген жинақталған өлім-жітім көрсеткіші бойынша, құтырудан болған өлім Қазақстанда ($n=38$; 1 миллион тұрғынға шаққанда 2) көршілес елдерге қарағанда жоғары деп есептелді, мысалы, Өзбекстанда (өлім тіркелмеген), Қырғызстанда ($n=12$; 1 миллионға 1,8), Түрікменстанда ($n=1$; 1 миллионға 0,2) және Ресей Федерациясында ($n=51$; 1 миллионға 0,3), Қытайды қоспағанда ($n=9\ 197$ өлім, 1 миллионға 6,6). Алайда, өкінішке орай, 2018–2021 жылдар аралығында Қазақстанда адам өлімі тіркелмеген (11). 1996–2004 жылдар аралығында Қазақстанда тіркелген жануарлар арасындағы жағдайлардың көпшілігі (725/1 119) ірі қара малға тиесілі болды, бұл ауқымды экономикалық шығындарға әкелді. Дегенмен, түр аралық берілуге байланысты тек үй жануарларына бағытталған алдын алу шаралары құтыруды толық жоюға және адам популяциясын қорғауға жеткіліксіз болып табылады, соның салдарынан елдің әртүрлі бөліктері ауруға осал күйінде қалып отыр. Қазақстанда ауруды бақылау мақсатында қабылданған негізгі шараларға індет өршуі кезінде және аурудың таралу қаупі бар аймақтарда жабайы жануарларды стратегиялық ауызша вакцинациялау; бейім үй жануарларын міндетті және профилактикалық вакцинациялау; сезімтал үй жануарларын тіркеу; халықты ақпараттандыру және ағарту жұмыстары жатады. Вакцинация науқанының ерекшеліктері, оның ішінде қолданылатын вакцина дозаларының саны мен вакцина түрі, сезімтал мал басының жалпы санына және ауданның эпидемиологиялық жағдайына байланысты анықталады. Қысқаша айтқанда, барлық сезімтал мал, иттер мен мысықтар вакцинацияланады, ал жоғары қауіп аймақтарында жабайы жануарларға арналған ауызша вакцина таратылады; орташа, төмен немесе елеусіз қауіп санатына жатқызылған аудандарда вакцинация және эпидемиологиялық қадағалау шаралары іріктеп қолданылады.

Ауруды бақылау бойынша жүргізіліп жатқан шараларға қарамастан, құтыру Қазақстанда әлі де эндемиялық болып қалып отыр. Елде ауруды бақылаудың шектеулі тиімділігін түсіндіретін себептерге, мысалы, сезімтал популяцияның орналасуын және санын анықтауға байланысты қиындықтар (бұл вакцинацияның толық қамтылмауына әкелуі мүмкін), бақылау шараларын іске асырудағы шектеулер (індет ошақтарын диагностикалау және жою бойынша мемлекеттік қызметтердің іс-қимылын үйлестіру 7 күнге дейін созылуы мүмкін), анықтау және ақпараттық қателіктердің ықпалы, сондай-ақ эпидемиологиялық қадағалаудың, әсіресе жабайы жануарлар арасында, шектеулі болуы жатады [37].

WAHIS деректері бойынша (4-кесте, 3-сурет), 2020 – 2023 жылдары құтырық жағдайлары негізінен Павлодар, Қостанай және Қарағанды облыстарында тіркелген. Ошақтарда ірі қара мал негізгі зақымданған түр болып табылады, алайда иттер, мысықтар, қой - ешкі және жекелеген жағдайларда жабайы жыртқыштар да тіркелген. Бұл деректер құтырық вирусының әртүрлі жануарлар популяциясы арасында бір мезгілде айналымда екенін көрсетеді.

Кесте 4 – 2020–2023 жылдары Қазақстан аумағында тіркелген құтырық ошақтарының жинақталған сипаттамасы (WAHIS деректері бойынша)

Жылдар	Облыс	Аудан	Негізгі зақымданған жануарлар	Бейім жануарлар саны	Өлім жағдайлары	Оң нәтижелер
2020	Павлодар	Баянауыл	Ірі қара мал, ит, мысық	73	1	1
2023	Павлодар	Майский	Ірі қара мал, ит, мысық, қой/ешкі	136	1	1
2023	Павлодар	Ақтоғай	Ірі қара мал, ит, жылқы, қой/ешкі	707	1	1
2023	Павлодар	Железин	Ірі қара мал, ит, мысық, қой/ешкі	61	1	1
2023	Қостанай	Ұзынкөл	Ірі қара мал	583	1	1
2023	Қарағанды	Қарқаралы	Ірі қара мал, ит, мысық, жылқы, қой/ешкі, қасқыр	4 642	1*	1
<i>Барлығы</i>				<i>6 202</i>	<i>6</i>	<i>6</i>

Бұл 4-кесте 2020 жылдан 2023 жылға дейін Қазақстан аумағында тіркелген құтырық вирусы жағдайлары туралы ақпаратты қамтиды.

Country	Report number	Disease	Genotype/ Serotype/ Subtype	Reason	Start date	Report date
 Kazakhstan	FUR_1	Rabies virus (Inf. with)	RABV	First occurrence in a zone or a compartment	2023/12/25	2024/11/01
 Kazakhstan	FUR_1	Rabies virus (Inf. with)	RABV	Recurrence of an eradicated disease	2023/10/03	2024/02/20
 Kazakhstan	FUR_3	Rabies virus (Inf. with)	RABV	Recurrence of an eradicated disease	2023/01/09	2023/06/05
 Kazakhstan	FUR_2	Rabies virus (Inf. with)	RABV	First occurrence in a zone or a compartment	2020/05/06	2020/10/26

Сурет 3 – 2020–2023 жылдары Қазақстан аумағында тіркелген құтырық ошақтарының жинақталған сипаттамасы (WAHIS деректері бойынша)

Жалпы алғанда, соңғы жылдардағы деректер құтырықтың таралу бағытының оңтүстіктен солтүстікке қарай ығысуын айқын көрсетеді. Бұрын салыстырмалы түрде қолайлы саналған орталық және солтүстік өңірлерде індеттің тіркелуі бұл аймақтарда эпизоотологиялық бақылауды күшейту қажеттігін дәлелдейді.

1.3 Құтырық кезіндегі патогенез, клиникалық белгілер және патологиялық-анатомиялық өзгерістер

Құтырық вирусының патогенезі бірнеше кезеңмен сипатталады:

Бірінші кезең – вирусының ағзаға енуі. Құтырық вирусы көбіне ауру жануардың тістеуі кезінде зақымдалған тері арқылы немесе сілекеймен жанасқан шырышты қабықтар арқылы ағзаға енеді. Аэрогендік жолмен жұғу мүмкіндігі әдеби деректерде көрсетілгенімен, ветеринариялық практикада бұл жолмен инфекцияның таралуы өте сирек тіркеледі. Жарқанаттарда вирус

сілекеймен, сүтпен және зәрмен бөлініп, жабық кеңістіктерде ұзақ уақыт болған жағдайда адамдар мен жануарларға жұғуы мүмкін.

Екінші кезең – орталық жүйке жүйесіне центрипеталды таралу. Жүйке жүйесінен тыс тіндерде вирустың репликациясы баяу жүреді, ал нейрондарда айқын белсенділік байқалады. Вирус жүйке ұштарындағы ацетилхолин рецепторларына адсорбцияланып, эндоцитоз арқылы нейрон ішіне енеді. Одан кейін инфекция ошағынан орталыққа қарай ретроградтық аксональды тасымал механизмі арқылы таралады. Бұл процесс тәулігіне бірнеше миллиметр жылдамдықпен жүреді және пассивті диффузиямен емес, белсенді тасымалмен жүзеге асады. Қозғалтқыш талшықтар арқылы вирус вентральды және бас сүйек ганглийлерін зақымдап, орталық жүйке жүйесіне жетеді. Құтырық вирусының бастапқы репликациясы нейрондарда өтетіні дәлелденген [38].

Үшінші кезең – орталық жүйке жүйесі ішіндегі таралу. Вирус жоғары дәрежеде сараланған нейрондардың цитоплазмасында көбейеді. Дендриттерде рибосомалардың шоғырлануына байланысты вириондардың жинақталуы айқынырақ байқалады, ал аксондарда бұл құрылымдар болмағандықтан, репликация шектеулі жүреді. Репликациядан кейін вирус постсинаптикалық мембранада бүршіктеніп, көрші нейрондарға дендро - аксональды жолмен беріледі. Орталық жүйке жүйесі бойымен таралуда жасуша ішіндегі вирус бөлшектері негізгі рөл атқарады, ал бос вириондардың маңызы төмен. Цереброспинальды сұйықтықта вирус, әдетте, аурудың соңғы кезеңдерінде ғана анықталады [38, с. 4-134].

Вирус ми, мишық, гиппокамп және ми қыртысының сұр затында басым шоғырланады. Гистологиялық тұрғыдан зақымданған нейрондарда рибонуклеопротеиннің жинақталуын көрсететін Бабеш – Негри денешіктері анықталады.

Төртінші кезең – перифериялық мүшелерге центрифугалық таралу. Вирус орталық жүйке жүйесінен периферияға антероградтық аксональды тасымал арқылы өтеді. Бұл кезеңде вирустық ақуыздар мен вириондар әртүрлі тіндерге таралып, жасушаларды зақымдайды. Сілекей бездерінде, әсіресе субмандибулярлы бездерде вирус концентрациясы аурудың соңғы сатысында ең жоғары деңгейге жетеді. Сонымен қатар вирус теріде, асқазан - ішек эпителийінде, бүйрек пен бүйрекүсті бездерінде, көз жасы және ұйқы бездерінде, бұлшықет талшықтары мен миокардта анықталады [38, с. 14-86].

Құтырық вирусының негізінен жасуша ішінде сақталуына байланысты иммундық жүйе оны дер кезінде бейтараптай алмайды, сондықтан антирабиялық иммунитеттің қалыптасуы кешігіп жүреді [38, с. 14-86].

Клиникалық белгілері. Құтырықтың клиникалық көрінісі вирустың вируленттілігіне, жануар түрі мен жасына, ағзаның жалпы сезімталдығына және инфекция қақпасының орналасуына тәуелді [38, с. 14-86]. Инкубациялық кезең бірнеше күннен бір жылға дейін созылады, ал жас жануарларда ол әдетте қысқа болады.

Клиникалық ағымына қарай құтырық қарқынды және тыныш (сал) түрлерге бөлінеді. Типтік емес жағдайларда бұлшықет атрофиясы, паралич және геморрагиялық гастроэнтерит белгілері байқалуы мүмкін [38, с. 14-86].

Қарқынды формада жануарларда айқын қозу байқалады. Агрессия, бағдарсыз қозғалу, қорғаныш реакцияларының әлсіреуі және адамдар мен жануарларға себепсіз шабуыл жасау тіркеледі. Бұл белгілер ірі қара малда, иттер мен қасқырларда жиі кездеседі. Кей жағдайларда мінез - құлық инстинкттерінің жоғалуы және дромомания байқалады.

Депрессиялық компонент басым түрлерінде қозғалыс белсенділігінің төмендеуі, ашушандық, фотофобия және гидрофобия байқалады [38, с. 14-86]. Қарқынды форманың дамуы продромальды, қозу және паралитикалық кезеңдерге бөлінеді. Соңғы кезеңде тыныс алу орталығының салдануы өлімге әкеледі.

Тыныш форма сілекейдің мол бөлінуімен, тыныс алудың қиындауымен және бұлшықет параличінің біртіндеп дамуы арқылы сипатталады [38, с. 14-86].

Патологиялық-анатомиялық өзгерістер. Құтырық кезінде патологиялық-анатомиялық өзгерістер көбіне айқын емес және спецификалық сипатта болмайды, сондықтан оларды дербес диагностикалық белгі ретінде қолдану шектеулі [38, с. 14-86]. Өлген жануарларда жалпы әлсіреу, сілекеймен ылғалданған жүн, кейде тістелу іздері байқалады. Ішкі тексеру кезінде шырышты қабаттардың цианозы, іш қуысына ұсақ қан құйылулар және ағзаның сарқылуы анықталады. Асқазанда жеуге жарамсыз бөгде заттар жиі кездеседі. Асқазан - ішек жолдарының кілегей қабығы гиперемияланған, кей жерлерінде қан құйылу ошақтары бар. Бас және жұлын миында ісіну мен гиперемия анықталады, ал иммундық жүйе мүшелерінде қабынуға тән морфологиялық өзгерістер байқалады [38, с. 3-134; 39, 40].

1.4 Құтырық ауруын зертханалық балау әдістері

Құтырық ауруын зертханалық диагностикалауда үш негізгі әдіс қолданылады. Құтырық вирусының антигенін анықтау, вирусты оқшаулау және вирус геномының фрагменттерін анықтау.

Зертханалық зерттеудің сенімділігі патологиялық материалды дұрыс іріктеу мен оны зертханаға уақтылы жеткізуге тікелей байланысты. Алынған материал ылғал өткізбейтін ыдыстарға салынып, металл контейнерлерге орналастырылады және мүмкіндігінше қысқа мерзімде зертханаға жөнелтіледі.

Құтырық вирусының антигенін анықтауда иммунофлуоресценция реакциясы (ИФР) кеңінен қолданылады. Бұл әдіс құтырық диагностикасындағы негізгі әдіс ретінде қабылданған және флуоресцентті антиденелер әдісі (МФА) деп те аталады. Әдістің негізінде флуорохроммен таңбаланған антиденелердің вирус антигенімен спецификалық байланысуы және түзілген «антиген–антидене» кешендерінің люминесцентті микроскопта жарқырап көрінуі жатыр.

Зерттеу материалы ретінде көбіне ми тіні пайдаланылады. Сонымен қатар құтырық вирусының антигенін көздің мөлдір қабығында, тері препараттарында және сілекей бездерінде анықтауға болады. Материалды дайындау және ИФР жүргізу қолданыстағы әдістемелік нұсқаулықтарға сәйкес жүзеге асырылады.

Флуоресцентті антирабиялық глобулинмен боялған жағынды - іздер люминесцентті микроскопта, әдетте иммерсиялық ұлғаюда зерттеледі. Иммерсия үшін флуоресцентті емес сұйықтық пайдаланылады. Құтырық

вирусының антигені ашық сарғыш - жасыл түсті, әртүрлі пішіндегі түйіршіктер ретінде көрінеді, олардың диаметрі 15–20 мкм-ге дейін жетуі мүмкін.

Егер көру өрісінде қарқындылығы 3–4 крест деңгейіндегі типтік түйіршіктер кемінде он бірлікте анықталса, нәтиже оң деп бағаланып, «құтырық» диагнозы қойылады. Теріс бақылау препараттарында мұндай түзілімдер анықталмауы тиіс [41-43].

Құтырық вирусын оқшаулау үшін ақ тышқандарда қойылатын биологиялық сынақ әдісі қолданылады. Бұл тәсілді алғаш рет 1935 жылы L.T. Webster мен O.R. Dawson ұсынған. Әдіс патологиялық материалды ақ тышқандарға егуге және жануарларда ауру белгілерінің дамуын немесе өлім - жітімді бақылауға негізделген. Биологиялық сынаманың нәтижелері міндетті түрде МФА әдісімен немесе өлген тышқандардың ми тінінен Бабеш–Негри денешіктерін анықтау арқылы расталады [44].

Қазіргі уақытта құтырық вирусын оқшаулауда жасуша культуралары кеңінен пайдаланылады. Әртүрлі жасуша өсірінділерінің ішінде тышқан нейробластомасы жасушалары (MNA, N - 2a) құтырық вирусына жоғары сезімталдығымен ерекшеленеді және McCoy, CER, BHK - 21 және A - 71 жасуша линияларымен салыстырғанда тиімділігі жоғары екені көрсетілген. Осыған байланысты далалық құтырық вирусын бөліп алу үшін нейробластома жасушалары жиі қолданылады [45].

Құтырық вирусының антигенін анықтауда қатты фазалы имуноферменттік талдау (ҚФ - ИФТ) да қолданылуы мүмкін. Үлгілер саны көп болған жағдайда ИФТ экономикалық тұрғыдан тиімді болғанымен, әдістің нәтижесіне зерттелетін материалдың сапасы айтарлықтай әсер етеді. Осы себепті бірқатар зерттеулерде ИФР әдісі сенімдірек деп көрсетіледі [46, 47].

Құтырық вирусының геномдық фрагменттерін анықтауда кері транскрипциялық полимеразды тізбекті реакция (КТ - ПТР) негізгі молекулалық әдістердің бірі болып табылады. Әдіс екі кезеңнен тұрады: алдымен кері транскриптаза ферментінің көмегімен РНҚ матрицасынан комплементарлы ДНҚ синтезделеді, кейін термостабильді ДНҚ - полимераза және арнайы праймерлер арқылы нысаналы геномдық аймақ амплификацияланады. Денатурация, праймерлердің байланысуы және тізбектің ұзаруы сатылары 30–35 цикл бойы қайталанады. Нәтижесінде вирус геномының белгілі бір бөлігі қысқа уақыт ішінде миллиондаған есеге көбейтіледі. КТ - ПТР әдісі құтырық вирусының РНҚ-сын бірнеше сағат ішінде анықтауға және әртүрлі жануарлардан алынған изоляттарды салыстырмалы талдауға мүмкіндік береді [48, 49].

Антирабикалық вакциналардың тиімділігін бағалау үшін вакцинацияланған жануарлардың қан сарысуындағы вирусты бейтараптандыратын антиденелердің деңгейі анықталады. Қорғаныш деңгейі ретінде 0,5 МЕ/мл көрсеткіші қабылданған. Дүниежүзілік жануарлар денсаулығы ұйымы ұсынатын негізгі әдіс - жасуша өсінділерінде жүргізілетін бейтараптандыру реакциясы.

Бұл реакцияның бірнеше нұсқасы қолданылады:

- флуоресцентті антиденелермен вирусты бейтараптандыру әдісі – тірі жануарларда антидене деңгейін бағалауға қолайлы;
- флуоресценция фокустарының тез тежелуін талдау (RFFIT) – гемолизі немесе контаминациясы бар үлгілер үшін бейімделген;
- 72 ұяшықты микропланшеттерде жүргізілетін микробейтараптандыру әдісі – сапасы төмен немесе мәйіт сұйықтығы бар материалдарды зерттеуге мүмкіндік береді [38, с. 3-134].

Нуклеотидтік секвенирлеу және филогенетикалық талдау вирус геномының фрагменттері немесе толық тізбегі алынғаннан кейін жүргізіледі. Бұл талдау вирустық изоляттарды топтастыруға, далалық және вакцина штамдарын ажыратуға, сондай-ақ олардың географиялық таралу ерекшеліктерін бағалауға мүмкіндік береді. Құтырық вирусында филогенетикалық талдау үшін көбіне N, G және толық геном аймақтары пайдаланылады [29, с. 4-186; 50].

1.5 Құтырықтың алдын алу және оған қарсы күрес шаралары

Құтырық – көптеген аймақтарда ұзақ эволюциялық даму нәтижесінде қалыптасқан жұқпалы аурулардың табиғи - ошақтық жүйесін сипаттайтын классикалық үлгі. Бұл жүйеде қоздырушы ретінде құтырық вирусы, ал негізгі резервуар және тасымалдаушы ретінде жабайы және үй жануарлары, сондай - ақ ауыл шаруашылығы малдары қатысады. Кей жағдайларда аурудың берілу тізбегіне адам да енеді [51].

Иттер популяциясында құтырық вирусын жоюға бағытталған шаралар кешенінде антирабиялық вакцинация негізгі рөл атқарады. Сонымен қатар, популяция тығыздығын реттеу мақсатында иммундық контрацепция әдістерін қолдану болашақта қосымша құрал ретінде қарастырылуы мүмкін.

Түлкі құтырығының табиғи ошағы туралы қалыптасқан түсінікке сәйкес, қазіргі жағдайда індеттік процесті тиімді басқарудың басты бағыты – қоздырушының негізгі иелері болып табылатын түрлердің санын және популяция тығыздығын биологиялық тұрғыдан қауіпсіз деңгейде ұстап тұру. Популяция санының шамадан тыс төмендеуі (шамамен 0,1 бас/км²-ден аз) түрдің ұзақ мерзімді сақталуына қауіп төндіретіндіктен, бұл тәсіл ғылыми негізделген есептеуді талап етеді [52].

Батыс Еуропа елдерінде жабайы жыртқыштарды ауыз арқылы иммундеу тәжірибесі бұл әдістің тиімділігі бірқатар нақты талаптарды орындауға тәуелді екенін көрсетті. Оларға сыртқы ортада тұрақты вакциналық штамдарды пайдалану, нысаналы түрлер үшін жоғары иммуногенділік пен тартымдылық, басқа жануарлар үшін қауіпсіздік, биомаркердің болуы, вакцинацияны ғылыми негізде жоспарлау, маусымдық ерекшеліктерді ескеру, аумақты толық қамту, авиациялық тарату тәсілдерін қолдану, көктем–күз кезеңдерінде бірнеше мәрте вакцинация жүргізу, сондай-ақ иммундық жағдайды бағалау үшін эпизоотологиялық мониторингті қамтамасыз ету жатады.

Қазақстан жағдайында мұндай шараларды іске асыру қатаң бақылауды және алынған нәтижелерді жүйелі талдауды қажет етеді. Жекелеген аймақтарда оральді вакциналардың жеткіліксіз қолданылуы жабайы жануарлар

популяциясын қосымша реттеу қажеттігін туындататыны белгілі. Мемлекеттік қаржыландыру көлемі шектеулі кезеңдерде профилактикалық шаралардың тиімділігін арттыру мақсатында ресурстарды оңтайлы бөлу маңызды. Бұл, ең алдымен, үй етқоректілерін вакцинациялау сапасын бақылауға, қаңғыбас жануарлар санын азайтуға және ірі елді мекендер маңында буферлік вакцинация аймақтарын құруға қатысты.

Құтырықты зертханалық диагностикалау әдістері жеткілікті болғанымен, олардың барлығы республика аумағында біркелкі қолданылмайды. Кейбір өңірлерде иттер арасындағы эпизоотиялық жағдайдың тұрақсыз сақталуы профилактикалық шаралардың тиімділігін қайта бағалауды талап етеді. Осыған байланысты мониторингті күшейту, күрес бағдарламаларын жетілдіру, диагностикалық зерттеулердің сапасын арттыру және қолданылатын вакциналардың иммуногенділігін тұрақты бақылау өзекті міндет болып табылады.

Жануарлардың құтырығына қарсы іс - шаралар жүйесі індеттік тізбектің барлық буындарын қамтуы тиіс: қоздырушының көзі, берілу механизмі және сезімтал жануарлар. Құтырықтың қолайлы аймақтарға әкелінуін болдырмау мақсатында жаңадан әкелінген жануарларға карантин белгілеу міндетті болып табылады. Иттер мен мысықтар, сондай - ақ хайуанаттар парктері мен жабайы фауна объектілерінде ұстайтын жануарлар ерекше бақылауға алынады [53].

Қазақстан аумағындағы барлық елді мекендерде иттер мен мысықтар тіркелген антирабиялық вакциналарды қолдану жөніндегі нұсқаулықтарға сәйкес міндетті профилактикалық вакцинациялауға жатады. Ауыл шаруашылығы жануарларының, иттердің немесе мысықтардың тістеу жағдайлары тіркелген кезде бұл туралы ветеринариялық қызметке дереу хабарлау қажет. Құтырыққа күдік туындаған жануарларды сенімді түрде оқшаулау және бақылау шараларын жүргізу аурудың әрі қарай таралуын болдырмаудың негізгі шарты болып табылады [29, с. 4-440].

1.5.1 Құтырыққа қарсы вакциналардың эволюциясы және вакциналық штамдар

Құтырық ауруының алдын алу тарихында XIX ғасырдың соңына дейінгі кезең антирабиялық вакциналар пайда болғанға дейінгі уақытпен сипатталады. Бұл кезеңде ауруды емдеу және алдын алу шаралары негізінен эмпирикалық сипатта болды. Жараларды күйдіру, химиялық заттармен өңдеу, жануар тіндерінен алынған әртүрлі экстракттарды қолдану сияқты тәсілдер кең таралған. Сонымен қатар, аурудың дамуын тежеуге бағытталған алғашқы профилактикалық талпыныстар да осы кезеңде байқалады [54].

XVIII ғасырда Италияда Eusebio Valli құтырықпен ауырған адамдар мен жануарларды алдын ала өңделген сілекей арқылы «егу» тәжірибесін жүргізгені туралы деректер кездеседі. Бұл тәжірибелер ғылыми тұрғыдан дәлелденбегенімен, құтырыққа қарсы ерекше профилактика жасауға деген алғашқы ұмтылыстардың бірі ретінде қарастырылады.

Антирабиялық вакциналардың ғылыми негізделген даму кезеңі 1885 жылдан басталады. Луи Пастер құтырық вирусын әлсірету арқылы алғашқы

тиімді вакцинаны әзірледі. Осы кезеңнен бастап 1970-жылдардың ортасына дейін антирабиялық вакциналар негізінен жануарлардың жүйке тіндерінен дайындалды. Алдымен қоянның, кейін қойдың, одан соң тышқанның ми тіндері пайдаланылды [54, р. 5-1-5-20; 55].

Құтырық вирусын жасушалық жүйелерде өсіру мүмкіндігі туралы алғашқы нақты деректер 1913 жылы Ногучи мен Левадитидің еңбектерінде жарияланды. Олар жануар жүйке тіндерінің өсірілген фрагменттерінде вирус ұзақ уақыт сақталатынын және көбейетінін көрсетті. Кейінгі зерттеулерде құтырық вирусының тек эмбриондық ми жасушаларында ғана емес, әртүрлі ісік жасушаларында да тиімді репликацияланатыны анықталды [56, 57].

1956 жылы Vieuchange алғаш рет тышқан бүйрегі жасушаларының бастапқы дақылдарының құтырық вирусына сезімтал екенін дәлелдеді. 1958 жылы *Kissling* теңіз шошқасының бүйрек жасушаларының бастапқы культураларында құтырық вирусының изоляттары мен тұрақты штамдарының сәтті сериялық өтуі мүмкін екенін көрсетті. Бұл деректер құтырық вирусын жасуша өсінділерінде культивациялау бағытындағы зерттеулердің кеңеюіне негіз қалады [58, 59].

1963 жылы жасуша өсінділерінде алынған вирус массасын вакцина өндірісінде қолдануға болатындығы дәлелденді. 1965–1969 жылдары маймыл, ит және шошқа бүйрегі жасушаларында, тауық пен үйрек эмбриондарының фибробласттарында, сондай-ақ *BHK - 21* және *Vero* сияқты тұрақты жасуша желілерінде құтырық вирусын кең көлемде өсіру мүмкіндігі толықтай расталды [60-63].

Алғаш рет 1882 жылы құтырған сиырдан бөлініп алынған Пастердің «*PV*» штамы әртүрлі жануар түрлерінде көп реттік пассаж жасау арқылы тұрақтандырылды. Иттерде инкубациялық кезең қысқарғанымен, қояндарда вирус жоғары вирулентті қасиетін сақтаған. Осылайша алынған штамм «тіркелген вирус» (*virus fixe*) деп аталып, кейін Луи Пастер тарапынан ғылыми зерттеулер мен вакцина дайындауда пайдаланылды. 1885 жылы бұл штамм негізінде алғашқы антирабиялық вакцина қолданылды [19, р. 12273; 64, 65].

1885 жылдың 2 мамырында Roux және Pasteur дәрігерлері адамға алғаш рет құтырықтан өлген қоянның эксикаторда кептірілген жұлын материалынан дайындалған препаратты енгізді. Осы оқиғадан кейін Пастер зертханасына Еуропаның әртүрлі елдерінен, сондай-ақ Ресей мен АҚШ-тан науқастар ағыла бастады. Кейіннен әлемнің көптеген елдерінде Пастер станциялары мен антирабиялық институттар құрылды [66].

Алайда жүйке тініне негізделген вакциналардың елеулі кемшіліктері анықталды. Вакцина құрамында жануар жүйке тіндерінің қалдықтарының болуы аллергиялық реакциялар мен поствакциналық энцефалиттің даму қаупін арттырды. Осыған байланысты жүйке тінін пайдаланбай, құтырық вирусын *in vitro* жағдайында культивациялау қажеттілігі туындады.

1946 жылы Копровски тауық эмбриондарын пайдалану арқылы құтырық вирусын өсіру әдісін ұсынды. Бұл тәжірибелерде Джонсон бөліп алған және бір күндік балапандарға бейімделген Flury штамы қолданылды. Кейіннен бұл бағыт жүйке тінінен толық бас тартуға мүмкіндік берді [67-68].

1975 жылдан бастап культуралық инактивацияланған вакциналар кеңінен енгізіліп, антирабиялық иммуноглобулинмен бірге қолданылатын Эссен схемасы клиникалық практикада орнықты. Бұл кезең антирабиялық профилактиканың сапалы жаңа деңгейге көтерілгенін көрсетті [69].

Вакцинациядан кейінгі иммунитеттің қалыптасуы вирусқа қарсы бейтараптаушы антиденелердің түзілуімен, жұқтырылған жасушаларды жоятын цитотоксикалық Т - лимфоциттердің белсенуімен және Т - хелпер жасушалары арқылы гамма - интерферон өндірілуінің күшеюімен байланысты. Осыған байланысты вакциналық штамды және адьювантты дұрыс таңдау ұзақ мерзімді әрі жеткілікті деңгейдегі антирабиялық иммунитет қалыптастырудың негізгі шарттарының бірі болып табылады.

Қазіргі уақытта тірі антирабиялық вакциналар негізінен жабайы жануарларды иммундеу мақсатында қолданылады. Бұрын қолданылған жыртқыштарды жоюға бағытталған депопуляция шаралары (ату, аулау, улау) ұзақ мерзімді нәтиже бермеген. Себебі көршілес аумақтардан жануарлардың қайта қоныс аударуы індеттің жалғасуына әкелген.

Осыған байланысты XX ғасырдың екінші жартысында жабайы етқоректі жануарларды ауыз арқылы иммундеу идеясы ұсынылды. Оральды вакцинация әдісін енгізу алдында вакцинаның формасы, жемнің құрамы, тарату тәсілі және иммунологиялық тиімділігін бақылау тетіктері жан - жақты зерттелді. Өлсіретілген штамдардың қалдық вируленттілігі мәселесі де ұзақ уақыт бойы ғылыми талқылауда болды.

Оральды вакцинацияның дамуы вакциналық жемдердің бірнеше буынын қалыптастырды. Алғашқы кезеңде парентералды енгізу әдісі қолданылғанымен, оның еңбек және қаржы шығыны жоғары болды. Кейін вакциналық қақпандар ұсынылды, алайда олардың қауіпсіздігі жеткіліксіз деп танылды. Нәтижесінде көлемі 1,5–2,0 мл вакциналық суспензиясы бар пластикалық блистер салынған жемдер ең тиімді нұсқа ретінде қабылданды [70-73].

Қазіргі оральды антирабиялық вакциналардың басым бөлігі осы қағидаға негізделген. Ресей мен Еуропада «*SAD Bern*», «*SAD B19*», «*PB - 97*», «*Внуково - 32*», «*ТС - 80*» штамдарына негізделген вакциналар кеңінен қолданылды [74].

Соңғы буын вакциналары генетикалық тұрғыдан тұрақтандырылған, қалдық вируленттілігі жойылған штамдарға негізделген [75]. Рекомбинантты антирабиялық вакциналарда патогендік вирус бөлшектері болмайды. Алғашқы рекомбинантты вакцина *Wistar* институтында *Vaccinia virus* негізінде әзірленіп, кейін далалық жағдайда тиімділігін көрсетті. Сонымен қатар аденовирус, ит герпесвирусы және жанат осповирусы негізіндегі вакциналар да жасалды [76, 77].

Рекомбинантты вакциналар өндірісінің жеңілдігімен, сыртқы орта факторларына төзімділігімен және жоғары иммуногендігімен ерекшеленеді. Сонымен қатар құтырық вирусының мРНҚ-на негізделген вакциналар да әзірленіп, клиникалық сынақтардан өтуде [78, 79].

1.6 Құтыру вирусының молекулалық-генетикалық талдауы бойынша әдеби шолу

Құтыру зооноздық инфекция ретінде адамзатқа өте ерте заманнан белгілі. Адамдар мен жануарларда байқалатын алғашқы белгілердің сипаттамалары шумердің жазуларында және Аристотель еңбектерінде (б.з.д. IV ғ.) кездеседі. Қазіргі Қазақстан аумағында, тарихи тұрғыдан көшпелі мал шаруашылығы басым болғандықтан, бұл ауру жергілікті халыққа да таныс болған. Қазақ көшпелілері қасқыр, түлкі және иттер арасындағы құтыру жағдайларымен бетпе-бет келіп, тістелген кезде дәстүрлі алдын алу және емдеу тәсілдерін қолданған, мысалы күйдіру, шөптерді пайдалану, түрлі ырымдық әрекеттер. Дегенмен, Қазақстан аумағында құтыруды ғылыми тұрғыдан зерттеу тек XX ғасырдың басында ғана басталды.

Алғашқы құжат жүзінде расталған жағдайлар және құтыруға қарсы ұйымдасқан күрес Ресей империясы кезеңіне жатады. 1914 жылы Торғай облысында, қазіргі Қостанай және Ақмола облыстарының бір бөлігін қамтитын аймақта, жануарлар арасында құтырудың алғашқы ресми тіркелген өршуі анықталды. Сол 1914 жылы Верный қаласында, қазіргі Алматыда, Түркістан дәрігер-эпидемиологы С.Ф. Тимофеевтің бастамасымен антирабиялық вакциналарды өндіру және қолдану үшін алғашқы Пастер станциясы ашылды. Станция ғимараты 1917 жылы әскери инженер А.П. Зенковтың жобасы бойынша салынды. Бұл станция Қазақстан аумағындағы алғашқы мамандандырылған мекеме болып, онда Луи Пастер әдісімен вакцинация жүргізіліп, құтыру бойынша жүйелі бақылау басталды.

Кеңестік кезеңде (1920–1991 жж.) құтыруды зерттеу Қазақ КСР ветеринариялық қызметі шеңберінде жоспарлы және мемлекеттік сипат алды. Алматыда, Қызылордада, Семейде және басқа да қалаларда қосымша Пастер станциялары мен ветеринариялық - бактериологиялық зертханалар ұйымдастырылды. Қызылордада қазақ тілінде «Құтырық» атты алғашқы танымдық еңбектердің бірі жарық көріп, онда егу станциялары мен зертханалардың ұйымдастырылуы және көшпелі халық арасында алдын алу шаралары сипатталған. Эпизоотология саласына кеңестік ветеринариялық институттар, соның ішінде 1928 жылы құрылған Қазақ өлкелік ветеринариялық институты, елеулі үлес қосты. Зерттеулер табиғи-ошақты инфекциялармен күресуге бағытталған одақтық бағдарламалар аясында жүргізілді, ал құтыру жабайы етқоректі жануарлардан, яғни қасқыр, түлкі, қарсақтан ауыл шаруашылық жануарларына және адамға берілетін зооноз ретінде қарастырылып зерттелді.

Зерттеулердің қазіргі кезеңі (1991 жылдан бүгінгі уақытқа дейін) сипаттамалық эпизоотологиядан кеңістіктік-уақыттық талдауға, GIS-технологияларға және молекулалық-генетикалық әдістерге көшуімен ерекшеленеді. Жетекші рөл С. Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық зерттеу университетінің (Астана қ.) ғалымдар ұжымына және «Ұлттық ветеринариялық орталығына» тиесілі.

Қазақстандағы қазіргі кезеңнің негізін қалаушылардың бірі С.К. Абдрахманов [1] және оның әріптестері. 2016–2023 жылдардағы еңбектерінде

олар алғаш рет 2012 – 2022 жылдар аралығында Қазақстан Республикасының бүкіл аумағында құтыру ауруына кешенді кеңістіктік уақыттық және тәуекелге бағдарланған талдау жүргізді (989 ошақ). Ауыл шаруашылығы, үй және жабайы жануарлар арасында құтырудың пайда болу қаупі бойынша аумақты аймақтарға бөлу карталары әзірленді, негізгі факторлар (климаттық ауытқулар, түлкілердің миграциясы, халық тығыздығы) анықталды. Осы зерттеулердің нәтижесінде тек әрекетке жауап беру шараларынан болжам жасау мен алдын алу бағытына көшуге мүмкіндік туды.

Құтыру вирусының молекулалық-генетикалық талдауы, кейін филогенетикалық дендрограммаларды құру және нуклеотидтік тізбектерді NCBI GenBank дерекқорына депонирлеумен қатар жүргізілуі қазіргі молекулалық эпидемиологияның негізгі құралдарының бірі болып саналады. Бұл тәсіл вирусының генетикалық желілерін және субкладтарын анықтауға, филогеографиялық байланыстарын, түрлер арасындағы берілуін және эволюциялық динамикасын бақылауға мүмкіндік береді. Мұның барлығы бақылау және алдын алу шараларын әзірлеуде шешуші рөл атқарады. Зерттеулердің стандартты хаттамасы әдетте жұқтырылған жануарлардың миынан РНҚ бөліп алуды, ПТР немесе жоғары өнімді секвенирлеуді, алынған тізбектерді жинақтауды, теңестіруді (MAFFT, ClustalW), сондай-ақ Neighbor-Joining (NJ), Maximum Likelihood (ML) немесе Bayesian әдістерімен (MEGA, RAxML, BEAST бағдарламалары, bootstrap, GTR, Tamura-Nei модельдері) филогенетикалық ағаштар құруды және деректерді міндетті түрде GenBank базасына енгізуді қамтиды.

2000 жылдан бастап әлемде RABV бойынша мыңдаған тізбектер (көбіне N гені) елеулі көлемде деректер жиналды. Жаһандық зерттеулер негізгі филогенетикалық *Cosmopolitan* (ең кең таралған, көбінесе иттермен байланысты), *Arctic/Arctic-like*, *Africa-1/2*, *Asia*, *Indian subcontinent* және жарқанаттарға тән желілердің бар екенін растады. Бұл жұмыстар вирус популяциясының айқын географиялық құрылымдануын және оның иелерімен тығыз байланысын көрсетті.

Лиссавирустардың ғаламдық филогеографиясының негізін қалаушылардың қатарында *H. Bourhy* (Institut Pasteur, Франция) және оның әріптестері бар [80]. *Bourhy* (2008) жүргізген негізгі зерттеулер *Cosmopolitan clade*-тың алты негізгі кластерін ажыратудың іргетасын қалағанымен, 2010-жылдардағы кейінгі зерттеулер [81] N генін пайдалану және GenBank базасына деректерді енгізу арқылы *Arctic-like* желісінің Оңтүстік Азияға миграциясын анықтап, сондай-ақ *Cosmopolitan* кластерінің тұрақтылығын растады. Бұл нәтижелер вирустың трансшекаралық таралу жолдарын және оның эволюциялық тарихын айқындауға мүмкіндік берді. Олар вирустың географиялық құрылымдалуын және өңірлер арасындағы миграциялық ағындардың әлсіз екенін атап өтті, соның ішінде Қазақстанның Ресеймен байланысы да көрсетілді. Бұл жұмыс Орталық Азияда RABV-тың трансшекаралық айналымын түсінуге негіз қалады.

Солтүстік Америка мен Еуропада елеулі үлесті *S.A. Nadin-Davis* (Канада) қосты. 2011–2022 жылдар аралығындағы жұмыстарында [82] формалинмен

фиксацияланған тіндерден де Illumina-секвенирлеу жүргізуге мүмкіндік беретін *Ampliseq* әдістері әзірленіп, тәжірибеге енгізілді. N гені бойынша филогенетикалық талдау жүргізіліп, алынған тізбектер GenBank базасына орналастырылды. Соның нәтижесінде Lyssavirus туысының құрылымы нақтыланып, архивтік материалдарды талдау мүмкіндіктері ашылды. Бұл, өз кезегінде, эпидемиологиялық зерттеулердің уақыттық ауқымын едәуір кеңейтті.

Азияда ауқымды зерттеулерді Zhang L., Feng Y., Tu C. жетекшілік еткен топ (Қытай) жүргізді. *Zhang және әріптестері* (2023) Оңтүстік-Шығыс және Оңтүстік Азиядан алынған RABV-тің 2368 штаммын талдап, ML-дендрограммалар құрастырды және *Cosmopolitan* мен *Asia* линиялары шегінде жоғары дивергенциямен қатар айқын географиялық кластерленуді анықтады. Сол сияқты *Li et al.* (2023) 1202 толық геном негізінде иелер мен аймақтарға байланысты филогенетикалық кластерлерді растады. Бұл жұмыстар алғаш рет Азиядағы RABV эволюциясының панорамалық көрінісін берді, трансшекаралық таралудың рөлін көрсетті және аймақтық мониторингке негіз қалады [83].

