

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

Некоммерческое акционерное общество «Казахский национальный исследовательский  
технический университет имени К.И.Сатпаева»

Институт Геологии и нефтегазового дела имени К. Турысова  
Кафедра «Химическая и биохимическая инженерия»

УДК 577.2.086, 578.223

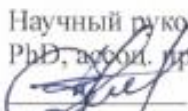
На правах рукописи

Иванова Карина Руслановна

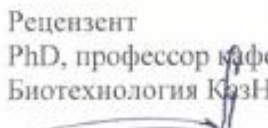
**МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ**

На соискание академической степени магистра

Название диссертации	«Генетическая характеристика вируса блютанга BTV-9W, циркулирующего в Южном Казахстане, и клонирование сегментов 2 и 10 вируса для разработки ПЦР тест-систем»
Направление подготовки	7M05105 – Биотехнология


Научный руководитель  
PhD, асс. профессор  
 Тастамбек К.Т.

«16» июня 2025г.


Рецензент  
PhD, профессор кафедры  
Биотехнология КазНУ им. аль-Фараби  
 Акимбеков Н.Ш.

«16» июня 2025 г.

**ДОПУЩЕН К ЗАЩИТЕ**

Норм контроль  
PhD, асс. профессор  
 Тастамбек К.Т.

16.06.2025 г.

Заведующий кафедрой  
Химической и биохимической инженерии,  
к.х.н., ассоц. проф.  Мангазбаева Р.А.  
16.06.2025 г.

Алматы, 2025


МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

Некоммерческое акционерное общество «Казахский национальный исследовательский  
технический университет имени К.И.Сатпаева»

Институт геологии и нефтегазового дела имени К. Турысова  
Кафедра «Химическая и биохимическая инженерия»

7M05105 – Биотехнология

**УТВЕРЖДАЮ**

Заведующая кафедрой  
«Химической и биохимической  
инженерии», к.х.н., ассоц. проф.  
 Мангазбаева Р.А.  
«16» июня 2025г.

**ЗАДАНИЕ**

**на выполнение магистерской диссертации**

Магистрантке Ивановой Карине Руслановне

Тема: Генетическая характеристика вируса блютанга BTV-9W, циркулирующего в  
Южном Казахстане, и клонирование сегментов 2 и 10 вируса для разработки ПЦР тест-  
систем

Утверждена приказом Ректора Университета №\_\_-п от \_\_. \_\_. 2025 г.

Срок сдачи законченной диссертации: 12.06.2025 г.

Исходные данные к магистерской диссертации: отобранные пробы патологического  
материала; данные, полученные при микробиологических, биохимических и молекулярных  
методов исследования.

Перечень подлежащих разработке в магистерской диссертации вопросов:

1 Генетическая характеристика вируса блютанга BTV-9W, циркулирующего на  
территории Южного Казахстана

2 Выбор мишеней и разработка праймеров и зондов qPCR для детекции и типирования  
BTV-9W.

3 Молекулярное клонирование сегментов 2 и 10 для разработки прототипа ОТ-ПЦР тест-  
системы в режиме реального времени и получение положительного контроля.

4 Оптимизация условий амплификации, валидация и оценка специфичности и  
чувствительности прототипа ОТ-ПЦР тест-системы в режиме реального времени.

Перечень графического материала (с точным указанием обязательных чертежей):  
Рекомендуемая основная литература:

1 Coetzee P., Stokstad M., Venter E.H., Myrmel M., Vuuren M. V. (2012). Bluetongue: a  
historical and epidemiological perspective with the emphasis on South Africa. Virology Journal,  
9, Article 198.

2 Schalkwyk A.V., Coetzee P., Ebersohn K., Teichman B.V., Venter E. (2023). Widespread  
Reassortment Contributes to Antigenic Shift in Bluetongue Viruses from South Africa. Viruses,  
15(7), 1611.

3 Gibbs J. Paul E., Greiner C. Ellis (2002). The epidemiology of bluetongue. Comparative  
Immunology, Microbiology and Infectious Disease, 17(3-4), 207-220.

**ГРАФИК**  
подготовки магистерской диссертации

Наименование разделов, перечень разрабатываемых вопросов	Сроки представления научному руководителю	Примечание
Введение. Обзор литературы	01.04.2025	
Материалы и методика исследования	01.05.2025	
Результаты исследований. Заключение и выводы	01.06.2025	

**Подписи**

консультантов и норм контролера на законченную магистерскую диссертацию с указанием относящихся к ним разделов диссертации

Наименования разделов	Консультанты, И.О.Ф (уч. степень, звание)	Дата подписания	Подпись
Магистерская диссертация	Тастамбек Қ.Т, PhD, ассоц.проф.	10.06.2025	
Норм контролёр	Тастамбек Қ.Т, PhD, ассоц.проф.	12.06.2025	

Научный руководитель

\_\_\_\_\_ Тастамбек Қ.Т.  
*подпись*

Задание принял к исполнению обучающийся

\_\_\_\_\_ Иванова К.Р.  
*подпись*

Дата

«\_\_» \_\_\_\_\_ 2025г.

## АННОТАЦИЯ

Магистерская исследовательская работа посвящена генетической характеристике вируса блютанга BTV-9W, циркулирующего в Южном Казахстане, и клонированию сегментов 2 и 10 для разработки ПЦР тест-систем. Катаральная лихорадка овец (КЛО) имеет важное экономическое значение, так как характеризуется высокой смертностью, снижением продуктивности, ухудшением здоровья, тем самым неся экономические потери. Несмотря на официально благополучный статус, наличие основных переносчиков – мокрецов рода *Culicoides*, особенно распространенных в Южном Казахстане, наряду с высокой плотностью восприимчивого скота и импортом животных из эндемичных по BTV районам создают высокий риск распространения вируса на территории Казахстана.

Целью настоящей магистерской диссертации является в проведении генетической характеристики вируса блютанга BTV-9W, циркулирующего на территории Южного Казахстана, а также клонирование сегментов 2 и 10 для разработки и валидации отечественной тест-системы. Научная новизна заключается в полученных генетических конструкциях сегментов 2 и 10, которые могут быть использованы в качестве стандартов и положительных контролей при разработке диагностических наборов, а также в разработанной прототипной тест-системе, обладающей высокой чувствительностью и специфичностью.

В данной исследовательской работе представлены результаты по генетической характеристики вируса блютанга топотипа “west” серотипа 9 (BTV-9W) и результаты по разработке и валидации ПЦР тест-системы для диагностики КЛО. В процессе разработки для точного выявления BTV использовался метод ПЦР с обратной транскрипцией в режиме реального времени, который позволяет обнаруживать небольшие количества вирусной РНК в биологических образцах. Основой набора являются праймеры и флуоресцентно меченый зонд, нацеленные на консервативный участок генома BTV (Seg 10), что обеспечивает высокую специфичность и возможность обнаружения различных серотипов вируса.

## АНДАТПА

Магистрлік зерттеу жұмысы Оңтүстік Қазақстанда таралатын BTV-9W блютанг вирусының генетикалық сипаттамасына және ПТР тест-жүйелерін әзірлеу үшін 2 және 10 сегменттерді клондау жайында. Қойлардың катаральды безгегі (ҚКБ) жоғары өлім, өнімділіктің төмендеуімен, денсаулықтың нашарлауымен сипатталып, экономикалық шығынға әкеледі, сол себепті оның маңызды экономикалық мәні бар. Ресми тұрақтылығына карамастан, *Culicoides* тектес құмыты, әсіресе Оңтүстік Қазақстанда таралған негізгі тасымалдаушылардың болуы, сезімтал малдың жоғары тығыздығымен және малдың BTV бойынша эндемикалық аудандардан импорты Қазақстан аумағында вирустың таралуының жоғары қаупін туғызады.

Осы магистрлік диссертацияның мақсаты Оңтүстік Қазақстан аумағында таралатын BTV-9W блютанг вирусына генетикалық сипаттама жүргізу, сондай-ақ отандық тест-жүйені әзірлеу және валидациялау үшін 2 және 10 сегменттерді клондау болып табылады. Ғылыми жаңалығы диагностикалық жинақтарды әзірлеу кезінде стандарттар мен оң бақылаулар ретінде пайдаланылуы мүмкін 2 және 10 сегменттердің алынған генетикалық құрылымдарында, сондай-ақ жоғары сезімталдығы мен ерекшелігі бар әзірленген прототиптік тест-жүйеде жатады.

Осы зерттеу жұмысында 9 серотиптің «west» топотипінің блютанг вирусының (BTV-9W) генетикалық сипаттамасы бойынша нәтижелер және ҚКБ диагностикасы үшін ПТР тест-жүйесін әзірлеу және валидациялау бойынша нәтижелер ұсынылған. Әзірлеу процесінде BTV-ді дәл анықтау үшін биологиялық үлгілердегі вирустық РНК аз мөлшерін анықтауға мүмкіндік беретін нақты уақыт режимінде кері транскрипциялы ПТР әдісі пайдаланылды. Жиынтықтың негізі BTV (Seg 10) геномының консервативті учаскесіне бағытталған праймерлер мен флуоресцентті таңбаланған зонд болып табылады, бұл вирустың әртүрлі серотиптерін табудың жоғары ерекшелігі мен мүмкіндігін қамтамасыз етеді.

## ANNOTATION

This master's research is dedicated to the genetic characterization of the Bluetongue virus serotype 9 West topotype (BTV-9W) circulating in Southern Kazakhstan, and the cloning of genome segments 2 and 10 for the development of PCR-based diagnostic test systems. Bluetongue disease (BT), also known as ovine catarrhal fever, holds significant economic importance due to its association with high mortality rates, reduced productivity, compromised animal health, and resulting financial losses.

Despite Kazakhstan's official status as free from BT, the presence of competent vectors—biting midges of the genus *Culicoides*, which are particularly prevalent in Southern Kazakhstan—combined with the high density of susceptible livestock and the importation of animals from BTV-endemic regions, poses a considerable risk for the virus's introduction and spread within the country.

The aim of this master's thesis is to perform genetic characterization of BTV-9W strains isolated in Southern Kazakhstan and to clone segments 2 and 10 of the viral genome for the development and validation of a domestic PCR-based diagnostic assay. The scientific novelty of this study lies in the generation of genetic constructs for segments 2 and 10, which may serve as standards and positive controls in diagnostic test development, as well as in the creation of a prototype PCR assay demonstrating high sensitivity and specificity.

This research presents data on the genetic features of the BTV-9W strain and the development and validation of a real-time reverse transcription PCR (RT-qPCR) assay for the detection of BTV. The assay targets a conserved region within segment 10 of the BTV genome using specifically designed primers and a fluorescently labeled probe, ensuring high specificity and the capacity to detect multiple serotypes.

## СОДЕРЖАНИЕ

	ВВЕДЕНИЕ	8
1	Литературный обзор	9
1.1	Описание вируса блютанга	9
1.2	Способ распространения вируса блютанга	10
1.3	Характеристика генома BTV	12
1.3.1	Характеристика сегмента 2 (Seg-2) BTV	13
1.3.2	Характеристика сегмента 10 (Seg-10) BTV	14
1.4	Эпидемиология BTV в Центральной Азии и Казахстане	16
1.5	Методы диагностики BTV	17
1.6	Сравнительный анализ диагностических систем на BTV	20
2	Материалы исследования	23
2.1	Объект исследования	23
2.2	Сбор биологических образцов	23
3	Методы исследования	24
3.1	Выделение нуклеиновых кислот и обратная транскрипция	24
3.2	Анализ ПЦР	25
3.3	Конструирование праймеров и зондов qPCR, их синтез и очистка	25
3.4	Приготовление компетентных клеток <i>E. coli</i>	26
3.5	Клонирование амплифицированных сегментов 2 и 10 в векторные системы и трансформация компетентных клеток	27
3.6	Секвенирование ДНК по Сэнгеру	28
3.7	Транскрипция <i>in vitro</i>	29
3.8	Отработка прототипа ОТ-ПЦР тест-системы в режиме реального времени	30
3.9	Статистический анализ	30
4	Результаты исследования	32
4.1	Сбор биологических результатов	32
4.2	Детекция BTV	33
4.3	Генетическая характеристика BTV	35
4.4	Разработка праймеров и зондов qPCR для детекции и типирования мишеней	38
4.5	Клонирование участков Seg-2 и Seg-10 BTV-9W и синтез РНК-контролей	39
4.6	Оценка чувствительности и эффективности для дуоплекса мишеней	44
4.7	Оценка температурной лабильности ОТ-кПЦР-РВ	47
4.8	Оценка специфичности ОТ-кПЦР-РВ	47
5	Обсуждение результатов	50
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	51
	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	53

## ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы: разработка отечественной ПЦР тест-системы, в основу которой входит консервативный сегмент вируса, является актуальной задачей, так как в настоящее время большинство коммерческих тест-систем основаны на зарубежных разработках, не учитывающих региональные особенности. Это в свою очередь ограничивает доступность своевременной диагностики. Проведение генетической характеристики вируса и разработка на основе полученных данных чувствительной и специфичной тест-системы позволит значительно повысить эффективность ранней диагностики и мониторинга катаральной лихорадки овец в Республике Казахстан.

Цель работы: проведение генетической характеристики вируса блютанга серотипа 9 топотипа “west”, циркулирующего в Южном Казахстане, и клонирование сегментов 2 и 10 для разработки отечественной ПЦР тест-системы.

Научная новизна: с использованием методов молекулярной биологии и биоинформатического анализа впервые была проведена генетическая характеристика вируса блютанга штамма BTV-9W, обнаруженного на территории Южного Казахстана, и осуществлено клонирование его сегментов 2 и 10 с целью разработки специфической ПЦР тест-системы, способной отличать вакцинные штаммы вируса от полевых.

Задачи:

1 Проведение генетической характеристики вируса блютанга BTV-9W, циркулирующего на территории Южного Казахстана.

2 Выбор мишеней и разработка праймеров и зондов qPCR для детекции и типирования BTV-9W.

3 Молекулярное клонирование сегментов 2 и 10 для разработки прототипа ОТ-ПЦР тест-системы в режиме реального времени и получение положительного контроля.

4 Оптимизация условий амплификации, валидация и оценка специфичности и чувствительности прототипа ОТ-ПЦР тест-системы в режиме реального времени.

Научное и практическое значение: вирус катаральной лихорадки овец является значимым патогеном для животных, как для крупного, так и для мелкого рогатого скота. Разработанная ПЦР тест-система позволит осуществить раннюю диагностику вируса блютанга, включая возможность отличия полевых и вакцинных штаммов. Результаты работы создают возможность внедрения отечественных молекулярных тест-систем, что повышает уровень продовольственной и биологической безопасности Республики Казахстан.

Структура и объем диссертационной работы. Диссертационная работа подготовлена на 63 страницах компьютерного текста, состоит из трех разделов – пояснений, основной части и списка литературы. В работе отражены теоретические исследования и интерпретированы в 8 таблицах и 16 рисунках.



# 1 Литературный обзор

## 1.1 Описание вируса блютанга

Катаральная лихорадка овец, или болезнь синего языка (КЛО, блютанг, BTV), представляет собой вирусную инфекцию, поражающую диких и домашних жвачных животных. Болезнь вызывает значительные экономические потери в овцеводстве и других секторах животноводства [1]. По классификации Всемирной организации по охране здоровья животных (ВОЗЖ) КЛО относится к категории А как одна из наиболее опасных инфекций. В связи с этим, при выявлении КЛО необходимо обязательное сообщение в ветеринарные службы и установление карантина. К вирусу более восприимчивы овцы. Козы, коровы и дикие жвачные животные длительное время могут быть носителями вируса, не проявляя клинических признаков [2]. Инфекция вызывает различные вариации патогенности: от бессимптомной инфекции до тяжелых симптомов, таких как лихорадка, воспаление слизистых оболочек, отеки головы и конечностей, дегенеративные изменения скелетной мускулатуры, а также некроз тканей и гибель животных на фоне сильного истощения [3]. Болезнь не всегда проявляется ярко выраженными симптомами, что усложняет диагностику, особенно на ранних стадиях развития болезни [4].