Ресейде зерттеу бойынша жетекші орын С.А. Чупин, А.А. Девяткин және А.Н. Лукашев тобына тиесілі. *Chupin және әріптестері* (2023) РФ-ның еуропалық бөлігіндегі 13 өңірден алынған N генінің 94 изолятын секвенирлеп, MEGA 11 бағдарламасында ML-дендрограммасын құрастырды. Chupin et al. (2023) Еуропалық Ресей бөлігінен алынған 94 изолятқа жүргізілген филогенетикалық талдау барысында (толық N гені, MEGA 11 бағдарламасындағы ML әдісі) Оңтүстік Қазақстаннан (2021 ж.) алынған штаммдар мен Ресейдің орталық өңірлерінен (Владимир, Рязань, Нижний Новгород облыстары) бөлінген изоляттар арасында жоғары генетикалық сәйкестік деңгейін (99,2–99,6 %) анықтады. Авторлар трансшекаралық берілу мүмкіндігін атап өтті, сондай-ақ вирустың айналымын сақтауда жарқанаттардың ықтимал рөлі бар деген гипотезаны да ұсынды. Олар талдауға Қазақстаннан алынған бұрынғы нуклеотидтік тізбектерді де қосты, мысалы, Батыс Қазақстаннан алынған KT965737 (2014 ж.) үлгісі. Барлық тізбектер GenBank базасына енгізілген [84]. *Deviatkin және әріптестері* (2017) бұған дейін 82 изоляттың филодинамикасын сипаттап, барлық негізгі топтардың циркуляциясын растаған болатын. Ресейлік зерттеулердің нәтижелері штаммдардың көршілес елдермен филогенетикалық жақындығын және алынған деректерді індеттердің өршуін болжау үшін пайдалануға болатынын көрсетті [85].

Аналогичные успехи достигнуты в Африке (группы Sabeta C.T., Markotter W., ЮАР) и Южной Америке (Cunha et al., Бразилия): переход к полногеномному секвенированию, выявление новых субкладов, Bayesian-анализ и подтверждение филогрупп I (RABV). Обзоры Bruncker (2018), Nauman (2016) и Holtz et al. [86] обобщили глобальную филогеографию, подчеркнув роль NGS в реальном времени для контроля бешенства.

Ұқсас жетістіктер Африкада (Sabeta C.T., Markotter W. топтары, ОАР) және Оңтүстік Америкада (Cunha et al., Бразилия) да қол жеткізілді. Толықгеномдық секвенирлеуге көшу, жаңа субкладтарды анықтау, Байес

талдауы және I филотобына (RABV) жататынын растау жүзеге асырылды. *Brunker (2018), Hayman (2016)* және *Holtz et al. [86]* шолулары жаһандық филогеографияны қорытындылап, құтыруды бақылауда нақты уақыттағы секвенирлеу рөлін ерекше атап өтті.

David және әріптестері (2021, Иордания) иттер мен түлкілерден алынған 12 геномды секвенирлеп, оларды bootstrap-қолдауы 98% болатын ME2 подкластеріне жатқызды. NCBI дерекқорымен салыстыру нәтижесінде еуропалық штаммдарға жақындығы анықталды, бұл трансшекаралық мониторинг жүргізудің қажеттілігін негіздеді. *Troupin және әріптестері (жаһандық талдау, 2023)* GenBank базасындағы мындаған нуклеотидтік тізбектерді пайдалана отырып, RABV-тың жаһандық филогениясы басым түрде пурифицирлеуші сұрыпталу ықпалында эволюцияланатынын, ал негізгі тармақтардың дивергенциясы шамамен 1000 жыл бұрын басталғанын көрсетті. Осы зерттеулер нәтижесінде GenBank дерекқорына жүздеген тізбектер (мысалы, OR311877) енгізілді, бұл індеттік ошақтарды модельдеуге және вакциналарды оңтайландыруға мүмкіндік берді [87].

Орталық Азия аумағында RABV филогенетикалық талдауы жүйелі түрде жүргізілмей, көбінесе көршілес мемлекеттер шеңберінде орындалған. Қазақстанмен шектесетін Забайкалье өңірінде (Ресей) 2020-жылдардағы филогенетикалық зерттеулер изоляттардың Еуропадан Моңғолия мен Қытайға дейін таралғанын анықтады. Қазақстан аумағын да аталған «дала» С линиясына жатқызды [88].

Қазақстанда мәселенің өзектілігіне қарамастан (табиғи ошақтардың тұрақты болуы) RABV бойынша молекулалық-генетикалық зерттеулер негізінен шолу сипатында баяндалған және өзіндік филогенетикалық деректер ұсынылмаған. 2023 жылы ҚазҰУ-де жасалған шолуда патогенез бен диагностика жаһандық деңгейде сипатталады, бірақ жергілікті изоляттарды секвенирлеу немесе дендрограммалар келтірілмейді. Сол сияқты, ҚазАТУ жарияланымдарында эволюциялық тарихты талдау мүмкіндігі аталғанымен, кластерлерге немесе NCBI дерекқорына жүктеулерге қатысты нақты эмпирикалық нәтижелер берілмеген. Scopus және PubMed базаларында (2010–2026) жүргізілген іздеу Қазақстаннан шыққан, толық геномды секвенирлеуді, филогенетикалық ағаштарды немесе GenBank қорына депонирлеуді қамтитын жарияланымдарды анықтамады, бұл көршілес Ресей еліндегі деректермен салыстырғанда айқын айырмашылық береді [89].

2021 жылға дейін Қазақстанда құтыру вирусына қатысты молекулалық-генетикалық талдау, оның ішінде филогенетикалық дендрограммалар құру және тізбектерді GenBank базасына енгізу жүргізілмеген. Қолда бар мәліметтер эпизоотологиялық және кеңістік-уақыттық зерттеулермен шектелді [1, 2]. Олар құтырудың эндемиялық сипатын, ірі қара мал арасында жағдайлардың басым екенін және жабайы жануарлардың рөлін көрсеткенімен, генетикалық желілерді, субкластерлерді немесе штаммдардың филогенетикалық байланыстары анықталмаған. Мұндай бағыттағы жұмыстардың толық болмауы Орталық Азиядағы RABV молекулалық эпидемиологиясын түсінуде елеулі ақпарат тапшылығы қалыптастырды.

Осылайша, Қазақстан ғалымдарының құтыруды зерттеуге қосқан үлесі 1914–1917 жылдары алғашқы Пастер станцияларын ұйымдастырудан және кеңестік ветеринариялық қызмет кезеңінен бастап, қазіргі молекулалық-генетикалық және GIS-зерттеулерге дейінгі ұзақ даму жолынан өтті. Егер революцияға дейінгі және ерте кеңестік кезеңдерде негізгі назар диагностика мен вакцинацияға аударылған болса, ХХІ ғасырда қазақстандық ғалымдар халықаралық стандарттар деңгейіне шықты.

Салыстырмалы талдау айқын контрастты көрсетеді. Шетелдік зерттеулер мыңдаған тізбектерге, толық геномдық деректерге және жаһандық модельдерге сүйенеді, соның нәтижесінде таралу механизмдері нақты айқындалып, қауіп-қатерлерді болжау мүмкіндігі артқан. Қазақстанда мұндай деректер соңғы уақытқа дейін болмады, сондықтан молекулалық мәліметтерді бақылаудың ұлттық жүйесіне тиімді енгізу шектеліп келді.

2 ЗЕРТТЕУ МАТЕРИАЛДАРЫ МЕН ӘДІСТЕРІ

2.1 Зерттеу нысаналары және материалдары

Зерттеу жұмыстары 2020–2022 жылдары «Қазақстан Республикасының аумағында айналымдағы құтырық вирусын молекулалық-биологиялық талдау» (AP08053353) ғылыми жобасының аясында орындалды.

Биологиялық материалдарды жинау Қазақстан Республикасында құтырықты диагностикалауға арналған қолданыстағы ережелер мен нұсқаулықтарға (МЕМСТ 26075 - 2013) сәйкес жүргізілді. Құтырық ауруына күдік туған жағдайда, жануардың ми тіндері тиісті температуралық режим сақтала отырып, биологиялық қауіпсіздік талаптарына сай Қазақстан Республикасы Ауыл шаруашылығы министрлігі Ветеринариялық бақылау және қадағалау комитетінің «Ветеринария бойынша ұлттық референттік орталығына» жеткізілді.

Індеттік жағдайды картографиялық талдау, статистикалық жұмыстың орындалуы «С.Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық зерттеу университеті» КеАҚ, «Ветеринариялық санитария» кафедрасында орындалды.

РНҚ-ны бөліп алу жұмыстары Астана қаласындағы «Ветеринария бойынша ұлттық референттік орталық» базасында, «Инфекциялық ауруларды диагностикалау» зертханасының молекулалық биология бөлімінде жүргізілді.

Сынамалардан бөлініп алынған *Rabies lyssavirus* штамдарының кДНК үлгілерін молекулалық-генетикалық зерттеулер «Ұлттық биотехнология орталығы» ЖШС-нің қолданбалы генетика зертханасының базасында жүргізілді.

Құтырық вирусының далалық изоляттарының топтамасын қалыптастыру үшін 2020–2022 жылдар аралығында Қазақстанның әртүрлі өңірлерінен түлкілерден, қасқырлардан, иттерден, мысықтардан, ірі қарадан, ұсақ малдан және жылқылардан барлығы 117 ми тіндерінің сынамалары жиналды (5-кесте).

Кесте 5 – 2020–2022 жылдары зерттеуге алынған құтырыққа күдікті жануарлардың бастапқы деректері

Жануардың түрі	Изолят нөмірі	Облыс	Аудан / Қала
1	2	3	4
Ит	181/2 - 14 (1)	Жамбыл облысы	Тараз қаласы
ҰҚМ	139/2 - 16 (1)	Жамбыл облысы	Мойынқум ауданы
Ит	139/2 - 16 (2)	Жамбыл облысы	Мойынқум ауданы
ІҚМ	139/2 - 16 (3)	Жамбыл облысы	Мойынқум ауданы
Ит	139/2 - 16 (4)	Жамбыл облысы	Жамбыл ауданы
ІҚМ	139/2 - 16 (5)	Жамбыл облысы	Қордай ауданы
Ит	139/2 - 16 (7)	Жамбыл облысы	Жамбыл ауданы
ІҚМ	139/2 - 16 (8)	Жамбыл облысы	Мойынқум ауданы
ит	139/2 - 16 (12)	Жамбыл облысы	Тараз қаласы
ит	139/2 - 16 (13)	Жамбыл облысы	Байзақ ауданы
ІҚМ	139/2 - 16 (15)	Жамбыл облысы	Байзақ ауданы
қасқыр	169 - 14 (1)	Түркістан облысы	Шымкент қаласы
ит	169 - 14 (3)	Түркістан облысы	Шымкент қаласы
есек	228 - 14 (2)	Түркістан облысы	Шымкент қаласы

5-кестенің жалғасы

1	2	3	4
ит	228 - 14 (3)	Түркістан облысы	Шымкент қаласы
ит	228 - 14 (4)	Түркістан облысы	Шымкент қаласы
ит	228 - 14 (5)	Түркістан облысы	Шымкент қаласы
ит	186 - 16 (1)	Түркістан облысы	Абай ауданы
ит	186 - 16 (4)	Түркістан облысы	Мақтаарал ауданы
ит	143/4 - 14 (1)	Павлодар облысы	Павлодар қаласы
ІҚМ	344 - 13 (1)	Павлодар облысы	Ақсу
түлкі	032/3 - 15 (1)	Павлодар облысы	Баянауыл ауданы
ІҚМ	032/3 - 15 (3)	Павлодар облысы	Качир ауданы
ІҚМ	1 - 049/2 - 19 (1)	Павлодар облысы	Ақкөл ауданы
түлкі	1 - 049/2 - 19 (2)	Павлодар облысы	Щербакты ауданы
мысық	349/1 - 13 (1)	ШҚО	Семей қаласы
ІҚМ	1 - 209 - 19 (1)	ШҚО	Семей қаласы
мысық	1 - 209 - 19 (2)	ШҚО	Семей қаласы
ІҚМ	1 - 230 - 19 (1)	ШҚО	Семей қаласы
ІҚМ	1 - 230 - 19 (2)	ШҚО	Семей қаласы
ІҚМ	1 - 230 - 19 (3)	ШҚО	Семей қаласы
мысық	1 - 230 - 19 (4)	ШҚО	Семей қаласы
түлкі	1 - 013/2 - 20 (1)	ШҚО	Уржар ауданы
ІҚМ	1 - 028 - 20 (1)	ШҚО	Семей қаласы
ІҚМ	1 - 028 - 20 (2)	ШҚО	Семей қаласы
ит	1 - 028 - 20 (3)	ШҚО	Семей қаласы
ІҚМ	1 - S21L - 93/1 - 1	ШҚО	Аягөз ауданы
ІҚМ	1 - S21L - 93/1 - 1	ШҚО	Аягөз ауданы
ІҚМ	1 - S21L - 93/1 - 1	ШҚО	Аягөз ауданы
ІҚМ	1 - S21L - 93/1 - 1	ШҚО	Аягөз ауданы
ІҚМ	1 - S21L - 93/1 - 1	ШҚО	Аягөз ауданы
ІҚМ	1 - S21L - 93/1 - 1	ШҚО	Аягөз ауданы
ІҚМ	1 - S21L - 93/1 - 1	ШҚО	Семей қаласы
ІҚМ	1 - S21L - 93/1 - 1	ШҚО	Аягөз ауданы
ІҚМ	1 - S21L - 93/1 - 1	ШҚО	Бесқарағай ауданы
ІҚМ	1 - S21L - 93/1 - 1	ШҚО	Бесқарағай ауданы
ІҚМ	1 - S21L - 93/1 - 1	ШҚО	Аягөз ауданы
ІҚМ	1 - S21L - 93/1 - 1	ШҚО	Аягөз ауданы
ІҚМ	1 - S21L - 93/1 - 1	ШҚО	Аягөз ауданы
ІҚМ	1 - S21L - 93/1 - 1	ШҚО	Жарма ауданы
ІҚМ	1 - 029 - 20 (10)	ШҚО	
мысық	036/1 - 18 (1)	Ақтөбе облысы	Иргиз ауданы
ит	1 - 014/1 - 20 (1)	Ақтөбе облысы	Шалқар ауданы
ит	1 - 014/2 - 20 (2)	Ақтөбе облысы	Ақтөбе қаласы
ІҚМ	1 - 017 - 20 (1)	Ақтөбе облысы	Хромтау ауданы
ІҚМ	1 - 017 - 20 (2)	Ақтөбе облысы	Хромтау ауданы
түлкі	1 - 029 - 20 (2)	БҚО	Қазталов ауданы
ит	1 - 029 - 20 (3)	БҚО	Шыңғырлау ауданы
ит	1 - 029 - 20 (4)	БҚО	Шыңғырлау ауданы
ит	1 - 029 - 20 (6)	БҚО	Шыңғырлау ауданы
ІҚМ	1 - 029 - 20 (7)	БҚО	Байтерек ауданы
ІҚМ	1 - 029 - 20 (9)	БҚО	Байтерек ауданы
ит	231 - 14 (1)	Ақмола облысы	Астрахан ауданы
ІҚМ	231 - 14 (2)	Ақмола облысы	Астрахан ауданы
мысық	231 - 14 (3)	Ақмола облысы	Астрахан ауданы
түлкі	234 - 14 (1)	Ақмола облысы	Сандықтау ауданы

5-кестенің жалғасы

1	2	3	4
ІҚМ	240 - 14 (1)	Ақмола облысы	Қорғалжын ауданы
ит	031 - 15 (1)	Ақмола облысы	Астана қаласы
ІҚМ	051 - 15 (1)	Ақмола облысы	Қорғалжын ауданы
жылқы	051 - 15 (2)	Ақмола облысы	Ерейментау ауданы
ит	051 - 15 (3)	Ақмола облысы	Астрахан ауданы
түлкі	051 - 15 (4)	Ақмола облысы	Целиноград ауданы
ІҚМ	053 - 15 (1)	Ақмола облысы	Қорғалжын ауданы
ІҚМ	053 - 15 (2)	Ақмола облысы	Қорғалжын ауданы
ит	1 - 008/2 - 20 (1)	Ақмола облысы	Буландин ауданы
Бұғы	1 - 086 - 20 (1)	Ақмола облысы	Ақкөл ауданы
Ит	1-S21R-18/B-59-02	Ақмола облысы	Астана қаласы
ит	1 - 232 - 19 (1)	Атырау облысы	Махамбет ауданы
ІҚМ	1 - 181/1 (1)	Атырау облысы	Индер ауданы
Түйе	1 - 181/2 (2)	Атырау облысы	Исатай ауданы
ІҚМ	1 - 181/3 (3)	Атырау облысы	Қызылқоға ауданы
ІҚМ	1S21-7-R/1-B-1-(01-05)1-001-20-B	Атырау облысы	Атырау қаласы
мысық	347 - 13 (1)	Қарағанды облысы	Нұра ауданы
ит	041 - 15 (1)	Қарағанды облысы	Ақтоғай ауданы
ІҚМ	041 - 15 (2)	Қарағанды облысы	Ақтоғай ауданы
ІҚМ	1-S21R-15/B-1-02	Қарағанды облысы	Балқаш қаласы
ІҚМ	1-S21R-33/B-1-02	Қарағанды облысы	Қарқаралы ауданы
ІҚМ	1-S21R-35/B-1-02	Қарағанды облысы	Приозерск қаласы
Түлкі	1-S21W - 70/1 - 63	Қарағанды облысы	Қарқаралы ауданы
Түлкі	1-S21W - 70/1 - 63	Қарағанды облысы	Қарқаралы ауданы
Түлкі	1-S21W - 70/1 - 63	Қарағанды облысы	Нұра ауданы
Түлкі	1-S21W - 70/1 - 63	Қарағанды облысы	Нұра ауданы
Түлкі	1-S21W - 70/1 - 63	Қарағанды облысы	Нұра ауданы
Түлкі	1-S21W - 70/1 - 63	Қарағанды облысы	Қарқаралы ауданы
Түлкі	1-S21W - 70/1 - 63	Қарағанды облысы	Қарқаралы ауданы
Түлкі	1-S21W - 70/1 - 63	Қарағанды облысы	Балқаш қаласы
Түлкі	1-S21W - 70/1 - 63	Қарағанды облысы	Балқаш қаласы
ІҚМ	1-S21R-34/B-1-02	Жезқазған облысы	Жезқазған қаласы
Құм қасқыры	1-S21W - 70/1 - 64	Жезқазған облысы	Жезқазған қаласы
ІҚМ	1 - S21L - 73/1 - 1	Қостанай облысы	Алтынсарин ауданы
ІҚМ	1 - S21L - 73/1 - 1	Қостанай облысы	Алтынсарин ауданы
ІҚМ	1-S21R-20/B-1-01	СҚО	Мамлют ауданы
Құм қасқыры	1-S21-W-19/B-64-01	СҚО	Ақжар ауданы
Түлкі	1-S21-W-19/B-63-02	СҚО	Ақжар ауданы
Түлкі	1-S21-W-19/B-63-02	СҚО	Ақжар ауданы
Түлкі	1-S21-W-19/B-63-02	СҚО	Аққайың ауданы
Түлкі	1-S21-W-19/B-63-02	СҚО	Ғабит Мүсірепов атындағы аудан
Түлкі	1-S21-W-19/B-63-02	СҚО	Ғабит Мүсірепов атындағы аудан
Түлкі	1-S21-W-19/B-63-02	СҚО	Есіл ауданы
Түлкі	1-S21-W-19/B-63-02	СҚО	Шал ақын ауданы
ІҚМ	1-S21R-65/B-1-03	СҚО	Мағжан Жұмабаев ауданы
ІҚМ	1- S21R - 82/1 - 1	СҚО	Жамбыл ауданы
ІҚМ	1- S21R - 82/1 - 1	СҚО	Ғабит Мүсірепов атындағы аудан
ІҚМ	1- S21R - 82/1 - 1	СҚО	Тимирязев ауданы
ІҚМ	1- S21R - 82/1 - 1	СҚО	Мағжан Жұмабаев ауданы
ІҚМ	1- S21R - 82/1 - 1	СҚО	Ақжар ауданы
ІҚМ	1- 033 - 19 (1)	СҚО	Есіл ауданы

5-кестеде зерттеуге енгізілген 2020–2022 жылдар аралығында құтырыққа күдікті жануарлардан алынған ми тіндері үлгілерінің бастапқы тіркеу деректерін жүйелейді. Кестеде әр сынаманың изолят нөмірі, алынған әкімшілік-аумақтық бірлігі (облыс, аудан немесе қала) және жануар түрі көрсетілген. Материалдар құрамына үй жануарлары (ит, мысық), ауыл шаруашылығы жануарлары (ірі қара мал, ұсақ мал, жылқы, түйе, есек, бұғы) және жабайы жыртқыштар (түлкі, қасқыр, құм қасқыры) енгізілген. Берілген деректер зерттеу объектілерінің аумақтық қамтылуын, үлгілердің шығу көздерін және молекулалық-генетикалық талдауға енгізілген далалық изоляттардың эпизоотологиялық контекстін сипаттайды. Әр аймақтан таңдалған патологиялық материалдардың жалпы саны 6 кестеде көрсетілген.

Кесте 6 – Зерттеу материалдарының облыстар мен жануар түрлері бойынша үлестірімі

Облыс	ІҚМ	Ит	Түлкі	Мысық	Құм қасқыры	Қасқыр	Есек	Түйе	ҰҚМ	Жылқы	Бұғы	Барлығы
Атырау облысы	3	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	5
Ақмола облысы	5	5	2	1	0	0	0	0	0	1	1	15
Ақтөбе облысы	2	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	5
БҚО	2	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	6
Жамбыл облысы	4	6	0	0	0	0	0	0	1	0	0	11
Жезқазған облысы	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2
Павлодар облысы	3	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	6
СҚО	8	0	7	0	1	0	0	0	0	0	0	16
Түркістан облысы	0	6	0	0	0	1	1	0	0	0	0	8
ШҚО	21	1	1	3	0	0	0	0	0	0	0	26
Қарағанды облысы	4	1	9	1	0	0	0	0	0	0	0	15
Қостанай облысы	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Барлығы	55	26	22	6	2	1	1	1	1	1	1	117

6-кестеде зерттеу материалдарының облыстар және жануар түрлері бойынша сандық үлестірімін көрсетеді. Кесте деректері бойынша жалпы 117 патологиялық материал тіркелген, олардың басым бөлігі ірі қара малдан (55) және иттерден (26) алынған, сондай-ақ түлкіден (22) және мысықтан (6) алынған үлгілер маңызды үлес құрайды. Материалдардың облыстар бойынша таралуы әркелкі, ең жоғары үлес ШҚО (26) және СҚО (16) өңірлеріне, сондай-ақ Ақмола және Қарағанды облыстарына (әрқайсысы 15) тиесілі. Жабайы фаунадан алынған үлгілердің болуы құтыру қоздырғышының табиғи ошақтармен байланысын және түр аралық берілу ықтималдығын ескеруге мүмкіндік береді, ал үй және ауыл шаруашылығы жануарлары бойынша деректер аурудың шаруашылық және қоғамдық-санитариялық маңызын бағалауға негіз болады.

2.2 Зерттеу әдістері

Зерттеу жұмысында молекулалық-генетикалық, биоинформатикалық және статистикалық талдау әдістері қолданылды.

«Ветеринария бойынша ұлттық референттік орталық» базасында құтырық вирусын анықтау ПТР әдісімен келесі бірізді кезеңдер арқылы жүзеге асырылды. Алдымен үлгілерден суспензия дайындалып, «ФБиоНуклео» коммерциялық жинағының нұсқаулығына сәйкес РНҚ бөлініп алынды. Бөліп алынған РНҚ негізінде кері транскрипция жүргізіліп, комплементарлы ДНҚ (кДНҚ) синтезделді. Алынған кДНҚ үлгілері нақты уақыт режиміндегі полимеразды тізбекті реакцияда қолданылып, ПТР нәтижелері талданып, есепке алынды.

«Ұлттық биотехнология орталығы» ЖШС - нің қолданбалы генетика зертханасында *Rabies lyssavirus* штамдарының кДНҚ үлгілеріне молекулалық - генетикалық зерттеулер жүргізілді. Бұл кезеңде алдымен құтырық вирусы геномын амплификациялауға арналған праймерлер таңдалып, олардың тиімділігі тәжірибелік амплификация арқылы тексерілді. Тиімділігі расталған праймерлерді пайдалана отырып алынған амплификация өнімдері негізінде вирустың толық геномдық секвенирлеуі жүргізілді. Секвенирлеу нәтижесінде алынған деректер өңделіп, жинақталды, ал сапасы расталған нуклеотидтік тізбектерге генотиптеу және филогенетикалық талдау жасалды.

2.2.1 Патологиялық материалдардан ми тіндерінің суспензиясын дайындау және РНҚ-ны бөліп алу

Зерттеу барысында үлгілерден суспензия дайындау және РНҚ - ны бөліп алу стандартты молекулалық-биологиялық әдістерге сәйкес жүргізілді. Стерильді жағдайда 1,5 мл көлемді Eppendorf типті микропробиркаға гомогенизацияға арналған металл шариктері мен 500 мкл физиологиялық ерітінді қосылды. Оған ми тінінің ұсақталған үлгілері енгізіліп, 10% концентрациялы суспензия дайындалды. Гомогенизация TissueLyser LT (Qiagen) құрылғысында 30 айн/сек жылдамдықта 30 секунд бойы жүргізілді.

Алынған суспензия бөлме температурасында 10 минут тұндырылғаннан кейін, РНҚ-ны бөліп алу үшін үстіңгі қабаттан (супернатанттан) 100 мкл көлемінде үлгі алынды. РНҚ-ны бөліп алуға дейінгі материалдың аликвоталары –70 °С температурада сақталды.

Биологиялық материалдан РНҚ-ны бөліп алу «ФБиоНуклео» (Ресей) коммерциялық жиынтығының өндіруші нұсқаулығына сәйкес жүргізілді. Жиынтық құрамына кері транскрипция–полимеразды тізбекті реакцияға арналған дайын микс (КТ-ПТР миксі), ферменттер қоспасы және оң бақылау үлгісі (КО+) кіреді. 50 реакцияға арналған жинақта КТ-ПТР миксі 750 мкл, ферменттер қоспасы 27 мкл және оң бақылау 180 мкл көлемінде қарастырылған, ал 100 реакцияға арналған нұсқада тиісінше 1500 мкл, 55 мкл және 360 мкл көлемде ұсынылған. Компоненттердің мұндай қатынасы кері транскрипция және амплификация кезеңдерінің тұрақты және қайталанымды жүргізілуін қамтамасыз етеді.

100 мкл үлгіге 400 мкл ПГ буфері қосылып, қоспа біркелкі араластырылды және бөлме температурасында 5 минут инкубацияланды. Одан кейін 500 мкл Са буфері қосылып, қайта араластырылып, тағы 5 минут инкубацияланды. Инкубациядан соң үлгі 5 минут бойы центрифугаланды.

Центрифугалаудан кейін 700 мкл супернатант центрифугалық колонкаға ауыстырылып, 60 секунд центрифугаланды. Нуклеин қышқылдарын жуу үшін колонкаға 450 мкл ПЕ буфері қосылып, 60 секунд центрифугаланды, жуу процедурасы бір рет қайталанды. Қалдық буферді жою үшін қосымша центрифугалау жүргізілді.

Нуклеин қышқылдарын жуу мақсатында колонкаға 450 мкл ПЕ буфері қосылып, 60 секунд центрифугаланды. Жуу процедурасы осы тәртіппен бір рет қайталанды.

Жуу буферінің қалдықтарын мембранадан толық жою үшін қосымша 60 секундтық центрифугалау жүргізілді. Жуу кезеңі аяқталған соң центрифугалық колонка таза жинау пробиркасына қайта орналастырылды.

Нуклеин қышқылдарын элюциялау үшін колонкаға 100 мкл ЕБ буфері немесе стерильді су қосылып, 1 минут центрифугаланды. Алынған элюат кері транскрипция кезеңінде матрица ретінде пайдаланылды [90, 91].

2.2.2 Кері транскрипция жүргізу

Кері транскрипция кезеңінде реакциялық қоспа 2X КТ - ПТР Миксі және М–MLV кері транскриптаза ферменті негізінде дайындалды. Әрбір реакция үшін 10 мкл 2X Микс және 0,5 мкл М - MLV транскриптаза қосылып, реакциялар санына сәйкес көлемдер пропорционалды түрде көбейтілді. Компоненттер стерильді микропробиркада араластырылып, қысқа уақыт вортесте өңделгеннен кейін центрифугаланды.

Фермент қосу кезінде пипетка ұшы ерітіндіге толық батырылып, бірнеше рет пипеткаланған. Фермент қоспасы қосылғаннан кейін бірден -20°C температураға қойылды.

Дайындалған қоспа вортесте араластырылып, қысқа уақыт центрифугаланды, кейін әр ПТР микропробиркасына 10 мкл көлемінде реакциялық қоспа үлестірілді.

Бірінші микропробиркаға 10 мкл теріс бақылау үлгісі (КО -), келесі микропробиркаларға 10 мкл зерттелетін үлгілер, ал соңғы микропробиркаға 10 мкл оң бақылау үлгісі (КО +) қосылды. Реакциялық қоспа Eppendorf Mastercycler амплификаторында 37°C температурада 30 минут инкубацияланды, нәтижесінде комплементарлы ДНҚ (кДНҚ) синтезделді. Алынған кДНҚ кейінгі полимеразды тізбекті реакция кезеңінде матрица ретінде пайдаланылды.

2.2.3 Құтырық вирусын нақты уақыт режиміндегі ПТР әдісімен анықтау

Вирустың биологиялық материалдағы бар - жоғын анықтау нақты уақыттағы ПТР әдісімен жүргізілді. Реакция қоспасы микропробиркаларға құйылып, олар Rotor - Gene 6000 амплификаторына орналастырылды, ротор теңестірілді.

Амплификация 7-кестеде көрсетілген температуралық профиль бойынша 40 цикл бойы жүргізілді. Реакцияның жалпы көлемі 25 мкл болып орнатылды.

Кесте 7 – ПТР жүргізудегі температуралық профиль

Кезең	Температура	Уақыт	Оқу	Циклдер саны	Ескертпе
Hold	37°C	15 мин	-	-	кері транскрипция
Hold	95°C	180 с	-	1	бастапқы денатурация
Cycling	60°C	30 с	А цикліне өту (жасыл, сары)	40	-
	95°C	10 с	А цикліне өтуге бол майды (жасыл, сары)	-	флуоресценция тіркелді

Амплификация аяқталғаннан кейін флуоресценция сигналдары FAM және R6G арналары бойынша тіркеліп, әр үлгі үшін Ct мәндері анықталды. Gain параметрлері өндіруші нұсқаулығына сәйкес оңтайландырылды.

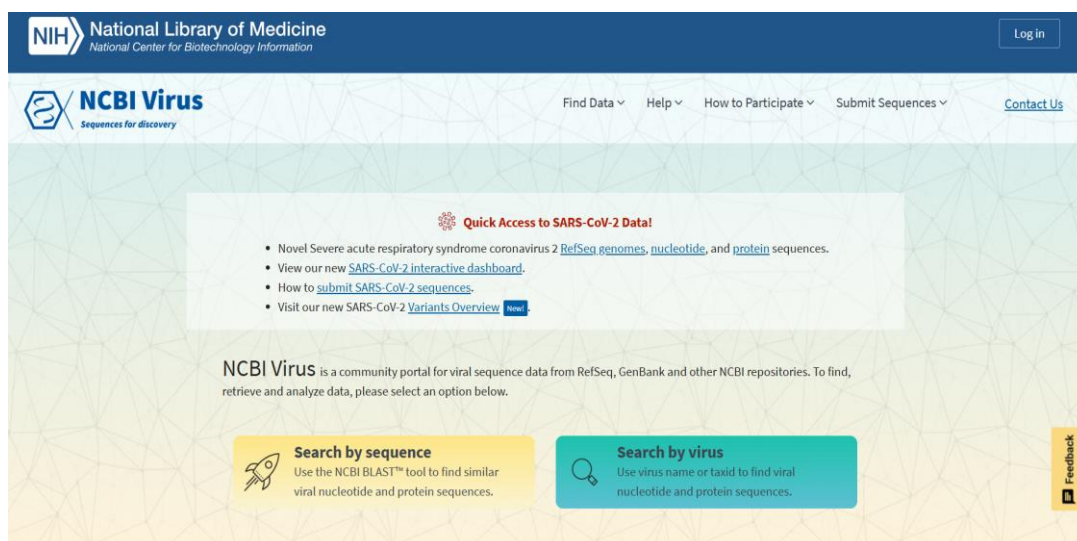
Нақты уақыттағы ПТР нәтижелерін бағалау барысында threshold мәні 0,1 деңгейінде орнатылып, порогтық сызық оң бақылау үлгісінің экспоненциалды өсу фазасына сәйкестендірілді. Нәтижелерді интерпретациялау тек бақылау үлгілерінің көрсеткіштері талаптарға сәйкес келген жағдайда жүзеге асырылды.

Зерттелетін сынамалар бойынша интерпретация екі флуоресценттік арна көрсеткіштеріне негізделді. FAM және R6G арналары бойынша Ct <35 болған жағдайда вирус РНҚ-сының бар екені анықталды. FAM арнасында Ct <35 және R6G арнасында Ct >40 тіркелген жағдайда вирус РНҚ-сы табылмады деп бағаланды. Екі арна бойынша Ct мәні 35-тен жоғары болған нәтижелер сенімсіз деп есептелді. Шекті көрсеткіштер анықталған кезде (FAM <35, R6G 35–40) талдау нуклеин қышқылын бөліп алу кезеңінен бастап қайта жүргізілді.

2.2.4 Құтырық вирусы геномын амплификациялауға арналған праймерлерді in silico таңдау және олардың амплификация тиімділігін бағалау

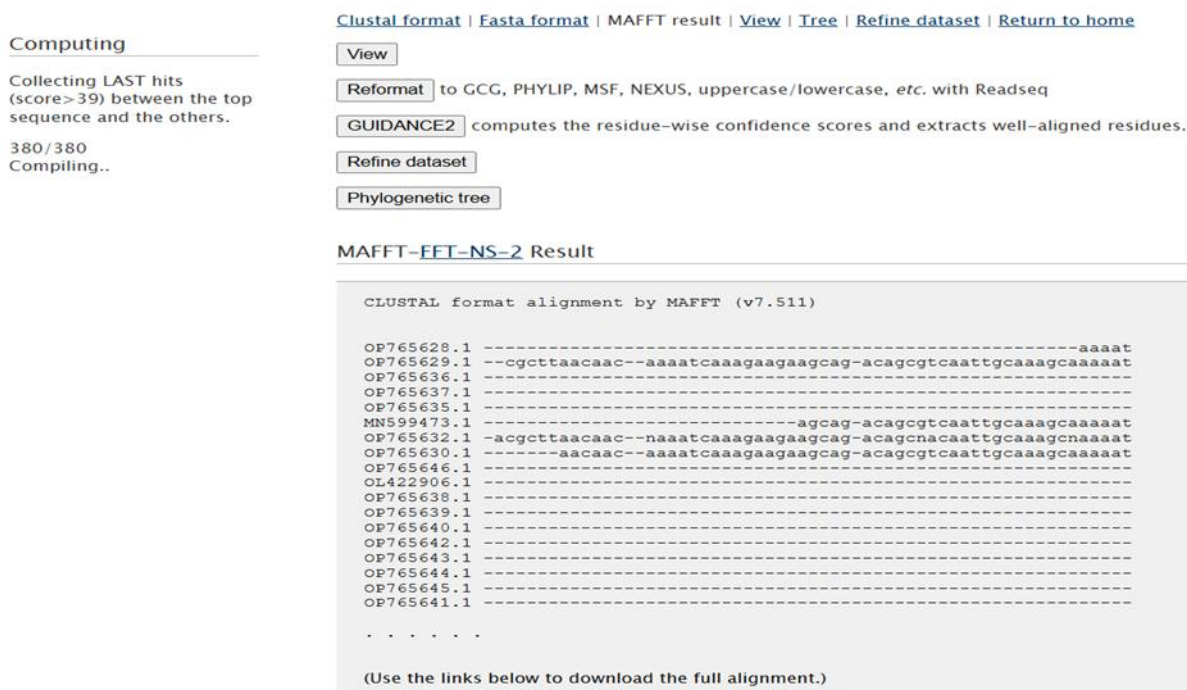
Құтырық вирусының толық геномын ампликондық тәсілмен жабу үшін праймерлерді іріктеу және олардың жұмысқа қабілеттілігін тәжірибелік амплификация арқылы бағалау жүргізілді. Алдымен NCBI Virus платформасынан (4-сурет) әртүрлі 77 елден алынған 380 құтырық вирусы изолятының толық геномдық тізбектері жүктелді (10 015 – 11 966 н.ж.). Импортталған тізбектер келесі мемлекеттерден жиналған: Ресей, Қытай, Ауғанстан, Гренландия, Польша, Грузия, Швейцария, Германия, Франция, Англия, Түркия, Моңғолия, Эстония, Ирак, Әзірбайжан, Сербия, Тәжікстан, Австрия, Венгрия, Иран, Бельгия, Словения, Финляндия, АҚШ, Канада, Мексика, Үндістан, Бангладеш, Оңтүстік Корея, Пәкістан, Эфиопия, Непал, Шри - Ланка, Марокко, Оңтүстік Африка, Тайланд, Бразилия, Гренада, Израиль, Лаос, Аргентина, Намибия, Нигер, Нигерия, Танзания, Орталық Африка Республикасы, Тайвань, Уганда, Зимбабве, Египет, Черногория, Бенин, Чили, Гайана, Француз Гвианасы, Филиппиндер, Қатар, Кения, Алжир, Сомали, Габон, Буркина - Фасо, Мавритания, Гвинея, Камбоджа, Индонезия, Сауд

Арабиясы, Оман, Біріккен Араб Әмірліктері, Мозамбик, Руанда, Мадагаскар, Сенегал, Чад, Камерун, Ботсвана және Тунис [92].



Сурет 4 – NCBI Virus деректер платформасы

Тізбектер *MAFFT v7.471* бағдарламасында «- auto» параметрімен қатарластырылып, нәтижесінде алынған консервативті гомологиялық аймақтар праймер жобалауға мақсатты учаскелер ретінде пайдаланылды (5-сурет) [93, 94].



Сурет 5 – MAFFT v7.471 бағдарламасында жүргізілген тізбектерді қатарластыру және гомологиялық аймақтарды анықтау

Құтырық вирусының геномдық аймақтарына арналған праймерлер *in silico* әдісімен *Primer3* бағдарламасы көмегімен жобаланды. Праймерлерді

жобалау кезінде нуклеотидтік тізбектердің ұзындығы, балқу температурасы (Tm), GC - құрамы, праймерлердің геномдағы орналасу аймақтары және амплификация өнімінің болжамды ұзындығы ескерілді (6-сурет).

Бағдарлама берілген параметрлерге сәйкес бірнеше праймер жұбын есептеп ұсынды, олардың ішінен термодинамикалық сипаттамалары оңтайлы және амплификацияға жарамды нұсқалар таңдап алынды. Праймерлердің GC - құрамы гуанин (G) мен цитозин (C) нуклеотидтерінің жалпы үлесі ретінде есептелді.

Жобаланған праймерлердің спецификалығы және геномның мақсатты аймақтарына сәйкестігі кейіннен қосымша *in silico* тексеруден өткізілді [95, 96].

Primer3web version 4.1.0 - Pick primers from a DNA sequence.

Select the [Task](#) for primer selection generic

[Template masking](#) before primer design ([available species](#))

Select species Example: Mus musculus [Nucleotides to mask in 5' direction](#) 1

[Primer failure rate cutoff](#) < 0.1 [Nucleotides to mask in 3' direction](#) 0

paste source sequence below (5'→3', string of ACGTNacgtn -- other letters treated as N -- numbers and blanks ignored) [repeat library](#) NONE

H671332.1 -tttttttgtaagcgt-
 X148246.1 -----
 F197744.1 ttttttttgtaagcgt-
 F197745.1 ttttttttgtaagcgt-

☒ Pick left primer, or use left primer below
 ☐ Pick hybridization probe (internal oligo), or use oligo below
 ☒

Сурет 6 – Primer3 бағдарламасы көмегімен құтырық вирусының геномдық аймақтарына арналған праймерлерді *in silico* жобалау кезеңі

Референстік геном ретінде *NC_001542.1* тізбегі алынып, геномның барлық бөлігін кемінде шамамен 100 нуклеотидтік қабаттасумен қамтитын 12 жұп праймер таңдалды (14 кесте).

Кері транскрипция үшін тура праймерлер қоспасы екі панель түрінде дайындалды (8-кесте).

Кесте 8 – Кері транскрипция үшін праймерлердің комбинациясы

Панель 1	Панель 2
Атауы	Тізбек, 5' - 3'
Rab - for 1	acgcttaacaaccagatcaaagaa
Rab - for 1860	atgttgagtgccagatagtcagacaaat
Rab - for 4031	tcaccaatagtagaggaaagagagcatc
Rab - for 6200	cttggtcaggttcaaagatcaaatatgg
Rab - for 8090	tcagtccttgatcaagccgatgag
Rab - for 10180	acatacctgaccctcattacttaccagtc

Кері транскрипция қою кезінде РНҚ үлгісі панельдік тура праймерлер қоспасымен алдын ала денатурация/аннелинг кезеңінен өткізілді (70°C – 2 мин, 56°C – 5 мин). Одан кейін SuperScript IV жүйесінің компоненттері (1× SSIV буфер, 50 мМ DTT, RNaseOUT, SuperScript IV reverse transcriptase және әр дНТФ 0,5 мМ) қосылып, реакция 40°C-та 1 сағат инкубацияланды. Алынған қДНҚ амплификацияға дейін –70°C-та сақталды.

Праймер жұптарының жұмысқа қабілеттілігі әр жұп үшін жеке амплификация қою арқылы тексерілді. Праймерлердің жұмысқа жарамдылығы тексеру, бірсатылы КТ - ПТР «ОТ - ПЦР Экстра» (Biolabmix, Ресей) жинағымен қойылды. Реакциялық қоспаның құрамы мен соңғы концентрациялар 9-кестеде келтірілген.