Впервые КЛО была зарегистрирована в конце XIX века в Южной Африке после импорта партии овец из Европы. Изначально болезнь называлась малярийной катаральной лихорадкой овец или эпизоотической злокачественной катаральной лихорадкой овец [5]. Первые достоверные эпизоотическое описание вируса датируется 1906 годом, а вирус как возбудитель КЛО был идентифицирован южноафриканским ветеринаром Арнольдом Тейлером в 1905 году [6]. Продолжительное время болезнь считалась исключительно африканской, эндемичной для тропических и субтропических регионов. Обуславливалось это обилием кровососущих насекомых [7]. Однако в конце XX ареал распространения вируса начал расширяться. Так, в 1940-х годах случаи инфицирования овец были зарегистрированы на Ближнем Востоке и Средиземноморском регионе [8]. Впервые за пределами Африки блютанг был зарегистрирован на Кипре в 1956 году [9]. В дальнейшем болезнь распространилась в страны Азии, Австралию, Индию, а также в Северную и Южную Америку.

Первое крупное распространение болезни в Европе было зарегистрировано на островах Сицилия и Сардиния в 1998 году. Было это связано с заносом серотипов BTV-2, BTV-4 и BTV-9 из Африканского континента [10]. Особое значение для Европы стало широкое распространение вируса 2006–2009 годов, вызванные серотипом BTV-8, распространившимся по всей Центральной и Северной Европе [11]. Данный серотип отличался высокой вирулентностью и поражал не только овец, но и крупный рогатый скот, вызывая аборт и снижение удоя. Всё это привело к большим экономическим потерям и вызвало необходимость масштабной вакцинации

[12]. В ответ страны Европейского союза, начиная с 2008 года, инициировали вакцинацию с применением инактивированных вакцин [13-14]. Тем не менее, появление новых серотипов продолжает представлять эпизоотическую угрозу и требует постоянного обновления средств и стратегий диагностического мониторинга [15-16]. Таким образом вирус блютанга представляет собой практическую проблему в странах с развитым овцеводством и животноводством. Его изменчивость и расширяющийся ареал являются необходимым фактором в постоянном мониторинге циркулирующих штаммов и совершенствование средств молекулярной диагностики на региональном уровне.

## 1.2 Способ распространения вируса

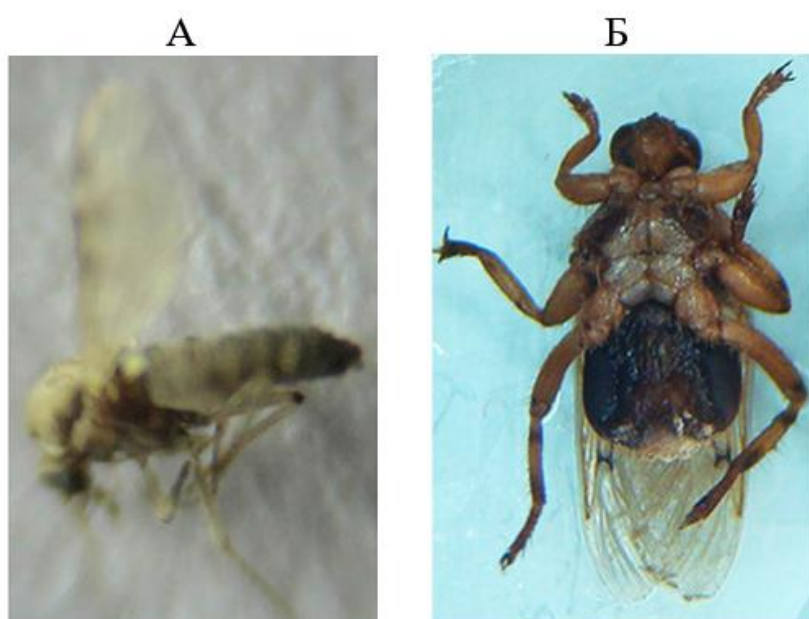
Передача вируса блютанга преимущественно осуществляется через укусы компетентных переносчиков - мокрецов рода *Culicoides* spp, что делает этих насекомых ключевыми векторами в эпидемиологии заболевания [17]. Мокрецы этого рода – это мелкие насекомые размером от 1 до 3 мм, обладающие короткими антеннами и пятнистыми крыльями. Их жизненный цикл включает такие стадии, как яйцо, личинка, куколка и имаго [18]. Род *Culicoides* включает в себя около 1400 видов, которые распространены по всему миру, за исключением Антарктиды. Несмотря на такое разнообразие, лишь 30 видов признаны эпидемиологически значимыми в передаче вируса блютанга [19-20]. Данные виды обладают способностью к биологической трансмиссии вируса: вирус, проникая в организм насекомого, реплицируется в нем, достигая слюнных желез, и передается следующему хозяину при кровососании [21]. Распространение мокрецов в значительной мере зависит от экологических условий, таких как температурный режим, климатические изменения и наличие географических препятствий для перелета насекомых-векторов [22-24]. Температурный режим оказывает влияние на динамику популяции и продолжительность инкубационного периода вируса. При понижении температуры ниже 15°C репликация вируса в теле насекомого прекращается или замедляется [25-26]. На сегодняшний день изменение климата привело к расширению ареала *Culicoides* на более северные регионы, что увеличивает риск распространения вируса блютанга на ранее неэндемичные территории [27]. Кроме того, импорт животных без надлежащего контроля и карантина способствуют распространению как вируса, так и насекомых-переносчиков [28].

Представители компетентных переносчиков блютанга распространены по всей территории Казахстана, но наиболее благоприятные условия для их размножения наблюдается в районах, где летом выпадает достаточное количество осадков, а зима теплая без крепких морозов. Такие условия сложились на юге Республики Казахстан (рисунок 1).



Рисунок 1 – Зона, благоприятная для размножения и распространения мокрецов рода *Culicoides* на территории Республики Казахстан [29]

Недавние исследования показали, что помимо компетентных переносчиков, вирус блютанга может передаваться через укусы лошадиных кровососок (*Hippobosca equina*) [30]. С помощью молекулярного анализа было выявлено наличие РНК вируса ВТВ-9, собранных с сельскохозяйственных животных на территории Южного Казахстана. Результаты работы указывают на потенциальную возможность участия лошадиных кровососок в эпидемиологии вируса блютанга. Однако, обнаружение вирусной РНК не подтверждает его роль в качестве биологического вектора. Способность кровососок *H. equina* выступать в качестве механических переносчиков вируса блютанга требует дальнейшего исследования [31]. Внешний вид мокреца рода *Culicoides* и лошадиной кровососки *Hippobosca equina* представлены на рисунке 2.

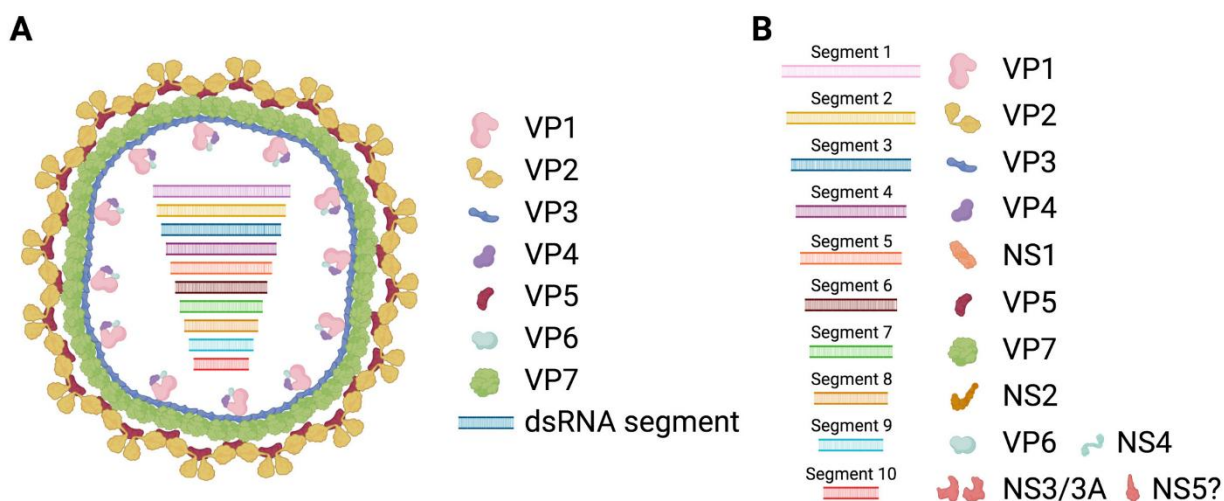


Обозначения: А – мокрец рода *Culicoides*; Б – лошадиная кровососка (*Hippobosca equina*)

Рисунок 2 – Внешний вид компетентного (А) и потенциального (Б) переносчиков вируса блютанга.

### 1.3 Характеристика генома вируса.

Вирус катаральной лихорадки овец (Bluetongue virus, BTV) относится к роду *Orbivirus* семейства *Reoviridae*. Геном вируса представлен десятью линейными сегментами двуцепочечной РНК [32]. Вирусный геном BTV кодирует пять неструктурных (NS1, NS2, NS3, NS3A, NS4) и семь структурных белков (VP1-VP7). Вирусная частица состоит из внешнего капсида, состоящего из белков VP2 и VP5, и внутреннего ядра, образованного белками VP7 и VP3 [33]. Внешнее ядро отвечает за взаимодействие с клеточными компонентами хозяина, что позволяет вирусу проникать в клетку, а внутреннее ядро служит защитной оболочкой для механизма репликации вируса, содержащее сегментированный геном [34]. Схематическое строение вируса представлено на рисунке 3.



Обозначения: А – Строение вириона BTV; Б – строение сегментированного генома BTV.

Рисунок 3 – Схематическое изображение BTV [35].

Вирус BTV характеризуется значительной генетической вариабельностью, что приводит к наличию множества серотипов. Согласно данным Европейской комиссии, существует 24 классических серотипа BTV. Однако, по информации Института Пирбрайт, Великобритания, существует по меньшей мере 29 серотипов, включая «атипичные» серотипы 25–29, которые могут распространяться контактным путем и обычно клинически не проявляются. Различия в структуре основного белка VP2 приводят к слабой

кросс-протективной защите антител между серотипами. Это ограничивает способность антител, выработанных против одного серотипа, эффективно нейтрализовать другие [36].

### 1.3.1 Характеристика сегмента 2 (Seg-2) BTV

Сегмент 2 (Seg-2) генома BTV является наиболее вариабельным и биологически значимым компонентом вирусного РНК-генома. Белок VP2, кодируемый сегментом – главный детерминант серотипа вируса, а также ключевой антиген, отвечающий за индукцию нейтрализующих антител в инфицированном организме [37]. Именно вариации последовательности Seg-2 определяют различия между серотипами BTV, делая этот сегмент важным для разработки вакцин и диагностических тест-систем [38].

Сравнительный нуклеотидный анализ последовательностей Seg-2 различных серотипов BTV выявил генетическое разнообразие, что позволяет использовать этот сегмент для быстрой и точной детекции и типирования серотипов с помощью секвенирования и RT-PCR. Например, в Китае филогенетический анализ сегмента позволил впервые идентифицировать и охарактеризовать новые серотипы BTV-5, BTV-7 и BTV-24, а также определить их сходство с африканскими штаммами [39]. В Европе и Индии анализ Seg-2 используется для мониторинга циркулирующих штаммов [40].

Сегмент 2 также играет важную роль в формировании антигенных эпитопов белка VP2, распознаваемых моноклональными антителами, а это в свою очередь используется для разработки серологических тестов и вакцин. Недавние исследования BTV-25 показали, что идентификация линейных эпитопов белка VP2 позволяет создавать высокоспецифичные диагностические реагенты для отдельных серотипов [37]. Но в то же время, точечные мутации в Seg-2 могут приводить к появлению вариантов, устойчивых к нейтрализации, что затрудняет серологическую диагностику и требует постоянного обновления диагностических тест-систем [41].

Роль Seg-2 в вирулентности и патогенезе BTV также была доказана экспериментальными исследованиями. Замена Seg-2 между аттенуированными и вирулентными штаммами BTV-8 показала, что белок VP2 является одним из основных факторов патогенности, наряду с другими сегментами, в частности с сегментом 10, кодирующим белок NS3 [42]. Однако для полного проявления вирулентности вируса блютанга требуется взаимодействие нескольких сегментов, и при изменении одного сегмента эффект может зависеть от того, какие другие сегменты присутствуют в вирусной частице. Всё это подчеркивает сложность генетического контроля BTV [43].

Особый интерес для исследований представляют атипичные серотипы BTV-25–29, которые отличаются от классических штаммов неспособностью инфицировать и реплицироваться в мокрецах рода *Culicoides* и способны передаваться горизонтально [44-46]. Генетический анализ показал, что Seg-2 у

атипичных серотипов формирует отдельные филогенетические кластеры и обладает низкой гомологией с классическими серотипами [47]. Недавние экспериментальные исследования свидетельствуют, что Seg-2 BTV-26 способствует горизонтальной передаче вируса между мышами, что может быть тесно связано с особенностями структуры белка VP2 [44]. Также в Китае был выявлен новый потенциальный серотип BTV-29, Seg-2 которого формирует отдельные нуклеотип и имеет около 63% гомологии с другими известными серотипами вируса, что расширяет представление о генетическом разнообразии BTV [45].

Молекулярная эпидемиология на основе анализа Seg-2 позволяет отслеживать пути распространения вируса, выявляя эндемичные или завозные штаммы, а также оценивать риски формирования новых серотипов [48]. Анализ изолятов с острова Корсика показал, что Seg-2 местного серотипа BTV-2 филогенетически близок к серотипам из Средиземноморских районов, что указывает на возможную миграцию вируса [49]. В Индии, где наблюдается высокая циркуляция вируса, частая реассортация Seg-2 приводит к появлению новых генотипов и фенотипов, усложняя при этом эпидемиологический контроль [50].

Традиционные методы определения серотипа BTV, например вирусная нейтрализация, требуют материальных и временных затрат и могут быть недостаточно информативными при образовании новых или атипичных штаммов вируса. В последние годы молекулярные методы, основанные на амплификации Seg-2 с последующим секвенированием, стали стандартом для быстрой и точной идентификации серотипа [51-53]. Разработка ОТ-кПЦР-РВ тестов с использованием специфических праймеров к сегменту 2 позволит быстро проводить типирование серотипа вируса, что существенно ускорит эпидемиологический надзор и контроль вспышек.

### **1.3.2 Характеристика сегмента 10 (Seg-10) BTV**

Сегмент 10 (Seg-10) BTV представляет собой наименьший из десяти РНК-сегментов генома вируса и, как и Seg-2, играет ключевую роль в жизненном цикле, патогенезе, диагностике и эволюции BTV [54]. Seg-10 кодирует неструктурный белок NS3 и его вариант NS3A, а также содержит дополнительные открытые рамки считывания, что подчеркивает его функциональное разнообразие и значимость для вируса [55]. Данные белки синтезируются с использованием двух стартовых кодонов. Оба белка могут существовать в гликозилированных и негликозилированных формах, локализуются в аппарате Гольджи и играют важную роль в экзоцитозе вирионов и взаимодействии с клеточными мембранами [54-56]. Вирусные белки NS3 и NS3A также участвуют в подавлении интерферонового ответа у млекопитающих. Они ингибируют фосфорилирование STAT1 и, как следствие, нарушают экспрессию индуцированных интерфероном генов [56]. Кроме того, Seg-10 является объектом интереса в эпизоотическом анализе, так как его

высокая генетическая изменчивость позволяет проследить филогенетические взаимоотношения между серотипами вируса, а также выявлять события реассортации генома [57]. При этом филогенетические деревья, построенные по Seg-10, часто не совпадают с серотипами, определяемыми по Seg-2, что доказывает независимость эволюции этих сегментов.