Кесте 9 – КТ - ПТР Экстра жинағының компоненттері

Компонент	Көлемі	Соңғы концентрациясы
Буфер RT - qPCR (2x)	25 мкл	1x
Экстра - микс RT - qPCR	2 мкл	
Тікелей праймер	өзгермелі	0,1 – 0,6 мкМ
Кері праймер	өзгермелі	0,1 – 0,6 мкМ
Зонд	өзгермелі	0,1 - 0,3 мкМ
РНҚ - матрица	өзгермелі	1 пг – 1 мкг
ДМСО	0,5-2,5 мкл	1 - 5%
Дистилденген су	50 мкл-ге дейін	-

Реакцияны орындау барысында RT - PCR Color (2×) буфері толық ерітіліп, жеңіл шайқалып араластырылды. Жұқа қабырғалы ПТР пробиркалары мұзда ұсталып, бір реакцияның соңғы көлемі 50 мкл болатындай компоненттер қосылды.

Геннің көшірме саны мен құрылымдық ерекшеліктеріне қарай экстра - микстің көлемі 1–3 мкл аралығында реттелді. Кеңістіктік құрылымы күрделі матрицаларды амплификациялауда қоспа көлемінің 1–5%-ы мөлшерінде ДМСО қолдануға рұқсат етілді. Сонымен қатар праймерлердің балқу температурасы (Т) амплификация бағдарламасын құрастыруда ескерілді. ДМСО-ның 5% мөлшерін енгізу Т-ді шамамен 5°C-қа төмендетіледі. Барлық компоненттер араластырылып, тұнуы үшін қысқа центрифугалау жүргізілді. ПТР ұсынылған режим бойынша орындалды.

Амплификация режимі праймерлердің балқу температурасы (Т) ескеріліп таңдалды (10-кесте).

Кесте 10 – ПТР жүргізудің ұсынылған режимі

Қадам	Температура, °C	Инкубация уақыты	Циклдер саны
Обраттық транскрипция	50	30 мин	1
Бастапқы денатурация	95	3 мин	1
Денатурация	93	12 сек	39
Отжиг	56	30 сек	
Элонгация	68	3 мин/т.н.ж.	
Финалды элонгация	68	10 мин	1

T_0 – матрица мен праймер кешенінің балқу температурасы, праймер құрылымына қарай есептеледі. $T \approx$ есептеу үшін кең таралған формула қолданылды:

$$T_0 (^{\circ}\text{C}) = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C) \quad (1)$$

Термиялық циклдеу Mastercycler Pro S (Eppendorf, Германия) құрылғысында жүргізілді.

Амплификация аяқталғаннан кейін әр реакциядан алынған ПТР өнімдерінің 5 мкл көлемі 1,5% агарозды гель электрофорезі арқылы тексерілді. Күтілетін ұзындықтағы өнімдер алынған жағдайда праймер жұбы жұмысқа жарамды деп бағаланды. Визуалды түрде расталған ампликондар үлес (пропорция) сақтай отырып біріктіріліп, кейінгі секвенирлеуге арналған кітапхана дайындауға дейін тазартудан өткізілді.

Ампликондарды тазарту қатты фазалы қайтымды иммобилизация (SPRI) принципіне негізделген *Agencourt AMPure XP* магниттік бөлшектері арқылы жүргізілді. Тазарту барысында артық праймерлер, дезоксинуклеотидтер, тұздар және фермент қалдықтары жойылып, кейінгі кітапхана дайындауға жарамды тазартылған ДНҚ алынды. Тазарту үшін 50 мкл ПТР қоспасына 90 мкл AMPure XP бөлшектері қосылып, бөлме температурасында инкубацияланды. Кейін үлгі магниттік штативте мөлдірлендіріліп, супернатант алынып тасталды. Бөлшектер 80% этанолмен жуылып, ампликондар 12 мкл Tris - HCl (pH 8,0) ерітіндісінде элюцияланды.

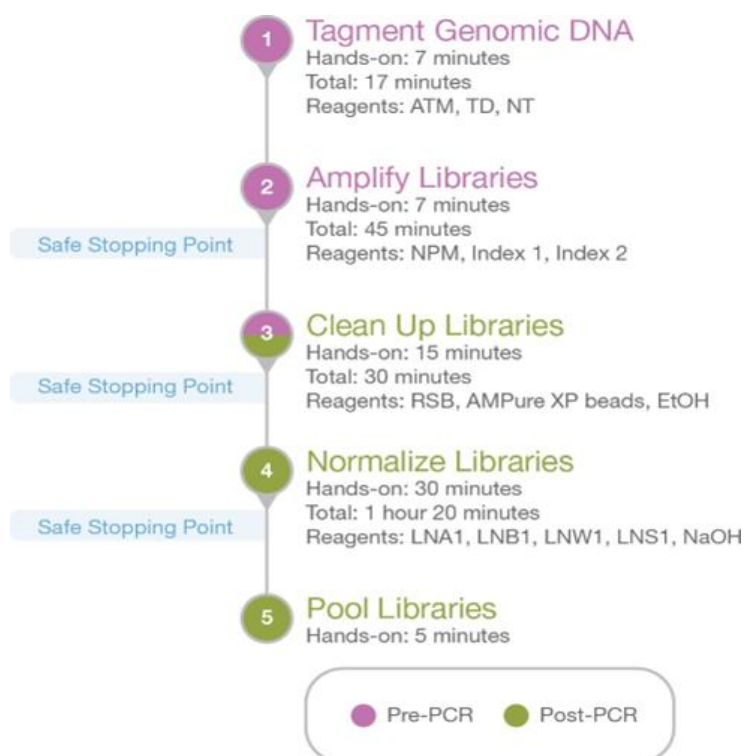
Тазартылған ампликондық ДНҚ концентрациясы Qubit 2.0 флуориметрі арқылы (dsDNA HS әдісі) өлшенді, ал өнімнің сапасы мен фрагмент мөлшері 1,5% агарозды гель электрофорезімен қосымша бағаланды. Осылай алынған тазартылған ампликондық ДНҚ келесі кезеңде Illumina платформасына арналған кітапхана дайындауға пайдаланылды.

2.2.5 Секвенирлеуге арналған ДНҚ кітапханаларын дайындау

Тазартылған ампликондық ДНҚ негізінде секвенирлеуге арналған ДНҚ кітапханалары (Illumina MiSeq платформасында) Illumina DNA Prep (M) жинағының өндіруші хаттамасына (Nextera XT қағидасы) сәйкес дайындалды. Жиынтықтағы реагенттер сақтау режиміне қарай үш топқа бөлінеді: SPB/TSB/TWB, RSB/TB1/EPM және BLT. Қосымша материалдар ретінде молекулалық - биология класты этанол, Qubit dsDNA HS өлшеу жиынтығы, Nextera DNA CD индекстері және NaOH ерітіндісі пайдаланылды [97].

Кітапхана дайындау алдында ампликондық ДНҚ мөлшері стандартталып, кітапханаға енгізілетін ұсынылатын масса 100–500 нг (ең төмені 100 нг) деңгейінде қамтамасыз етілді. Енгізу көлемі 2 мкл-ден төмен болған жағдайда үлгі жұмыс концентрациясына дейін сұйылтылды.

Кітапхана дайындау үдерісі ДНҚ тагментациясы, индекстік амплификация, кітапхананы тазарту, концентрацияны теңестіру (нормализация) және секвенирлеуге дейін денатурациялау кезеңдерінен тұрды (7-сурет).



Сурет 7 – Nextera XT технологиясы бойынша ДНҚ кітапханасын дайындаудың жалпы сызбасы

Кезең 1. ДНҚ тагментациясы және таңбалау (Tagment Genomic DNA)

Тагментация кезеңіне дейін BLT және TB1 ерітінділері бөлме температурасына жеткізілді. BLT түтігі тік күйде ұсталып, магниттік бөлшектердің буферде толық батуы қамтамасыз етілді. Ампликондық ДНҚ 96-ұяшықты ПТР-планшетке орналастырылып, тагментация кезеңі үшін TB1 және BLT реагенттері тең көлемде араластырылып дайындалған мастер-қоспа әр үлгіге 10 мкл TB1 және 10 мкл BLT есебімен қосылды. Қоспа компоненттерінің бірдей көлемде енгізілуі фрагментация және адаптерлердің жалғану үдерісінің стандартталған жағдайда жүруін қамтамасыз етті.

Тагментация кезеңінде ампликондық ДНҚ транспозома кешенінің қатысуымен бір мезетте фрагментацияланып, секвенирлеуге қажетті адаптерлік тізбектермен таңбаланды. Реакция құрамына ATM (Amplicon Tagment Mix), TD (Tagment DNA Buffer) және зерттелетін ДНҚ үлгісі енгізіліп, инкубация нәтижесінде ДНҚ молекулалары транспозомамен өңделді. Процестің аяқталуы NT (Neutralize Tagment Buffer) буферін қосу арқылы жүзеге асырылды, бұл ферменттік белсенділікті тоқтатып, келесі кезеңге өтуге мүмкіндік берді.

Қолданылған реагенттердің сақтау және пайдалану талаптары өндіруші нұсқаулығына сәйкес сақталды. ATM және TD реагенттері -25°C пен -15°C аралығында сақталып, жұмыс алдында мұзда ерітіліп, ерігеннен кейін 3–5 рет жұмсақ аударылып, қысқа уақыт центрифугаланды. NT буфері 15°C – 30°C аралығында сақталып, тұнба байқалған жағдайда толық ерігенше араластырылды. Мұндай шарттарды сақтау тагментация реакциясының тиімділігі мен нәтижелердің қайталанғыштығын қамтамасыз етті.

Кезең 2. Таңбаланған кітапханаларды амплификациялау (Amplify Libraries)

Тагментацияланған ДНҚ - ға индекстік адаптерлер (i5/i7) және 15 мкл Nextera PCR Master Mix (NPM) қосылып, ПТР арқылы индекстік амплификация жүргізілді. Қоспа пипеткамен 10 рет араластырылып, планшет жабылды. Планшет 280 × g жылдамдықпен 20°C - та 1 минут центрифугаланды. Amplify Libraries кезеңінде кітапханаларды индекстеу және жеткілікті мөлшерде амплификациялау үшін реакцияға арналған негізгі компоненттер пайдаланылды. Индекс адаптерлері –25°C –15°C температурада сақталып, қолданар алдында бөлме температурасында ерітілді, түтікшелердегі адаптерлер жеңіл араластырылып, қысқа уақыт центрифугаланды, ал планшет форматындағы адаптерлер пайдалану алдында аздап бұралды. NPM реагенті де –25°C –15°C температурада сақталып, жұмыс алдында мұз үстінде шамамен 20 минут ерітілді. Реакциялық қоспа дайындалғаннан кейін планшет алдын ала бағдарламаланған термиялық циклге орналастырылып, ПТР бағдарламасы іске қосылды, нәтижесінде әр үлгі жеке индекспен таңбаланып, кітапхана концентрациясы қажетті деңгейге дейін арттырылды.

Кезең 3. Кітапхананы тазалау (Clean Up Libraries)

Амплификация кезеңінен кейін реакциялық қоспадан артық праймерлер, ферменттер және қысқа фрагменттер AMPure XP магниттік бөлшектері арқылы жойылды. Реагенттер өндіруші ұсынымдарына сәйкес қолданылды: AMPure XP бөлшектері 2–8°C температурада сақталып, жұмыс алдында 30 минут бойы бөлме температурасында ұсталды және біртекті күйге келтіру үшін жұмсақ араластырылды; RSB буфері –25°C-тен –15°C аралығында сақталып, қолданар алдында мұзда ерітіліп, бөлме температурасында теңестірілді, кейін 2–8°C-та сақталды.

Фрагмент өлшеміне байланысты AMPure XP көлемі енгізілетін ДНҚ мөлшеріне сәйкес таңдалды: 300–500 нуклеотид аралығындағы фрагменттер үшін 1,8× коэффициент (90 мкл), 500 нуклеотидтен жоғары фрагменттер үшін 0,6× коэффициент (30 мкл), ал 2×250 циклдік режим жағдайында 0,5× коэффициент (25 мкл) қолданылды. Этанолмен жуу және RSB буферімен элюциялау нәтижесінде секвенирлеуге жарамды, тазартылған кітапхана алынды.

Кітапхананың сапасы, фрагменттік үлестірімі және өнімнің біркелкілігі Agilent 2100 Bioanalyzer құралында бағаланды. Талдау нәтижелері ампликондардың күтілетін өлшем диапазонында қалыптасқанын және кітапхананың кейінгі секвенирлеуге жарамдылығын растады.

Кезең 4. Кітапханаларды нормализациялау (Normalize Libraries)

Тазартылған кітапханалардың концентрациясын теңестіру LN сериялы реагенттер (LNA1, LNB1, LNW1, LNS1) көмегімен жүргізілді. Нормализация кезеңінің мақсаты – әрбір үлгінің секвенирлеу реакциясына тең көлемде қатысуын қамтамасыз ету және деректердегі үлестік ауытқуларды болдырмау.

LNA1 реагенті –25°C –15°C температура аралығында сақталды және қолданар алдында бөлме температурасында қыздырылды; еріту үдерісін жеделдету үшін 20–25°C су ваннасы пайдаланылды. LNB1 және LNW1

реагенттері 2–8°C температурада сақталып, жұмыс алдында бөлме температурасында теңестірілді, қажет болған жағдайда су ваннасы қолданылды. LNS1 реагенті бөлме температурасында сақталып, қолданар алдында алдын ала қыздырылды.

Кезең 5. Денатурациялау және секвенирлеуге дейінгі сұйылту

Нормаланған кітапханалар Illumina платформасына секвенирлеуге жүктеу алдында қажетті бастапқы концентрацияға (4 нМ) дейін сұйылтылып, жаңа дайындалған NaOH ерітіндісімен денатурацияланды және HT1 буферімен соңғы жүктеу концентрациясына (12 пМ) жеткізілді (11-кесте).

Кесте 11 – Денатурацияланған кітапхананы жүктеуге арналған концентрациялар (µl бірлігінде)

Денатурацияланған пул	Концентрация = 10 пМ	Денатурацияланған пул	Концентрация = 20 пМ
қорытынды жүктеу концентрациясы	қажетті HT1 көлемі	қажетті денатурацияланған пул көлемі	қажетті HT1 көлемі
8 пМ	200 мЛ	800 мЛ	600 мЛ
9 пМ	100 мЛ	900 мЛ	550 мЛ
10 пМ	NA	NA	500 мЛ
12 пМ	NA	NA	400 мЛ
14 пМ	NA	NA	300 мЛ
15 пМ	NA	NA	250 мЛ
18 пМ	NA	NA	100 мЛ
20 пМ	NA	NA	NA

Нәтижесінде секвенирлеуге дейінгі кезеңге арналған индекстелген, тазартылған, нормаланған және денатурацияланған ДНҚ кітапханалары алынды.

2.2.6 Құтырық вирусының толық геномын секвенирлеу

Дайындалған, индекстелген және денатурацияланған ДНҚ кітапханалары Illumina MiSeq платформасына өндіруші хаттамасына сәйкес жүктеліп, толық геномдық секвенирлеу жүргізілді. Секвенирлеуге дейін үлгілер бір пулға біріктіріліп, пул концентрациясы *Qubit dsDNA HS* әдісімен өлшенді және хаттамаға сәйкес жұмыс концентрациясына келтірілді.

Секвенирлеу жұмыстары *MiSeq Reagent Kit v3 (600-cycle)* реагенттер жиынтығын қолдану арқылы жүргізілді. Оқу ұзындығы Illumina платформалары үшін өндіруші ұсынымдарына сәйкес таңдалды. Жоғары өнімділікке арналған *NovaSeq 6000*, *HiSeq X*, *HiSeq 3000/4000*, сондай-ақ *NextSeq 500/550*, *MiSeq*, *MiniSeq* және *iSeq 100* жүйелерінде ұсынылатын формат 2×151 жұпталған оқылым болып табылады. *HiSeq 2000* және *HiSeq 2500* платформасының жоғары өнімділік режимінде 2×126 формат, ал *HiSeq 2500* жедел іске қосу режимінде 2×251 формат қолданылады.

Осы ұсынымдарға сәйкес зерттеуде жұпталған оқылым технологиясы пайдаланылып, кітапхана фрагменттерін екі бағытта оқу арқылы геномдық аймақтардың қамтылу тереңдігі мен жинақтау дәлдігі қамтамасыз етілді.

Секвенирлеу барысында үлгілердің индекстелуі Nextera DNA CD индекстер картасына сәйкес жүргізілді (12-кесте). Қажет болған жағдайда секвенирлеу сапасын ішкі бақылау үшін PhiX бақылау үлгісі қосылды.

Кесте 12 – Nextera DNA CD индекстері (96 индекс, планшет түріндегі жинақ)

Запуск	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	H505 - H701	H506 - H702	H517 - H703	H505 - H705	H506 - H707	H517 - H723	H505 - H706	H506 - H712	H517 - H720	H05 - H710	H506 - H711	H517 - H714
B	H517 - H702	H505 - H703	H506 - H701	H517 - H707	H505 - H723	H506 - H705	H517 - H712	H505 - H720	H506 - H706	H517 - H711	H505 - H714	H506 - H710
C	H506 - H703	H517 - H701	H505 - H702	H506 - H723	H517 - H705	H505 - H707	H506 - H720	H517 - H706	H505 - H712	H506 - H714	H517 - H710	H505 - H711
D	H503 - H705	H503 - H707	H503 - H723	H503 - H706	H503 - H712	H503 - H720	H503 - H710	H503 - H711	H503 - H714	H503 - H701	H503 - H702	H503 - H703
E	H516 - H706	H516 - H712	H516 - H720	H516 - H710	H516 - H711	H516 - H714	H516 - H701	H516 - H702	H516 - H703	H516 - H705	H516 - H707	H516 - H723
F	H522 - H710	H510 - H711	H513 - H714	H522 - H701	H510 - H702	H513 - H703	H522 - H705	H510 - H707	H513 - H723	H522 - H706	H510 - H712	H513 - H720
G	H513 - H711	H522 - H714	H510 - H710	H513 - H702	H522 - H703	H510 - H701	H513 - H707	H522 - H723	H510 - H705	H513 - H712	H522 - H720	H510 - H706
H	H510 - H714	H513 - H710	H522 - H711	H510 - H703	H513 - H701	H522 - H702	H510 - H723	H513 - H70	H522 - H707	H510 - H720	H513 - H706	H522 - H712

Секвенирлеу аяқталғаннан кейін бастапқы деректер *FASTQ* форматында экспортталып, әрі қарай сапалық бақылау және биоинформатикалық өңдеуге жіберілді.

Қосымша валидациялау мақсатында жекелеген ПТР-өнімдер мен қысқа геномдық фрагменттер Сэнгер әдісімен секвенирленді. Циклдік секвенирлеу BigDye Terminator v3.1 реакциялық жиынтығын қолдана отырып, өндіруші ұсынымдарына сәйкес жүргізілді. Реакциялық қоспа құрамына 1 мкл v3.1 дайын реакциялық қоспа, 1,5 мкл 5 есе секвенирлеу буфері, 0,5 мкл 20 мкМ тура немесе кері праймер және 50–150 нг мөлшеріндегі матрицалық ДНҚ (плазмида немесе тазартылған ПТР өнімі) енгізілді, жалпы көлемі нуклеазсыз сумен 10 мкл-ге дейін жеткізілді.

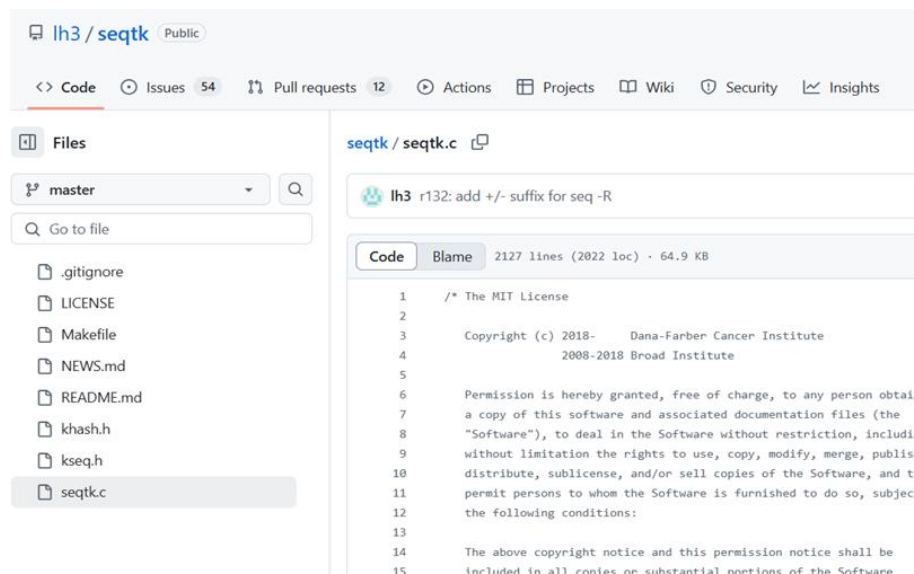
Циклдік реакция аяқталғаннан кейін амплификаттар этанол - ЭДТА әдісімен тазартылып, Hi-Di формамидінде қайта суспендирленді. ДНҚ фрагменттерінің капиллярлық электрофорезі *3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems)* генетикалық анализаторында жүргізілді. Алынған хроматограммалар негізінде нуклеотидтік тізбектер оқылып, бастапқы нәтижелермен салыстырмалы талдау арқылы расталды.

2.2.7 Секвенирлеу нәтижелерін бастапқы өңдеу және деректерді жинақтау

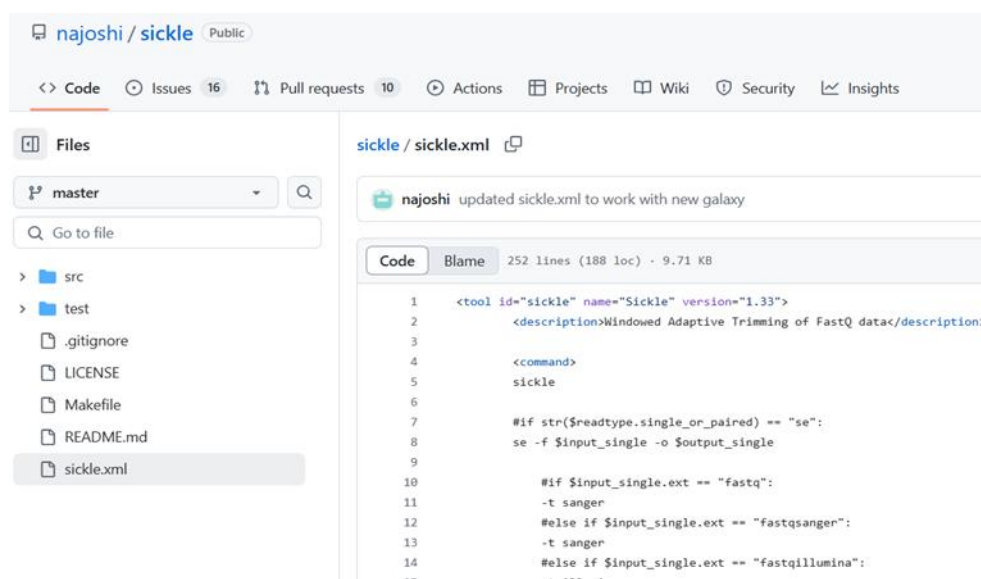
Секвенирлеу нәтижесінде алынған бастапқы деректердің сапасы *FastQC v0.11.7* бағдарламасы көмегімен бағаланды. Оқу ұзындығы, сапа көрсеткіштері (Q - score), адаптерлердің болуы және нуклеотидтік құрам тексерілді.

Шикі деректерді алдын ала өңдеу барысында төмен сапалы нуклеотидтер мен қысқа оқуларды алып тастау үшін *Seqtk v1.3 - r106* (8-сурет) және *Sickle*

v1.33 (9-сурет) құралдары қолданылды. Сапалық сүзгіден өткен оқулар кейінгі жинақтау кезеңіне пайдаланылды [98-100].



Сурет 8 – Seqtk v1.3 - r106 бағдарламасы арқылы оқылымдардың бастапқы өңделуі



Сурет 9 – Шикі деректерді Sickle v1.33 бағдарламалары арқылы талдау

Фильтрацияланған оқулар SPAdes v3.15.3 бағдарламасында *de novo* тәсілімен жиналды (к - mer = 127, - careful параметрі). Жинақтау нәтижесінде алынған контигтер ішінен ең ұзын және сапасы жоғары тізбектер таңдалып, олардың таксономиялық сәйкестігі *Nucleotide BLAST* сервисі арқылы *Rabies virus* (taxid: 11292) дерекқорымен салыстыру жолымен тексерілді. Жабын көлемі мен сәйкестік пайызы ең жоғары болған тізбек референстік геном ретінде қабылданды (10-сурет) [101-103].

Basic Local Alignment Search Tool

BLAST finds regions of similarity between biological sequences. The program compares nucleotide or protein sequences to sequence databases and calculates the statistical significance. [Learn more](#)

Web BLAST

Nucleotide BLAST
nucleotide ► nucleotide

blastx
translated nucleotide ► protein

tblastn
protein ► translated nucleotide

Protein BLAST
protein ► protein

BLAST Genomes

Human Mouse Rat Microbes **Search**

Enter Query Sequence

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) [Clear](#)

Query subrange [?](#)

From

To

Or, upload file Файл не выбран [?](#)

Job Title

Enter a descriptive title for your BLAST search [?](#)

☐ Align two or more sequences [?](#)

Choose Search Set

Database ☒ Standard databases (nr etc.): ☐ rRNA/ITS databases ☐ Genomic + transcript databases ☐ Betacoronavirus

☒ Experimental databases [Try experimental taxonomic nt databases](#) [Download](#)

For more info see [What are taxonomic nt databases?](#)

Nucleotide collection (nr/nt) [?](#)

Lyssavirus rabies (taxid:11292) ☐ exclude [Add organism](#)

Enter organism common name, binomial, or tax id. Only 20 top taxa will be shown [?](#)

☐ Models (XM/XP) ☐ Uncultured/environmental sample sequences

☐ Sequences from type material

[YouTube](#) Create custom database

Enter an Entrez query to limit search [?](#)

Program Selection

Optimize for ☒ Highly similar sequences (megablast)

☐ More dissimilar sequences (discontiguous megablast)

☐ Somewhat similar sequences (blastn)

Choose a BLAST algorithm [?](#)

BLAST Search database Nucleotide collection (nr/nt) using Megablast (Optimize for highly similar sequences)

☐ Show results in a new window

+ Algorithm parameters

Сурет 10 – Nucleotide BLAST сервисінде алынған тізбектердің Nucleotide collection дерекқорымен салыстырылуы

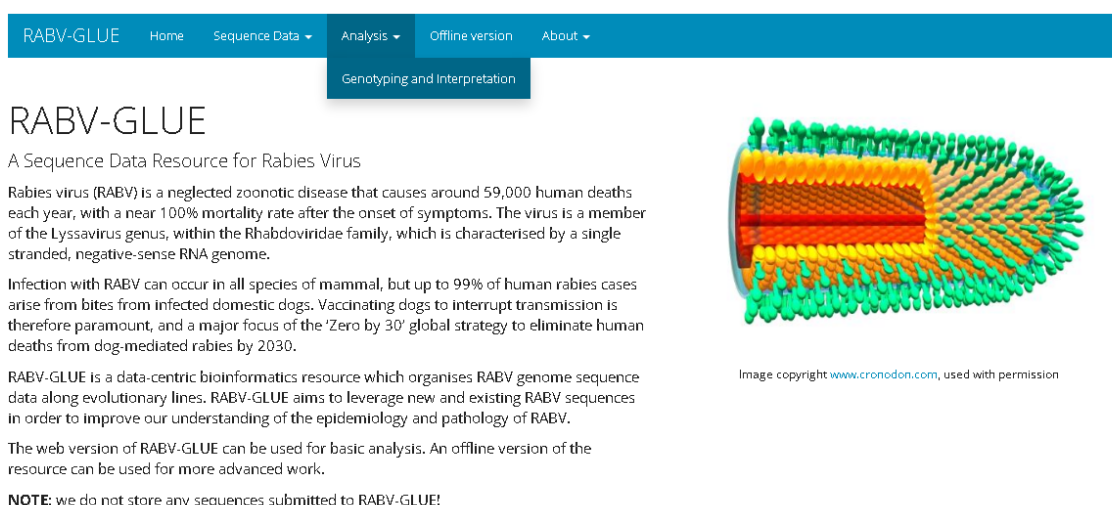
Оқуларды таңдалған референстік геномға туралау *BWA v0.7.17 - r1188* бағдарламасының көмегімен жүргізілді. Тураланған деректер негізінде нуклеотидтік варианттарды анықтау және консенсус тізбектерін қалыптастыру *FreeBayes v1.3.6* және *BCFtools v1.15.1* құралдары арқылы жүзеге асырылды.

Секвенирлеу тереңдігі мен жабын біркелкілігі *SAMtools v1.15.1* бағдарламасымен есептелді. Алынған консенсус геномдық тізбектер *VADR v1.4.1* бағдарламасы көмегімен аннотацияланып, гендердің орналасуы мен құрылымдық элементтері анықталды [104].

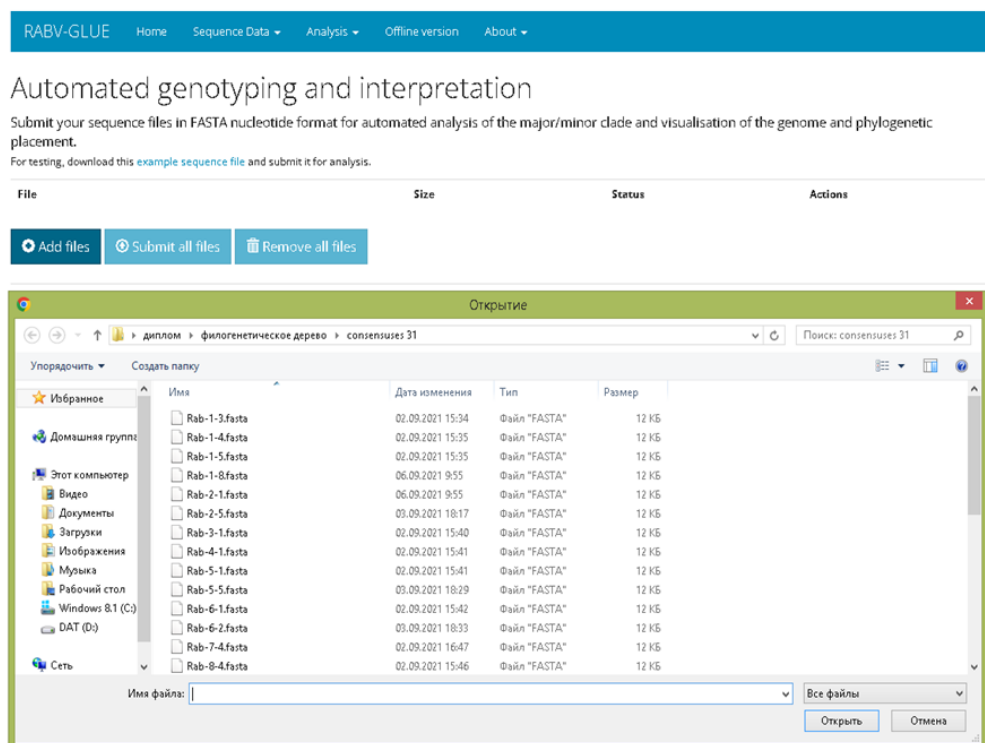
Барлық биоинформатикалық талдау кезеңдері *Ubuntu 20.04.4 LTS* операциялық жүйесінде орындалды.

2.2.8 Құтырық вирусы изоляттарының генотиптік және филогенетикалық талдауы

2.2.8.1 Генотиптеу және салыстырмалы референттік тізбектерді іріктеу
Зерттелген құтырық вирусы изоляттарының генотиптік тиесілігін анықтау және филогенетикалық тұрғыдан жақын тізбектерді іріктеу үшін *RABV - GLUE* және *NCBI Virus* интернет - ресурстары пайдаланылды (11, 12, 13-суреттер) [105].



Сурет 11 – RABV - GLUE веб - платформасының бастапқы интерфейсі



Сурет 12 – RABV - GLUE жүйесіне тізбектерді жүктеу кезеңі

RABV-GLUE
Home
Sequence Data
Analysis
Offline version
About

Automated genotyping and interpretation

Submit your sequence files in FASTA nucleotide format for automated analysis of the major/minor clade and visualisation of the genome and phylogenetic placement.

For testing, download this [example sequence file](#) and submit it for analysis.

File	Size	Status	Actions
Rab-1-3.fasta	0.01 MB		Submit Show analysis Remove
Rab-1-4.fasta	0.01 MB		Submit Show analysis Remove
Rab-1-5.fasta	0.01 MB		Submit Show analysis Remove
Rab-1-8.fasta	0.01 MB		Submit Show analysis Remove
Rab-2-1.fasta	0.01 MB		Submit Show analysis Remove
Rab-2-5.fasta	0.01 MB		Submit Show analysis Remove
Rab-3-1.fasta	0.01 MB		Submit Show analysis Remove
Rab-4-1.fasta	0.01 MB		Submit Show analysis Remove
Rab-5-1.fasta	0.01 MB		Submit Show analysis Remove
Rab-5-5.fasta	0.01 MB		Submit Show analysis Remove
Rab-6-1.fasta	0.01 MB		Submit Show analysis Remove
Rab-6-2.fasta	0.01 MB		Submit Show analysis Remove
Rab-7-4.fasta	0.01 MB		Submit Show analysis Remove
Rab-8-4.fasta	0.01 MB		Submit Show analysis Remove
Rab-9-1.fasta	0.01 MB		Submit Show analysis Remove
a			
Rab-11-1.fasta	0.01 MB		Submit Show analysis Remove
Rab-12C.fasta	0.01 MB		Submit Show analysis Remove
Rab-13-1.fasta	0.01 MB		Submit Show analysis Remove
Rab-014.fasta	0.01 MB		Submit Show analysis Remove
Rab-14-1-blue.fasta	0.01 MB		Submit Show analysis Remove
Rab-15-1.fasta	0.01 MB		Submit Show analysis Remove
Rab-16-6.fasta	0.01 MB		Submit Show analysis Remove
Rab-35-1-4.fasta	0.01 MB		Submit Show analysis Remove
Rab-35-2-4.fasta	0.01 MB		Submit Show analysis Remove
Rab-228.fasta	0.01 MB		Submit Show analysis Remove
Rab-231-1.fasta	0.01 MB		Submit Show analysis Remove
Rab-349.fasta	0.01 MB		Submit Show analysis Remove
Rab-Arman-1.fasta	0.01 MB		Submit Show analysis Remove
Rab-Arman-2.fasta	0.01 MB		Submit Show analysis Remove
Rab-Asi-1.fasta	0.01 MB		Submit Show analysis Remove

Add files
Submit all files
Remove all files

ә

Сурет 13 – RABV - GLUE бағдарламасында автоматты генотиптеу және нәтижелерді интерпретациялау

RABV - GLUE платформасы құтырық вирусының геномдық тізбектерін эволюциялық тармақтар бойынша жүйелеп, жаңа алынған изоляттарды белгілі генотиптермен автоматты түрде салыстыруға мүмкіндік береді. Осы ресурс

көмегімен зерттелген тізбектердің белгілі кладаларға жатуы алдын ала анықталды.

2.2.8.2 Нуклеотидтік тізбектерді туралау және деректерді талдауға дайындау

Изоляттардың белгілі кладаларға жатуын нақтылау мақсатында зерттелген үлгілердің N генінің толық тізбектері Қазақстан өңірлерінен және көршілес елдерден алынған 202 репрезентативті изоляттың тізбектерімен салыстырылды.

Барлық нуклеотидтік тізбектер *MEGA X* бағдарламасында *ClustalW* алгоритмі көмегімен кодон деңгейінде, әдепкі параметрлер бойынша тураланды. Туралау нәтижелері визуалды түрде тексеріліп, әрі қарай филогенетикалық талдауға пайдалануға жарамды деп танылды (Қосымша Д).

2.2.8.3 Neighbor-Joining әдісімен филогенетикалық ағаш құру

Тураланған деректер *MEGA X* бағдарламасының *Analyze* режимінде ашылып, филогенетикалық ағаш *Neighbor - Joining* әдісімен құрылды.

Ағаштың тармақтарының сенімділігі *1000 bootstrap* репликациясы арқылы бағаланды, ал эволюциялық арақашықтық *p - distance* әдісімен есептелді. Сенімділігі төмен (<50%) тармақтар автоматты түрде қысқартылып, сыртқы топ (outgroup) белгіленді (Қосымша Д).

2.2.8.4 Филогенетикалық ағаштарды визуализациялау және экспорттау

Қорытынды филогенетикалық ағаш *PDF* және *Newick* форматтарында экспортталды (Қосымша Д).

Newick форматындағы файлдар әрі қарай *iTOL* веб - платформасына жүктеліп, визуалды редакциялау және аннотациялау жүргізілді (Қосымша Д) [45, p. 2193-2195].

2.2.8.5 Байес әдісіне негізделген эволюциялық талдау (BEAST)

Құтырық вирусының эволюциялық жылдамдығын және филогенетикалық параметрлерін бағалау мақсатында талдау *BEAST v1.10.4* бағдарламалық пакеті көмегімен жүргізілді. Есептеулерде Марков тізбектері Монте - Карло әдісі (MCMC) қолданылып, модельге изоляттардың алынған уақыты (sampling date) енгізілді.

Алдымен талдауға арналған тізбектер *MAFFT* бағдарламасында көптік қатарластырудан өткізілді. Осы тураланған деректер негізінде *BEAST2* форматына арналған *XML* файлы құрылып, онда нуклеотидтерді алмастыру моделі, молекулалық сағат моделі, филогенетикалық ағашқа арналған априорлық үлестірулер және *MCMC* параметрлері анықталды.

MCMC есептеулері аяқталғаннан кейін нәтижелер *Tracer* бағдарламасында сходимость пен параметрлердің сенімділігін бағалау үшін талданды, *TreeAnnotator* көмегімен максималды сенімділік ағашы (*MCC tree*) құрастырылды, ал *FigTree* бағдарламасында қорытынды ағаш визуализацияланып, аннотацияланды [106].

Осы кезеңдер BEAST бағдарламалық кешені көмегімен құтырық вирусының эволюциялық тарихын кешенді бағалауға мүмкіндік берді.

2.2.8.6 Генетикалық қашықтықты Байес тәсілімен бағалау

Филогенетикалық ағаштарды құру және модель параметрлерін бағалау *BEAST* бағдарламасы арқылы жүзеге асырылды. Алынған ағаш құрылымдары *MEGA* бағдарламасында визуализацияланды. Талдау барысында жануар иесінің түрі жеке сипаттама ретінде енгізіліп, филогенетикалық құрылымда белгіленді.

Генотиптер арасындағы генетикалық қашықтықты бағалау және эволюциялық өзара байланыстарды анықтау мақсатында Байес әдісіне негізделген филогенетикалық талдау жүргізілді. Талдауға әртүрлі жануар иелерінен бөлініп алынған 31 *Rabies lyssavirus* штамының N генінің нуклеотидтік тізбектері енгізілді.

Алдымен барлық тізбектер көптік туралау (multiple sequence alignment) әдісімен өңделді. Туралау *ClustalW* және *MAFFT* бағдарламаларының көмегімен орындалды, нәтижесінде нуклеотидтердің позициялық сәйкестігі қамтамасыз етілді. Тураланған тізбектер негізінде генетикалық қашықтықтарды есептеу және филогенетикалық модельдеу үшін деректер жиынтығы қалыптастырылды.

Филогенетикалық талдау барысында Байес ықтималдық әдісі қолданылды. Нуклеотидтік ауысуларды сипаттау үшін жалпы уақытқа қайтымды модель (GTR) таңдалды. Қосымша салыстырмалы бағалау мақсатында нуклеотидтік ауысулар саны *Jukes - Cantor* моделіне сәйкес есептелді. Бұл модельдер нуклеотидтердің ауысу ықтималдықтарын ескеруге және генетикалық қашықтықты стандартталған түрде бағалауға мүмкіндік береді.

3 ЗЕРТТЕУ НӘТИЖЕЛЕРІ

3.1 Патологиялық материалдардан алынған суспензиялар, РНҚ-ны бөліп алу, кері транскрипция және нақты уақыт режиміндегі ПТР нәтижелері

2020–2022 жылдары құтырыққа клиникалық күдік туғызған жануарлардан алынған 117 ми үлгісі молекулалық зерттеуге тартылды (2.1 бөлім, 5 кесте). Барлық үлгілерден 10% суспензия дайындалып, коммерциялық жинақ нұсқаулығына сәйкес РНҚ бөлініп алынды. Бөліп алынған РНҚ негізінде кері транскрипция жүргізіліп, алынған кДНК нақты уақыт режиміндегі ПТР арқылы құтырық вирусының РНҚ-сына (*Rabies virus/Rabies lyssavirus*) скринингтен өткізілді.

Зерттелетін сынамалар бойынша ПТР нәтижесінің интерпретациясы FAM және R6G арналары бойынша Ct <35 болған жағдайда вирус РНҚ-сының бар екенін растады. FAM арнасында Ct <35 және R6G арнасында Ct >40 тіркелген жағдайда вирус РНҚ-сы табылмады деп бағаланды. Екі арна бойынша Ct мәні 35-тен жоғары болған нәтижелер сенімсіз деп есептелді.