Впервые полная нуклеотидная последовательность Seg-10 была определена с использованием кДНК-клона BTV-10, что позволило установить длину сегмента в 822 пары оснований и открытую рамку считывания, кодирующую белок из 229 аминокислот [54,58]. Сравнительный анализ терминальных последовательностей показал наличие гомологичных 3'-концевых участков у всех сегментов BTV, включая Seg-10, что важно для упаковки генома и репликации вируса [59]. Однако за пределами этих терминальных участков последовательности сегмента могут значительно различаться, что показывает эволюционную адаптацию вируса.

Важной особенностью Seg-10 является его роль в упаковке генома. Исследования *in vitro* показали, что упаковка начинается именно с Seg-10, который инициирует формирование РНК-РНК взаимодействий с другими малыми сегментами, необходимую для дальнейшего присоединения средних и крупных размеров [60]. Непереводимые области Seg-10 критичны для запуска этого процесса, а мутации в участках взаимодействия могут нарушать сборку вирусного генома и снижать эффективность репликации. Данные подчеркивают функциональную значимость Seg-10 в жизненном цикле вируса [61].

Seg-10 отличается высокой степенью консервативности среди различных серотипов BTV. Это подтверждается гибридизацией клонов Seg-10 с изолятами разных серотипов [62]. Такая консервативность делает Seg-10 удобной мишенью для молекулярной диагностики и идентификации BTV, позволяя выявлять широкий спектр изолятов вируса без перекрестной реакции с близкородственными вирусами, поскольку он максимально отличается от аналогичных сегментов других орбивирусов, таких как вирус эпизоотической гемморагической болезни (EHFV). Клон Seg-10 BTV гибридизируется со всеми исследованными изолятами, но не с EHFV, что показывает его специфичность [63]. Генетические исследования Seg-10 из различных географических регионов и серотипов BTV показывают его высокую консервативность, что позволяет использовать этот сегмент для отслеживания происхождения и распространения вируса [64]. Например, исследования индийского изолята BTV-10 показали, что последовательности Seg-10 и других генов этого серотипа имеют более 99% идентичности с вакцинным штаммом из США, что свидетельствует о возможном завозе западного топотипа вируса на территорию Индии [65]. Таким образом, Seg-10 не только играет важную роль в биологии BTV, но и является ключевым инструментом для молекулярной диагностики, эпидемиологического мониторинга и разработки современных вакцинных стратегий.

## 1.4 Эпидемиология BTV в Центральной Азии и Казахстане

BTV представляет собой трансмиссивную инфекцию и оказывает существенное влияние на здоровье жвачных животных и экономику животноводства. В последние десятилетия наблюдается расширение ареала распространения вируса, включая регионы Центральной Азии. Климатические изменения, глобализация торговли и миграции животных способствуют увеличению риска заноса и распространения болезни в ранее незатронутых регионах [66].

Впервые подтверждение наличия BTV в Казахстане было получено в 2003 году. В исследовании были выявлены серологические и вирусологические доказательства циркуляции вируса у крупного рогатого скота в южных регионах страны, что позволило говорить о возможной эндемичности инфекции в определенных географических зонах [67]. Эти данные стали основой для последующих эпидемиологических наблюдений и разработки стратегий мониторинга.

Существенным вкладом в понимание эпидемиологии BTV в Казахстане стало исследование по моделированию риска распространения вируса в 2021 году. С использованием климатических и зоогеографических данных была построена пространственно-временная модель, позволяющая оценить вероятность передачи вируса в различных регионах страны. Согласно результатам моделирования, активная передача BTV маловероятна в зимние месяцы (октябрь–март), однако значительно возрастает в теплое время года, особенно в июле, достигая максимума в северных регионах [68]. Такой сезонный характер распространения вируса обусловлен биологическими особенностями переносчиков рода *Culicoides*.

Важным этапом стало исследование, проведенное в 2022 году в юго-восточном Казахстане, где было проведено изучение серологического статуса сельскохозяйственных животных и наличия вируса в популяции мошек. Обнаружение РНК BTV в крови клинически здоровых овец, а также в образцах насекомых, позволило предположить наличие активной циркуляции вируса. Филогенетический анализ показал принадлежность выявленного штамма к топотипу “west” серотипа BTV-9, что совпадает с вариантами, циркулирующими на Ближнем Востоке [69].

Исследование 2023–2024 годов существенно расширило представление о распространенности BTV на территории Казахстана. В выборке, охватывающей северные и южные регионы, отмечено значительное увеличение серопревалентности в южном регионе – до 29,5% у коз и 10% у крупного рогатого скота в 2024 году по сравнению с 2023 годом (3,8% и 0% соответственно). Результаты данного исследования также подчеркивают важность систематического мониторинга *Culicoides* spp. в Казахстане. Выявление таких видов, как *C. miutissimus*, *C. sphagnumennis*, *C. newtedi* и *C. pestipennis*, как потенциальных векторов BTV, требует дальнейшего изучения



для разработки эффективных мер по предотвращению распространения BTV в регионе [70].

Помимо Казахстана, исследования проводились в ближайших странах, граничащих с Казахстаном. В Кыргызстане в 2014 году впервые было зафиксировано наличие антител к BTV у овец, что указывает на эндемическую циркуляцию вируса на территории. Несмотря на ограниченность выборки, работа подчеркивает необходимость создания систем регулярного мониторинга и в других странах Центральной Азии [71]. Китай, являясь одним из крупнейших соседей Казахстана, также представил обширные данные по циркуляции BTV. В исследованиях, проведенных в разные годы, документируется устойчивое присутствие вируса в южных провинциях, а также наличие различных серотипов, циркулирующих в стране [72-77]. Это свидетельствует о сложной эпидемиологической картине и потенциале межрегионального распространения вируса.

Теоретическое обоснование глобального распространения BTV и прогнозирование его ареалов требует анализа иммунологических, экологических и вирусологических факторов. Исследование 2015 года рассматривает иммунный ответ животных на BTV, включая особенности формирования гуморального иммунитета и кросс-реактивность между серотипами [78]. Данные сведения важны для оценки эффективности вакцинных стратегий и предотвращения вспышек болезни в эндемичных районах. Также важно учитывать роль климатических изменений, миграции диких жвачных животных и антропогенных факторов в усилении трансграничного распространения вируса, что актуализирует проблемы для стран Центральной Азии [79].

Таким образом, современное состояние эпидемиологии BTV в Казахстане и странах Центральной Азии характеризуется устойчивой циркуляцией вируса, выраженной сезонностью, разнообразием векторов и нарастающим сероэпидемиологическим распространением. Эти данные свидетельствуют о необходимости укрепления систем мониторинга, внедрения профилактических программ, включая разработку вакцин и диагностических систем тестирования, а также проведения регулярного мониторинга. Только комплексный и координированный подход позволит минимизировать эпизоотические и экономические последствия.

### **1.5 Методы диагностики BTV**

В настоящее время диагностика BTV представляет собой важное направление в ветеринарной вирусологии, требующее применения высокоспецифичных и чувствительных методов. Согласно актуальным данным литературы, наиболее широко используются молекулярные методы, в частности ПЦР, которая позволяет выявлять вирусный геном на ранних стадиях инфекции. Кроме того, серологические методы, такие как иммуноферментный анализ (ИФА) и вирус-нейтрализационный тест,

применяются для оценки наличия антител и серотипов вируса в организме. Анализ научных работ показывает, что выбор метода диагностики во многом зависит от целей исследования, фазы заболевания, а также доступности лабораторного оборудования. В последние годы активно развиваются экспресс-методы, позволяющие проводить скрининг в полевых условиях, что особенно важно при вспышках инфекции. Таким образом, комплексный подход, включающий сочетание разных диагностических методик, обеспечивает наиболее полную и достоверную оценку эпизоотической ситуации.

Метод ИФА широко применим для диагностики BTV у домашних и диких жвачных животных благодаря высокой чувствительности и специфичности. Современные ИФА-тесты позволяют выявлять серотип-специфические антитела к вирусу, что наиболее важно для контроля инфекции и эпидемиологического надзора. Например, конкурентные и сэндвич-ИФА методы демонстрируют специфичность и чувствительность выше 95% для большинства серотипов, хотя точные показатели могут варьироваться в зависимости от используемого теста [80]. Разработаны ИФА-тесты для раннего обнаружения IgM-антител, что позволило отличать недавно приобретенные от продолжительных инфекций и проводить быструю эпидемиологическую оценку [81]. Серотип-специфические тесты ИФА на основе рекомбинантных белков позволяют проводить мониторинг циркуляции серотипов [82]. Антиген-ИФА (Ag-ELISA) может использоваться для прямого выявления антигена на ранних стадиях, что особенно важно при остром течении болезни [83]. Необходимо учитывать то, что некоторые тесты могут давать перекрестные реакции с близкородственными орбивирусами. Однако современные моноклональные антитела и оптимизация протоколов позволяют минимизировать получение ложноположительных результатов [84]. Методы ИФА, нацеленные на обнаружение антител, также являются основными методами диагностики вируса благодаря возможности массового скрининга. Наиболее часто используются конкурентные (c-ELISA), блокирующие (b-ELISA) и непрямые (i-ELISA) варианты, основанные на обнаружении антител к группоспецифическому белку VP7, кодируемому сегментом 7 (Seg-7), или серотип-специфическому белку VP2 вируса BTV [85]. Блокирующие и конкурентные ИФА-тесты демонстрируют высокую чувствительность, достигая до 99%, и специфичность до 100%, превосходя этим традиционные методы, особенно на ранних стадиях [86]. Блокирующие ИФА-тесты с использованием моноклональных антител позволяют минимизировать перекрестные реакции и выявлять антитела на ранних стадиях заражения [87]. Серотип-специфические ИФА-тесты на основе белка VP2 применяются для эпидемиологического контроля и мониторинга [88].

Вирус-изоляция является классическим и высокоспецифичным методом диагностики BTV. Данный метод позволяет подтвердить наличие живого вируса в клинических образцах жвачных животных. Процесс включает в себя выделение вируса из ткани или крови животных, последующее

культивирование на клеточных линиях или эмбриональных куриных яйцах. Далее проводится идентификация с использованием методов ИФА, и окончательное типирование с помощью вируснейтрализационного теста [89]. Несмотря на высокую специфичность, метод вирус-изоляции считается трудоемким, требующий значительным материальных и временных затрат, а также наличия специализированных лабораторных условий, что ограничивает его применение для массового скрининга [90]. Данный метод особенно ценен для подтверждения острых случаев заболевания, выделения новых серотипов вируса и получения вируса для дальнейших исследований и разработки вакцин. В настоящее время вирус-изоляция уступает по скорости и чувствительности ПЦР-методам, однако остается «золотым стандартом» для окончательной верификации [91].

Электронная и иммунная электронная микроскопия (ИЭМ) используется для диагностики BTV для визуализации вирусных частиц и структур, связанных с инфекцией. Электронная микроскопия позволяет выявлять вирус в инфицированных клетках, обнаруживая характерные морфологические изменения, например появление вирусных частиц в фагоцитарных везикулах, лизосомах и гранулярных включениях, а также формирование специфических тубул, связанных с белком NS1 [92]. ИЭМ с использованием моноклональных антител к структурному белкам BTV позволяет повысить специфичность метода и дает возможность обнаруживать вирусные частицы внутри эритроцитов инфицированных овец [93]. Данный метод также применяется для выявления вируса в организмах насекомых-переносчиков, и позволяет локализовать его в различных тканях, включая слюнные железы и мышцы [94]. В дополнении к этому, иммунносорбционная электронная микроскопия используется для оценки вирусоподобных частиц в культурах клеток, что особенно важно для исследований и производства вакцин [95]. Даже при высокой информативности, микроскопия требует специализированного оборудования и высокой квалификации персонала. Также метод не подходит для массового скрининга по причине трудоемкости и низкой чувствительности по сравнению с серологическими и молекулярно-генетическими методами [96].

Классический метод ОТ-ПЦР является одним из ключевых в молекулярной диагностике вируса блютанга, обеспечивая высокую специфичность и чувствительность при выявлении РНК BTV в клинических образцах. Данный метод позволяет выявлять вирус на ранних стадиях, еще до появления антител, что важно для своевременного эпиднадзора и контроля распространения инфекции [97]. Классическая ОТ-ПЦР основана, как правило, на амплификации консервативного и вариабельного участков генома BTV, чаще всего на сегменты 2 и 10, что позволяет не только детектировать вирус, но и определять его серотип [98]. Преимуществом метода является быстрая и надежная идентификация BTV и его серотипа, а также отсутствие перекрестных реакций с другими орбивирусами [99]. Однако сравнительные исследования показали, что классическая ОТ-ПЦР уступает по

чувствительности и скорости современным вариантом ОТ-ПЦР в режиме реального времени, но тем не менее, остается востребованной в лабораториях с ограниченными ресурсами и для подтверждения результатов [100].

Современная диагностика вируса блютанга основывается на сочетании серологических, молекулярных и классических методов, обеспечивая высокую точность и своевременность выявления инфекции. Молекулярные методы считаются наиболее специфичными и чувствительными для ранней детекции вируса и его типирования, что важно для мониторинга и контроля вспышек. Серологические методы имеют широкое использования для массового скрининга популяций, что позволяет выявлять острые и перенесенные инфекции, а также оценивать эффективность вакцинации. Новые технологии, такие как цифровая ПЦР и мультиплексные платформы расширяют возможность одновременного обнаружения вируса и определения его серотипа в больших выборках. Суммарно, интеграция разных методов позволяет достичь максимальной эффективности диагностики BTV, обеспечивая быстрое выявление острых случаев и эпидемиологический мониторинг на популяционном уровне.

## **1.6 Сравнительный анализ диагностических систем на BTV**

Диагностика BTV остаётся ключевым элементом в системах ветеринарного надзора, особенно в странах, где циркуляция вируса подтверждена молекулярно-эпидемиологическими исследованиями, включая южные регионы Казахстана, Кавказ и Среднюю Азию [101]. На сегодняшний день методы полимеразной цепной реакции в реальном времени (ОТ-кПЦР-РВ) являются основным инструментом лабораторной диагностики, благодаря высокой чувствительности, специфичности и возможностям стандартизации [102].

Наиболее часто используемые универсальные тест-системы ориентированы на выявление сегмента 10 генома вируса, кодирующего неструктурный белок NS3/NS3a. Этот сегмент высококонсервативен среди всех известных серотипов BTV, что делает его идеальной мишенью для первичного скрининга. Например, тест-система ID Gene® BTV Duplex RT-qPCR (IDvet, Франция) продемонстрировала высокую чувствительность (<10 копий РНК/реакция) и успешно применяется в рамках европейских программ мониторинга [103]. В условиях стран СНГ, включая Казахстан, она также используется как основной инструмент первичной диагностики в ветеринарных лабораториях, особенно при расследовании вспышек и контроле карантинных мероприятий. Однако, несмотря на высокую эффективность, эти тесты не позволяют дифференцировать серотип вируса, что ограничивает их применимость в эпизоотическом анализе.