Теріс бақылауда (КО -) FAM және R6G арналары бойынша Ct мәндері тіркелмеді, ал оң бақылауда (КО +) зерттелген жалпы 117 үлгіден 31 үлгіде екі арнада да Ct көрсеткіші 35 циклден төмен болды. Сапа критерийлеріне сәйкес келген 31 үлгі толық геномдық талдауға жарамды деп танылды. Секвенирленген және GenBank дерекқорына енгізілген изоляттардың паспорты 13-кестеде берілген.

Кесте 13 – Секвенирлеуге өткен (толық геном алынған) изоляттар және GenBank тіркеу нөмірлері

Изолят нөмірі	Жануар түрі	Облыс	Аудан/қала
Rab - 2 - 1	ІҚМ	ШҚО	Аягөз ауданы
Rab - 3 - 1	ІҚМ	ШҚО	Аягөз ауданы
Rab - 4 - 1	ІҚМ	ШҚО	Аягөз ауданы
Rab - 5 - 1	ІҚМ	ШҚО	Аягөз ауданы
Rab - 6 - 1	ІҚМ	ШҚО	Аягөз ауданы
Rab - 9 - 1	ІҚМ	ШҚО	Бесқарағай ауданы
Rab - 10 - 1	ІҚМ	ШҚО	Бесқарағай ауданы
Rab - 11 - 1	ІҚМ	ШҚО	Аягөз ауданы
Rab - 13 - 1	ІҚМ	ШҚО	Аягөз ауданы
Rab - 14 - 1 - blue	ІҚМ	ШҚО	Жармин ауданы
Rab - 15 - 1	ІҚМ	ШҚО	Жармин ауданы
Rab - Asl - 1	Түлкі	ШҚО	Урджар ауданы
Rab - 16 - 6	Түлкі	ШҚО	Аягөз ауданы
Rab - 349	Мысық	ШҚО	Семей қаласы
Rab - 1 - 5	ІҚМ	Павлодар облысы	Баянауыл ауданы
Rab - 2 - 5	ІҚМ	Павлодар облысы	Железин ауданы
Rab - 5 - 5	ІҚМ	Павлодар облысы	Железин ауданы
Rab - 6 - 2	Түлкі	Павлодар облысы	Аққулы ауданы
Rab - 231 - 1	Ит	Ақмола облысы	Астрахан ауданы
Rab - 1 - 4	ІҚМ	Атырау облысы	Қызылқоға ауданы
Rab - 7 - 4	ІҚМ	Атырау облысы	Қызылқоға ауданы

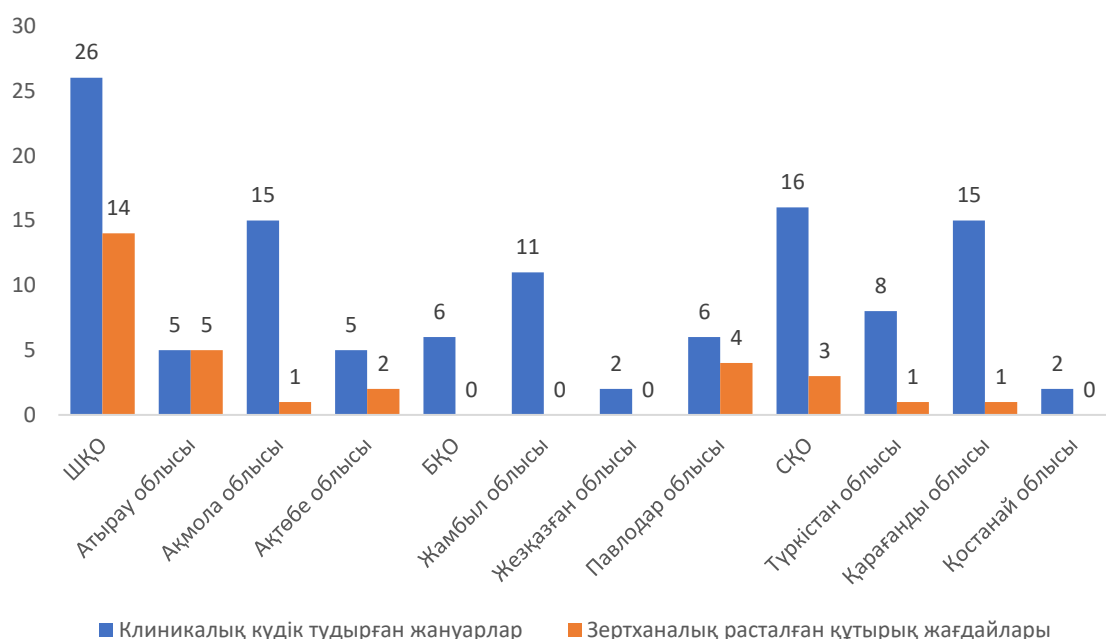
13-кестенің жалғасы

Rab - 8 - 4	ON366708	ІҚМ	Атырау облысы	Қызылқоға ауданы
Rab - 35 - 1 - 4	ON366709	ІҚМ	Атырау облысы	Қызылқоға ауданы
Rab - 35 - 2 - 4	ON366710	ІҚМ	Атырау облысы	Қызылқоға ауданы
Rab - 12C	OP477371	Ит	Ақтөбе облысы	Ақтөбе қаласы
Rab - 014	OP477368	Ит	Ақтөбе облысы	Шалқар ауданы
Rab - Arman - 2	OP477392	ІҚМ	СҚО	Мамлют ауданы
Rab - 1 - 3	OP477373	Ит	СҚО	Қызылжар ауданы
Rab - 1 - 8	OP477378	ІҚМ	СҚО	Ақжар ауданы
Rab - Arman - 1	OP477391	ІҚМ	Қарағанды облысы	Балқаш ауданы
Rab - 228	OP477380	Ит	Түркістан облысы	Шымкент қаласы

Толық геномдық тізбектер алынған 31 изоляттың жануар түрлері бойынша таралуы: 22 - ірі қара мал, 5 - ит, 3 - жабайы түлкі, 1 - мысық.

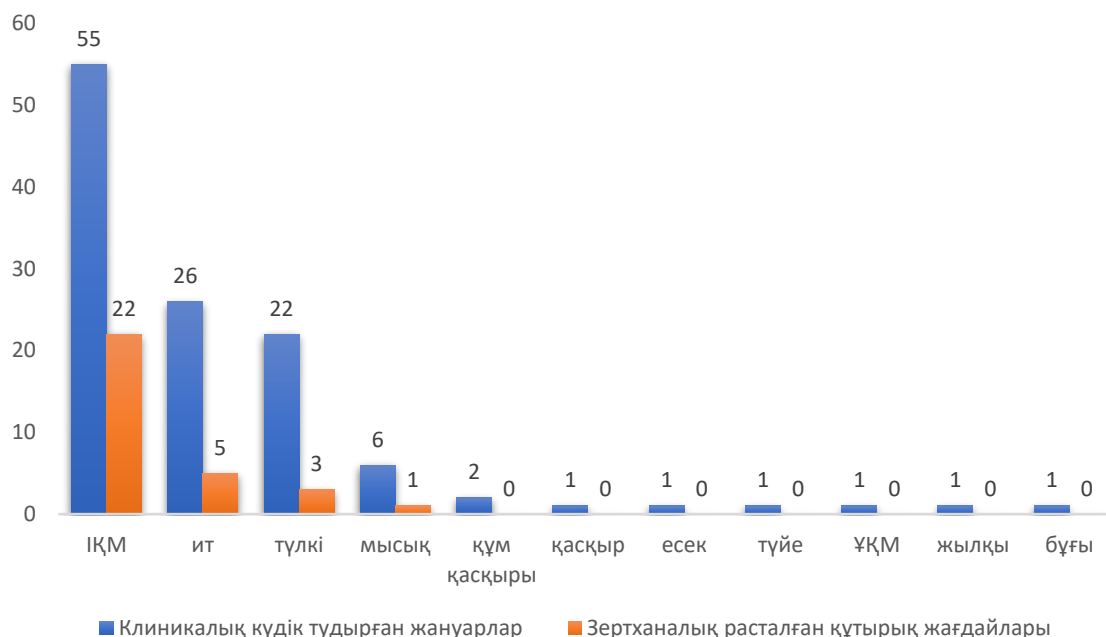
Эпизоотиялық өршудің шыңы 2021 жылға (25 үлгі; 80,6%) сәйкес келді. 2020 және 2022 жылдардағы төмен көрсеткіштер (әр жылда 3 үлгіден) құтырық ауруының табиғи циклділігімен немесе ветеринариялық іс-шаралардың (вакцинация) тиімділігінің ауытқуымен байланысты болуы мүмкін.

2020 - 2022 жылдары Қазақстан аумағында құтырыққа клиникалық күдік тудырған жануарлардан алынған материалдар бойынша аймақтық және түрлік құрылымға талдау жүргізілді. Клиникалық күдік тіркелген жағдайлар мен зертханалық расталған құтырық диагноздарының арақатынасы өңірлер бойынша 14-суретте көрсетілген.



Сурет 14 – 2020-2022 жылдары Қазақстан өңірлері бойынша құтырыққа клиникалық күдік тудырған жануарлар мен зертханалық расталған жағдайлардың арақатынасы

Сонымен қатар, зерттеуге тартылған жануарлар түрлері бойынша құтырыққа күдікті және расталған жағдайлардың үлестік таралуы 15-суретте берілген.



Сурет 15 – 2020-2022 жылдары зерттеуге алынған жануар түрлері бойынша құтырыққа клиникалық күдік тудырған және зертханалық расталған жағдайлардың таралуы

14-суретте 2020–2022 жылдар аралығында Қазақстан өңірлері бойынша құтырыққа клиникалық күдік тудырған жануарлар саны мен зертханалық расталған жағдайлардың арақатынасы көрсетілген. Аурудың ең көп шоғырлануы Шығыс Қазақстан облысында байқалды (14 оң үлгі, яғни жалпы оң нәтижелердің 45,1%-ы). Бұл аймақтың географиялық ерекшелігі, орманды-таулы алқаптардың көптігі және жабайы фаунаның (түлкі, қарсақ) тығыздығы эпизоотиялық тізбектің тұрақты сақталуына ықпал етеді. Сонымен қатар, Атырау (5 үлгі) және Павлодар (4 үлгі) облыстарындағы көрсеткіштер вирустың Қазақстанның батыс және солтүстік аймақтарында да белсенді айналымда екенін растайды.

15-суретте зерттеуге алынған жануар түрлері бойынша құтырыққа клиникалық күдік тудырған және зертханалық расталған жағдайлардың құрылымын бейнелейді. Клиникалық күдік жағдайларының негізгі үлесі ірі қара малға (55) тиесілі, одан кейін иттер (26) және түлкілер (22) орын алады. Зертханалық расталған жағдайлар ішінде де ірі қара мал (22) және иттер (5) басым, түлкілерден 3 оң нәтиже анықталған. Мысықтар арасында 1 расталған жағдай тіркелген, ал құм қасқыры, қасқыр, есек, түйе, ұсақ мал, жылқы және бұғы бойынша зертханалық растау тіркелмеген. Көрсеткіштер құтырықтың ауыл шаруашылығы жануарлары мен үй жануарлары арасында эпизоотиялық маңызын айқындайды, сондай-ақ жабайы фауна өкілдерінің инфекция айналымындағы рөлін көрсетеді.

14, 15-суреттерде келтірілген деректер 2020–2022 жылдары Қазақстан аумағында құтырыққа клиникалық күдік тіркелген жануарлар санының (n = 117) өңірлер мен жануар түрлері бойынша біркелкі таралмағанын көрсетеді. Клиникалық күдік жағдайлары ең алдымен ірі қара мал, иттер мен түлкілер арасында басым болды, алайда зертханалық түрде расталған құтырық жағдайларының үлесі салыстырмалы түрде төмен екені байқалды.

Ірі қара малдың (ІҚМ) үлесінің жоғары болуы (71%) олардың вирус көзі екенін білдірмейді. Бұл көрсеткіш, негізінен, осы жануарлардың қоздырғышқа өте сезімтал келетінін және табиғи ошақтарда жыртқыштармен жиі байланысқа түсетінін көрсетеді. Яғни ІҚМ эпизоотиялық үдерісте инфекцияны ары қарай таратпайтын, «тұйық» буын ретінде қаралады, басқаша айтқанда, инциденттік сезімтал ие (dead-end host) қызметін атқарады.

Аурудың нақты табиғи резервуарлары ретінде зерттеу барысында анықталған түлкілер мен жабайы иттерді атау орынды. Дәл осы жануарлар арасында вирус тұрақты түрде айналымда болады және олар ауыл шаруашылығы малдары үшін негізгі жұқтыру көзі болып қалып отыр.

Сондықтан 13-кесте мен 15-суретте келтірілген мәліметтер Қазақстанның әртүрлі өңірлеріндегі құтырықтың эпизоотиялық жағдайы жабайы фауна өкілдерінің белсенділігімен тікелей байланысты екенін көрсетеді.

Осы 31 үлгі бойынша сапалы толық немесе толыққа жуық геномдық нуклеотидтік тізбектер алынып, әрі қарай секвенирлеу және биоинформатикалық өңдеу кезеңдеріне жіберілді.

3.2 Құтырық вирусы геномын амплификациялауға арналған праймерлерді іріктеу және олардың тиімділігін бағалау нәтижелері

Аталған 31 үлгі бойынша толық немесе толыққа жуық геномдық нуклеотидтік тізбектер алу мақсатында амплификация және секвенирлеу хаттамалары қолданылды. Осы кезеңнің тиімді орындалуы амплификацияға арналған праймерлерді дұрыс таңдауға тікелей тәуелді болғандықтан, *Rabies lyssavirus* геномын толық қамтитын праймерлерді іріктеу және олардың жұмысқа қабілеттілігін бағалау нәтижелері қарастырылды.

In silico салыстырмалы талдау нәтижесінде *Rabies lyssavirus* геномының консервативті аймақтарына бағытталған, геномды толық қамтитын 12 праймер жұбы іріктелді. Таңдалған праймерлердің нуклеотидтік тізбектері мен орналасу аймақтары 14-кестеде келтірілген.

Кесте 14 – Іріктелген праймерлер

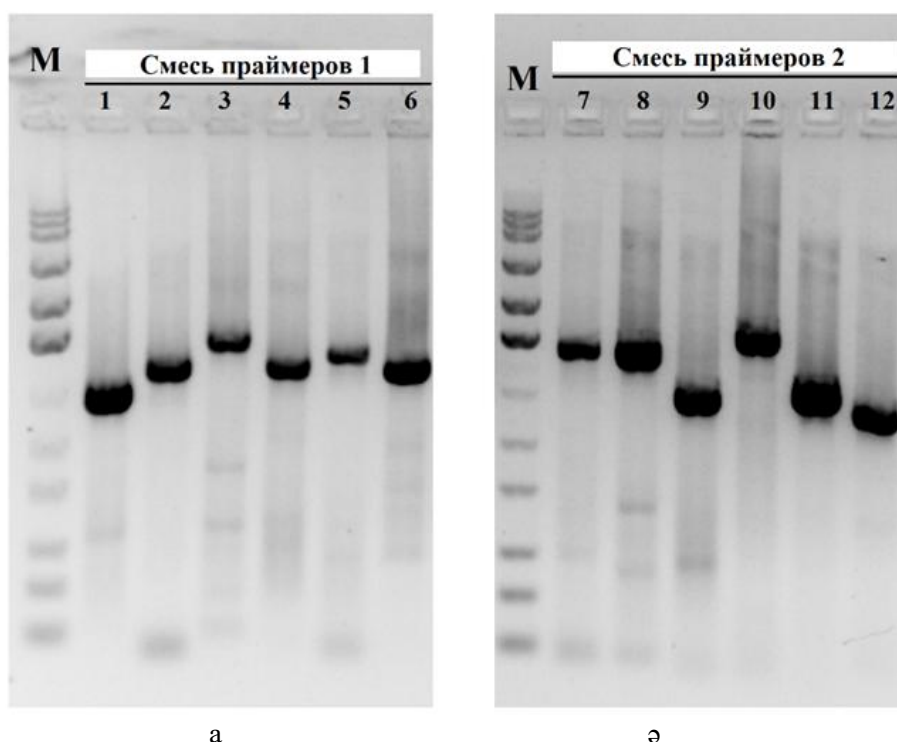
Тікелей праймер	Тікелей праймер тізбегі, 5' - 3'	Кері праймер	Кері праймер тізбегі, 5' - 3'
Rab - for 1	acgcttaacaaccagatcaagaa	Rab - rev 1000	atcctacaaagtgaatgagattgaacac
Rab - for 895	ttcgaggaagagataaggagaatgtt	Rab - rev 2230	gcttctttaactatgtcatcaagggtcat
Rab - for 1860	atgttgagtcagatagtcagacaaat	Rab - rev 3040	cctcgaattcatgttgatacacca
Rab - for 2910	aggaccttatcttcagtgggc	Rab - rev 4250	actcctctcttttcttgaccaactcctc
Rab - for 4031	tcaccaatagtagaggaaagagagcatc	Rab - rev 5560	aatggggtcatcgtagacttctcc

Rab - for 5470	gtgcataattataaagggtgggtcat	Rab - rev 6430	acttcataaccagagtttccgcacat
Rab - for 6200	cttggtcaggttcaaagatcaaatatgg	Rab - rev 7390	tttgatgattgttcacttctcatagtc
Rab - for 7000	tactggatgacaagtcacacttttcacc	Rab - rev 8480	atacagagcctttctgattgcatcctt
Rab - for 8090	tcagtctttgatcaagccgatgag	Rab - rev 9390	cataaagcatcaatggctggaacat
Rab - for 9275	gggtcagccttgacaggttcaa	Rab - rev 10250	gcacctgcctcattaaagaactca
Rab - for 10180	acatacctgaccctcattactaccagtc	Rab - rev 11330	agagttatgatcatctcattgtaaggatt
Rab - for 10950	cataattgtgacgcagaagtactgacat	Rab - rev 11760	ttttgtaaatacagccttatccagtgag

Іріктелген праймер жұптары геномның барлық аймақтарын орта есеппен 100 нуклеотидтік қабаттасумен қамтып, толық геномдық амплификация жүргізуге мүмкіндік берді. In silico болжау бойынша амплификаттардың ұзындығы 750–1500 нуклеотид аралығында болды, ал қабаттасатын аймақтардың орташа ұзындығы шамамен 100 нуклеотидті құрады.

3.3 Құтырық вирусының толық геномын амплификациялау нәтижелері

Зертханалық тексеру нәтижесінде барлық праймер жұптары күтілген мөлшерге сәйкес келетін ПТР өнімдерін түзді. ПТР өнімдерінің мөлшері мен спецификалығы агарозды гель электрофорезі арқылы расталды (16-сурет).



М - молекулалық салмақ маркері (100 – 10000 н.ж.); 1 - 12 – 28 - кестеге сәйкес праймер жұптары

Сурет 16 – Rab - 1 - 4 изолятынан алынған ПТР өнімдерінің электрофореграммасы

Клиникалық материалдан алынған РНҚ үлгілерінің концентрациясы біркелкі болмағандықтан, барлық 12 праймер жұбын әрбір үлгі үшін жеке

Illumina MiSeq платформасы талап ететін ДНҚ концентрациясына (1 нг/мкл-ден кем) жетпейтіні анықталды. Осыған байланысты, мұндай үлгілерге Amicon Ultra-0.5 секілді центрифугалық сүзгілер арқылы РНҚ-ны қосымша концентрлеу немесе қайталама ПТР әдісін қолдану қажеттілігі негізделді. Бұл тәсіл заманауи вирусологиялық зерттеулердегі «low-copy numbers» үлгілерімен жұмыс істеу протоколдарына сәйкес келеді.

РНҚ мөлшері шектеулі үлгілер үшін праймер жұптары екі параллель реакцияға біріктіріліп, мультиплексті тәсіл қолданылды. Алынған ПТР өнімдері магниттік бөлшектер (SPRI beads) арқылы тазартылып, кейін эквимолярлы қатынаста біріктірілді.

Жекелеген үлгілер бойынша амплификация динамикасы:

- Rab-Asl-1 үлгісі: Барлық 12 фрагменттің айқын экспрессиясы байқалды (17-сурет), бұл үлгінің жоғары сапалы толық геномдық секвенирлеуге дайындығын растады.

- 1-181/1 үлгісі: 12 фрагменттің тек 10-ы ғана амплификацияланды. Бұл жағдайда консенсус тізбекті толтыру үшін өткізіп алған аймақтарға арнайы қайталама ПТР жүргізілді.

Жүргізілген валидация нәтижесінде құтырық диагнозы расталған 31 жануардан алынған кДНҚ үлгілерінің жиынтығы қалыптастырылды. Ст мәндеріне негізделген сұрыптау әдісі секвенирлеу шығындарын оңтайландыруға және генетикалық деректердің толықтығын (coverage) 98-100% деңгейінде қамтамасыз етуге мүмкіндік берді.

Жүргізілген зерттеу нәтижесінде құтырық диагнозы расталған 31 жануардан алынған кДНҚ үлгілерінің жиынтығы қалыптастырылды. Бұл үлгілер N және G гендері бойынша генотиптеу жүргізуге, ал РНҚ концентрациясы жоғары үлгілер құтырық вирусының толық геномын секвенирлеуге жарамды екені анықталды.

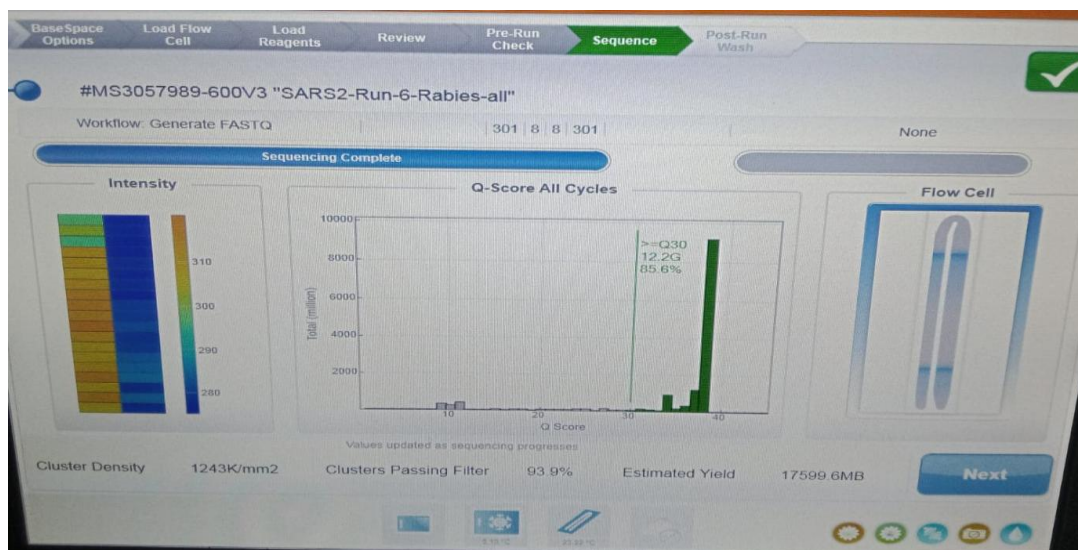
3.4 Құтырық вирусы изоляттарының толық геномдық секвенирлеу нәтижелері

Құтырық вирусының толық геномдық секвенирлеуі нәтижесінде зерттеуге алынған 31 изолят бойынша жоғары сапалы секвенирлеу деректері алынды. Секвенирлеу *Illumina MiSeq* платформасында жүргізіліп, құрылғы параметрлері өндіруші ұсынған диапазондарға толық сәйкес келді. Кластер тығыздығы 1243 мың/мм² деңгейінде болып, ұсынылған 1200–1400 мың/мм² аралығына сәйкес келді (18-сурет).

Секвенирлеу сапасын бағалау барысында *Q30* (Phred quality score) сапа шегінен өткен нуклеотидтердің үлесі 85,6% құрады, бұл алынған деректердің сенімді әрі талдауға жарамды екенін көрсетті. *Illumina* платформасы үшін алынған *Q30* көрсеткіші (85,6%) халықаралық стандарттарға сәйкес «жақсы» (good) деңгейге жатады. *Illumina* компаниясының ресми спецификациялары бойынша 2×150 bp үшін ≥80%, 2×300 bp үшін ≥70–75% *Q30* талап етіледі [115, 116]. Бұл әрбір 1000 нуклеотидтің 856-сы 99,9% дәлдікпен (*Q30*) анықталғанын білдіреді, бұл *Rabies lyssavirus* толық геномын сенімді жинақтау үшін

жеткілікті сапа болып табылады. Жалпы алғанда, секвенирлеу барысында айтарлықтай техникалық ақаулар немесе жүйелік қателіктер байқалмады.

Толық геномдық секвенирлеу нәтижесінде алынған «шикі» деректердің негізгі сипаттамалары 15-кестеде келтірілген. Үлгілер арасындағы оқылым саны 300 256-дан 725 584-ке дейін өзгеріп отырды. Оқылымдардың орташа ұзындығы 213–282 нуклеотид аралығында болды. Геномның GC - құрамы барлық изоляттарда салыстырмалы түрде тұрақты болып, 45–47% шамасында сақталды. Дупликацияланған оқылымдардың үлесі 65,7–77,3% аралығында ауытқыды. Бұл нәтиже қолданылған ампликондық секвенирлеу тәсілінің табиғи ерекшелігімен байланысты. Толық геномды секвенирлеуде мұндай деңгейдегі дупликация әдетте қате ретінде қарастырылады, ал ампликондық әдісте керісінше, мақсатты учаскелердің өте жоғары қамтылу тереңдігін қамтамасыз етеді, ол 1823×–7587× аралығында болды. Осындай жоғары дупликация әрбір нуклеотид позициясының жүздеген, кейде мыңдаған рет қайта оқылуына жағдай жасайды. Нәтижесінде секвенирлеу барысында жіберілетін қателіктер едәуір төмендеп, сенімділігі жоғары консенсус тізбек алынады [82, 114].



Сурет 18 – MiSeq секвенирлеу процесі аяқталғаннан кейінгі жүйелік көрсеткіштер

Кесте 15 – Толық геномдық секвенирлеудің бастапқы (шикі) деректерінің сипаттамасы

Изолят	Оқу саны	Орташа ұзындық, н.қ.	GC%	Көшіру үлесі, %
Rab - 1 - 3	336 682	227	46	70
Rab - 1 - 4	553 542	227	46	68
Rab - 1 - 5	522 758	232	45	72
Rab - 1 - 8	347 960	235	45	69.9
Rab - 2 - 1	492 146	240	46	70.1
Rab - 2 - 5	596 334	232	46	71.2
Rab - 3 - 1	537 494	240	45	74.4
Rab - 4 - 1	496 912	233	45	73.9
Rab - 5 - 1	664 660	232	45	72.8
Rab - 5 - 5	394 296	241	45	71.8

Rab - 6 - 1	443 704	237	46	73.4
Rab - 6 - 2	701 552	245	46	77.3
Rab - 7 - 4	605 538	228	47	66
Rab - 8 - 4	300 256	213	46	66.4
Rab - 9 - 1	395 692	252	45	72.8
Rab - 10 - 1	649 048	230	45	75.6
Rab - 11 - 1	342 258	215	45	70.7
Rab - 12C	322 684	217	45	69.9
Rab - 13 - 1	552 396	232	46	76.1
Rab - 14 - 1 - blue	606 734	237	46	76.8
Rab - 014	620 958	234	45	67.5
Rab - 15 - 1	510 062	245	45	73.5
Rab - 16 - 6	517 972	236	45	74.7
Rab - 35 - 1 - 4	564 354	230	46	65.7
Rab - 35 - 2 - 4	479 574	220	46	69.4
Rab - 228	484 510	244	45	73.4
Rab - 231 - 1	725 584	237	46	73.1
Rab - 349	461 780	253	46	68.2
Rab - Arman - 1	332 140	221	45	67
Rab - Arman - 2	556 064	240	46	73.4
Rab - Asl - 1	395 200	282	45	76.9

15-кестеде келтірілген толық геномдық секвенирлеудің бастапқы деректері барлық изоляттар бойынша жеткілікті көлемде секвенирлеу тереңдігіне қол жеткізілгенін көрсетеді. Оқылым саны 300 256-дан 725 584-ке дейін ауытқып, үлгілер арасында кітапхана дайындау және амплификация тиімділігінің әркелкі болғанын айғақтайды. Соған қарамастан, барлық изоляттар бойынша алынған деректер көлемі геномды сенімді жинақтауға жеткілікті деңгейде бағаланады.

Оқылымдардың орташа ұзындығы 213–282 нуклеотид аралығында тіркелді, ал нақты диапазон 35-тен 301 нуклеотидке дейін жетті. Көрсеткіштердің мұндай таралуы ампликондық кітапхана дайындау технологиясының ерекшеліктеріне сәйкес келеді және фрагментация мен амплификация кезеңдерінің тұрақты орындалғанын көрсетеді. Орташа ұзындық мәндерінің бір-біріне жақын болуы секвенирлеу сапасының салыстырмалы түрде біркелкі болғанын дәлелдейді.

ГС-құрамы барлық изоляттарда 45–47% шегінде сақталды, бұл зерттелген геномдардың нуклеотидтік композициясының тұрақтылығын және айқын контаминация белгілерінің жоқтығын көрсетеді. ГС-пайыздың үлгілер арасында елеулі ауытқымауы зерттелген изоляттардың генетикалық табиғатының ұқсастығын және әдістемелік қателіктердің болмауын жанама түрде растайды.

Дубликацияланған оқылымдар үлесі 65,7–77,3% аралығында анықталды. Мұндай деңгей ампликондық секвенирлеуге тән және мақсатты аймақтардың бірнеше мәрте амплификациялануымен байланысты. Дубликация үлесінің салыстырмалы жоғары болуы деректердің артық қамтылуын көрсетіп, геномдық позициялар бойынша сенімді консенсус тізбегін қалыптастыруға мүмкіндік береді.

Жалпы алғанда, алынған бастапқы секвенирлеу көрсеткіштері барлық изоляттар үшін сапалық талаптарға сәйкес келеді және кейінгі биоинформатикалық талдау мен геномдарды жинақтау кезеңдерін жүргізуге жеткілікті деректік негіз қалыптастырады.

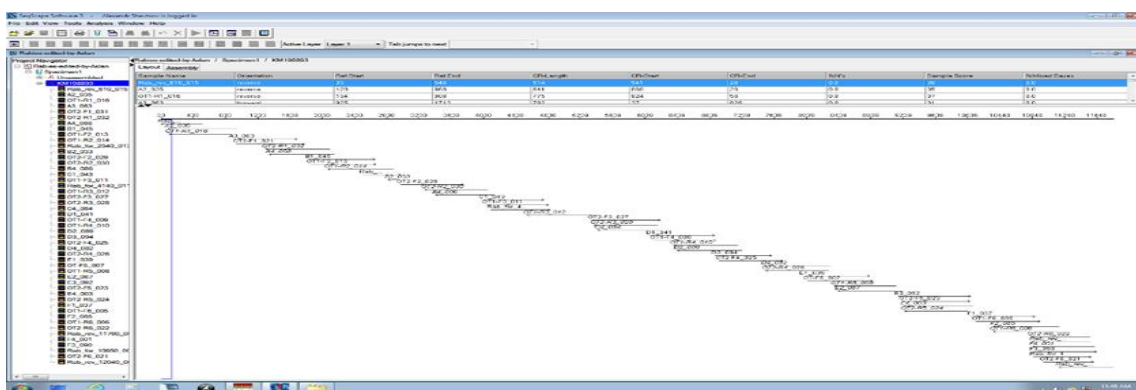
Секвенирлеу спецификалығын бағалау мақсатында Rab - Asl - 1 үлгісінен амплификацияланған 12 геномдық фрагменттің секвенирлеу нәтижелері талданды. Барлық фрагменттер бойынша алынған хроматограммаларда сигналдардың айқын бөлінуі байқалып, аралас немесе фондық сигналдар тіркелмеді, бұл қолданылған праймерлердің жоғары спецификалығын растады (19-сурет).



Сурет 19 – Rab - Asl - 1 үлгісінен алынған секвенирлеу хроматограммалары

19-суретте берілген хроматограммалар Sanger секвенирлеу нәтижесінде алынған. Олар MiSeq қолданылғанға дейінгі кезеңде праймерлердің дұрыстығын тексеру сатысын көрсетеді.

Барлық амплификацияланған фрагменттерді біріктіру нәтижесінде құтырық вирусының толық геномдық тізбектері жинақталды. Алынған тізбектердің референттік *KM198893* геномымен қабаттасу деңгейі жоғары болып, геномның барлық кодтаушы аймақтары қамтылды (20-сурет).



Сурет 20 – Алынған секвенстердің референттік геномдағы орналасуы

Нәтижесінде Rab - Asl - 1 үлгісі үшін құтырық вирусының толық геномдық тізбегі алынған болса, 1 - 181/1 үлгісінде вирустық РНҚ концентрациясының төмен болуына байланысты тек N және G гендерінің

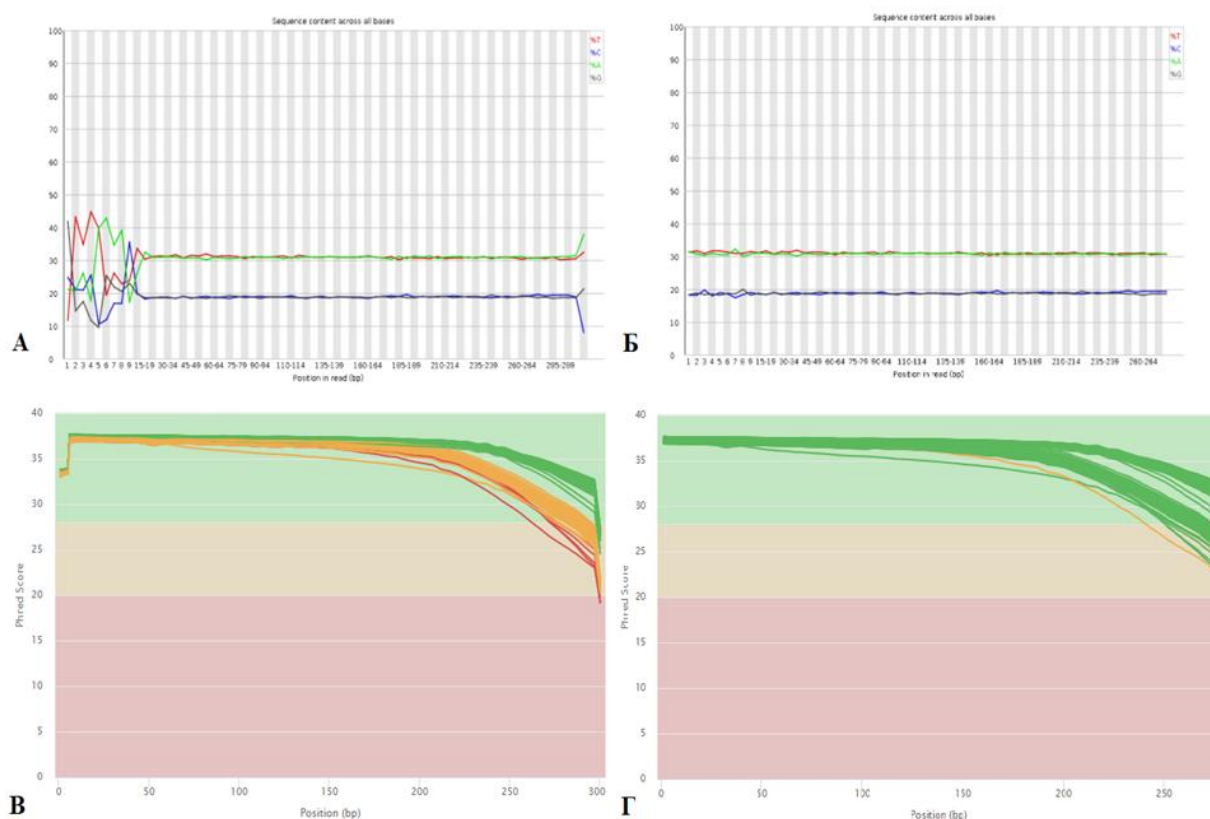
нуклеотидтік тізбектері анықталды. Бұл деректер секвенирлеу нәтижелерінің амплификация тиімділігімен және бастапқы материал сапасымен тікелей байланысты екенін көрсетті.

Зерттеу барысында екі түрлі тәсіл біріктіріліп қолданылды, әрқайсысының өз міндеті болды. Illumina MiSeq (NGS) негізгі әдіс ретінде таңдалды, өйткені осы платформа арқылы барлық 31 изоляттың толық геномдық тізбегі алынды. Негізгі деректер осы тәсілмен жиналды.

Sanger секвенирлеу әдісі қосымша бақылау құралы ретінде пайдаланылды. Атап айтқанда, Rab-Asl-1 үлгісінде және кейбір изоляттарда амплификациясы қиын, сапасы төмен учаскелерді нақтылау үшін қолданылды. Сонымен қатар праймерлердің спецификалығын тексеруде маңызды рөл атқарды.

3.5 Секвенирлеу деректерін бастапқы өңдеу және жинақтау нәтижелері

Секвенирлеу нәтижесінде алынған деректердің сапасы FastQC бағдарламасы көмегімен бағаланды. 21-суретте FastQC есебінің «Per base sequence content» (А, Б) және «Per base sequence quality» (В, Г) модульдерінің графиктері көрсетілген.



Сурет 21 – FastQC бағдарламасы бойынша оқылымдардың сапалық көрсеткіштері

Шикі деректерді талдау барысында (А график) нуклеотидтердің үлестірімі біркелкі емес екені анықталды. Оқылымдардың 5' ұшында алғашқы шамамен 20 нуклеотид, ал 3' ұшында шамамен 5 нуклеотид деңгейінде ауытқулар байқалды. Қалыпты жағдайда бұл графикте нуклеотидтердің үлесі параллель және біркелкі сызықтар түрінде көрінуі тиіс. Анықталған ауытқулар Nextera негізіндегі кітапхана дайындау әдісіне тән құбылыс болып табылады, себебі тагментация барысында транспозаза ферментінің қолданылуы нуклеотидтік құрамның шеткі аймақтарында ығысуына әкелуі мүмкін.

Оқылымдардың сапалық көрсеткіштерін сипаттайтын «Per base sequence quality» модулінде (В график) сапа мәндерінің біртіндеп төмендеу үрдісі байқалды, нәтижесінде жекелеген позициялар «сары» және «қызыл» аймақтарға түсті. Бұл аймақтарда нуклеотидтерді дұрыс анықтау ықтималдығы 99,9%-дан төмендейді. Мұндай құбылыс *Illumina* платформасында жүргізілетін секвенирлеуге тән және секвенирлеу циклі ұзарған сайын кластерлердегі сигналдың әлсіреуімен байланысты.

Биоинформатикалық өңдеу барысында деректерге сапалық кесу (trimming) жүргізілді. Кесу нәтижесінде «Per base sequence content» графигінде (Б) нуклеотидтердің үлестірімі айтарлықтай түзетіліп, сызықтар бір - біріне параллель күйге жақындады. Сонымен қатар «Per base sequence quality» графигінде (Г) сапа көрсеткіштері негізінен «жасыл» аймақта шоғырланды. Бұл өңделген деректердің әрі қарай de novo жинақтау және референттік геномдарға карталау үшін толық жарамды екенін көрсетті. Сапалық кесу (trimming) және сүзгілеу (filtering) нәтижесінде (Б және Г графиктері) барлық төмен сапалы нуклеотидтер мен адаптерлік тізбектер жойылды.

Толық геномдық секвенирлеу нәтижесінде әр үлгі бойынша алынған оқылымдар саны 395 200-ден 620 958-ге дейін өзгерді. GC - құрамы барлық изоляттарда салыстырмалы түрде тұрақты болып, 45–47% аралығында сақталды. Оқылымдардың орташа ұзындығы 213–282 нуклеотид диапазонында болды. De novo жинақтау барысында алынған контигтердің ұзындығы 2326 н.ж.-ден 5564 н.ж.-ге дейін жетті.

Алынған контигтер BLAST талдауы арқылы салыстырылып, құтырық вирусына жататын келесі референттік тізбектермен жоғары сәйкестік көрсетті: KT728349.1, LN879480.1, KX148159.1 және KP997032.1.

Референттік геномдарға оқылымдарды карталау нәтижесінде 31 *Rabies virus* изолятының толық геномдық консенсустық тізбектері алынды. Алынған консенсустар вирустың барлық кодтайтын аймақтарын қамтып, олардың ұзындығы 11770 – 11874 нуклеотид аралығында болды. De novo жинақтау аяқталғаннан кейін алынған контигтер референттік геномдармен (мысалы, NC_001542 немесе басқа стандартты RABV референстерімен) салыстырылып, карталанған кезде медиандық оқу тереңдігі (median read depth) $1823 \times - 7587 \times$ аралығында тіркелді. Бұл мәндер вирусология саласында кеңінен қолданылатын көрсеткіштерден едәуір жоғары: әдетте $100 \times - 500 \times$ деңгейі жеткілікті деп есептеледі, ал толық геном негізіндегі филогенетикалық талдау үшін $1000 \times$ -тен жоғары деңгей өте сапалы деп қабылданады. Осындай жоғары қамту тереңдігі алынған 31 толық геномдық тізбектің филогенетикалық және

филодинамикалық зерттеулерде сенімді әрі дәл пайдалануға жарамды екенін көрсетеді [114].