В целях типирования широко применяются серотип-специфичные qRT-PCR-системы, таргетирующие сегмент 2 (VP2), отвечающий за антигенную специфику вируса. Данный подход позволяет точно определить конкретный

серотип, что критически важно для отслеживания маршрутов распространения, контроля вакцинации и оценки рисков повторного заноса [104]. Одним из примеров таких систем является VetMAX™ BTV Typing Kit (Thermo Fisher Scientific), который позволяет одновременно обнаруживать до 10 серотипов вируса в мультиплексном формате. Система получила положительную оценку в ходе валидации Европейской референс-лабораторией по блютангу (EURL-BTV) и применяется в ряде стран для серотипизации вируса в полевых условиях [105]. Ограничением остаются высокая стоимость реагентов, необходимость мультиканального оборудования и обучение персонала, что может снижать доступность метода для менее оснащённых лабораторий в Центральной Азии.

Перспективным направлением является разработка и внедрение специфичных RT-qPCR-тестов для отдельных серотипов, циркулирующих в конкретных регионах. Например, в работе 2019 года авторы представили серотип-специфичный qRT-PCR для BTV-9, адаптированный под условия распространения вируса в Восточной Европе, Закавказье и Средней Азии. Этот тест показал высокую чувствительность (до 50 копий РНК/реакция) и может быть использован для точечной диагностики при локальных вспышках [106]. Однако, как и все моносpezifичные тесты, он не охватывает других серотипов, что требует его применения в составе диагностических панелей.

Методика цифровой ПЦР (dPCR) представляет собой современный подход к молекулярной диагностике, обеспечивающий сверхвысокую чувствительность (<5 копий РНК/реакция) и возможность абсолютного количественного анализа без зависимости от стандартных кривых амплификации [107]. Особенно ценно применение dPCR при исследовании субклинических форм инфекции или при необходимости точной калибровки стандартов. Несмотря на это, её внедрение ограничивается высокой стоимостью оборудования и технической сложности, что делает её менее доступной в лабораториях стран СНГ [108].

Сравнительный анализ всех перечисленных методик демонстрирует, что наилучшие результаты достигаются при комбинированном использовании универсальных тестов для первичного выявления вируса [109] и серотип-специфичных систем [110-111] для детального эпизоотического анализа. Такая стратегия позволяет эффективно отслеживать циркуляцию вируса, прогнозировать риски и разрабатывать таргетированные меры по биозащите. Рекомендации Европейского агентства по безопасности продуктов питания (EFSA, 2021) и Всемирной организации здравоохранения животных (ВОАН) подчёркивают необходимость внедрения именно комплексного подхода в регионах, характеризующихся полисеротипной циркуляцией и высокой вероятностью заноса вируса с сопредельных территорий [112].

Таким образом, современные ПЦР-тест-системы, доступные на сегодняшний день, представляют собой надёжную платформу для выявления и мониторинга вируса блютанга. Однако их эффективность в конкретной стране или регионе зависит от эпизоотической ситуации, финансирования,

кадрового потенциала и технического оснащения лабораторий. В условиях Центральной Азии приоритетной задачей остаётся адаптация международных методик под местные реалии и разработка собственных валидированных решений на основе актуальных штаммов вируса.

## **2. Материалы исследования**

### **2.1 Объект исследования**

Объекты исследования — кровь животных, гомогенаты насекомых-переносчиков, РНК BTV.

### **2.2 Сбор биологических образцов**

Сбор биологических образцов проводился с целью последующей валидации разработанной ПЦР-тест-системы, предназначенной для выявления BTV. В рамках этого процесса в качестве положительных контролей были использованы ранее заархивированные образцы, которые показали положительный результат на наличие РНК BTV при предыдущих мониторинговых исследованиях, проведённых в период с 2018 по 2020 годы.

Для подтверждения чувствительности и специфичности новой ПЦР-тест-системы были дополнительно использованы образцы РНК, выделенные из вакцинных препаратов, содержащих известные серотипы вируса блютанга — BTV-4 и BTV-14. Это позволило проверить корректность выявления конкретных генотипов вируса в условиях лабораторного моделирования.

Также в целях оценки специфичности тест-системы проводился анализ архивных ПЦР-положительных образцов, содержащих генетический материал вирусов, как родственных, так и неродственных BTV. Эти образцы были предварительно протестированы с использованием праймеров, нацеленных на 2-й и 10-й сегменты генома BTV, что позволило определить возможность перекрёстной реакции и убедиться в высокой специфичности разрабатываемой методики.

Учитывая эпизоотологическую ситуацию и зарегистрированные ранее риски заноса и распространения вируса блютанга, особое внимание было уделено регионам с наибольшей вероятностью циркуляции вируса, а именно: Жамбылской, Туркестанской и Алматинской областям. В этих регионах были организованы выезды полевых групп с целью отбора проб биологического материала. Отбор включал забор крови у сельскохозяйственных животных, преимущественно представителей семейства полорогих, а также сбор потенциальных переносчиков вируса — насекомых, как компетентных, так и механических.

В общей сложности в исследование было включено 582 образца от животных, из которых 520 (89%) были получены от овец, 27 (4,6%) — от коз, 11 (1,9%) — от коров и 24 (4,1%) — от верблюдов. Кроме того, было собрано 266 экземпляров насекомых-переносчиков.

### 3. Методы исследования

#### 3.1 Выделение нуклеиновых кислот и обратная транскрипция

Собранные насекомые, отнесённые к потенциальным переносчикам (BTV), были объединены в пулы в зависимости от места и времени сбора, а также по морфологическим признакам. Для последующего анализа каждый пул насекомых подвергался механической деструкции с целью получения гомогенатов. Гомогенизация осуществлялась с использованием высокоэффективного герметичного гомогенизатора Homogenizer Mixer Mill MM 400 (Retsch). Обработка проводилась в течение 5 минут при частоте 25 Гц. Для повышения эффективности разрушения тканей в пробирки с образцами добавлялись три стеклянных размольных шарика и 600 мкл стерильного фосфатно-солевого буфера (PBS), что обеспечивало достаточное разжижение биологического материала и сохранение РНК в стабильной форме.

После гомогенизации образцы подвергались центрифугированию при  $10\,000 \times g$  в течение 1 минуты при температуре  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Полученный супернатант использовался для дальнейшей экстракции РНК.

Выделение РНК из крови животных и из гомогенатов насекомых осуществлялось с применением реагента TRIzol (Sigma-Aldrich) в соответствии с протоколом, предоставленным производителем. TRIzol обеспечивает эффективный лизис клеток, инактивацию нуклеаз и разделение фаз для извлечения чистой РНК. На этапе анализа качества и количества выделенной РНК проводилось спектрофотометрическое измерение оптической плотности растворов на приборе NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, США). Оценка чистоты РНК осуществлялась по соотношению оптической плотности при длинах волн 260/280 и 260/230 нм.

Для последующего проведения ПЦР-исследований требовалась обратная транскрипция выделенной РНК в комплементарную ДНК (кДНК). Этот этап выполнялся с использованием фермента обратной транскриптазы M-MLV (SibEnzyme), обеспечивающей синтез кДНК на основе РНК-матрицы. Каждая реакционная смесь содержала 10 мкл выделенной РНК, 1 мкл случайных гексамерных праймеров (Random Hexamers, Thermo Fisher Scientific) и 9 мкл реакционного раствора, включающего необходимые буферы, дНТФ и обратную транскриптазу. Реакция обратной транскрипции проходила в три этапа: первичная инкубация при  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 10 минут (для гибридизации праймеров), затем основной этап синтеза кДНК при  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 60 минут, после чего смесь прогревали при  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 10 минут для инактивации фермента.

Полученная кДНК использовалась в качестве матрицы для дальнейших амплификационных реакций в режиме ПЦР с целью детекции РНК BTV и оценки эффективности разработанного прототипа тест-системы.