Алынған деректердің сапа параметрлері, соның ішінде Q30 деңгейі мен камту тереңдігінің жоғары болуы, қазіргі халықаралық вирусологиялық зерттеулер талаптарына сай келеді. Бұл нәтижелер Қазақстан Республикасында құтырық вирусы (RABV) изоляттары бойынша молекулалық-генетикалық картаны қалыптастыруға, филогеографиялық талдау жүргізуге және эпидемиологиялық бақылау жүйесін жетілдіруге жеткілікті ғылыми негіз береді.

3.6 Құтырық вирусы изоляттарының генотиптік және филогенетикалық талдау нәтижелері

3.6.1 Генотиптеу нәтижелері

RABV - *GLUE* және *NCBI Virus* дерекқорларының көмегімен жүргізілген генотиптеу нәтижелері бойынша зерттелген 31 құтырық вирусы изолятының барлығы далалық типке (Cosmopolitan major clade) жататыны анықталды. Олардың 30-ы Cosmopolitan CA1 минор класына енгізілді, ал Rab - 228 изоляты үшін минор класы анықталмады (16-кесте, 22-сурет).

Rab - 228 изолятының таксономиялық орнын нақтылау мақсатында *RABV* - *GLUE* дерекқорының толық мәліметтер базасы пайдаланылып, N генінің толық нуклеотидтік тізбегі бойынша қосымша *BLAST* талдау жүргізілді. Гомология мәндерін кему ретімен сұрыптау нәтижесінде Rab - 228 тізбегі минор класы анықталмаған бірқатар изоляттармен жоғары ұқсастық көрсетті, соның ішінде: AF045664 (97,33%; түлкі, 1998 ж.), LN879480 (99,26%; Әзербайжан, 2002 ж., ит), KY765901 (98,37%; Тәжікстан, 2012 ж., ит), MT079918, MT079908, MT079949, MT079935 (98,74–98,96%; Грузия, 2015 ж., ит), MW055108 (98,89%; Грузия, 2016 ж., ит) және KT965733 (99,60%; 92% жамылғымен, Оңтүстік Қазақстан, 2014 ж., шибөрі).

Осы изоляттар тобы *CA1* минор класына жататын тізбектерден филогенетикалық тұрғыдан бөлек орналасқан, бұл Rab - 228 изолятының бұрын сипатталмаған жаңа минор кластың өкілі болуы мүмкін екенін көрсетеді.

Сонымен қатар Р генін талдау барысында Rab - 014 изолятында ТАА стоп - кодонының глутаминді кодтайтын *CAA* кодонына ауысуы анықталды. Бұл мутация фосфопротеиннің ұзындығын 4 аминқышқыл қалдығына арттырады, алайда оның функционалдық әсері қосымша зерттеуді талап етеді.

Кесте 16 – RABV - GLUE дерекқорынан анықталған филогенетикалық кластар

Sequence	Identified as RABV	Major clade	Minor clade	Closest full genome reference sequence	Coding region coverage				
					N, %	P, %	M, %	G, %	L, %
Rab - 1 - 3	Yes	Cosmopolitan	Cosmopolitan CA1	KX148159	100.00	100.00	100.00	100.00	99.28
Rab - 1 - 4	Yes	Cosmopolitan	Cosmopolitan CA1	JQ944705	100.00	100.00	100.00	100.00	90.25
Rab - 1 - 5	Yes	Cosmopolitan	Cosmopolitan CA1	KX148159	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Rab - 1 - 8	Yes	Cosmopolitan	Cosmopolitan CA1	KX148159	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Rab - 2 - 1	Yes	Cosmopolitan	Cosmopolitan CA1	JQ944705	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Rab - 2 - 5	Yes	Cosmopolitan	Cosmopolitan CA1	KX148159	100.00	100.00	100.00	100.00	98.85
Rab - 3 - 1	Yes	Cosmopolitan	Cosmopolitan CA1	JQ944705	100.00	100.00	100.00	100.00	90.26
Rab - 4 - 1	Yes	Cosmopolitan	Cosmopolitan CA1	KX148159	100.00	100.00	100.00	100.00	90.42
Rab - 5 - 1	Yes	Cosmopolitan	Cosmopolitan CA1	JQ944705	100.00	100.00	100.00	100.00	90.25
Rab - 5 - 5	Yes	Cosmopolitan	Cosmopolitan CA1	KX148159	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Rab - 6 - 1	Yes	Cosmopolitan	Cosmopolitan CA1	KX148159	100.00	100.00	100.00	100.00	90.42
Rab - 6 - 2	Yes	Cosmopolitan	Cosmopolitan CA1	KX148159	100.00	100.00	100.00	100.00	99.24
Rab - 7 - 4	Yes	Cosmopolitan	Cosmopolitan CA1	JQ944705	100.00	100.00	100.00	100.00	90.42
Rab - 8 - 4	Yes	Cosmopolitan	Cosmopolitan CA1	JQ944705	100.00	100.00	100.00	100.00	90.25
Rab - 9 - 1	Yes	Cosmopolitan	Cosmopolitan CA1	JQ944705	100.00	100.00	100.00	100.00	97.60
Rab - 10 - 1	Yes	Cosmopolitan	Cosmopolitan CA1	JQ944705	100.00	100.00	100.00	100.00	90.25
Rab - 11 - 1	Yes	Cosmopolitan	Cosmopolitan CA1	JQ944705	100.00	100.00	100.00	100.00	90.25
Rab - 12C	Yes	Cosmopolitan	Cosmopolitan CA1	KX148159	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Rab - 13 - 1	Yes	Cosmopolitan	Cosmopolitan CA1	JQ944705	100.00	100.00	100.00	100.00	90.25
Rab - 014	Yes	Cosmopolitan	Cosmopolitan CA1	JQ944705	100.00	100.00	100.00	100.00	90.25
Rab - 14 - 1 - blue	Yes	Cosmopolitan	Cosmopolitan CA1	JQ944705	100.00	100.00	100.00	100.00	90.42
Rab - 15 - 1	Yes	Cosmopolitan	Cosmopolitan CA1	KX148159	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Rab - 16 - 6	Yes	Cosmopolitan	Cosmopolitan CA1	JQ944705	100.00	100.00	100.00	100.00	90.25
consensus N Rab - 35 - 1 - 4	Yes	Cosmopolitan	Cosmopolitan CA1	JQ944705	100.00	100.00	100.00	100.00	90.42
Rab - 35 - 2 - 4	Yes	Cosmopolitan	Cosmopolitan CA1	JQ944705	100.00	100.00	100.00	100.00	90.25
Rab - 228	Yes	Cosmopolitan	unknown	KX148159	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Rab - 231 - 1	Yes	Cosmopolitan	Cosmopolitan CA1	KX148159	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Rab - 349	Yes	Cosmopolitan	Cosmopolitan CA1	KX148159	100.00	100.00	100.00	100.00	98.77
Rab - Arman - 1	Yes	Cosmopolitan	Cosmopolitan CA1	JQ944705	100.00	100.00	100.00	100.00	99.53
Rab - Arman - 2	Yes	Cosmopolitan	Cosmopolitan CA1	KX148159	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Rab - Asl - 1	Yes	Cosmopolitan	Cosmopolitan CA1	KX148159	100.00	100.00	100.00	100.00	96.59

RABV-GLUE Home Sequence Data Analysis Offline version About										
Cosmopolitan CA1										
Clade reference sequence: Cosmopolitan CA1 Reference (KX148159)										
Parent clade: Cosmopolitan										
Child clades: None										
Clade member sequences										
This dataset contains sequences from NCBI nucleotide which group within Cosmopolitan CA1. Patent-related sequences and those of length < 200bp are excluded.										
First Previous Next Last Items per page: 500 Sort criteria (1) Filters (0) Download										
Members 501 to 816 of 816										
NCBI Nucleotide ID	Major / Minor Clade	NCBI Entry Creation Date	NCBI Last Update Date	Sequence Length	Isolate ID	Country of Origin	Host Species	Collection Year Range	Reference	
OP477368	19-Apr-2023	19-Apr-2023	11841	Rab-014	Kazakhstan (KAZ)	Canis familiaris	2023 or earlier	-		
OP477369	19-Apr-2023	19-Apr-2023	11831	Rab-10-1	Kazakhstan (KAZ)	Felis catus	2021	-		
OP477370	19-Apr-2023	19-Apr-2023	11770	Rab-11-1	Kazakhstan (KAZ)	Felis catus	2021	-		
OP477371	19-Apr-2023	19-Apr-2023	11867	Rab-12C	Kazakhstan (KAZ)	Canis familiaris	2023 or earlier	-		
OP477372	19-Apr-2023	19-Apr-2023	11797	Rab-13-1	Kazakhstan (KAZ)	Felis catus	2021	-		
OP477373	19-Apr-2023	19-Apr-2023	11799	Rab-1-3	Kazakhstan (KAZ)	Canis familiaris	2021	-		
OP477374	19-Apr-2023	19-Apr-2023	11771	Rab-14-1-blue	Kazakhstan (KAZ)	Felis catus	2021	-		
OP477375	19-Apr-2023	19-Apr-2023	11803	Rab-15-1	Kazakhstan (KAZ)	Felis catus	2021	-		
OP477376	19-Apr-2023	19-Apr-2023	11803	Rab-1-5	Kazakhstan (KAZ)	Felis catus	2021	-		
OP477377	19-Apr-2023	19-Apr-2023	11871	Rab-16-6	Kazakhstan (KAZ)	Vulpes vulpes	2021	-		
OP477378	19-Apr-2023	19-Apr-2023	11867	Rab-1-8	Kazakhstan (KAZ)	Felis catus	2021	-		
OP477379	19-Apr-2023	19-Apr-2023	11859	Rab-2-1	Kazakhstan (KAZ)	Felis catus	2021	-		
OP477380	19-Apr-2023	19-Apr-2023	11872	Rab-228	Kazakhstan (KAZ)	Canis familiaris	2023 or earlier	-		
OP477381	19-Apr-2023	19-Apr-2023	11802	Rab-231-1	Kazakhstan (KAZ)	Canis familiaris	2023 or earlier	-		
OP477382	19-Apr-2023	19-Apr-2023	11803	Rab-2-5	Kazakhstan (KAZ)	Felis catus	2021	-		
OP477383	19-Apr-2023	19-Apr-2023	11873	Rab-3-1	Kazakhstan (KAZ)	Felis catus	2021	-		
OP477384	19-Apr-2023	19-Apr-2023	11860	Rab-349	Kazakhstan (KAZ)	Felis catus	2023 or earlier	-		
OP477385	19-Apr-2023	19-Apr-2023	11802	Rab-4-1	Kazakhstan (KAZ)	Felis catus	2021	-		
OP477386	19-Apr-2023	19-Apr-2023	11787	Rab-5-1	Kazakhstan (KAZ)	Felis catus	2021	-		
OP477387	19-Apr-2023	19-Apr-2023	11874	Rab-5-5	Kazakhstan (KAZ)	Felis catus	2021	-		
OP477388	19-Apr-2023	19-Apr-2023	11824	Rab-6-1	Kazakhstan (KAZ)	Felis catus	2021	-		
OP477389	19-Apr-2023	19-Apr-2023	11834	Rab-6-2	Kazakhstan (KAZ)	Vulpes vulpes	2021	-		
OP477390	19-Apr-2023	19-Apr-2023	11865	Rab-9-1	Kazakhstan (KAZ)	Felis catus	2021	-		
OP477391	19-Apr-2023	19-Apr-2023	11873	Rab-Arman-1	Kazakhstan (KAZ)	Felis catus	2023 or earlier	-		
OP477392	19-Apr-2023	19-Apr-2023	11873	Rab-Arman-2	Kazakhstan (KAZ)	Felis catus	2023 or earlier	-		
OP477393	19-Apr-2023	19-Apr-2023	11650	Rab-Asl-1	Kazakhstan (KAZ)	Vulpes vulpes	2023 or earlier	-		
ON366706	11-Oct-2022	11-Oct-2022	11723	Rab-1-4	Kazakhstan (KAZ)	Felis catus	2021	-		
ON366707	11-Oct-2022	11-Oct-2022	11723	Rab-7-4	Kazakhstan (KAZ)	Felis catus	2021	-		
ON366708	11-Oct-2022	11-Oct-2022	11723	Rab-8-4	Kazakhstan (KAZ)	Felis catus	2021	-		
ON366709	11-Oct-2022	11-Oct-2022	11723	Rab-35-1-4	Kazakhstan (KAZ)	Felis catus	2021	-		
ON366710	11-Oct-2022	11-Oct-2022	11723	Rab-35-2-4	Kazakhstan (KAZ)	Felis catus	2021	-		

Сурет 22 – 2020 жылдан 2022 жылға дейінгі аралықта NCBI тізбегінен алынған құтырық вирусының тізбектері

Ескерту – RABV - GLUE деректер базасының мәліметтері бойынша

Генотиптеу нәтижелері *RABV - GLUE* және *NCBI Virus* ресурстарында алынған мәліметтермен толық сәйкес келді.

RABV-GLUE және NCBI Virus дерекқорларын пайдаланып жүргізілген генотиптеу барысында зерттеуге енгізілген 31 құтырық вирусы изолятының барлығы Cosmopolitan (major clade) тобына жататыны анықталды. Бұл

деректердің диагностикалық және эпизоотологиялық тұрғыдан маңызы айқын көрінеді.

Cosmopolitan класының толық басым болуы Қазақстан аумағында құтырық вирусының айналымы салыстырмалы түрде біркелкі генетикалық негізде қалыптасқанын көрсетеді. Мұндай нәтижелер қолданылып жүрген ПТР-тест жүйелері мен праймерлердің сенімділігін жанама түрде растайды, өйткені Cosmopolitan класы әлемдік ауқымда, соның ішінде Орталық Азияда, ең кең таралған әрі генетикалық тұрақты топтардың бірі ретінде сипатталады. Эпизоотологиялық тұрғыдан алғанда, изоляттардың басым бөлігі (30 үлгі, 96,7%) Cosmopolitan CA1 минор класына жатуы вирустың «далалық» айналымымен, яғни жабайы фауна арқылы таралуымен тығыз байланысты екенін көрсетеді. Бұл жағдайда негізгі резервуар ретінде түлкілер мен қарсақтар секілді жыртқыштар қарастырылады, ал инфекцияның таралуы мемлекеттік шекаралармен шектелмейтінін байқауға болады.

Rab-228 изоляты ерекше назар аударады, себебі оның минор класы «анықталмаған» ретінде тіркелген. N гені бойынша жүргізілген BLAST-талдау бұл изоляттың Кавказ өңіріндегі (Грузия, Әзербайжан) және Тәжікстандағы штаммдармен жоғары деңгейде ұқсас екенін көрсетті (97,33–99,60%). Сонымен қатар, оның 2014 жылы Оңтүстік Қазақстан аумағында шибөріден бөлінген изолятпен генетикалық жақындығы бұл варианттың аймақ ішінде ұзақ уақыт сақталып келе жатқан, белгілі бір дәрежеде локализацияланған эволюциялық тармақ болуы мүмкін екенін көрсетеді. Бұл топтың CA1 класына тікелей қосылмауы Қазақстан аумағында бұрын толық сипатталмаған жеке минор кластың болуы ықтимал деген ойға жетелейді. Осыған байланысты өңірлік эпизоотиялық мониторинг жүйесін нақтылау қажеттілігі туындайды.

Функционалдық өзгерістер де анықталды. Атап айтқанда, Р генін талдау кезінде Rab-014 изолятында стоп-кодонның ТАА-дан САА-ға ауысуы тіркелген, соның нәтижесінде фосфопротеиннің ұзындығы төрт аминқышқылына ұзарған. Мұндай өзгеріс вирустың репликациялық белсенділігіне немесе патогенділік қасиеттеріне ықпал етуі мүмкін, әрі бұл құтырық вирусының геномдық деңгейде микроэволюциялық өзгерістерге ұшырап отырғанын көрсетеді.

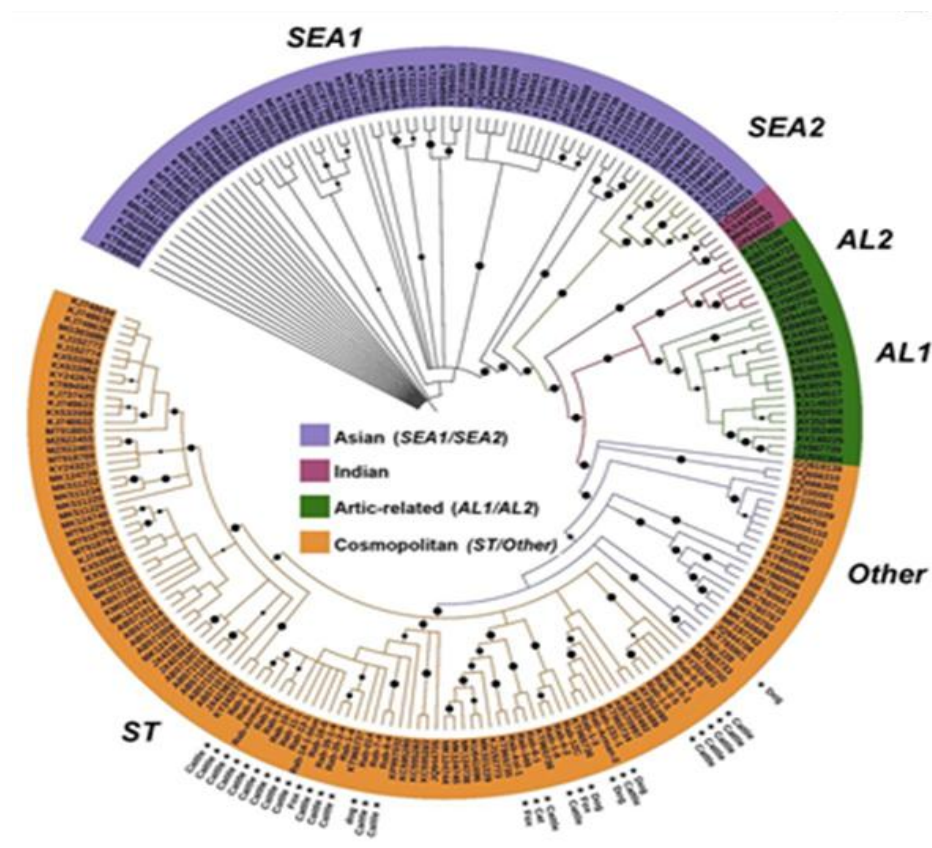
3.6.2 Құтырық вирусы изоляттарының жалпы филогенетикалық құрылымы

Филогенетикалық талдау үшін құтырық вирусының N генінің нуклеотидтік тізбектері пайдаланылды, себебі бұл ген филогенетикалық айырмашылықтарды анықтауға ең қолайлы маркер болып саналады. Талдауға осы зерттеуде алынған 31 изолят, сондай - ақ Қазақстан аумағынан және көршілес елдерден алынған 199 анықтамалық *RABV* тізбегі енгізілді.

Анықтамалық тізбектер *RABV* - дің төрт негізгі класына бөлінді: Азиялық, Үнді субконтиненті, Арктикалық және Космополитикалық, олардың ішкі субкладалары ескерілді. Филогенетикалық ағаш Neighbor - Joining әдісімен құрылып, тармақтардың сенімділігі 1000 bootstrap репликациясы арқылы бағаланды. N гені тізбектерінің өзара ұқсастығы жоғары болған жағдайда

Neighbor - Joining әдісін қолдану есептеу үдерісінің тиімділігімен және ауқымды филогенетикалық ағаштарда кластерлердің бастапқы құрылымын сенімді айқындау мүмкіндігімен түсіндіріледі. Кейінгі кезеңде алынған нәтижелерді нақтылау үшін Байестік талдау алгоритмі пайдаланылды.

Филогенетикалық талдау нәтижелері бойынша зерттелген 31 штамның барлығы космополитикалық клада шегінде топтастырылды (23-сурет). Олардың 30-ы далалық типке (*ST*, *Cosmopolitan CAI*) жатса, Rab - 228 изоляты жеке тармақ түзді, бұл оның басқа субкладалардан айырмашылығын тағы да растады.



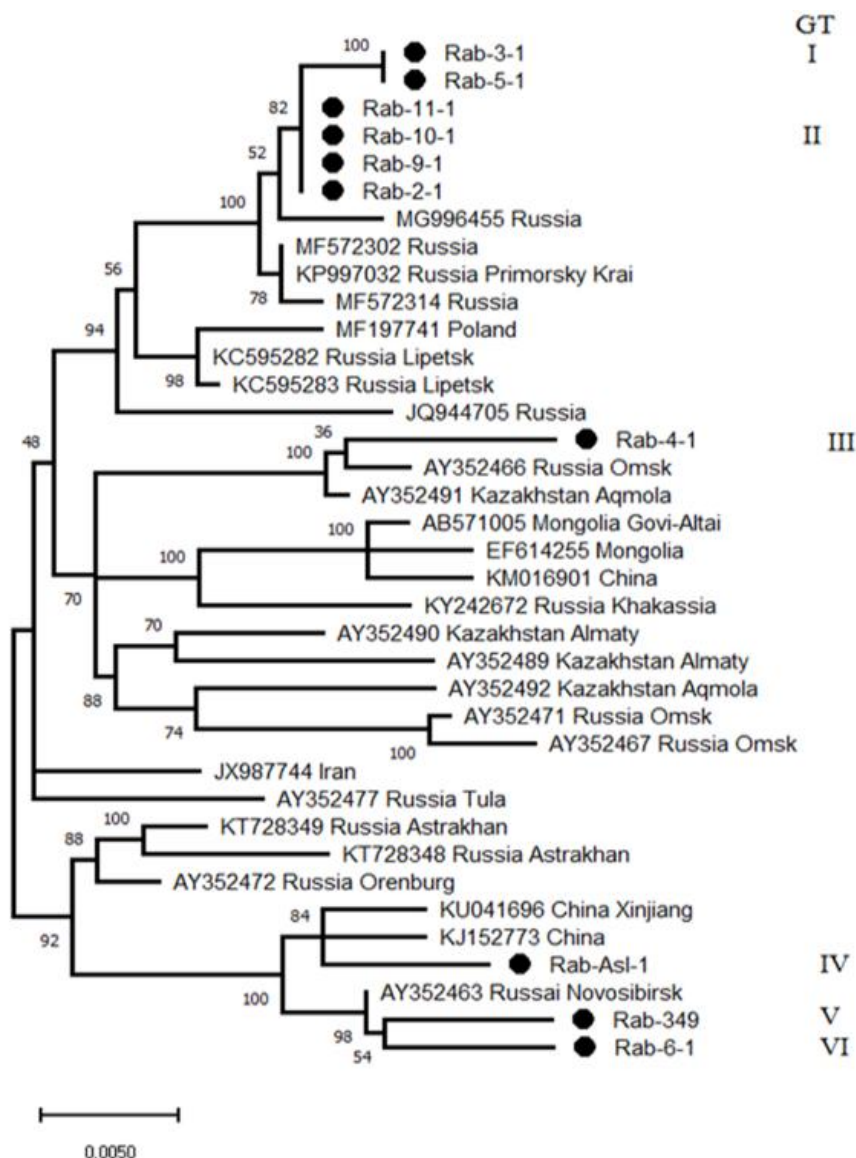
Сурет 23 – Құтырық вирусының (RABV) N гені негізінде жасалған филогенетикалық ағашы

Қазақстан аумағында кең таралған космополитикалық клада Орталық және Солтүстік Азия аймақтарында бұрын сипатталған далалық тип пен оған жақын субкладаларды қамтиды. Осы зерттеуде алынған ST субкладына жататын штамдар негізінен түлкілерден, иттерден және ірі қара малдан бөлініп, Қазақстанның шығыс, солтүстік және батыс өңірлерінде тіркелген.

Rab - 228 изоляты Қазақстанның оңтүстігінен алынған ит үлгісінен бөлініп, филогенетикалық тұрғыдан негізгі *CAI* кластерінен бөлек орналасуы арқылы ерекше орын алды. Бұл дерек құтырық вирусының аймақтық эволюциясында бұрын ескерілмеген тармақтың болуы мүмкін екенін көрсетеді.

3.6.3 Шығыс Қазақстан облысы аумағында бөлініп алынған құтырық вирусы изоляттарының филогенетикалық талдау нәтижелері

Шығыс Қазақстан облысы аумағынан бөлініп алынған далалық құтырық вирусы изолятының N гені фрагменттерінің нуклеотидтік тізбектері негізінде филогенетикалық талдау жүргізілді. Талдау нәтижесінде өңірде айналымдағы вирус штамдары мен изоляттарының өзара эволюциялық байланысын көрсететін филогенетикалық ағаш құрастырылды (24-сурет).



Сурет 24 – ШҚО аумағындағы құтырық вирусы штамдары мен изоляттарының N гені фрагменті негізінде салынған филогенетикалық ағаш

Филогенетикалық ағашты талдау нәтижесінде зерттелген изоляттардың барлығы классикалық *Rabies virus* түріне (*RABV*) жататыны және космополитикалық клада шегінде топтасатыны анықталды. Ағаш құрылымында Қазақстан аумағынан алынған изоляттар халықаралық деректер қорындағы (GenBank) Ресей, Қытай, Моңғолия, Иран және Польша аумақтарынан тіркелген референс-штамдармен салыстырылып орналастырылды. N гені фрагменттері бойынша жүргізілген салыстырмалы

талдау изоляттарды алты филогенетикалық топқа (кластерге) бөлуге мүмкіндік берді. Кластерлерді анықтау критерийлері ретінде N гені бойынша нуклеотидтік сәйкестіктің жоғары деңгейі (98-100%), тармақтардың статистикалық қолдауы ($BS > 75\%$) және көршілес мемлекеттердің (РФ, ҚХР) белгілі бір аймақтық штамдарымен топологиялық бірлесуі алынды⁷

Аталған филогенетикалық топтардың қалыптасуы олардың географиялық шығу тегіне тікелей байланысты екені байқалды. Атап айтқанда:

1 филогенетикалық топқа Rab-3-1 (OP477383) және Rab-5-1 (OP477386) изоляттары кірді. Бұл изоляттар Ресей Федерациясының Қиыр Шығыс аймағынан, соның ішінде Приморье өлкесінен тіркелген штамдарға филогенетикалық тұрғыдан жақын орналасқан.

2 топқа Rab-11-1 (OP477370), Rab-10-1 (OP477369), Rab-9-1 (OP477390) және Rab-2-1 (OP477379) изоляттары топтасты. Аталған изоляттар Ресей аумағындағы штамдармен бір кластерде орналасып, ортақ эволюциялық шығу тегін көрсетеді.

3 топ құрамына Rab-4-1 (OP477385) изоляты енді. Бұл изолят Омбы облысы (Ресей) және Ақмола облысында (Қазақстан) бұрын тіркелген AY352466 және AY352491 нөмірлі штамдарға филогенетикалық жақындық көрсетті.

4 топта Rab-Asl-1 (OP477393) изоляты Қытай Халық Республикасының Шыңжаң өңірінен тіркелген KU041696 және KJ152773 штамдарымен, сондай-ақ Ресейдің Новосибирск облысындағы AY352463 штамымен бір тармаққа бірікті.

5 және 6 топтар тиісінше Rab-349 (OP477384) және Rab-6-1 (OP477388) изоляттарымен ұсынылды. Бұл изоляттар да Ресейдің Новосибирск облысынан сипатталған штамдарға генетикалық жақын екені анықталды.

Алынған деректер Шығыс Қазақстан облысында айналымдағы құтырық вирусының генетикалық әртүрлілігі жоғары екенін және бұл аймақтың бірнеше трансшекаралық эпизоотиялық ошақтардың тоғысқан аймағы болуы мүмкін екенін көрсетеді. Мұндай жағдай жабайы және үй жануарларының көші - қоны, сондай-ақ көршілес мемлекеттермен шекаралас аумақтар арқылы вирус штамдарының таралуымен түсіндіріледі.

3.6.4 Атырау облысы аумағында бөлініп алынған құтырық вирусы изоляттарының филогенетикалық талдау нәтижелері

Атырау облысының Қызылқоға ауданы, Миялы ауылында 2021 жылдың сәуір айында үй ірі қара малынан алынған 5 *Rabies virus* изолятына (Rab - 1 - 4, Rab - 7 - 4, Rab - 8 - 4, Rab - 35 - 1 - 4 және Rab - 35 - 2 - 4) толық геномдық секвенирлеу жүргізілді. Нәтижесінде аталған изоляттар үшін барлық кодтайтын аймақтарды қамтитын консенсус тізбектері алынды, олардың ұзындығы тиісінше 11711–11796 нуклеотид жұбы аралығында болды.

Illumina MiSeq платформасында секвенирлеу нәтижесінде әр үлгі бойынша 300 256-дан 605 538-ге дейін шикі оқылым алынды. *De novo* жинақтау барысында ұзындығы 2326–5564 н.ж. аралығындағы контигтер қалыптасты.

BLAST талдауы бойынша ең жақын референстік тізбек ретінде KP997032.1 (11873 н.ж., қамтылуы 99%, сәйкестік 99,3%) анықталды.

Референстік геномға карталау нәтижесінде зерттелген изоляттарда 74 – 85 аралығында мутация анықталды, ал секвенирлеу тереңдігі 1823×–3323× шегінде болды. Rab - 8 - 4 изоляты үшін секвенирлеу тереңдігінің біркелкі еместігі байқалып, 1000–2000, 5100–6000 және 11183–11767 нуклеотидтік аймақтарда амплификация тиімділігі төмен екені анықталды (25-сурет).

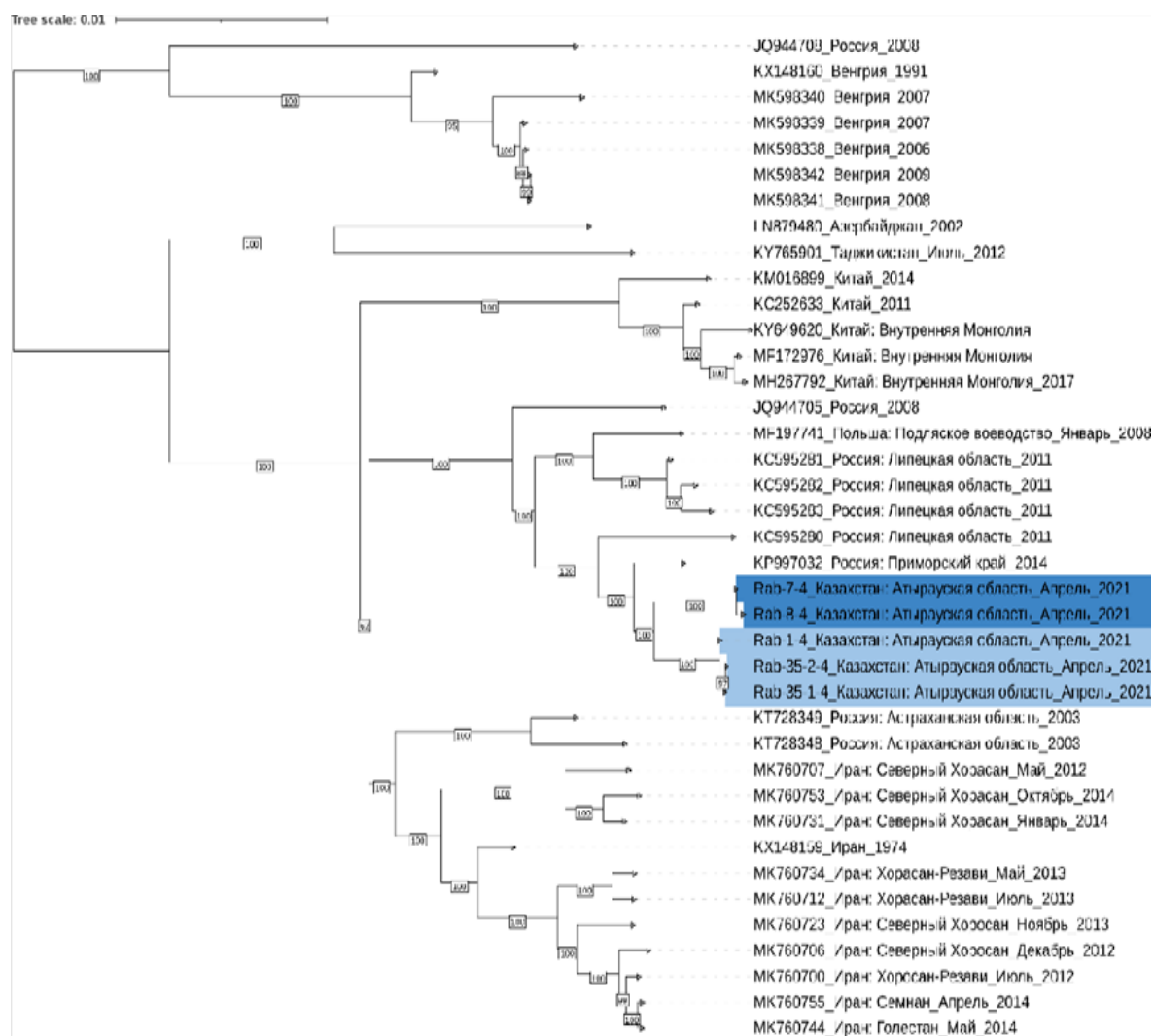


Сурет 25 – Rab - 8 - 4 изолятының секвенирлеу тереңдігінің графигі

Осыған байланысты L генінің кодтау аймағының соңғы бөлігі (11183–11767 н.ж.) Сэнгер әдісімен қосымша секвенирленіп, алынған деректер Illumina нәтижелерімен біріктірілді. Нәтижесінде барлық 5 изолят үшін толық кодтайтын аймақтарды қамтитын консенсус тізбектері қалпына келтірілді.

RABV - *GLUE* дерекқоры бойынша аталған изоляттардың барлығы *Cosmopolitan* мажор кладасына және *CAI* минор кладасына жататыны анықталды. Ең жақын референстік тізбек ретінде *JQ944705* көрсетілді.

Филогенетикалық талдау үшін *RABV* - *GLUE* және *NCBI Virus* дерекқорларынан *Cosmopolitan* кладасына жататын 838 толық геномдық тізбек және N генінің кемінде 1000 н.ж. қамтитын 5781 тізбек пайдаланылды. Толық геномдық тізбектер негізінде құрылған филогенетикалық ағаш 26-суретте көрсетілген (гомологиялық аймақ: 11722 н.ж.).



Сурет 26 – Атырау облысынан алынған құтырық вирусы изоляттарының толық геномдық тізбектері негізіндегі филогенетикалық ағаш

Филогенетикалық талдау нәтижесінде зерттелген 5 изолят екі ішкі кластерге бөлінді:

I кластерге Rab - 7 - 4 және Rab - 8 - 4,

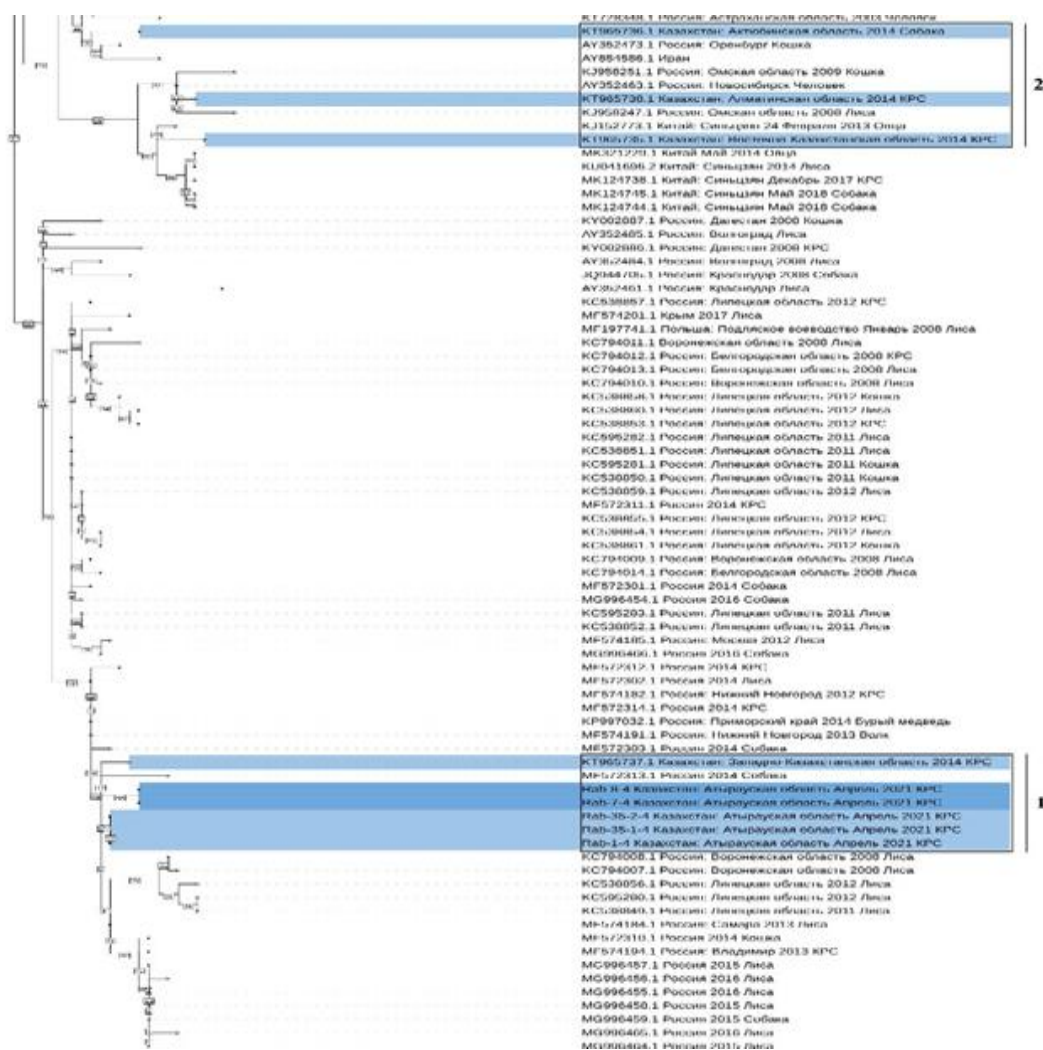
II кластерге Rab - 1 - 4, Rab - 35 - 1 - 4 және Rab - 35 - 2 - 4 изоляттары кірді.

Екі кластер арасындағы айырмашылық шамамен 54 *SNP* деңгейінде бағаланды. Екі кластер арасындағы 54 *SNP* айырмашылығы олардың бір жергілікті ошақ ішіндегі эволюция емес, өңірге вирустың екі түрлі қайнар көзден немесе екі түрлі уақытта енгізілгенін (multiple introduction) білдіреді. Генетикалық тұрғыдан ең жақын тізбектер Ресей Федерациясының еуропалық бөлігінен (Липецк облысы, 2011 ж.) және Приморье өңірінен алынған изоляттармен сәйкес келді, ал келесі жақын кладалар Қытай мен Иран аумақтарынан алынған штамдарды қамтыды.

N гені негізінде құрылған филогенетикалық ағаш (27-сурет) дерекқор қамтылуын кеңейтіп, зерттелген изоляттардың эпизоотиялық байланыстарын тереңірек талдауға мүмкіндік берді.



Сурет 27 – N ген тізбектері негізінде алынған изоляттардың филогенетикалық ағашы, парақ 1



ә

Сурет 27, парақ 2

Байес әдісін қолдана отырып, Қазақстан мен көршілес елдерден жиналған 202 N ген тізбегіне қосымша эволюциялық талдау жүргізілді. Нуклеотидтік ауысу жылдамдығы $3,07 \times 10^{-4}$ сайт⁻¹·жыл⁻¹ (95% HPD: $2,06 - 4,06 \times 10^{-4}$) деп бағаланды. *TMSCA* нәтижелері бойынша *CAI* минор кладасының бөліну уақыты 1910 – 1966 жылдар (медиана: 1942), ал *Cosmopolitan* мажор кладасының ажырауы 1734 – 1915 жылдар (медиана: 1839) аралығына сәйкес келді.

Толық геномдық деректерге негізделген талдау N гені бойынша жүргізілген талдаумен салыстырғанда анағұрлым жоғары ажыратымдылық көрсетіп, құтырық вирусының таралу жолдарын, генетикалық әртүрлілігін және трансшекаралық байланыстарын нақтырақ сипаттауға мүмкіндік берді. Бұл тәсілдің тиімділігі бұрынғы зерттеулерде де көрсетілген.

Атырау облысы бойынша жасалған эпизоотологиялық қорытындылар (екі ішкі кластердің бөлінуі) толық геномдық деректердің жоғары ажыратымдылығына негізделген, ал жалпы Қазақстан бойынша топтастыру N генінің нуклеотидтік тізбектеріне сүйеніп жасалды.

линиялардың статистикалық тұрғыдан сенімді екенін көрсетеді. Мұндай нәтижелер зерттелген аймақта вирустың бірнеше генетикалық линиялары қатар айналымда жүргенін дәлелдейді [117]. Мұнда кемінде төрт тәуелсіз филогенетикалық линияның қатысқаны байқалды:

Бірінші линия Rab - 4 - 1 және Rab - 15 - 1 изоляттарымен ұсынылып, Павлодар облысынан алынған Rab - 1 - 5, Rab - 2 - 5 және Rab - 5 - 5 изоляттарына жақын болды.

Екінші линия Rab - 6 - 1 изолятымен сипатталып, бұрын тіркелген Rab - 349 (мысық, 2013 ж.) және KT965738 (ірі қара мал, 2014 ж.) тізбектерімен филогенетикалық жақындық көрсетті.

Үшінші линия Rab - Asl - 1 изолятымен ұсынылды. Ол 2020 жылы жабайы түлкіден алынған және Шығыс Қазақстан мен Қытайдың Солтүстік - Батыс өңірлерінен алынған изоляттармен туыстас болды.

Төртінші линия эпизоотиялық тұрғыдан аз байқалғанымен, генетикалық дербес тармақ ретінде ерекшеленді.

Атырау облысында тіркелген екінші эпидемия ірі қара малдан алынған изоляттармен сипатталды және филогенетикалық тұрғыдан ШҚО - ғы таралым желісіне жақын болды. Бұл линияға 2020 жылы Ақтөбе облысында иттен бөлінген Rab - 014 изоляты да жақын орналасқанымен, оның Р геніндегі маркерлі мутациясына байланысты эпидемияның бастапқы көзі ретінде қарастырылмады.

Rab - 6 - 2 (қасқыр, 2021 ж.), Rab - 1 - 8 (ірі қара мал, 2021 ж.) және Rab - 12С (ит, 2020 ж.) изоляттарымен ұсынылған линия географиялық тұрғыдан ең кең таралған болып шықты және кемінде төрт облысты қамтыды. Сонымен қатар Rab - Arman - 2 және Rab - 1 - 3 изоляттарынан құралған жеке тармақ бұрынғы (2014) Ақмола және Шығыс Қазақстан облыстарынан алынған изоляттармен бір кластерге бірікті.

Ерекше назар Rab - 228 изолятына аударылды. Бұл изолят *CA1* минор кладасының сыртында орналасып, Грузия, Әзербайжан, Тәжікстан және Қазақстан аумақтарынан алынған тізбектермен жоғары гомология көрсетті. Мұндай орналасу оның Батыс Азия (Таяу Шығыс) бағытынан таралуы мүмкін екендігін көрсетеді.

Жалпы алғанда, Қазақстан аумағынан алынған құтырық вирусы изоляттарының саны шектеулі болғанымен, олардың генетикалық әртүрлілігі, географиялық және уақыттық құрылымы айқын байқалады. Бұл жағдай Еуразияның дала және орманды - дала экожүйелерінде құтырық вирусының тарихи және қазіргі таралу заңдылықтарына сәйкес келеді. Сонымен қатар *CA1* минор кладасының негізгі тармағының даталануы 1946 – 1977 жылдар аралығына сәйкес келіп, бұл кезеңнің халық пен мал миграциясының күшеюімен сипатталатын тарихи процестермен қабаттасуы ықтимал.

Толық геномдық деректердің шектеулі болуына байланысты талдау негізінен N геніне сүйеніп жүргізілді. Дегенмен алынған нәтижелер Қазақстан аумағында құтырық вирусының көплиниялы эволюциялық құрылымын айқын көрсетеді. Алдағы уақытта толық геномдық секвенирлеу деректерін кеңейту

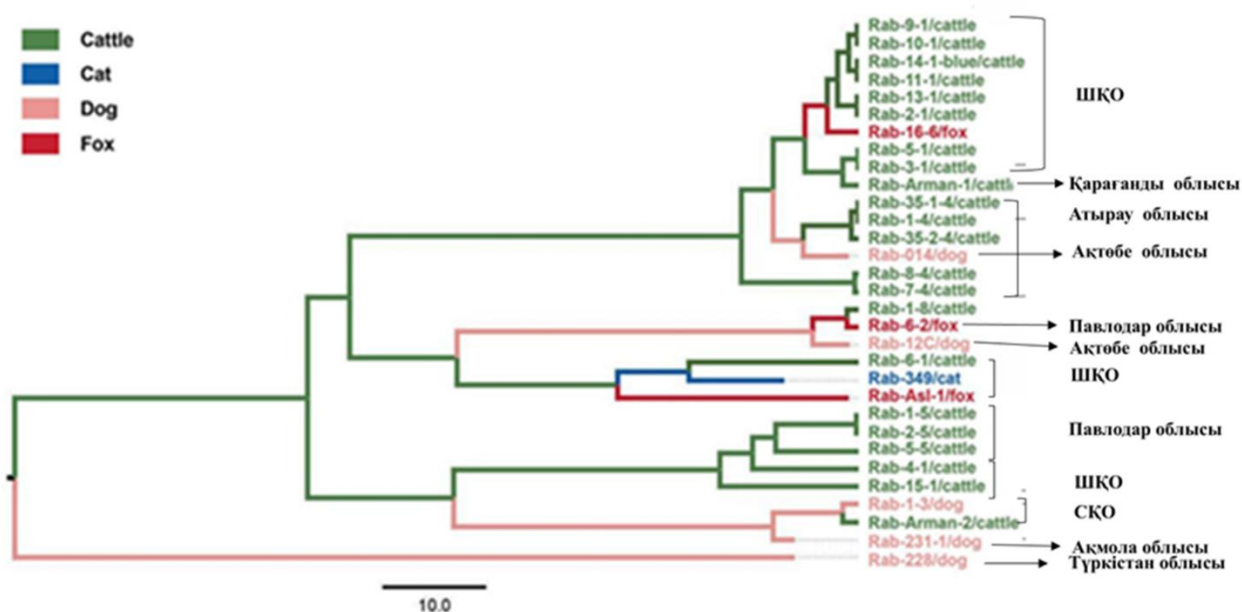
құтырық вирусының генетикалық әртүрлілігін тереңірек бағалауға және эпизоотиялық бақылау шараларын жетілдіруге мүмкіндік береді.

3.6.6 Байес әдісімен бағаланған генетикалық қашықтық және филогенетикалық ағаштар

Үй жануарлары мен жабайы жыртқыштар арасындағы құтырық вирусының таралу ерекшеліктерін тереңірек бағалау мақсатында, әртүрлі иелерден бөлініп алынған 31 *Rabies lyssavirus* штамының N ген тізбектері негізінде Байес әдісіне сүйенген қосымша филогенетикалық талдау жүргізілді. Талдауда әр штамның иесі (ірі қара мал, ит, түлкі, мысық) жеке аннотациялық белгі ретінде қарастырылды.

Нуклеотидтік тізбектер көптік туралаудан кейін Байес әдісімен филогенетикалық ағаш құруға пайдаланылды. Генетикалық қашықтық тізбектер арасындағы нуклеотидтік ауысулар санына және олардың үлесіне негізделіп бағаланды. Эволюциялық модель ретінде GTR моделі қолданылды, ал нуклеотидтік ауысулардың түзетілген мәндерін есептеу үшін *Jukes–Cantor* тәсілі пайдаланылды.

Алынған филогенетикалық ағашта (30-сурет) зерттелген штамдар негізінен *ST (steppe - type)* субкласына бірігіп, иелеріне қарамастан бірқатар тығыз кластерлер түзді. Бұл құтырық вирусының белгілі бір генетикалық линиялары әртүрлі жануар иелерінде параллель түрде айналымда болатынын көрсетті.



Сурет 30 – Жануар иелері бойынша аннотацияланған филогенетикалық ағаш

ST субкласына жататын 30 штамның ішінде түлкіден алынған Rab - 16 - 6 изоляты ірі қара малдан алынған алты штаммен генетикалық тұрғыдан өте жақын орналасқаны анықталды. Бұл изоляттар үлгі алынған уақыты мен

географиялық орналасуы бойынша да сәйкес келіп, бір эпизоотиялық желіге жатуы мүмкін екенін көрсетті.

Шығыс Қазақстан облысынан алынған ірі қара мал изоляттары – Rab-2-1, Rab-3-1, Rab-4-1, Rab-5-1, Rab-6-1, Rab-9-1, Rab-10-1, Rab-11-1, Rab-13-1, Rab-14-1-blue, Rab-15-1 – бір-біріне генетикалық жақын орналасып, өңірлік эпизоотиялық байланыстың тұрақты екенін айғақтайды. Осы кластерде түлкіден алынған Rab-16-6 изолятының орналасуы жабайы және үй жануарлары арасындағы вирус алмасуын көрсетеді.

Павлодар облысындағы Rab-1-5, Rab-2-5, Rab-5-5 ірі қара мал изоляттары мен Rab-6-2 түлкі изоляты бір филогенетикалық тармақта топтасып, табиғи ошақ пен ауыл шаруашылығы жануарлары арасындағы эпизоотиялық байланысты растайды. Солтүстік Қазақстан облысынан алынған Rab-1-8 ірі қара малы мен Rab-1-3 ит изоляттарының жақындығы да иелер арасындағы берілу тізбегінің бар екенін көрсетеді. Rab-Arman-2 және Rab-Arman-1 изоляттарының басқа өңірлік штамдармен тығыз топтасуы вирус циркуляциясының кең географиялық ауқымын дәлелдейді.

Иттерден алынған Rab-014 (OP477368), Rab-12C, Rab-231-1 және Rab-228 изоляттары ірі қара мал және түлкі штамдарымен бір кластерлерде орналасып, иттердің эпизоотиялық процесте аралық буын ретіндегі рөлін көрсетеді. ШҚО-дан алынған Rab-Asl-1 түлкі изоляты және Rab-349 мысық изоляты да ST субкласы шегінде орналасып, табиғи ошақтық жүйенің көпкомпонентті сипатын айғақтайды.

Атырау облысынан алынған Rab-1-4, Rab-7-4, Rab-8-4, Rab-35-1-4, Rab-35-2-4 изоляттарының бір тармақта шоғырлануы өңір ішіндегі генетикалық біртектілікті көрсетеді.

Жалпы алғанда, филогенетикалық ағаш құрылымы құтырық вирусының Қазақстан аумағында табиғи-ошақтық типте айналымда болатынын, негізгі резервуар ретінде жабайы жыртқыштардың, әсіресе түлкінің рөлін, ал иттер мен ірі қара малдың эпизоотиялық тізбекте қатысушы және вирус таралуын қолдайтын иелер екенін көрсетеді. Иелерге тәуелсіз аралас кластерлердің қалыптасуы вирус штамдарының трансшекаралық және өңіраралық қозғалысын, сондай-ақ жануар популяциялары арасындағы тұрақты эпизоотиялық байланысты дәлелдейді. Нәтижелердегі түлкі мен ІҚМ изоляттарының филогенетикалық сәйкестігі (99.8%) және Еуразияның далалық зоналарындағы түлкілердің (*Vulpes vulpes*, *V. corsac*) негізгі резервуарлық рөлі туралы әдеби мәліметтер [118] бұл тұжырымды толық негіздейді.

3.7 Қазақстан аумағында бөлініп алынған құтырық вирусы изоляттарының нуклеотидтік тізбектерінің деректер қорын қалыптастыру нәтижелері

Осы зерттеу аясында алынған құтырық вирусының (*Rabies lyssavirus*) толық және жартылай геномдық нуклеотидтік тізбектері халықаралық ашық деректер репозиторийі – GenBank деректер қорына депонирленді (31-сурет).

Зерттелген изоляттарға тиесілі нуклеотидтік тізбектер OP477379 – OP477391 және ON366706 – ON366710 инвентарлық нөмірлері бойынша

тіркелді. Барлық тізбектер PRJNA832888 BioProject шеңберінде біріктіріліп, NCBI деректер инфрақұрылымы арқылы еркін қолжетімді етілді [108-110].

Тіркелген геномдық деректер Қазақстан аумағында айналымда жүрген құтырық вирусының молекулалық-генетикалық ерекшеліктерін сипаттайтын алғашқы жүйелі дерекқорлардың бірі болып табылады. Бұл мәліметтер эпидемиологиялық қадағалау, филогенетикалық талдау, генотиптеу және трансшекаралық таралу жолдарын зерттеу үшін маңызды ақпараттық база қалыптастырады.

Құтырық вирусына қатысты нуклеотидтік тізбектерге қол жеткізу және оларды салыстырмалы талдау *NCBI Virus* платформасы арқылы жүзеге асырылады. Бұл портал *RefSeq*, *GenBank* және *NCBI*-дің өзге де репозиторийлерінде жинақталған вирус тізбектерін біріздендірілген форматта қарауға мүмкіндік береді.

Accession	Organism Name	GenBank/RefSeq ID	Assembly ID	Submitters	Organization	Release Date	Isolate	Species	Length	Completion	Gen Location	Host	Tissue/Specimen/Source	Collection
CP017011.1	Coxsackievirus B3	CP017011.1	CP017011.1	NCBI Virus	National Center for Biotechnology Information	2020-04-29	Ref-125	Coxsackievirus B3	12887	complete	Kazakhstan: Aktau region...	Canis lupus familiaris	brain	2023
CP017012.1	Coxsackievirus B3	CP017012.1	CP017012.1	NCBI Virus	National Center for Biotechnology Information	2020-04-29	Ref-126	Coxsackievirus B3	12797	complete	Kazakhstan: East Kazakhstan...	Bos taurus	brain	2023
CP017013.1	Coxsackievirus B3	CP017013.1	CP017013.1	NCBI Virus	National Center for Biotechnology Information	2020-04-29	Ref-127	Coxsackievirus B3	12799	complete	Kazakhstan: North Kazakhstan...	Canis lupus familiaris	brain	2023
CP017014.1	Coxsackievirus B3	CP017014.1	CP017014.1	NCBI Virus	National Center for Biotechnology Information	2020-04-29	Ref-128	Coxsackievirus B3	12771	complete	Kazakhstan: East Kazakhstan...	Bos taurus	brain	2023
CP017015.1	Coxsackievirus B3	CP017015.1	CP017015.1	NCBI Virus	National Center for Biotechnology Information	2020-04-29	Ref-129	Coxsackievirus B3	12803	complete	Kazakhstan: East Kazakhstan...	Bos taurus	brain	2023
CP017016.1	Coxsackievirus B3	CP017016.1	CP017016.1	NCBI Virus	National Center for Biotechnology Information	2020-04-29	Ref-130	Coxsackievirus B3	12803	complete	Kazakhstan: North Kazakhstan...	Bos taurus	brain	2023
CP017017.1	Coxsackievirus B3	CP017017.1	CP017017.1	NCBI Virus	National Center for Biotechnology Information	2020-04-29	Ref-131	Coxsackievirus B3	12871	complete	Kazakhstan: East Kazakhstan...	Canis lupus familiaris	brain	2023
CP017018.1	Coxsackievirus B3	CP017018.1	CP017018.1	NCBI Virus	National Center for Biotechnology Information	2020-04-29	Ref-132	Coxsackievirus B3	12867	complete	Kazakhstan: North Kazakhstan...	Bos taurus	brain	2023
CP017019.1	Coxsackievirus B3	CP017019.1	CP017019.1	NCBI Virus	National Center for Biotechnology Information	2020-04-29	Ref-133	Coxsackievirus B3	12859	complete	Kazakhstan: East Kazakhstan...	Bos taurus	brain	2023
CP017020.1	Coxsackievirus B3	CP017020.1	CP017020.1	NCBI Virus	National Center for Biotechnology Information	2020-04-29	Ref-134	Coxsackievirus B3	12872	complete	Kazakhstan: Turkmenistan...	Canis lupus familiaris	brain	2023
CP017021.1	Coxsackievirus B3	CP017021.1	CP017021.1	NCBI Virus	National Center for Biotechnology Information	2020-04-29	Ref-135	Coxsackievirus B3	12802	complete	Kazakhstan: Aktau region...	Canis lupus familiaris	brain	2023
CP017022.1	Coxsackievirus B3	CP017022.1	CP017022.1	NCBI Virus	National Center for Biotechnology Information	2020-04-29	Ref-136	Coxsackievirus B3	12803	complete	Kazakhstan: North Kazakhstan...	Bos taurus	brain	2023
CP017023.1	Coxsackievirus B3	CP017023.1	CP017023.1	NCBI Virus	National Center for Biotechnology Information	2020-04-29	Ref-137	Coxsackievirus B3	12873	complete	Kazakhstan: East Kazakhstan...	Bos taurus	brain	2023
CP017024.1	Coxsackievirus B3	CP017024.1	CP017024.1	NCBI Virus	National Center for Biotechnology Information	2020-04-29	Ref-138	Coxsackievirus B3	12860	complete	Kazakhstan: East Kazakhstan...	Felis catus	brain	2023
CP017025.1	Coxsackievirus B3	CP017025.1	CP017025.1	NCBI Virus	National Center for Biotechnology Information	2020-04-29	Ref-139	Coxsackievirus B3	12801	complete	Kazakhstan: East Kazakhstan...	Bos taurus	brain	2023

Сурет 31 – GenBank дерекқорында тіркелген құтырық вирусының геном тізбектері

Қазақстаннан алынған изоляттардың ашық деректер қорында тіркелуі құтырық вирусының аймақтық және ғаламдық эволюциясын зерттеуге, халықаралық салыстырмалы жұмыстар жүргізуге және эпизоотиялық жағдайды болжау модельдерін жетілдіруге жағдай жасайды. Сонымен қатар, бұл деректер алдағы уақытта Қазақстан мен көршілес елдерде құтырыққа қарсы профилактикалық және бақылау шараларын ғылыми негізде жоспарлауға мүмкіндік береді [111-113].

ЗЕРТТЕУ НӘТИЖЕЛЕРІН ТАЛҚЫЛАУ

Жүргізілген жұмыс Қазақстан аумағында таралған құтыру вирусы изоляттарына алғаш рет кешенді молекулалық-генетикалық сипаттама беруге бағытталды. Мұндай талдаулар эпизоотологиялық үдерістердің ішкі заңдылықтарын тереңірек ұғынуға және ауруды бақылауға арналған тиімді, ғылыми негізделген тәсілдерді әзірлеуге жол ашады. 2020 – 2022 жылдары республика бойынша 12 өңірден жиналған 117 патологиялық үлгі зерттеліп, соның негізінде *RABV* вирусының генетикалық әртүрлілігі мен оның таралу ерекшеліктері жөнінде жеткілікті деңгейде толық мәлімет алынды. Бұл таңдама жиынтығы еліміздің негізгі табиғи ошақтары шоғырланған Шығыс, Солтүстік, Батыс және Оңтүстік өңірлерін қамти отырып, республикадағы ағымдағы эпизоотиялық жағдайды сипаттауға мүмкіндік береді.

Жылдар бойынша секвенирленген үлгілердің негізгі бөлігі 2021 жылға келеді (25/31). Бұл кезеңде індеттік белсенділіктің жоғары болғаны материалдың да көп түсуімен қабаттасады. 2020 және 2022 жылдары секвенирлеуге өткен үлгілер саны бірдей деңгейде (3/31) тіркелді. Мұнда «нақты төмендеу» немесе «айқын бәсеңдеу» деген тұжырым жасауға негіз жеткіліксіз, себебі зерттеуге түскен материал саны мен сапасы жылдар бойынша тең болмаған.

Филогенетикалық талдау нәтижелері Қазақстан аумағында *Cosmopolitan* мажор кладасының толық басым екенін көрсетті, яғни анықталған изоляттардың барлығы осы кластерге жатады. Бұл деректер Еуразияның далалық аймағында айналымдағы вирустың генетикалық құрылымы біркелкі деген болжамды қолдайды. Сонымен қатар, Шығыс Қазақстан облысынан алынған изоляттардың Новосибирск облысы, Омбы облысы және Шыңжаң аумақтарында тіркелген штамдармен нуклеотидтік деңгейде өте жоғары ұқсастық көрсетуі (98–100%) және *bootstrap* мәндерінің жеткілікті жоғары болуы ($BS > 75\%$) вирустың трансшекаралық таралу мүмкіндігін дәлелдейді. Мұндай құбылыс, ең алдымен, жабайы жануарлардың, атап айтқанда түлкілер мен қарсақтардың табиғи миграциялық қозғалысымен байланысты. Осыған байланысты құтырыққа қарсы іс-шараларды тек ұлттық деңгейде емес, көршілес елдермен үйлестірілген аймақтық форматта жүргізу қажеттілігі туындайды [54, p. 5-1-5-20].

Түркістан облысынан алынған Rab-228 изолятының ерекше филогенетикалық орны және оның Батыс Азиялық (Грузия, Әзербайжан) штамдармен ұқсастығы Қазақстанның оңтүстігінде әлі толық сипатталмаған жаңа генетикалық линияның болуы мүмкін екенін көрсетеді. Сонымен қатар, Rab-014 изолятындағы Р-генінің 4 аминқышқылына ұзаруына әкелген нүктелік мутация вирустың микроэволюциялық процестерін бақылау үшін маңызды.

Филогенетикалық талдау нәтижелері айналымдағы штаммдардың генетикалық тұрғыдан біркелкі еместігін айқын көрсетті. Әсіресе бұл жағдай Шығыс Қазақстан облысында анық байқалады. Мұнда шығу тегі әртүрлі алты бөлек филогенетикалық кластер тіркелді. Мұндай көрініс шекаралас аймақтардағы эпизоотиялық жағдайдың күрделі екенін аңғартады. Оған

жабайы етқоректі жануарлардың еркін көші-қоны мен мал шаруашылығының белсенді дамуы да ықпал етуі мүмкін. Қазақстандық изоляттардың Ресей, Қытай, Моңғолия және Иран аумақтарынан алынған штаммдармен генетикалық жағынан жақын болуы вирустың шекарадан тыс айналымын растайды. Осыған байланысты қадағалау мен бақылау шараларын тек ұлттық деңгейде ғана емес, өңірлік деңгейде де үйлестіріп жүргізудің маңызы арта түседі.

Байес әдісімен жүргізілген уақыттық талдау (TMRCA) Cosmopolitan кладасының Қазақстан мен көршілес аймақтарда дивергенциялануы 1839 жылдарға (1734–1915), ал SA1 минор кладасының пайда болуы 1942 жылдарға (1910–1966) сәйкес келетінін көрсетті. Бұл кезеңдер Орталық Азиядағы демографиялық өсім, мал шаруашылығының интенсификациясы және урбанизация үдерістерімен тұспа-тұс келеді. Вирустың нуклеотидтік ауысу жылдамдығы $3,07 \times 10^{-4}$ сайт⁻¹·жыл⁻¹) RABV үшін орташа эволюциялық қарқынды сипаттайды, бұл вирустың қоршаған ортаға және жаңа иелерге бейімделу қабілетінің тұрақтылығын білдіреді. (4.6.5-бөлім) [54, р. 5-1-5-20].

Зерттеу нәтижелері бойынша ірі қара малдың үлесі жоғары (71%) екені тіркелді, алайда бұл көрсеткішті оларды эпизоотиялық резервуар ретінде қарастыруға негіз болмайды. Филогенетикалық талдау нәтижесінде (30-сурет) түлкіден және ірі қара малдан алынған изоляттардың (мысалы, Rab-16-6 және Rab-2-1) бір кластерде топтасып, 99,8% генетикалық ұқсастық көрсетуі ірі қара малдың инфекция тізбегінде тек кездейсоқ сезімтал ие (dead-end host) рөлін атқаратынын дәлелдейді. Негізгі резервуарлық қызмет жабайы жыртқыштарға тиесілі, ал ауыл шаруашылығы жануарлары табиғи ошақтардағы вирустың айналым белсенділігін жанама түрде көрсететін индикатор ретінде сипатталады (4.6.6-бөлім) [11, с. 3-374; 12].

Аумақтық талдау нәтижелері құтыру жағдайларының біркелкі таралмайтынын көрсетті. Ең көп тіркелген аймақ Шығыс Қазақстан облысы (14 жағдай), ал Солтүстік Қазақстан облысында 3 жағдай анықталған. Мұндай айырмашылық тек эпизоотологиялық факторлармен ғана емес, кей жерлерде диагностика деңгейінің әртүрлі болуымен де байланысты болуы мүмкін. Сонымен қатар, шекараға жақын өңірлерде жағдайлардың жиірек кездесуі бұл инфекцияның трансшекаралық сипаты бар екенін байқатады. Осыған байланысты көршілес елдермен бірлескен эпидемиологиялық бақылауды күшейту қажет екені анық.

Алынған 31 толық геномдық тізбектің GenBank дерекқорына енгізілуі (BioProject PRJNA832888) отандық вирусология ғылымы үшін маңызды қадам болып табылады. Зерттеу нәтижелері Қазақстандағы құтырық вирусының молекулалық-генетикалық картасын қалыптастыруға, диагностикалық праймерлердің тиімділігін арттыруға және вакцинация стратегияларын ғылыми негізде оңтайландыруға тікелей негіз болады.

ҚОРЫТЫНДЫ

Диссертациялық жұмыста қойылған мақсатқа сәйкес жүргізілген молекулалық-генетикалық және филогенетикалық зерттеулер нәтижесінде төмендегідей негізгі **қорытындылар** жасалды:

1. 2020 - 2022 жылдары құтырыққа клиникалық күдік туғызған жануарлардан алынған 117 ми үлгісі бойынша 10% суспензиялар дайындалып, РНҚ бөлініп алынды, кері транскрипция жүргізіліп, нақты уақыт режиміндегі ПТР нәтижелері негізінде олардың ішінен 31 үлгі құтырық вирусының РНҚ - сына оң нәтиже көрсетіп, әрі қарайғы молекулалық - генетикалық талдауға жарамды деп танылды. Сапа критерийлеріне сәйкес 31 үлгі әрі қарайғы генетикалық талдауға жарамды кДНҚ қоры ретінде қалыптастырылды. Бұл жиынтық кейінгі амплификация, секвенирлеу және генотиптеу кезеңдерін толық қамтамасыз етті.

2. Іріктелген 31 үлгіде *Rabies lyssavirus* геномын толық қамтуға арналған 12 праймер жұбының көмегімен амплификация жүргізілді. Нәтижесінде барлық үлгілер үшін N және G гендерінің нуклеотидтік тізбектері алынғаны анықталды. Оның ішінде 25 үлгіде (80,6%) құтырық вирусының толық немесе толыққа жуық геномдық тізбегі, ал РНҚ концентрациясы төмен үлгілерде кемінде диагностикалық маңызы бар N және G ген аймақтары сәтті секвенирленді. Сонымен бірге жекелеген үлгілерде (мысалы, Rab - 014) P ген аймағында ықтимал биологиялық маңызы бар өзгеріс байқалып, оның функционалдық әсерін нақтылау қосымша зерттеуді қажет ететіні көрсетілді.

3. Генотиптеу нәтижелері бойынша зерттелген 31 изоляттың барлығы классикалық *Rabies virus (RABV)* түріне жататыны анықталды. Олардың 30-ы Cosmopolitan major clade құрамындағы Cosmopolitan CA1 minor clade - қа, яғни дала типті (*steppe - type*) еуразиялық құтырық вирусына тиесілі болды. Бұл Қазақстан аумағында 2020 - 2022 жылдары құтырық ауруын тудырған негізгі вирус типі *Cosmopolitan CA1 (steppe - type RABV)* екенін дәлелдейді.

N гені негізінде Neighbor - Joining және Байес әдістерін қолдана отырып филогенетикалық талдау жүргізілді.

Филогенетикалық ағаштарда алынған изоляттардың Ресей Федерациясы, Қытай және Орталық Азия елдерінен бұрын сипатталған штамдармен тығыз туыстығы анықталып, Қазақстандағы құтырық вирусының таралуы еуразиялық дала аймағына тән трансшекаралық модельге сәйкес келетіні дәлелденді. Байес әдісіне негізделген уақыттық талдау *Cosmopolitan CA1* минор кладасының Қазақстан аумағындағы қазіргі айналымы 1910 - 1966 жылдар аралығында қалыптасқан еуразиялық дала типімен тікелей байланысты екенін көрсетті. Толық геномдық деректер бұл типтің бірнеше тәуелсіз филогенетикалық линиялар арқылы әр өңірде параллель таралатынын дәлелдеді, алайда олардың барлығы бір эволюциялық бағытқа - *steppe - type RABV*-ге жатады.

4. Зерттеу барысында алынған құтырық вирусының 31 толық және жартылай геномдық нуклеотидтік тізбегі халықаралық GenBank дерекқорына тіркелді. Барлық тізбектер PRJNA832888 BioProject аясында біріктіріліп, OP477379 - OP477391 және ON366706 - ON366710 тіркеу нөмірлерімен

жарияланды. Осылайша, Қазақстан аумағында айналымдағы *Rabies lyssavirus* штамдарының молекулалық-генетикалық ерекшеліктерін сипаттайтын жүйеленген ұлттық дерекқор алғаш рет қалыптастырылды.

Жалпы алғанда, жүргізілген зерттеу Қазақстан Республикасында құтырық ауруының қоздырғышы ретінде классикалық *Rabies virus*, ал оның басым айналымдағы типі *Cosmopolitan CA1* (steppe - type) екенін молекулалық - генетикалық деңгейде дәлелдеді. Алынған нәтижелер құтырықтың табиғи - ошақтық сипатын, жабайы жыртқыштар (негізінен түлкі) негізгі резервуар екенін және профилактикалық шаралар дәл осы генетикалық типке бағытталуы тиіс екенін көрсетеді.

Жүргізілген зерттеулердің нәтижелеріне сүйене отырып, Қазақстанда құтырыққа қарсы профилактикалық шараларды жетілдіру үшін келесі бағыттар ұсынылады:

- эпизоотикалық ошақ анықталған әрбір жағдайда молекулалық-генетикалық талдауды міндетті түрде енгізу;
- үй және жабайы жануарлар арасында құтырық вирусының айналымын біртұтас экожүйе ретінде қарастыру;
- шекаралас аймақтарда көршілес елдермен үйлестірілген вакцинация және мониторинг бағдарламаларын іске асыру;
- құтырық вирусының толық геномдық деректерін жүйелі түрде жинақтау және ұлттық дерекқорды кеңейту.

Үй жануарларынан (ит, ірі қара мал) бөлінген изоляттардың жабайы жыртқыштардан (түлкі) алынған штамдармен генетикалық жақындығын ескере отырып, жабайы жыртқыштар арасында оральды вакцинациялау шараларын жүйелі түрде жүргізу қажет.

Құтырық вирусының толық және жартылай геномдық тізбектерін GenBank халықаралық деректер қорларына тұрақты түрде енгізу арқылы ұлттық молекулалық-эпизоотологиялық дерекқор қалыптастыру ұсынылады. Бұл Қазақстан аумағындағы құтырық вирусының эволюциясын ұзақ мерзімді бақылауға мүмкіндік береді.

Шекаралас аймақтарда (Шығыс Қазақстан, Атырау және өзге де өңірлер) тіркелген изоляттардың көршілес мемлекеттерден алынған штамдармен филогенетикалық туыстығын ескере отырып, трансшекаралық эпизоотиялық мониторинг пен ақпарат алмасуды күшейту қажет.

Осы зерттеуде әзірленген құтырық вирусының геномын амплификациялау, секвенирлеу және филогенетикалық талдау хаттамаларын ветеринариялық зертханалар мен ғылыми - зерттеу ұйымдарының тәжірибесіне енгізу ұсынылады.

Осы кешенді тәсіл ғана Қазақстан аумағында құтырық ауруының таралуын тиімді бақылауға және ұзақ мерзімді перспективада індетті жоюға мүмкіндік береді.

ПАЙДАЛАНЫЛҒАН ӘДЕБИЕТТЕР ТІЗІМІ

- 1 Абдрахманов С.К., Бейсембаев К.К., Кабжанова А.М. Влияние природно-климатических условий на эпизоотический процесс бешенства // Сб. науч. тр. КНЦЗВ. – 2019. – Т. 8, №2. – С. 99-104.
- 2 Sultanov A.A., Abdrakhmanov S.K., Abdybekova A.M. et al. Rabies in Kazakhstan // PLOS Neglected Tropical Diseases. – 2016. – Vol. 10, Issue 8. – P. 1-15.
- 3 Abdrakhmanov S.K., Abenova A.Z., Mukhanbetkaliyeva A.A. et al. Animal Rabies in Kazakhstan: Stable Endemicity, Surveillance Pitfalls, and Priority Actions // Pathogens. – 2025. – Vol. 14, Issue 11. – P. 1079.
- 4 Yessembekova G.N. et al. Molecular epidemiological study of animal rabies in Kazakhstan // Journal of Integrative Agriculture. – 2023. – Vol. 22, Issue 4. – P. 1266-1275.
- 5 Shevtsov A.B., Yessembekova G.N., Abenova A.Zh. et al. Molecular genetic analysis of rabies virus in the East Kazakhstan region // Вестник науки казахского Агротехнического университета имени С. Сейфуллина. – 2021. – №4(111). – С. 138-143.
- 6 Есембекова Г.Н., Амиргазин А.О., Абенова А.Ж. и др. Протокол полногеномного секвенирования и генотипирования изолятов Rabies virus // Eurasian Journal of Applied Biotechnology. – 2022. – Issue 4. – P. 120-129.
- 7 Abenova A.Z. Molecular and biological analysis of the rabies virus circulating in the Republic of Kazakhstan // Матер. междунар. науч.-практ. конф. «Сейфуллинские чтения – 18: «Молодежь и наука – взгляд в будущее». – Астана, 2022. – С. 10-14
- 8 Абенова А.Ж. Молекулярно-генетический анализ вируса бешенства // Матер. междунар. науч.-практ. конф. «Сейфуллинские чтения - 18(2): «Наука XXI века – эпоха трансформации». – М., 2022. – С. 199-201.
- 9 Абенова А.Ж. Молекулярно-генетический анализ вируса бешенства // Матер. 12-й междунар. науч.-практ. конф. «Сибирская деревня: 200 лет развития Омской области – от реформ М.М. Сперанского до агропромышленного центра Сибири». – Омск, 2022. – С. 513-517.
- 10 Абенова А.Ж. Абдрахманов С.К., Есембекова Г.Н. Қазақстанда таралатын құтырық вирусының штамдарын молекулалық-генетикалық талдау және алдын алу іс-шараларының стратегиясын әзірлеу // 120 лет казахской ветеринарной науке: достижения и новые вызовы в обеспечении биологической безопасности: матер. междунар. науч.-практ. конф. – Алматы, 2025. – С. 27-38.
- 11 Шабейкин А.А. Цифровые модели эпизоотических процессов бешенства и сибирской язвы, оценка и управление рисками: дис. ... док. вет. наук: 4.2.3. – М., 2022. – 379 с.
- 12 Virus Taxonomy 2023 Release. Rhabdoviridae, Lyssavirus / International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) // <https://ictv.global/report/chapter/rhabdoviridae/rhabdoviridae/lyssavirus>. 10.10.2025.
- 13 Rupprecht C.E., Kuzmin I.V., Meslin F.X. Lyssaviruses and rabies: current conundrums, concerns, contradictions and controversies // F1000Research. – 2017. –

Vol. 6. – P. 184.

14 Dundarova H. et al. Phylogeographic Aspects of Bat Lyssaviruses in Europe: A Review // Pathogens. – 2023. – Vol. 12. – P. 1089.

15 Cai X., Zhou J., Li Y. et al. Structural Heterogeneity of the Rabies Virus Virion // Viruses. – 2024. – Vol. 16. – P. 1447.

16 Сухарьков А.Ю. Разработка методов оценки оральной антирабической вакцинации животных: дис. ... канд. биол. наук: 03.02.02. – М., 2016. – 141 с.

17 Svitkin Y.V., Albertini A.A.V. Looking at the Pathogenesis of the Rabies Lyssavirus Strain Pasteur Vaccins through a Prism of the Disorder-Based Bioinformatics // Biomolecules. – Biomolecules. – 2022. – Vol. 12. – P. 1436.

18 Борзова З.В. Вирусы: лекция. – Махачкала, 2020. – 24 с.

19 Rappuoli R. Inner Workings: 1885, the first rabies vaccination in humans // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2014. – Vol. 111, Issue 34. – P. 12273.

20 Koprowski H. Biological modification of rabies virus as a result of its adaptation to chicks and developing chick embryos // Bulletin of the World Health Organization. – 1954. – Vol. 10, Issue 5. – P. 709-724.

21 Груздев К.Н., Метлин А.Е. Бешенство животных. – Владимир, 2019. – 394 с.

22 Пат. 2746588 С1 РФ. Способ опосредованного определения полноты инактивации антигена вируса бешенства с применением обратнотранскриптазной полимеразной цепной реакции с последующим электрофорезом ампликонов в агарозном геле / Доронин М.Е. и др.; опубл. 16.04.21, Бюл. №11. – 34 с.

23 Шишков А.В., Пяткина А.А., Манин Б.Л. Динамика адаптации вируса бешенства вакцинного штамма «RV-97» к монослойной культуре клеток ВНК-21/13 // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2021. – №2(54). – С. 157-164.

24 Бабак В.А., Гаранович М.М. Суспензионное культивирование вируса бешенства РВ-97 на культуре клеток ВНК-21 // Исследования молодых ученых в решении проблем животноводства: матер. 6-й междунар. науч.-практ. конф. – Витебск: ВГАВМ, 2008. – С. 22-23.

25 Никифоров В.В., Авдеева М.Г. Бешенство. Актуальные вопросы // эпидемиология и инфекционные болезни. – 2017. – Т. 22, №6. – С. 295-305.

26 Бессарабов Б.Ф., Вашутин А.А., Воронин Е.С. и др. Инфекционные болезни животных: справочник. – М.: КолосС, 2007. – 671 с.

27 Davis A.D., Rudd R.J., Bowen R.A. Effects of Aerosolized Rabies Virus Exposure on Bats and Mice // The Journal of Infectious Diseases. – 2007. – Vol. 195, Issue 8. – P. 1144-1150.

28 Макаров В.В. Эпизоотический паттерн бешенства на Европейской части России на современном этапе. – М., 2020. – 105 с.

29 Метлин А.Е. Комплекс средств и методов диагностики и борьбы с бешенством: дис. ... канд. вет. наук: 06.02.02. – Владимир, 2018. – 445 с.

30 Ботвинкин А.Д., Отгонбаатар Д. Бешенство на сопредельных территориях России и Монголии (исторический обзор) // Сибирский

медицинский журнал. – 2006. – №7. – С. 8-10.

31 Odontsetseg N., Uuganbayar D., Tserendorj Sh., Adiyasuren Z. Animal and human rabies in Mongolia // *Rev Sci Tech.* – 2009. – Vol. 28, Issue 3. – P. 995-1003.

32 Zhou H., Vong S., Liu K. et al. Human Rabies in China, 1960–2014: A Descriptive Epidemiological Study // *PLoS Neglected Tropical Diseases.* – 2016. – Vol. 10, Issue 8. – P. e0004874.

33 Кабжанова А.М., Есембекова Г.Н., Абдрахманов С.К. Проявление бешенства в Казахстане на фоне современных природно-климатических условий // *Вестник науки Казахского агротехнического университета им. С. Сейфуллина.* – 2021. – №1(108). – Б. 132-142.

34 Ситуация по бешенству скота в ВКО стабилизирована, угроза распространения болезни снята // <https://nomad.su/?a=7-20200727>. 10.10.2025.

35 Абдрахманов С.К., Муханбеткалиев Е.Е. Оценка риска распространения особо опасных инфекционных болезней в Казахстане: монография. – Астана, 2023. – 247 с.

36 Kabzhanova A.M., Mukhanbetkaliyev E.E., Yesembekova G.N. et al. Пространственно-временной анализ эпизоотической ситуации по бешенству животных в Казахстане // *Вестник науки КазАТУ им. С. Сейфуллина.* – 2022. – №3-2(114). – С. 51-58.

37 Kabzhanova A.M., Kadyrov A.S., Mukhanbetkaliyeva A.A. et al. Rabies in the Republic of Kazakhstan: spatial and temporal characteristics of disease spread over one decade (2013–2022) // *Frontiers in Veterinary Science.* – 2023. – Vol. 10. – P. 01-06.

38 Чернышова Е.В. Разработка и совершенствование методов диагностики бешенства и молекулярно-биологическая характеристика полевых изолятов вируса: дис. ... канд. ветер. наук: 06.02.02. – Владимир, 2017. – 136 с.

39 Бешенство//*Biosafety.kz.* – 2019 // <https://biosafety.kz/ru/>. 10.10.2025.

40 World Health Organization. Rabies fact sheet. – 2024. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/rabies>. 10.10.2025.

41 Rabies (infection with rabies virus and other lyssaviruses): Terrestrial Manual. – 2023 / World Organisation for Animal Health // <https://agris.fao.org/search/en/providers/125096/records/>. 10.02.2025.

42 Rupprecht C.E., Anthony R. Fooks et al. Laboratory techniques in rabies. – Ed. 5 th. – Geneva, 2018. – 289 p.

43 Борисевич С.В., Писцов М.Н., Рубцов В.В. и др. Лабораторная диагностика бешенства. Современное состояние и направление развития // *Проблемы особо опасных инфекций.* – 2021. – №2. – С. 6-15.

44 Webster L.T., Dawson J.R. Early diagnosis of rabies by mouse inoculation. Measurement of humoral immunity to rabies by mouse protection test // *Proc Soc Exp Biol Med.* – 1935. – Vol. 32. – P. 570-573.

45 Kanitz F.A., Cargnelutti J.F., Weiblen R. et al. Virus isolation in cell culture for confirmatory diagnostic of rabies in bovine specimens // *Ciência Rural.* – 2015. – Vol. 45, Issue 12. – P. 2193-2196.

46 Okoh G.R., Kazeem H.M., Kia G.S.N. et al. Evaluation of Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay and Rapid Immuno-Diagnostic Test for Rabies Antigen

Detection in Archived Dog Brain Tissues // *Folia Veterinaria*. – 2018. – Vol. 62, Issue 1. – P. 18-24.

47 Jayakumar R., Ramadass P., Raghavan N. Comparison of enzyme immunodiagnosis with immunofluorescence for rapid diagnosis of rabies in dogs // *Zentralblatt für Bakteriologie*. – 1989. – Vol. 271, Issue 4. – P. 501-503.

48 Гулюкин А.М. Значимость современных методов лабораторной диагностики и идентификации возбудителя бешенства для иммунологического мониторинга данного зооноза // *Вопросы вирусологии*. – 2014. – №3. – С. 5-10.

49 Fooks A.R. et al. Emerging Technologies for the Detection of Rabies Virus: Challenges and Hopes in the 21st Century // *PLoS Neglected Tropical Diseases*. – 2009. – Vol. 3, Issue 9. – P. e530.

50 Девяткин А.А., Лукашев А.Н., Полещук Е.М. и др. Молекулярная эпидемиология вируса бешенства на территории Российской Федерации // *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика*. – 2017. – Т. 1, №92. – С. 39-42.

51 Аликова Г.А., Сочнев В.В., Авилов В.М. и др. Зоны риска рабической инфекции в Волгоградской области // *Главные эпизоотологические параметры популяции животных: сб. науч. тр. ФГБОУ ВПО НГСХА*. – Нижний Новгород, 2015. – С. 312-319.

52 Макаров В.В., Воробьев А.А. Актуальные проблемы бешенства: природная очаговость, методология исследования и контроля в центре России // *Ветеринарная патология*. – 2004. – №3. – С. 102-116.

53 Меры борьбы с бешенством в дикой природе и городских условиях: мониторинг эффективности оральных антирабических вакцин // <https://ppt-online.org/1560148>. 10.10.2025.

54 Tarantola A. Four Thousand Years of Concepts Relating to Rabies in Animals and Humans, Its Prevention and Its Cure // *Tropical Medicine and Infectious Disease*. – 2017. – Vol. 2, Issue 2. – P. 5-1-5-21.

55 Martini M., Cavarra B., Bragazzi N. Anti-rabies vaccination between the 18th and 19th centuries and its pioneer Eusebio Giacinto Valli (1755–1816) // *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*. – 2019. – Vol. 60, Issue 1. – P. 1204.

56 Noguchi H. The culture of spirochaetes and of the virus of rabies and poliomyelitis: Dr. Noguchi's Cultivation Methods and the Demonstration of *T. Pallidum* in the Brain // *British Medical Journal*. – 1913. – Vol. 2, Issue 2756. – P. 1100-1101.

57 Noguchi H. Contribution to the cultivation of the parasite of rabies // *Journal of Experimental Medicine*. – 1913. – Vol. 18. – P. 314-316.

58 Vieuchange J., Bequignon R., Gruet J. et al. Affinity of rabies virus for the cells of kidney origin cultivated in vitro // *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*. – 1956. – Vol. 140, Issue 5-6. – P. 77-79.

59 Kissling R.E. Growth of rabies virus in non-nervous tissue culture // *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. – 1958. – Vol. 98, Issue 2. – P. 223-225.

60 Natesan K. et al. Developments in Rabies Vaccines: The Path Traversed from Pasteur to the Modern Era of Immunization // *Vaccines*. – 2023. – Vol. 11, Issue 4. – P. 756.

- 61 Sikes R.K. Effective Protection of Monkeys Against Death from Street Virus by Post-Exposure Administration of Tissue-Culture Rabies Vaccine // Bulletin of the World Health Organization. – 1971. – Vol. 45, Issue 2. – P. 1-11.
- 62 Lalošević D. et al. BHK-21 cell culture rabies vaccine: immunogenicity of a candidate vaccine for humans // Developments in Biologicals (Basel). – 2008. – Vol. 131. – P. 421-429.
- 63 Laboratory Techniques in Rabies / World Health Organization. – Ed. 4th. – Geneva, 1996. – 494 p.
- 64 Абрамова Е.Г., Никифоров А.К., Мовсесянц А.А. и др. Бешенство и антирабические иммунобиологические препараты: от прививки Пастера к современным биотехнологиям // Журнал микробиологии и биотехнологии. – 2019. – Т. 96, №5. – С. 83-94.
- 65 Roumiantzeff M. The present status of rabies vaccine development and clinical experience with rabies vaccine // Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health. – 1988. – Vol. 19, Issue 4. – P. 549-561.
- 66 Pasteur's work in rabies prevention: dried spinal cord from infected animals was used to vaccinate humans against rabies // https://en.wikipedia.org/wiki/Rabies_vaccine. 10.10.2025.
- 67 Koprowski H., Cox H.R. Studies on chick embryo-adapted rabies virus: culture characteristics and pathogenicity // Journal of Immunology. – 1948. – Vol. 60, Issue 4. – P. 533-554.
- 68 Fox J.P. et al. Study of antirabies immunization of man – Observations with HEP Flury and Other Vaccines, with and without Hyperimmune Serum, in Primary and Recall Immunizations // WHO Bulletin. – 1957. – Vol. 17. – P. 869-904.
- 69 Robertson K. et al. Seroconversion following incomplete human rabies post-exposure prophylaxis // Vaccine. – 2010. – Vol. 28, Issue 39. – P. 6523-6526.
- 70 Maki J. et al. Oral vaccination of wildlife using a vaccinia-rabies recombinant vaccine: RABORAL V-RG® // Veterinary Research. – 2017. – Vol. 48. – P. 57-1-57-26.
- 71 Slate D., Algeo T.P., Nelson K.M. et al. Oral rabies vaccination in North America: opportunities, complexities, and challenges // PLoS Neglected Tropical Diseases. – 2009. – Vol. 3, Issue 12. – P. e549.
- 72 Sobey K.G., Walpole A.A., Rosatte R. et al. An assessment of ONRAB oral rabies vaccine persistence in free-ranging mammal populations in Ontario, Canada // Vaccine. – 2013. – Vol. 31, Issue 17. – P. 2207-2213.
- 73 René F. Najera Feeding Vaccines to Wild Animals: The Story of Oral Rabies Vaccination // <https://historyofvaccines.org/blog/feeding>. 10.10.2025.
- 74 Елаков А.Л. Антирабические вакцины, применяемые в Российской Федерации, и перспективы их совершенствования // Вопросы вирусологии. – 2022. – Т. 67, №2. – С. 107-114.
- 75 Айкимбаев А.М., Тулеуов А.М., Жолшоринов А.Ж. и др. Мониторинг очагов рабической инфекции в Казахстане // Медицина Кыргызстана – Бишкек. – 2015. – Т. 1, №3. – С. 26-34.
- 76 Fooks A.R., Banyard A.C., Ertl H.C.J. New rabies vaccines for use in humans // Vaccines. – 2019. – Vol. 7, Issue 2. – P. 54.

77 Yin C. Progress in the Development of Animal Rabies Vaccines in China // China CDC Weekly. – 2021. – Vol. 3, Issue 39. – P. 825-830.

78 Zhang Z., Du J. et al. Research progress of mRNA vaccines for infectious diseases // European Journal of Medical Research. – 2025. – Vol. 30. – P. 792.

79 Armbruster N. et al. Advances in RNA vaccines for preventive indications // Vaccines. – 2019. – Vol. 7, Issue 4. – P. 132.

80 Bourhy H., Reynes J.-M., Dunham E. J., Dacheux L., Larrous F., Huong V. T. Q., Xu G., Yan J., Miranda M. E. G., Holmes E. C. The origin and phylogeography of dog rabies virus // Journal of General Virology. – 2008. – Vol. 89, Pt 11. – P. 2673-2681.

81 Pant G. R., Lavenir R., Wong F. Y. K., Certoma A., Larrous F. et al. Recent emergence and spread of an Arctic-related phylogenetic lineage of rabies virus in Nepal // PLoS Neglected Tropical Diseases. – 2013. – Vol. 7, №11. – e2560.

82 Nadin-Davis S. A., Hartke A., Kang M. Ampliseq for Illumina technology enables detailed molecular epidemiology of rabies lyssaviruses from infected formalin-fixed paraffin-embedded tissues // Viruses. – 2022. – Vol. 14, №10. – 2241.

83 Zhang L., Sun S., Gong W., Thompson L., Cruz J., Dukpa K. et al. Large-scale phylogenetic analysis reveals genetic diversity and geographic distribution of rabies virus in South-East and South Asia // Infection, Genetics and Evolution. – 2023. – Vol. 113. – 105472.

84 Chupin S. A., Sprygin A. V., Zinyakov N. G. et al. Phylogenetic characterization of rabies virus field isolates collected from animals in European Russian regions in 2009–2022 // Microorganisms. – 2023. – Vol. 11, №10. – 2526.

85 Deviatkin A. A., Lukashev A. N., Poleshchuk E. M., Dedkov V. G., Tkachev S. E., Sidorov G. N. et al. The phylodynamics of the rabies virus in the Russian Federation // PLoS One. – 2017. – Vol. 12, №2. – e0171855.

86 Holtz A., Baele G., Bourhy H. et al. Integrating full and partial genome sequences to decipher the global spread of canine rabies virus // Nature Communications. – 2023. – Vol. 14, №1. – 4247.

87 AL-Eitan L. N., Wu G., Golding M., Tang Y., Goharriz H., Marston D. A., Fooks A. R., McElhinney L. M. Whole-genome sequencing and phylogenetic analysis of rabies viruses from Jordan // PLoS Neglected Tropical Diseases. – 2021. – Vol. 15, №5. – e0009431.

88 Ботвинкин А.Д., Зарва И.Д., Яковчиц Н.В. Эпидемиологический анализ вспышек бешенства в Забайкалье после трансграничного заноса инфекции // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. – 2019. – №3. – С. 15-24.

89 Баянды Г., Ахметсадыков Н., Бисенбаев А. Молекулярно-генетическая характеристика вируса бешенства, патогенез и достижения в диагностике и разработке средств борьбы // Experimental Biology. – 2023. – Т. 95, №2. – С. 4–20.

90 Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из клинических образцов «ФБиоНуклео» по ТУ 21.20.23-001-83881765-2020 // <https://expomedical.ru/reestr/rc/45057/?ysclid=mlywmcv6z4719212181>. 10.06.2025.

91 Набор «ФБиоНуклео» для выделения нуклеиновых кислот из

биологического материала // <https://fractalbio.com>. 10.06.2025.

92 Community portal for viral sequence data from RefSeq, GenBank and other NCBI repositories // <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/virus/vssi/#/>. 10.06.2025.

93 Multiple alignment program for amino acid or nucleotide sequences // <https://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>. 10.06.2025.

94 MAFFT version 7. Multiple alignment program for amino acid or nucleotide sequences // <https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>. 10.06.2025.

95 Primer3web version 4.1.0 - Pick primers from a DNA sequence // <https://primer3.ut.ee/>. 10.06.2025.

96 Pick primers from a DNA sequence / Primer3Plus // <https://www.primer3plus.com/index.html>. 10.06.2025.

97 Illumina Technical Documentation. Nextera XT DNA Library Preparation Kit Reference Guide // <https://support-docs.illumina.com>. 10.06.2025.

98 lh3. seqtk (GitHub repository) // <https://github.com/lh3/seqtk>. 10.06.2025.

99 najoshi. sickle (GitHub repository) // <https://github.com/najoshi/sickle>. 10.06.2025.

100 Bioinformatics & genomics // <https://www.biglab.or.kr/bioinformatic-tools>. 10.06.2025.

101 Basic Local Alignment Search Tool / Nucleotide BLAST // <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. 10.06.2025.

102 Assemble Reads with SPAdes - v3.15.3 // https://kbase.us/applist/apps/kb_SPAdes/run_SPAdes. 10.06.2025.

103 Petersburg genome assembler / SPAdes – St // <https://software.cqls.06.01.2025>.

104 SAMtools v1.15.1 // <https://sourceforge.net/projects>. 10.05.2025.

105 A Sequence Data Resource for Rabies Virus / RABV-GLUE // <https://rabv-glue.cvr.gla.ac.uk/#/home>. 10.10.2025.

106 FigTree GitHub repository // <https://tree.bio.ed.ac.uk/software>. 10.10.2025.

107 Абдрахманов С.К., Абулгазин Т.Б., Кемешов Ж.О. Картографический анализ распространения бешенства с использованием ГИС-технологий // Вестник науки КАТУ им. С.Сейфуллина. – 2011. – №1(67). – С. 89-95.

108 Explore Virus Data / GenBank // <https://www.ncbi.nlm.nih>. 10.10.2025.

109 GenBank Overview // <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. 10.10.2025.

110 RefSeq: NCBI Reference Sequence Database // <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>. 10.10.2025.

111 Абдрахманов С.К., Кутумбетов Л.Б., Бейсембаев К.К. и др. Методические рекомендации по организации профилактических и противозoonотических мероприятий против бешенства. – Астана: КазНИВИ, КАТУ им. С. Сейфуллина, 2015. – 29 с.

112 Абдрахманов С.К., Бейсембаев К.К. Эпизоотология бешенства в Казахстане: монография. – Астана: Изд-во КазАТУ, 2018. – 172 с.

113 Зонирование РК по бешенству // <https://katruvet1.maps.arcgis.com/apps/instant/basic/index.html?appid>. 10.10.2025.

114 Brunner K., Jaswant G., Thumbi S. M., Lushasi K., Lugelo A., Czupryna A. M. et al. Rapid in-country sequencing of whole virus genomes to inform rabies

elimination programmes // Wellcome Open Research. – 2020. – Vol. 5. – 3.

115 Illumina. Quality Scores for Next-Generation Sequencing. Illumina Technical Note. – 2011 // https://www.illumina.com/documents/products/technotes/technote_Q-Scores.pdf 10.10.2025.

116 Illumina. MiSeq Sequencing System Specifications. Official Illumina Specifications. – 2024–2025 // <https://www.illumina.com/systems/sequencing-platforms/miseq/specifications.html> 10.10.2025.

117 Hillis, D. M., & Bull, J. J. (1993). An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology*, 42(2), 182–192.

118 Botvinkin A. D., Poleschuk E. M., Kuzmin I. V., Borisova T. A., Ritter D. G., Black D. et al. Rabies in the Mongolian steppes // *Dev Biol (Basel)* – 2008. – 131. – P. 199-205.

ҚОСЫМША А

Scopus (Скопус)/ Web of Science деректер базасында халықаралық рецензияланатын ғылыми журналдарда жарияланған еңбектер

Journal of Integrative Agriculture 2023, 22(4): 1265–1275



Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect



SHORT COMMUNICATION

Molecular epidemiological study of animal rabies in Kazakhstan



Guizhan N. YESSEMBEKOVA¹*, XIAO Shuang², Assem ABENOV¹, Talgat KARIBAEV³, Alexandr SHEVTSOV⁴, Amirgazin ASYLULAN⁴, Yersyn Y. MUKHANBETKALIYEV¹, SHUAI Lei^{2#}, BU Zhi-gao^{2#}, Sarsenbay K. ABDRAKHMANOV^{1#}

¹ S. Seifullin Kazakh Agro Technical University, Nur-Sultan 010011, Kazakhstan

² State Key Laboratory for Animal Disease Control and Prevention, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150000, P.R. China

³ National Reference Center for Veterinary Medicine, Center for Biotechnology, Nur-Sultan 010000, Kazakhstan

⁴ National Center for Biotechnology, Nur-Sultan 010000, Kazakhstan

Abstract

Rabies is a serious public health issue in Kazakhstan, with high economic impact and social burden. As part of a routine surveillance, 31 rabies-positive brain specimens taken from livestock (cattle) and carnivores (dogs, foxes, and cats) during 2013–2021 were subject to viral sequencing. Phylogenetic and Bayesian analysis were performed using obtained rabies virus (RABV) sequences. All 31 strains of RABV candidate belonged to the Cosmopolitan clade, of which 30 strains belonged to steppe-type subclade, and 1 dog strain belonged to Other subclade. The 31 strains did not diverge from RABV strains in Kazakhstan and neighboring countries, including Russia, Mongolia, and China, suggesting that animal rabies has close relationship and transmission between borders. Fox-originated strains and cattle strains shared similar sequence signature, and some animal rabies cases had space–time intersection, showing that infected foxes were a major transmission source of cattle rabies in different Kazakhstan regions. Besides, free-roaming dogs played a pivotal role in rabies epizootics of cattle in Kazakhstan. The recent spread of animal rabies presents an increasing threat to public health, and provides updated information for improving current control and prevention strategies at the source for Kazakhstan and neighboring countries.

Keywords: rabies, livestock, carnivores, phylogenetic analysis

1. Introduction

Rabies is caused by rabies virus (RABV), which is a fatal zoonotic disease of humans and almost all warm-blooded animals (Jackson and Wunner 2007). Due to high mortality rate of rabies and lack of effective treatment, animal rabies annually presents a serious public health threat and heavy economic burden per year worldwide, resulting estimated 59 000 human deaths per year occurred throughout the world, mainly in Asia and Africa

Received 15 September, 2022 Accepted 23 November, 2022
Guizhan N. YESSEMBEKOVA, E-mail: Guizhan_na@mail.ru;
XIAO Shuang, E-mail: xiaoshuang1722@163.com;

*Correspondence Sarsenbay K. ABDRAKHMANOV, E-mail: s_abdrakhmanov@mail.ru; BU Zhi-gao, E-mail: buzhigao@caas.cn;
SHUAI Lei, E-mail: shualai@caas.cn

[#]These authors contributed equally to this study.

© 2023 CAAS. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).
doi: 10.1016/j.jia.2022.11.011

Opinion

Animal Rabies in Kazakhstan: Stable Endemicity, Surveillance Pitfalls, and Priority Actions

Sarsenbay K. Abdrakhmanov ^{1,*} , Asem Zh. Abenova ¹, Aizada A. Mukhanbetkaliyeva ¹, Fedor I. Korennoy ^{2,3}  and Andres M. Perez ⁴ 

¹ Institute of Animal Science and Veterinary, S. Seifullin Kazakh Agro Technical Research University, Astana 010011, Kazakhstan; asem.abenova.1993@mail.ru (A.Z.A.); aizada.1970@mail.ru (A.A.M.)

² Federal Centre for Animal Health (FGBI ARRIAH), Vladimir 600901, Russia; korennoy@arriah.ru

³ Federal Research Center for Virology and Microbiology, Branch in Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod 603950, Russia

⁴ Center for Animal Health and Food Safety, College of Veterinary Medicine, University of Minnesota, St. Paul Campus, St. Paul, MN 55108, USA; aperez@umn.edu

* Correspondence: s_abdrakhmanov@mail.ru

Abstract

Rabies is endemic in Kazakhstan, with the primary reservoirs being wild canids, such as foxes and dogs, maintaining distinct sylvatic and urban cycles. This paper outlines three high-return priorities for rabies control in the country, informed by the epidemiological patterns of the disease, the national regulatory framework (Order No. 7-1/587), and evidence on the knowledge, attitudes, and practices (KAP) of the Kazakh population. The three priorities are (a) transition into a One Health, real-time surveillance system featuring standardized digital reporting and GIS-guided interventions; (b) implement biannual oral rabies vaccination (ORV) of foxes in high-risk districts, incorporating mandatory quality assurance (via tetracycline biomarkers and/or serology) aligned with EU/EFSA standards; and (c) adopt an urban strategy focused on dogs to increase vaccination coverage and reduce delays in human post-exposure prophylaxis (PEP). These measures align with the WOAHE Terrestrial Code and the “Zero by 30” roadmap, leveraging existing national assets like risk maps and laboratory capacity, such as dFAT, RT-PCR, and sequencing. Kazakhstan’s predictable rabies pattern allows for targeting district-level strategies and transparent measurement of risk reduction, contingent on enforcing standardized reporting and rigorous quality assurance programs. The opinions introduced in this paper are based on the scientific evidence collected in Kazakhstan over the last decade and summarize the need for urgent actions to promote rabies control in the country.

Keywords: rabies; Kazakhstan; One Health; vaccination; control; epidemiology



Academic Editor: Makoto Ozawa

Received: 21 September 2025

Revised: 19 October 2025

Accepted: 22 October 2025

Published: 23 October 2025

Citation: Abdrakhmanov, S.K.; Abenova, A.Z.; Mukhanbetkaliyeva, A.A.; Korennoy, F.I.; Perez, A.M. Animal Rabies in Kazakhstan: Stable Endemicity, Surveillance Pitfalls, and Priority Actions. *Pathogens* **2025**, *14*, 1079. <https://doi.org/10.3390/pathogens14111079>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Rabies is a disease of mammals considered to be almost uniformly fatal once clinical signs appear, yet it is fully preventable with timely post-exposure prophylaxis (PEP) [1,2]. The global “Zero by 30” initiative targets the elimination of dog-mediated human rabies deaths by 2030, providing a unifying programmatic objective and a shared monitoring language across sectors [3]. Within the veterinary domain, the WOAHE Terrestrial Animal Health Code (Rabies) defines surveillance, vaccination, and movement-control standards that national programs can operationalize and audit against [4].

Қазақстан Республикасы Ғылым және жоғары білім саласындағы сапаны
камтамасыз ету Комитетінің (КОКСОН) дерекқорында рецензияланатын
ғылыми журналдарда жарияланған еңбектер

Original articles

УДК 578.824.11

Original articles

ПРОТОКОЛ ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНТИРОВАНИЯ И ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ИЗОЛЯТОВ
RABIES VIRUS

Есембекова Г.¹, Абенова А.¹, Амиргазин А.^{2*}, Карибаев Т.², Шевцов А.², Абдрахманов С.¹¹Казахский агротехнический университет им. С. Сейфуллина, проспект Женис 62, Казахстан, Астана, 010011.²Национальный центр биотехнологии, Кургадзджинское шоссе 13/5, Казахстан, Астана, 010000.

*asyulana0894@gmail.com

АБСТРАКТ

В данной работе описывается разработанный протокол полногеномного секвенирования клинических образцов РНК *Rabies virus* на платформе Illumina MiSeq. Ранее, генотипирование вируса бешенства, циркулирующего на территории Казахстана, проводилось на основе последовательности гена нуклеопротеина (N ген). В протоколе описываются методы пробоподготовки, полногеномного секвенирования и генотипирования применяемые в настоящее время для эпидемиологического анализа не только *Rabies virus*, но и для других вирусных возбудителей, таких как SARS-CoV-2, Influenza и других. Цель работы заключалась в разработке и апробации протокола полногеномного секвенирования и генотипирования изолятов вируса бешенства с целью дальнейшего использования в эпидемиологическом мониторинге. В результате исследований, впервые были получены полногеномные последовательности 31 изолята *Rabies virus* выделенные от различных инфицированных животных и областей Казахстана. Все изоляты принадлежат мажорной кладе степного типа – Cosmopolitan (30 изолятов принадлежат минорной кладе CA1, в то время как, 1 изолят принадлежит неназначенной минорной кладе). Были идентифицированы 2 локальные вспышки и 6 обособленных от них линий вируса бешенства. Рассчитаны предполагаемые даты расхождения от общего предка, как для клады Cosmopolitan, так и для минорной клады CA1.

Ключевые слова: бешенство, *Rabies*, эпидемиология, секвенирование, Казахстан, вспышка

ВВЕДЕНИЕ

Бешенство – это вирусное инфекционное заболевание, природно-очагового характера, являющееся смертельным зоонозным заболеванием человека и почти всех теплокровных животных. Возбудителем классического бешенства животных и человека является *Rabies virus* (RABV) – распространенный по всему миру высоко нейротропный вирус вызывающий смертельный энцефаломенингит, и единственный из 16 членов рода *Lyssavirus*, распространяющийся множеством резервуаров-хозяев [1]. Вирион вируса состоит из 5 структурных белков: фосфопротеина (Р), матричного протеина (М), гликопротеина (G), РНК-зависимая РНК-полимераза (L) и нуклеопротеина (N). RABV филогенетически классифицируется на 8 мажорных клад: Africa-2, Africa-3, Arctic/Arctic-like, Asian, Bats, Cosmopolitan, Indian-Sub и RAC-SK. В свою очередь, мажорные клад Arctic/Arctic-like, Asian, Bats и Cosmopolitan классифицируются на 5, 7, 20 и 24 минорные клад, соответственно [2]. На основе ранее опубликованных последовательностей N гена было определено, что на территории Казахстана циркулирует вирус бешенства, принадлежащий мажорной кладе степного типа (Cosmopolitan) [3].

Ежегодно в Казахстане регистрируются сотни случаев бешенства животных почти во всех географических районах с большей концентрацией вспышек на Северо-Западной и Юго-Восточной территориях Казахстана, граничащих с Россией, Китаем и Кыргызстаном. Среди восприимчивых животных, наблюдаемых в случаях бешенства, упоминались: крупный рогатый скот (КРС), собаки, лисы, овцы/козы, кошки, лошади, верблюды, волки и шакалы [4]. Согласно предыдущим исследованиям [4], на момент 2016 года в РК наблюдалась восходящая тенденция заболеваемости бешенством, со средним приростом 7% в год среди восприимчивых животных. Еже-

годная регулярная вакцинация сельскохозяйственных и диких животных не повлияла на общее число случаев заболевания [5]. Хотя наблюдаемая доля заболевания бешенством среди сельскохозяйственных животных в РК составляет 50-62,8% [5], основным естественным резервуаром и главным переносчиком инфекции безусловно являются дикие мигрирующие животные. В связи с этим, генотипирование вспышек с целью эпидемиологического анализа и отслеживания источников инфекции является актуальной задачей. Предполагается, что на территории Казахстана циркулируют генотипы степного типа, также при наблюдении крупных вспышек, мы ожидаем, что все изоляты принадлежат соответствующим вспышкам, будут филогенетически идентичными.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение РНК

В данной работе было исследовано 117 образцов головного мозга, отобранных от различных животных из различных областей Казахстана. Работа с патогенным материалом проводилась на базе РГП «Национальный референтный центр по ветеринарии» КВКиН МСХ РК. Клинические признаки бешенства наблюдались у всех животных, но эпидемиологических данных о контактах с хищниками не было. Бешенство было подтверждено прямым флуоресцентным тестом (FAT) [6]. РНК выделялась из 10% суспензии мозговой ткани в PBS буфере, приготовленной в TissueLyser LT (Qiagen) набором RNeasy Mini Kit (Qiagen). Выделенные образцы РНК хранились в жидком азоте до начала исследования.

ПЦР-амплификация генома *Rabies virus*

Амплификация генома вируса бешенства была выполнена в двух параллельных реакциях согласно двум смесям праймеров в одношаговой ОТ-ПЦР (таблица 1).

Acknowledgement

The article was performed within the scientific project IRN №08053353 "Molecular and biological analysis of rabies virus circulating in the Republic of Kazakhstan" under budgetary program 217 "Development of science", subprogram 102 "Grant financing of scientific research" MES RK, grant financing of young scientists on scientific and (or) scientific and technical projects for 2020-2022.

ШЫҒЫС ҚАЗАҚСТАН ОБЛЫСЫ АУМАҒЫНДАҒЫ ҚҰТЫРУ ВІРУСЫН МОЛЕКУЛЯРЛЫҚ-ГЕНЕТИКАЛЫҚ ТАЛДАУ

Шевцов А.Б.¹, Есембекова Г.Н.², Әбенәева Ә.Ж.², Кабжанова А.М.², Әбдірахманов С.Қ.²

¹Ұлттық биотехнология орталығы

Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан

²С. Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университеті

Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан

E-mail: ncbshevtsov@gmail.com

Түйін

Мақалада генетикалық талдау мақсатында Шығыс Қазақстанның аумағында оқшауланған лиссавирусының штамдардың молекулалық-генетикалық зерттеуі ұсынылған. Рабдовирусының нуклеопротеині бар тазартылған ПТР өнімдерінің он позитивті үлгісі зерттелді. Сонымен, филогенетикалық талдау нәтижесінде Шығыс Қазақстан облысындағы құтыру ауруының он толық нуклеопротеиндік тізбегі екі тобына жататын 6 типке жікталды: арктикалық тектес топ және ең көп таралған топ - Степная.

Кілт сөздер: құтыру, ПТР, секвенирлеу, филогенетикалық ағаш, штамм, изолят, генотип.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВИРУСА БЕШЕНСТВА НА ТЕРРИТОРИИ ВОСТОЧНО-КАЗАХСТАНСКОЙ ОБЛАСТИ

Шевцов А.Б.¹, Есембекова Г.Н.², Абенова А.Ж.², Кабжанова А.М.², Абдрахманов С.К.²

¹Национальный центр биотехнологии, г. Нур-Султан, Казахстан

²Казахский агротехнический университет им. С.Сейфуллина

г. Нур-Султан, Казахстан

E-mail: ncbshevtsov@gmail.com

Аннотация

В данной статье представлены результаты секвенирования геномов изолятов лиссавирусов, выделенных от животных обитающих в Восточно-Казахстанской области с целью проведения генетического анализа. Происследовано десять положительных проб (ПЦР-продуктов), содержащих рабдовирус. В результате филогенетического анализа было собрано десять полных последовательностей нуклеопротеина вируса бешенства из Восточно-Казахстанской области в 6 генотипов, которые относятся к двум группам лиссавирусов: Арктически-подобная группа и наиболее распространенная группа – Степная.

Ключевые слова: бешенство, ПЦР, секвенирование, филогенетическое дерево, штамм, изолят, генотип.

С.Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университетінің Ғылым жаршысы(пәнаралық)
= Вестник науки Казахского агротехнического университета им.С.Сейфуллина
(междисциплинарный). - 2022. – № 4 (115). –Ч.2. – С. 4-15

doi.org/10.51452/kazatu.2022.4.1194

УДК 578.2: 578.824.11(574.4) (045)

ПРОТОКОЛ ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ И ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ИЗОЛЯТОВ *RABIES VIRUS*

Есембекова Гульжан Нурлыбековна

PhD

Казахский агротехнический университет имени С. Сейфуллина

г. Астана, Казахстан

E- mail: Gulzhan_nk@mail.ru

Амиргазин Асылулан Оразгалиевич

Научный сотрудник лаборатории «Прикладной генетики»

Национальный центр биотехнологии

4-13г. Астана, Казахстан

E- mail: asylulan0894@gmail.com

Шевцов Александр Борисович

Кандидат биологических наук

Национальный центр биотехнологии

г. Астана, Казахстан

E- mail: ncbshevtsov@gmail.com

Абеннова Асем Жандарбековна

Докторант

Казахский агротехнический университет имени С. Сейфуллина

г. Астана, Казахстан

E- mail: asem.abenova.1993@mail.ru

Кабжанова Анар Магжановна

Магистр ветеринарных наук

Казахский агротехнический университет имени С. Сейфуллина

г. Астана, Казахстан

E-mail: an_kab@bk.ru

Абдрахманов Сарсенбай Кадырович

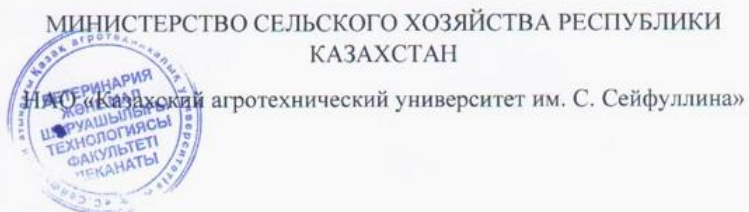
Доктор ветеринарных наук

Казахский агротехнический университет имени С. Сейфуллина

г. Астана, Казахстан

ҚОСЫМША Б

Методикалық нұсқама



Есембекова Гүлжан Нұрлыбековна, Абенова Асем Жандарбековна

Методические рекомендации по молекулярно-генетическому анализу
вируса бешенства в Казахстане

Астана 2022

ҚОСЫМША В

Енгізу актісі

Қазақстан Республикасының Ауыл шаруашылық министрлігі
«С. Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық зерттеу университеті» КеАҚ

БЕКІТЕМІН

Басқарма мүшесі - ғылым және инновациялық қызмет жөніндегі проректор, физика-математика ғылымдарының кандидаты  Сыргалиев Е.Ө.
«24» 02 2025 ж.

Оқу үрдісіне ғылыми-зерттеу жұмыс нәтижелерін енгізу бойынша АКТ

1. Ғылыми-зерттеу, ғылыми-техникалық жұмыстардың және (немесе) ғылыми және (немесе) ғылыми-техникалық қызмет нәтижелерінің атауы (монография, диссертация, ғылыми жоба, патент – жарияланған қылы, беттер саны):

Зерттеудің нәтижесінде Қазақстандағы құтырық вирусының изоляттарының геномдық нуклеотидтік тізбектері GeneBank деректер қорында тіркеліп, OP477379-OP477391 және ON366706-ON366710 инвентарлық нөмірлері бойынша сақталды. Бұл деректер PRJNA832888 биопроектісінде тіркелген және NCBI деректер қорынан қолжетімді.

2. Авторлар туралы мәліметтер (Автордың аты-жөні, тегі, ғылыми дәрежесі, ғылыми атағы, қызметі, факультет, кафедра): PhD, аға оқытушы Есембекова Гульжан Нурлыбековна, ветеринария ғылымдарының магистрі Әбенова Әсем Жандарбекқызы, ветеринария ғылымдарының докторы, профессор Абдрахманов Сарсенбай Кадырович,

3. Қысқаша аннотация:

Қазақстан Республикасы Ауыл шаруашылығы министрлігінің 2020-2022 жж. бағдарламалық-нысаналы қаржыландыру АР08053353 «Қазақстан Республикасында айналымдағы құтырық вирусының молекулярлық-биологиялық талдауы» ғылыми-техникалық бағдарлама шеңберінде құтырық вирусының толық геномдық тізбегін анықтау жүргізілді және хаттамасы әзірленді. Ұсынылған әдіспен зерттеу нәтижесінде Қазақстанда жиналған 117 үлгінің 31-інен вирус изоляттары бөлініп, олардың 30-ы CA1 класына, ал біреуі жаңа вирус желісіне жататыны анықталды. Алынған деректер құтырық вирусының таралу ерекшеліктерін бағалауға мүмкіндік беріп, Қазақстандағы эпидемиологиялық мониторинг пен алдын алу шараларын жетілдіру қажеттілігін көрсетті. Алынған эпидемиологиялық мәліметтер және молекулярлық - генетикалық әдіс жоғары курс студенттерін инновациялық зерттеу тәсілдерін үйрету мақсатында «Охрана здоровья животных при эмерджентных инфекциях» пәнін оқыту үрдісінде дәріс және зертханалық сабақтарына ендірілді.

4. Енгізу орны (факультет, кафедра, білім беру бағдарламасы): «Ветеринария және мал шаруашылығы технологиясы» факультеті, «Ветеринариялық медицина» кафедрасы, 6В09101 «Ветеринариялық қауіпсіздік» білім беру бағдарламасы, «Ветеринариялық эпидемиология 1,2», «Охрана здоровья животных при эмерджентных инфекциях» пәні

5. Енгізу формасы (лекция, практикалық оқыту, зертханалық жұмыс, пән бойынша семинар және т.б.):

Авторлық құқық объектісі «Ветеринариялық эпидемиология 1,2», «Охрана здоровья животных при эмерджентных инфекциях» пәні ендірілді.

Осы Акт 3 данада жасалып, оқу-әдістемелік бөлімге, ғылыми қызметті басқару жөніндегі бөлімге, кафедраға сақтауға берілді.

Комиссия мүшесі:

«Ветеринария және мал шаруашылығы технологиясы» факультет деканы

Ө.С. Әкібеков

«Ветеринариялық медицина» кафедрасының меңгерушісі

Ж.Ө.Кемешов

«Ветеринариялық медицина» кафедрасының профессоры, в.ғ.к.

Е.Е.Муханбеткалиев

БЕКІТЕМІН

Басқарма мүшесі – ғылыми
қызмет жөніндегі проректор, физика-
математика ғылымдарының кандидаты
Е.Ө. Сырғалиев
2025



Оқу үрдісіне
ғылыми-зерттеу
жұмыс нәтижелерін енгізу бойынша
АКТ

1. Ғылыми-зерттеу, ғылыми-техникалық жұмыстардың және (немесе) ғылыми және (немесе) ғылыми-техникалық қызмет нәтижелерінің атауы (монография, диссертация, ғылыми жоба, патент – жарияланған жылы, беттер саны):

Ғылыми-техникалық әзірleme: «Ақпараттық-коммуникациялық технологияларды қолдану негізінде жануарлар құтырығын дауалау шараларын жетілдіру»

2. Авторлар туралы мәліметтер (Автордың аты-жөні, тегі, ғылыми дәрежесі, ғылыми атағы, қызметі, факультет, кафедра):

- Абдрахманов Сарсенбай Кадырович, в.ғ.д., профессор, Жануарлар ғылымы және ветеринария институтының директоры;

- Муханбеткалиев Ерсін Ергазыевич, в.ғ.к., профессор, Жануарлар ғылымы және ветеринария институты, «Ветеринария» БББ тобының профессоры;

- Мұханбетқалиева Айзада Әйкеқызы, ветеринария ғылымдарының кандидаты, доцент Жануарлар ғылымы және ветеринария институты, «Ветеринария» БББ тобының профессоры м.а;

- Кадыров Аблайхан Сарсенбаевич, ғылымды қажетсінетін өндірістерді басқару мамандығы бойынша магистр, Жануарлар ғылымы және ветеринария институты, «Ветеринария» БББ тобында ғылыми қызметкер;

- Кабжанова Анара Мағжановна, ветеринария ғылымдарының магистрі, Жануарлар ғылымы және ветеринария институты, «Ветеринария» БББ тобының оқытушысы;

- Абенова Асем Жандарбекқызы ветеринария ғылымдарының магистрі, Жануарлар ғылымы және ветеринария институты, «Ветеринария» БББ тобының аға оқытушысы.

3. Қысқаша аннотация:

Ғылыми-техникалық әзірleme 2023–2025 жылдар аралығында жүзеге асырылып жатқан АР19679670 «Ақпараттық-коммуникациялық технологияларды қолдану негізінде жануарлардың инфекциялық ауруларына қарсы дауалау шараларын жетілдіру (құтырық үлгісінде)» ғылыми жобасының шеңберінде әзірленді. Құтырықтың таралуы бойынша эпизоотологиялық деректер базасы ArcGIS PRO-да құрылды. MaxEnt, SatScan және «кеңістіктік-уақыттық куб» әдістері арқылы тәуекелді болжау модельдері әзірленді. ArcGIS Online-да құтырықтың таралуы мен аудандардың эпизоотиялық мәртебесін көрсететін интерактивті карталар жасалды. Көпжылдық талдауға сүйене отырып, дауалық және вакциналау жоспары әзірленді. Жоба нәтижелері құтырықтың індеттік жағдайын тиімді бақылауға, мониторингке және дауалық шаралардың тиімділігін арттыруға ықпал етеді. Жобаны уске асыру нәтижесінде келесі нысандар, оқу үдерісіне ендірілді:

- Қазақстан Республикасы аумағында жануарлар құтырығының таралуы туралы індеттанулық деректердің электронды базасы;

- Өлеуметтік маңызы бар зооноздық аурулардың (құтырық) пайда болу және/немесе ену қаупін математикалық модельдеу әдістемесі;

- Жануарлардың құтырығы кезінде мал шаруашылығы өнімдерін экспорттау/импорттау қауіпсіздігі бойынша аудандардың мәртебесін көрсететін интерактивті онлайн-карталар;

- Қазақстан Республикасында құтырықты дауалау және індетке қарсы шаралар жоспары.

4. Енгізу орны (факультет, кафедра, білім беру бағдарламасы):

Жануарлар ғылымы және ветеринария институты, «Ветеринария» білім беру тобының үш деңгейдегі білім беру бағдарламаларына.

5. Енгізу формасы (лекция, практикалық оқыту, зертханалық жұмыс, пән бойынша семинар және т.б.):

Енгізу нысандары: 6B09101 «Ветеринариялық қауіпсіздік» және 6B09102 «Тағам қауіпсіздігі» БББ «Ветеринарлық эпидемиология», 7M09101 «Жануарлар ауруларын балау, емдеу және алдын алу» БББ «Жануарлардың жайлылығы және ауруларды алдын алу», 7M09102 «Тағам өнімдерінің қауіпсіздігі мен сапасы» БББ «Жануарлардың жұқпалы ауруларын эпизоотологиялық бақылау және болжау», 8D09101 «Жануарлардың ветеринариялық жайлылығы» БББ «Жануарлардың аса қауіпті аурулары кезіндегі биологиялық қауіпсіздік» және 8D09102 «Мал шаруашылығы өнімдерінің санитарлық-экологиялық қауіпсіздігі» «Ветеринариялық география» пәндерінің дәрістеріне және зертханалық сабақтарына ендірілді.

Осы Акт 3 данада жасалып, екі данасы Жануарлар ғылымы және ветеринария институтының академиялық сапа кеңесіне және университеттің ғылым және инновация департаментіне сақтауға берілді.

Комиссия мүшесі:

«Ветеринария» білім беру бағдарламасы
тобының жетекшісі



Ж.О. Кемешов

Жануарлар ғылымы және ветеринария
институтының академиялық сапа кеңесінің
төрайымы



К.Х.Шайкенова

«Ветеринария» білім беру бағдарламасы
тобының профессоры



Ж.Ш. Адильбеков

«Ветеринария» білім беру бағдарламалары
тобының профессоры



С.Н. Боровиков

«Ветеринария» білім беру бағдарламалары
тобының профессоры м.а



Г.А. Байкадамова

ҚОСЫМША Г

Халықаралық ғылыми-тәжірибелік конференция материалдарында жарияланған еңбектер

«Сейфуллин оқулары – 18: « Жастар және ғылым – болашаққа көзқарас» халықаралық ғылыми-практикалық конференция материалдары = Материалы международной научно-практической конференции «Сейфуллинские чтения – 18: « Молодежь и наука – взгляд в будущее» - 2022.- Т.І, Ч.ІІІ. - Р.10-14

MOLECULAR AND BIOLOGICAL ANALYSIS OF RABIES VIRUS CIRCULATING IN THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

*Abenova A.Zh., 2nd year doctoral student
Kazakh Agro-Technical University named after S. Seifullin, Nur-Sultan*

The spread of rabies among animals is one of the most important international criteria for assessing the biological and environmental safety of the human habitat. In the world, from 55 to 70 thousand people die from rabies every year, half of which are children, and up to 6.5 million people are subjected to post-exposure anti-rabies treatments

The analysis of nucleotide sequences will make it possible to find out the evolutionary history of the rabies virus circulating in the territory of the Republic of Kazakhstan, to identify the pathogen genovariants, to determine the time of divergence of different evolutionary branches of the rabies virus. Such an approach can improve the epidemiological surveillance of rabies infection, provide a better understanding of the dynamics of the spread of rabies and give a clear idea.

Materials of research. In order to exclude the possibility of infection of researchers, as well as compliance with the regulations in force in the Republic of Kazakhstan, all work with infected material was carried out in the RSE «National Center for Monitoring and Reference in Veterinary Medicine» of the Ministry of Agriculture of the Republic of Kazakhstan. The isolation of rabies virus RNA was carried out on the basis of the «National Reference Center for Veterinary Medicine». This organization is equipped with the latest devices and apparatus for laboratory research, and has a permit to work with pathogens of particularly dangerous diseases. Work with cDNA samples and further molecular biological analysis was carried out in the «National Center of Biotechnology» of the KN of the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan.

The material for the project was brain samples from various types of agricultural, domestic and wild animals. Biological material was selected from animals with clinical signs characteristic of rabies. The formation of a collection of biological samples with virus-containing material includes the following stages: collection of biological material and its transportation to the laboratory; preparation of brain suspensions and their aliquation; freezing of at least two suspensions at a temperature of minus 70 ° C; use of one suspension for RNA isolation and diagnosis verification.

Methods of research

- The preparation of the suspension.
- Isolation of RNA
- Conducting reverse transcription.

«Сейфуллин окулары – 18(2): «XXI ғасыр ғылыми - трансформация дәуірі» халықаралық ғылыми - практикалық конференция материалдары = Материалы международной научно-практической конференции «Сейфуллинские чтения - 18(2): «Наука XXI века - эпоха трансформации» 2022. - Т.1, Ч.II. - С.199-201.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВИРУСА БЕШЕНСТВА

Абенова А.Ж., докторант 3 – го курса
Казахского агротехнического университета им. С. Сейфуллина, г. Астана

Распространение бешенства среди животных является одним из важнейших международных критериев оценки биологической и экологической безопасности среды обитания человека. В мире от бешенства ежегодно умирает от 55 до 70 тысяч человек, половина из которых - дети, и до 6,5 миллионов человек подвергаются постконтактному антирабическому лечению[1].

Анализ нуклеотидных последовательностей позволит выяснить эволюционную историю вируса бешенства, циркулирующего на территории Республики Казахстан, идентифицировать геноварианты возбудителя, определить время расхождения разных эволюционных ветвей вируса бешенства. Такой подход может улучшить эпидемиологический надзор за заражением бешенством, обеспечить лучшее понимание динамики распространения бешенства и дать четкое представление.

Материалы исследования. Материалом для проекта послужили образцы мозга различных видов сельскохозяйственных, домашних и диких животных. Биологический материал отбирали у животных с клиническими признаками, характерными для бешенства. Формирование коллекции биологических образцов с вирусосодержащим материалом включает следующие этапы: сбор биологического материала и его транспортировка в лабораторию; приготовление мозговых суспензий и их аликвация; замораживание не менее двух суспензий при температуре минус 70°C; использование одной суспензии для выделения РНК и верификация диагноза.

Методы исследования: Наличие вируса было установлено методом ОТ-ПЦР в реальном времени с использованием коммерческого набора «Набор для определения РНК вируса бешенства, полностью оборудованный», производства FractalBio, Россия, в соответствии с инструкциями производителя. Общую РНК выделяли из 10% суспензии головного мозга на PBS, приготовленной в электромеханическом гомогенизаторе TissueLyserLT (Qiagen) с использованием коммерческого набора «FBioNucleo» для выделения нуклеиновых кислот из биологического материала, производства FractalBio, Россия, согласно инструкциям производителя. Образцы РНК хранили в низкотемпературной морозильной камере при температуре минус 70°C до начала исследования[2, 3].

ҚАЗАҚСТАНДА ТАРАЛАТЫН ҚҰТЫРЫҚ ВИРУСЫНЫҢ ШТАМДАРЫН МОЛЕКУЛЯЛЫҚ-ГЕНЕТИКАЛЫҚ ТАЛДАУ ЖӘНЕ АЛДЫН АЛУ ІС-ШАРАЛАРЫНЫҢ СТРАТЕГИЯСЫН ӘЗІРЛЕУ

Әбенова Ә.Ж., в.ғ.м. «С.Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық зерттеу университеті» КеАҚ

Абдрахманов С.К., ветеринария ғылымдарының докторы, профессор,
«С.Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық зерттеу университеті» КеАҚ

Есембекова Г.Н., PhD, «С.Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық зерттеу университеті» КеАҚ

Аннотация. Зерттеу Қазақстанның әртүрлі өңірлерінен 2020 - 2022 жж. жиналған 117 биоматериалдың молекулярлық-генетикалық талдауына негізделген. Талдау нәтижелері бойынша 31 оң нәтиже анықталды, олардың 92% 2021 жылғы сәуірде шоғырланған. Толық геномдық секвенирлеу (Illumina MiSeq) және филогенетикалық талдау (MEGA X, BEAST) арқылы қатарластырылған штамдардың 90% Cosmopolitan CA1 минор класына жіктелді. Негізгі тасымалдаушылар ірі қара мал (22 изолят), ит (5) және түлкі (3) болып табылды.

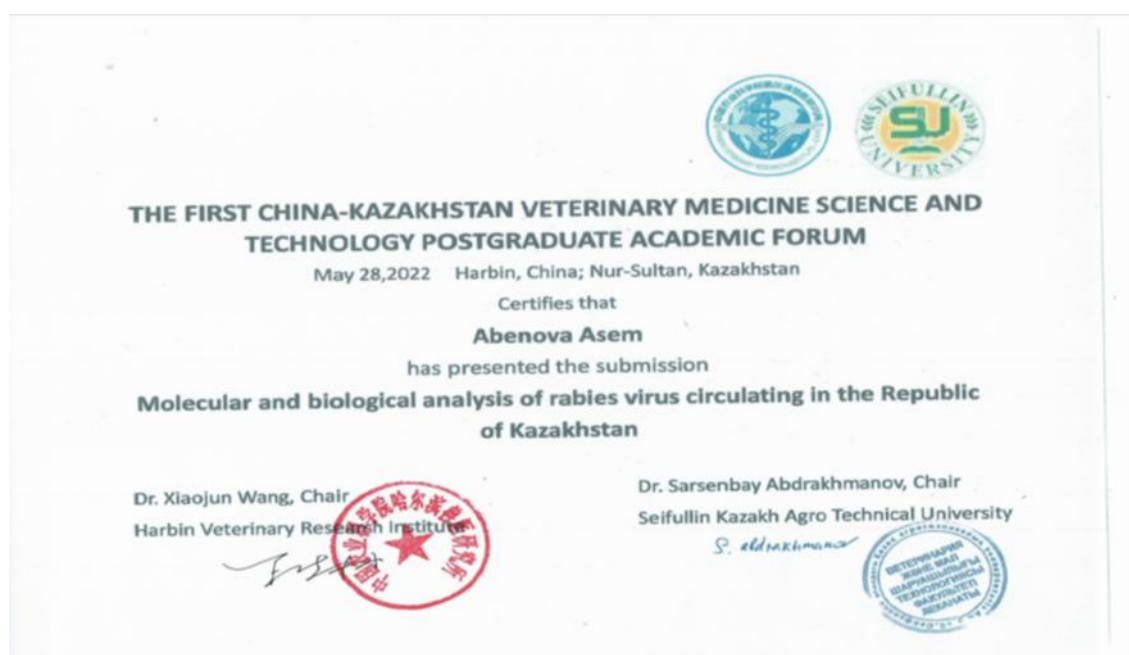
Зерттеу N және G Rabies lyssavirus гендерінің консервативті аймақтарын анықтады және CA1 желісіне қарсы қолданыстағы вакциналардың («Rabix», «Rabikan», «Nobivak Rabies») тиімділігін растады. Дегенмен, Rab-228 изоляторда анықталған генетикалық ерекшеліктер жергілікті штамдарға бейімделген вакциналарды әзірлеу қажеттігін көрсетті.

Алынған нәтижелер Қазақстанда Cosmopolitan CA1 класының үстемдігін және геномдық мониторингтің маңыздылығы туралы куәландырады. Зерттеу өңірдегі құтырудың алдын алу стратегияларын жаңарту үшін негіз бола алады.

Түйінді сөздер: құтыру, Rabies lyssavirus, Cosmopolitan CA1, филогенетикалық талдау, геномдық секвенирлеу, вакцинация.

ҚОСЫМША Ғ

Сертификаттар



CERTIFICATE

TO: ABENOVA ASSEM

This is to certify that Ms. Abenova Assem has completed the training courses about standardized laboratory diagnosis technology for animal epidemics in China-Kazakhstan Joint Laboratory Cooperation Plan from May 2, 2023 to June 2, 2023 at Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences.

This plan was based on the "Agreement on cooperation in the field of education and science between S.Seifullin Kazakh Agrotechnical University and Harbin Veterinary Research Institute, the Chinese Academy of Agricultural Sciences" signed by both parties in 2019.



Dr. Zhigao Bu

Director of Harbin Veterinary Research Institute, CAAS

Harbin, June 2, 2023

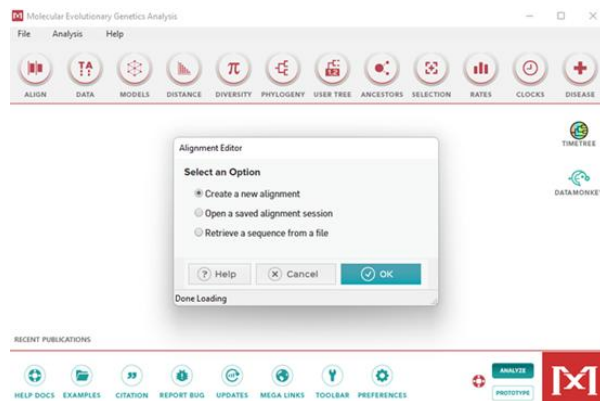


ҚОСЫМША Д

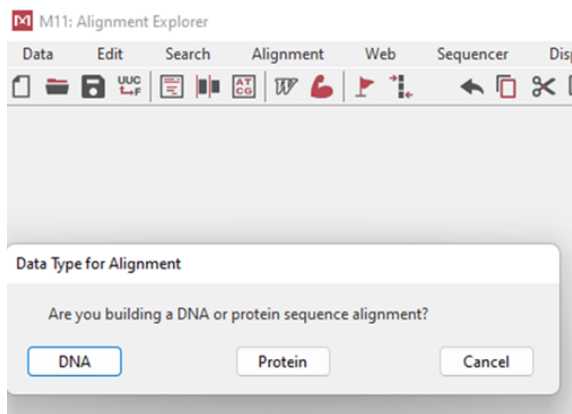
Филогенетикалық талдау кезеңдерінің иллюстрациялары



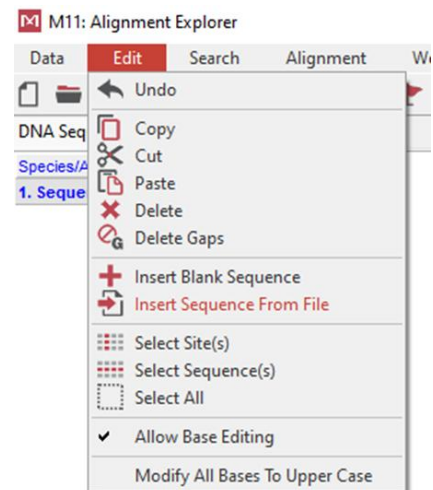
Сурет Д.1 - MEGA X бағдарламасының негізгі терезесі



Сурет Д.2 - Жаңа туралау құжатын құру



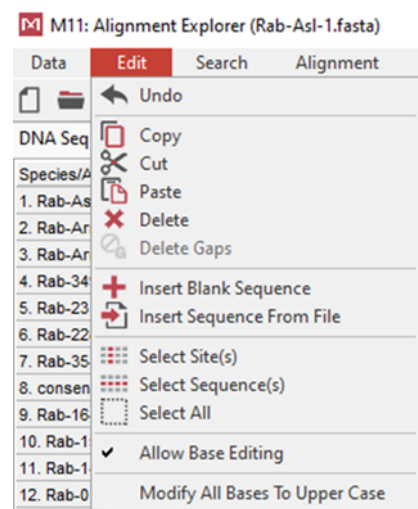
Сурет Д.3 - ДНҚ тізбектері режимін таңдау



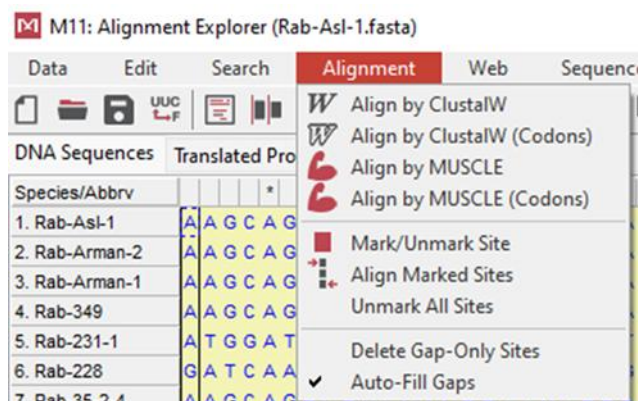
Сурет Д.4 - FASTA форматындағы тізбектерді жүктеу мәзірі



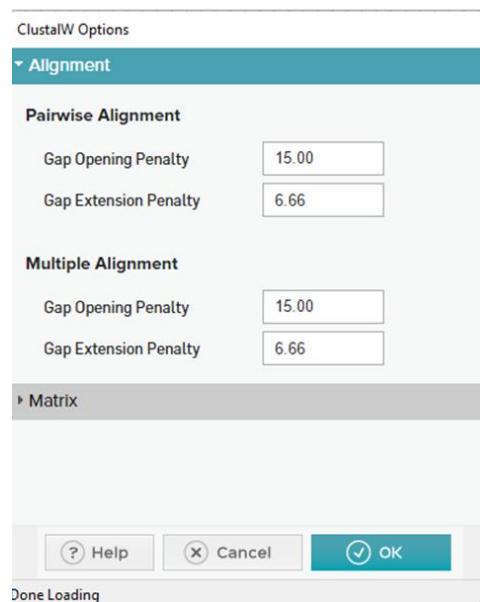
Сурет Д.5 - FASTA тізбектерін MEGA ортасына енгізу



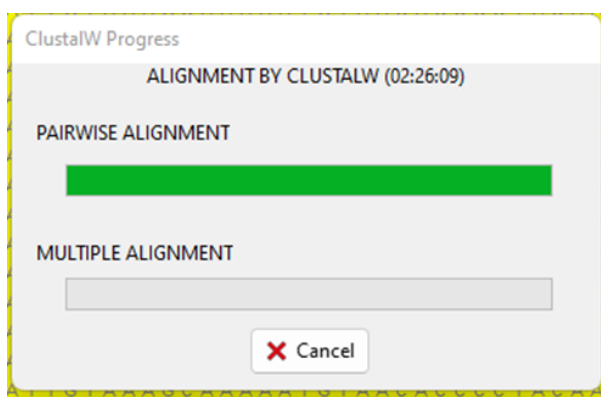
Сурет Д.6 - Жүктелген тізбектерді бастапқы өңдеу



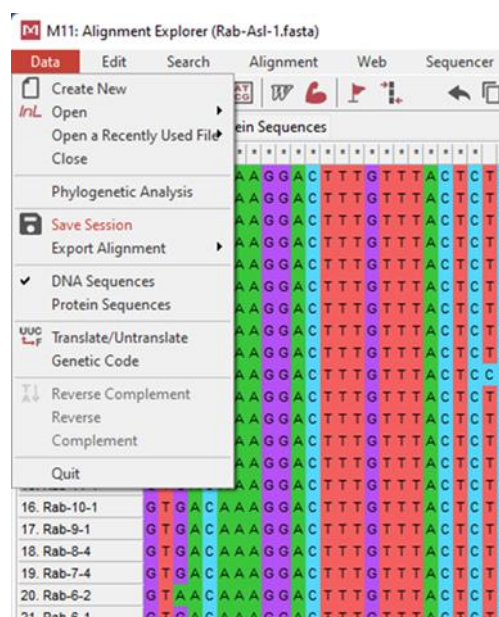
Сурет Д.7 - ClustalW алгоритмі арқылы автоматты туралау



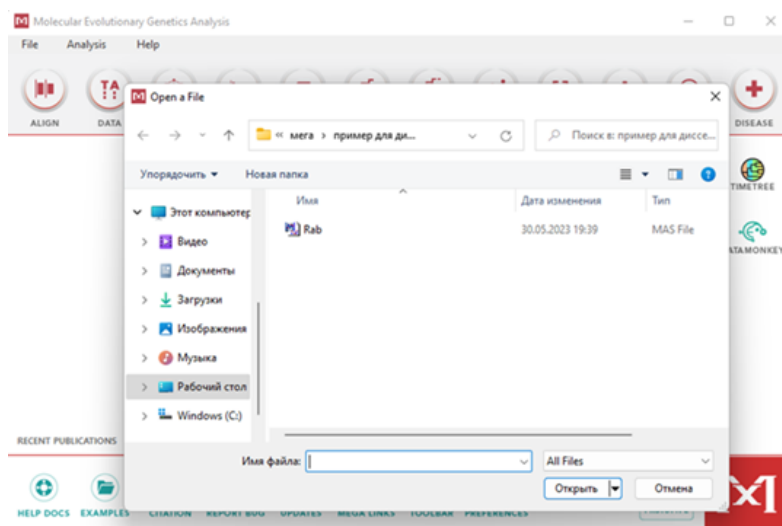
Сурет Д.8 - ClustalW параметрлері (әдепкі баптаулар)



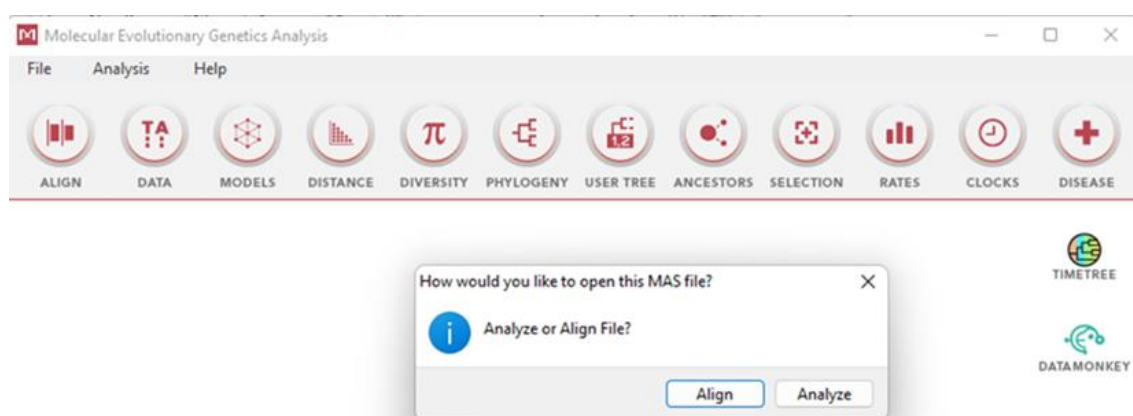
Сурет Д.9 - ClustalW параметрлері бойынша туралау алгоритмі



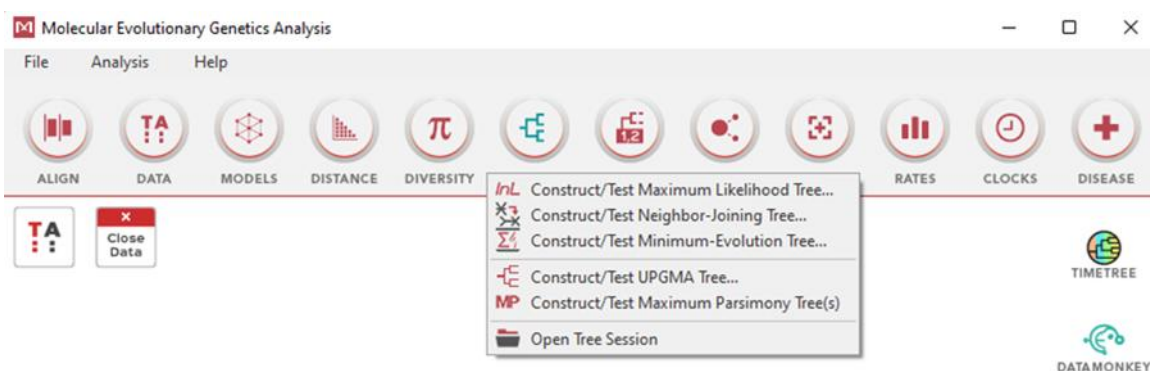
Сурет Д.10 - Тураланған деректерді сақтау (MAS форматы)



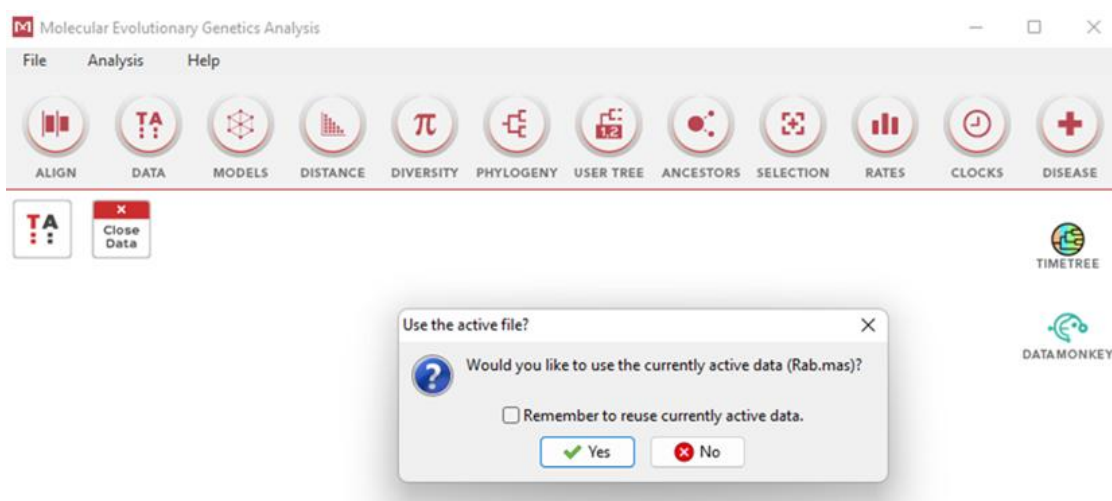
Сурет Д.11 - Тураланған деректерді талдау режимінде ашу



Сурет Д.12 - MAS файлын Analyze режимінде жүктеу



Сурет Д.13 - Neighbor - Joining әдісімен филогенетикалық ағаш құру



Сурет Д.14 - Белсенді деректер кестесін пайдалану

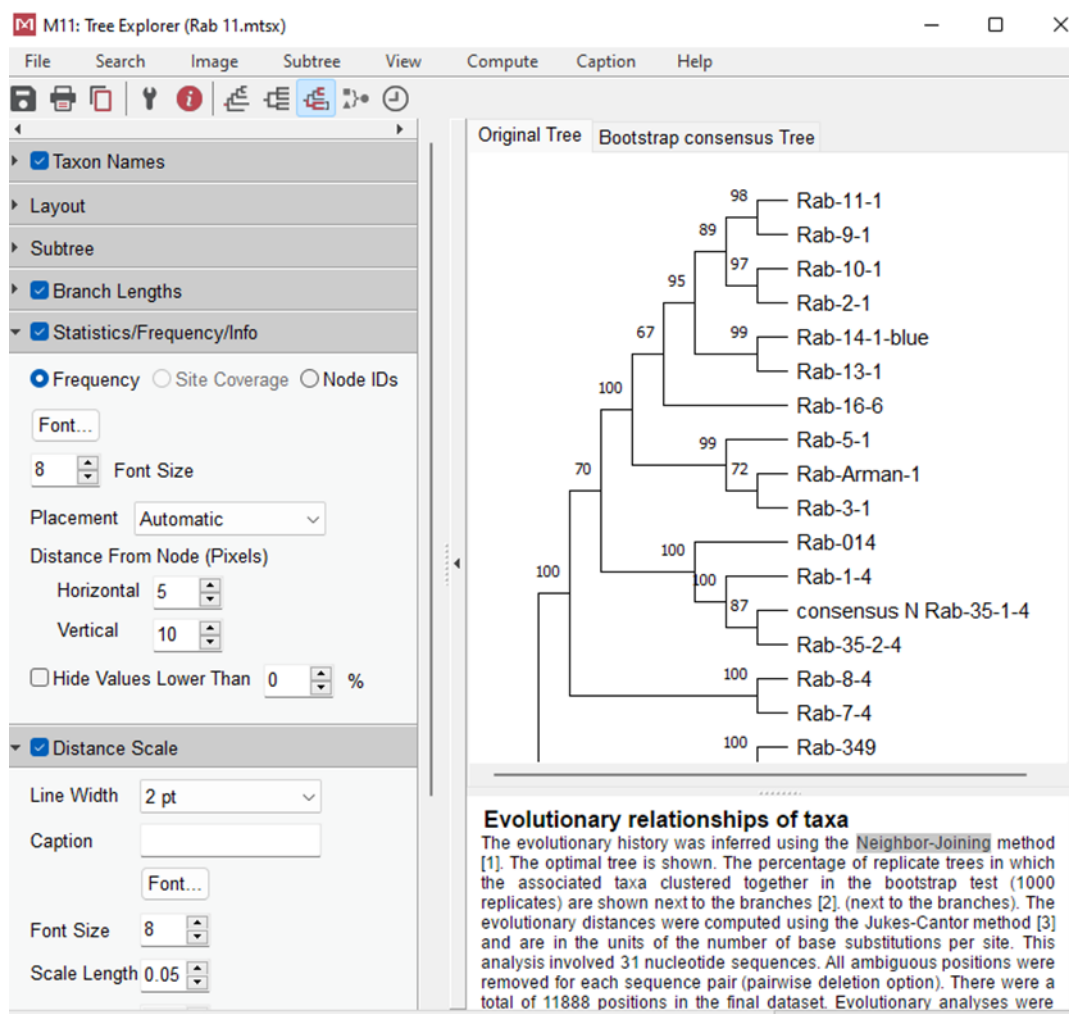
M11: Analysis Preferences

Phylogeny Reconstruction

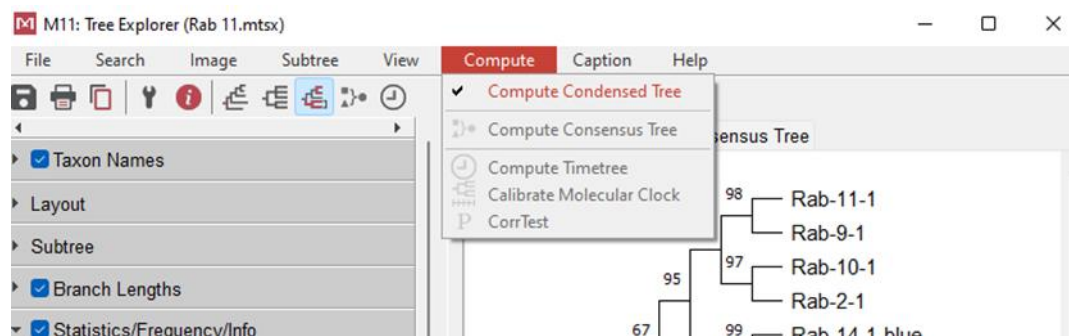
Option	Setting
ANALYSIS	
Scope →	All Selected Taxa
Statistical Method →	Neighbor-joining
PHYLOGENY TEST	
Test of Phylogeny →	Bootstrap method
No. of Bootstrap Replications →	1000
SUBSTITUTION MODEL	
Substitutions Type →	Nucleotide
Genetic Code Table →	Not Applicable
Model/Method →	Jukes-Cantor model
Fixed Transition/Transversion Ratio →	Not Applicable
Substitutions to Include →	All
RATES AND PATTERNS	
Rates among Sites →	Uniform Rates
Gamma Parameter →	Not Applicable
Pattern among Lineages →	Same (Homogeneous)
DATA SUBSET TO USE	
Gaps/Missing Data Treatment →	Pairwise deletion
Site Coverage Cutoff (%) →	Not Applicable
Select Codon Positions →	☒ 1st ☒ 2nd ☒ 3rd ☒ Noncoding Sites
SYSTEM RESOURCE USAGE	
Number of Threads →	1

? Help X Cancel ✓ OK

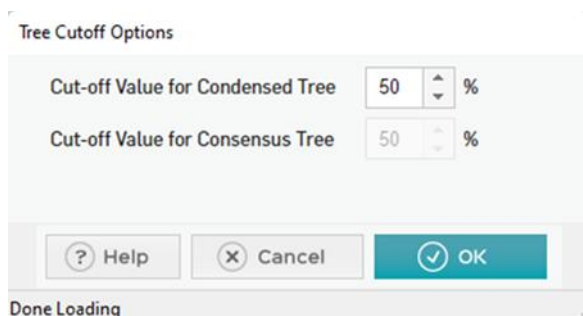
Сурет Д.15 - Филогенетикалық талдау параметрлерін баптау



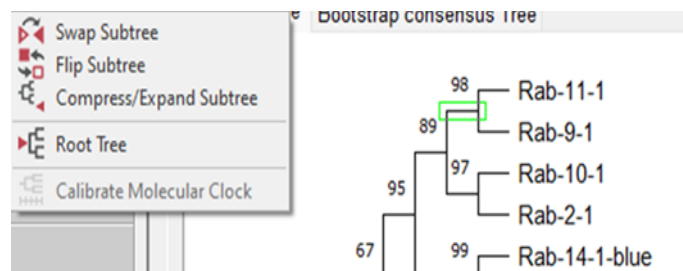
Сурет Д.16 - Құрылған филогенетикалық ағаш және bootstrap мәндері



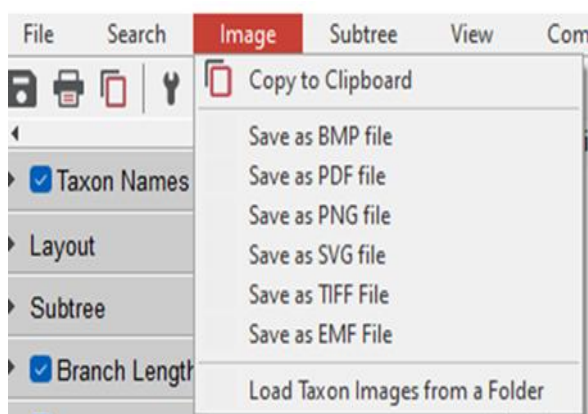
Сурет Д.17 - Сенімсіз тармақтарды қысқарту (Condensed Tree)



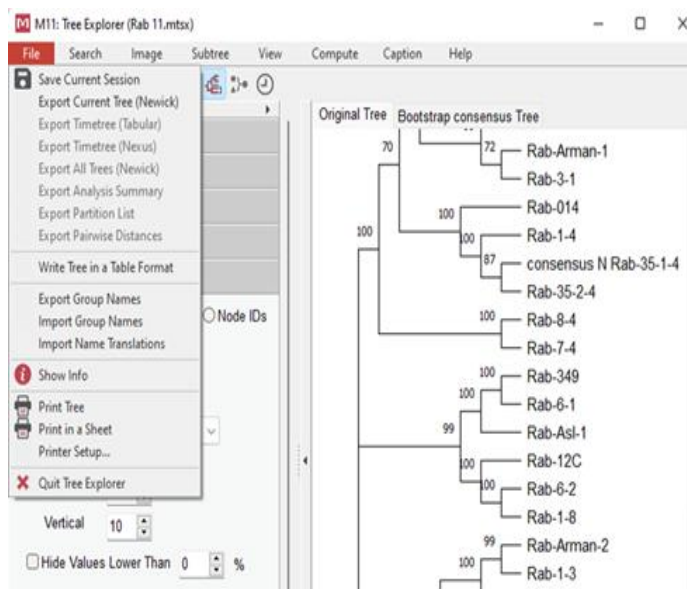
Сурет Д.18 - Cut - off мәнін орнату (50%)



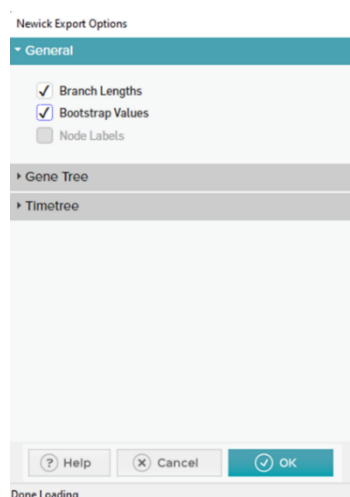
Сурет Д.19 - Қысқартылған ағаш және сыртқы топты белгілеу



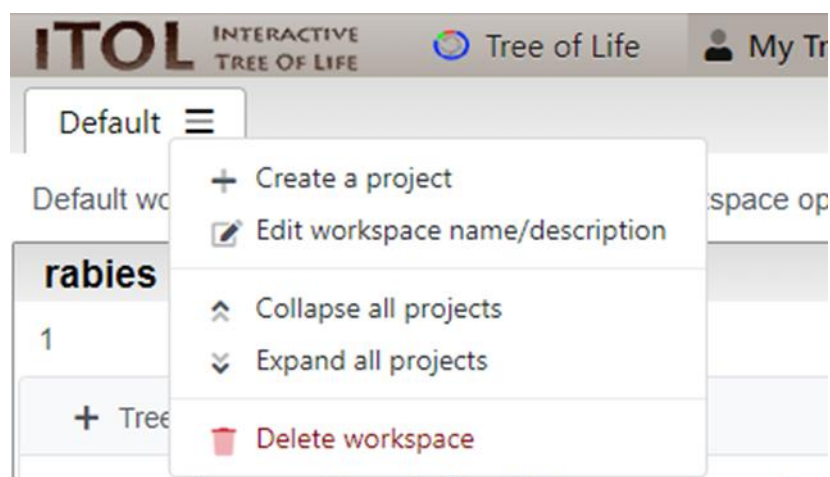
Сурет Д.20 - Филогенетикалык ағашты PDF форматында сақтау



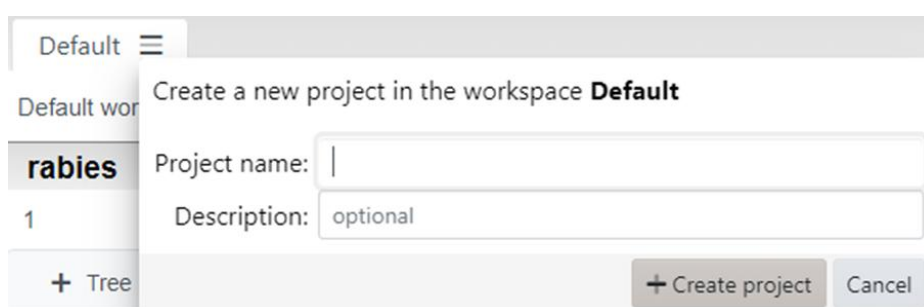
Сурет Д.21 - Ағашты Newick форматында экспорттау



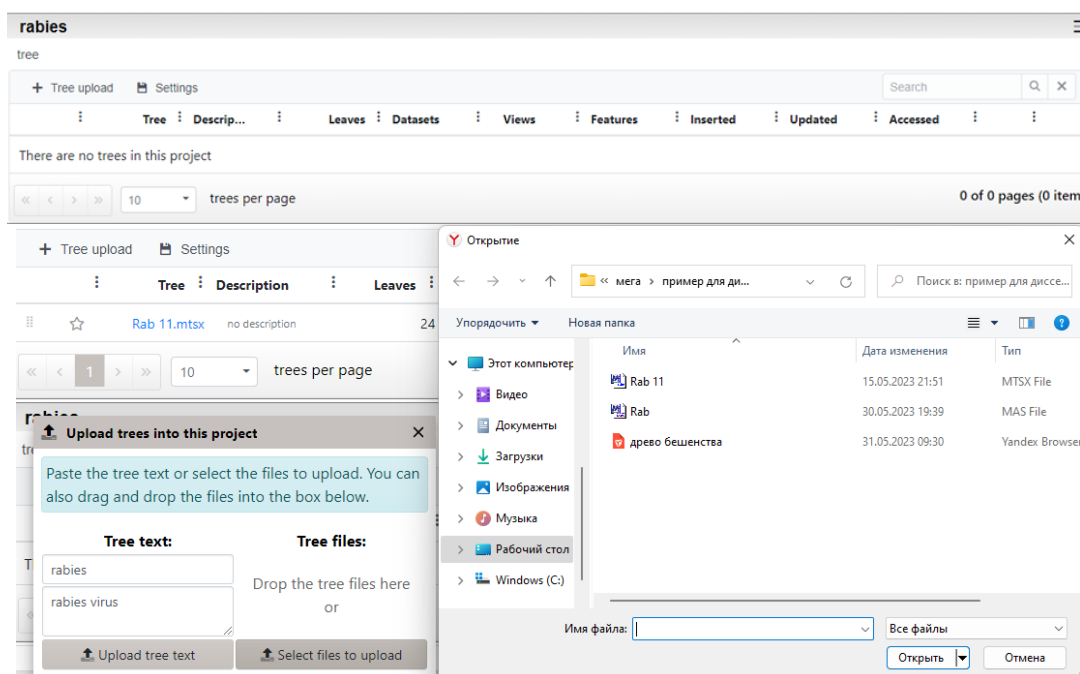
Сурет Д.22 - Newick файлын экспорттау параметрлері



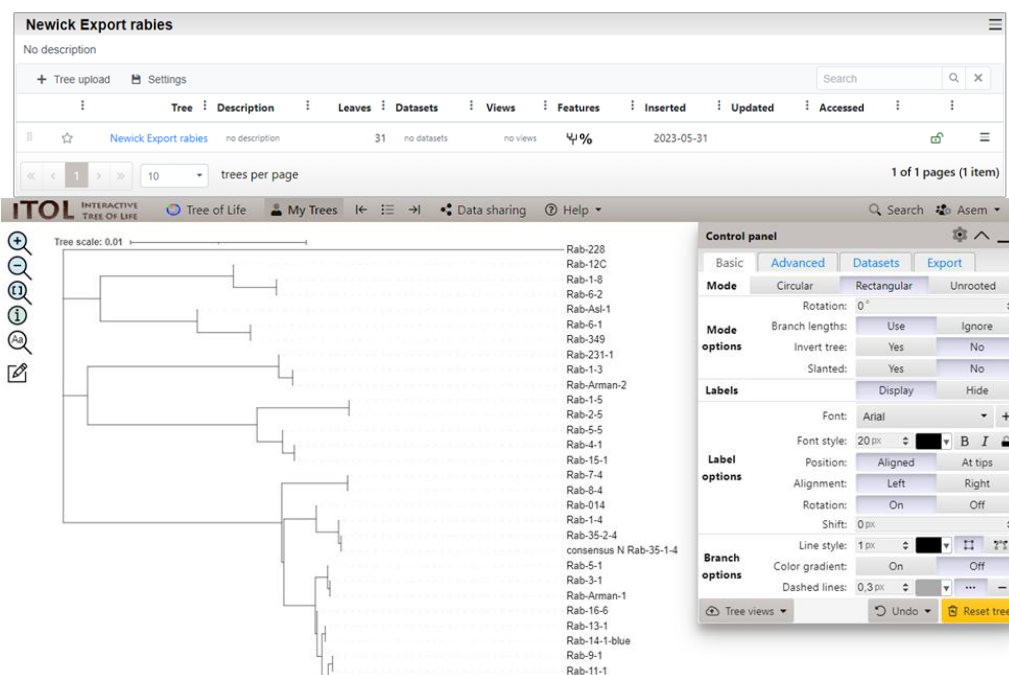
Сурет Д.25 - iTOL жүйесінде жаңа жоба құру



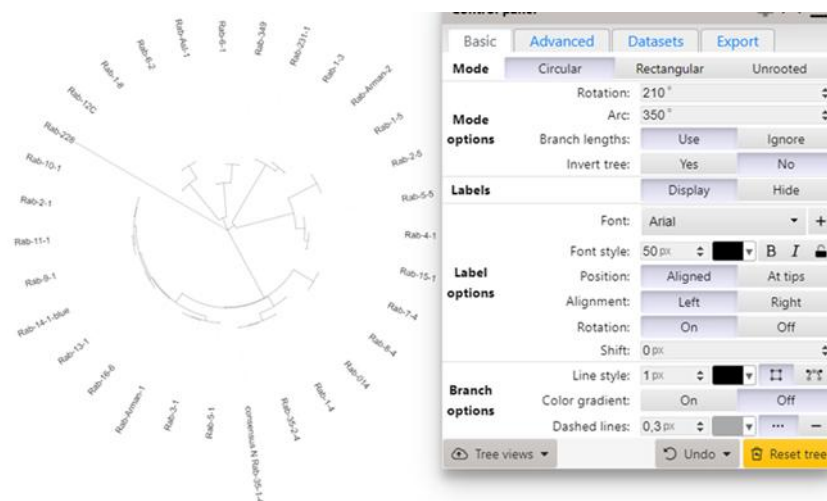
Сурет Д.26 - Жобаны атау және сипаттау



Сурет Д.27 - Newick ағашын iTOL жүйесіне жүктеу



Сурет Д.28 - Ағашты визуалды баптау және редакциялау



Сурет Д.29 - Филогенетикалық ағаштың circular форматтағы көрінісі