### 3.2 Анализ ПЦР

Для валидации разрабатываемой ПЦР тест-системы были сформированы коллекции биологических образцов положительные и отрицательные по присутствию РНК BTV. Для этого, собранные образцы РНК, выделенные из крови животных и гомогенатов насекомых-переносчиков BTV, анализировали методом классической ПЦР. Первая реакция ПЦР была выполнена с использованием внешних праймеров “BTV-S10-F” и “BTV-S10-R”, нацеленных на десятый сегмент дцРНК, кодирующий поверхностные белки вируса NS3/3A [113]. Для второй реакции использовались две пары внутренних праймеров “BTV\_Seg10\_F” и “BTV\_NS3\_R” [113,114]. Кроме того, для детекции вируса BTV серотипа 9 “West” была проведена ПЦР с использованием праймеров “BTV-9W-S2-F” и “BTV-9W-S2-R”, нацеленных на второй сегмент дцРНК вируса, кодирующий основной поверхностный белок вируса VP2 [115]. Последовательность вышеуказанных праймеров указана в таблице 1.

Таблица 1 – Последовательность праймеров для детекции и типирования BTV-9W методом классической ПЦР

Название праймера	Последовательность праймера
BTV-S10-F	(5')CATCATCACGAAACGCTTC
BTV-S10-R	(5')ACCTYGGGGCGCCACTC
BTV_Seg10_F	(5')TGCTATCCGGGCTGATCCAAA
BTV_NS3_R	(5')GCGTACGATGCGAATGCAGC
BTV-9W-S2-F	(5')GGAATGTGTCAAGTCTATCAG
BTV-9W-S2-R	(5')GTCCTCCACATAGTGACG

Амплификация выполнялась с использованием Hot-Start Taq ДНК-полимеразы (NEB) по методике, рекомендованной производителем. Условия амплификации были следующими: 95°C в течение 5 минут, затем 94°C в течение 30 секунд, 54°C в течение 30 секунд, 72°C в течение одной минуты, далее 5 минут при 72°C. Всего было выполнено 40 циклов. Продукты ПЦР анализировали методом электрофореза в 1,5% агарозном геле и визуализировали под УФ-светом.

### 3.3 Конструирование праймеров и зондов qPCR, их синтез и очистка

Для создания высокоспецифичной и чувствительной тест-системы на основе обратной транскрипции с последующей количественной полимеразной цепной реакцией в реальном времени (RT-qPCR), был проведен анализ *in silico* для разработки праймеров и зондов. Целью данного этапа являлась идентификация участков вирусного генома, обладающих высокой степенью консервативности внутри целевого топотида BTV, с минимальной вероятностью перекрёстной гибридизации с генетическим материалом родственных и неродственных вирусов.

На первом этапе анализа использовалась программная платформа MEGA-X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) [116], предназначенная для множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей и построения филогенетических деревьев. С помощью данного программного обеспечения были выявлены высококонсервативные фрагменты нуклеотидных последовательностей в пределах целевого сегмента генома BTV, характерные для выбранного топотипа. Эти участки были рассмотрены как потенциальные мишени для связывания праймеров и зондов.

Далее, для оценки структурной стабильности проектируемых олигонуклеотидов и исключения формирования вторичных структур (шпильек, димеров, петлевых элементов), а также для прогнозирования возможных межмолекулярных взаимодействий между праймерами и зондами, был использован программный пакет RNAstructure 6.0.1, разработанный Национальными институтами здравоохранения США (NIH) [117]. Это позволило исключить конструкции, склонные к самокомплементарности или образованию нежелательных гетеродимеров, способных повлиять на эффективность амплификации и флуоресцентный сигнал.

Температурные характеристики праймеров, в частности температура отжига ( $T_m$ ), были рассчитаны с применением инструмента  $T_m$  Calculator (Thermo Fisher Scientific) [118]. Оптимизация  $T_m$  обеспечила эффективную работу праймеров в одинаковом температурном диапазоне и позволила снизить риск неспецифического связывания с матрицей или другими компонентами реакционной смеси.

После окончательной верификации проектных параметров, отобранные последовательности праймеров и зондов были направлены на синтез. Синтез олигонуклеотидов осуществлялся на автоматическом синтезаторе олигонуклеотидов в лаборатории органического синтеза ТОО «Национальный центр биотехнологии». Для обеспечения высокой чистоты и точности последовательностей синтезированные олигонуклеотиды прошли процедуру очистки методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Это позволило удалить побочные продукты синтеза и повысить эффективность флуоресцентного считывания в ходе ПЦР.

### 3.4 Приготовление компетентных клеток *E. coli*

Для трансформации ДНК в *E. coli* часто применяется метод приготовления химически компетентных клеток с использованием солей рубидия, марганца и кальция. Для этого необходимо отдельную бактериальную колонию штамма DH5 Alpha инокулируют в 5 мл жидкой среды Лурии-Бертани (LB) без добавления антибиотика ампициллина и инкубируют при 37°C в течение ночи. Далее 200  $\mu$ l ночной культуры добавляют в 200 мл свежей LB-среды без ампициллина. Культуру инкубируют при 37°C с аэрацией до достижения оптической плотности при 600 нм ( $OD_{600}$ ) в пределах 0,4–0,6, что соответствует стадии экспоненциального роста. После

достижения необходимой плотности клетки охлаждают в течение 15 минут при 4°C. Далее культуру центрифугируют при 4000–4500 об/мин в течение 12 минут при 4°C. Супернатант удаляют, осадок ресуспендируют в 16,5 мл RF I буфере и инкубируют в течение 15 минут при 4°C. После инкубации клетки снова центрифугируют при тех же условиях (12 минут, 4000–4500 об/мин, 4°C), затем осадок ресуспендируют в 4 мл буфера RF II. После пятнадцатиминутной инкубации клеточной суспензии во льду смесь распределяют по предварительно охлажденным и стерильным пробиркам по 300  $\mu$ l. Для увеличения выживаемости клеток рекомендуется проводить заморозку жидким азотом. Клеточные суспензии хранятся при -70°C. Методика приготовления буферов RF I и RF II представлен в таблице 2.

Таблица 2 - Методика приготовления буферов RF I и RF II для приготовления компетентных клеток *E. coli*

<b>RF I</b>		<b>RF II</b>	
	<b>на 500 мл</b>		<b>на 100 мл</b>
1M KAc (pH = 7,5)	15 мл	0,5 M MOPS pH = 6,8	2 мл
RbCl	6 г	RbCl	0,12 г
MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	4,95 г	CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,75 г
Глицерин	75 г	Глицерин	15 г
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,75 г		
pH довести до 5,8 (0,1 н NaOH).		pH довести до 6,8 (0,1 н NaOH).	

### 3.5 Клонирование амплифицированных сегментов 2 и 10 в векторные системы и трансформация компетентных клеток

Для подтверждения специфичности и последовательностной точности амплифицированных фрагментов ДНК, а также с целью создания стабильных клонов для дальнейшего секвенирования и анализа, было выполнено молекулярное клонирование ПЦР-продуктов. Клонирование осуществлялось с использованием коммерческого набора TOPO™ TA Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific, США) в строгом соответствии с протоколом, предложенным производителем. Для этого к 2  $\mu$ l ПЦР-продукта добавляли 0,6  $\mu$ l стерильной воды, 0,7  $\mu$ l солевого раствора и 0,7  $\mu$ l вектора pCR™2.1-TOPO. После реакционную смесь инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре. Общий объем смеси составлял 20  $\mu$ l.

На предварительном этапе ампликоны, полученные в результате ПЦР, были разделены с помощью агарозного гель-электрофореза и визуализированы с применением интеркалирующих красителей. Целевые фрагменты были аккуратно вырезаны из геля и подвергнуты элюированию с использованием стандартных гель-экстракционных методик. Полученные очищенные ампликоны использовались для прямого клонирования в коммерчески доступный линейаризованный вектор pCR™2.1-TOPO,

содержащий липкие концы, что позволяет эффективно лигировать ампликоны, синтезированные с использованием Taq-полимеразы.

Процесс трансформации рекомбинантных плазмид в компетентные клетки *E. coli* штамма DH5 Alpha был проведен методом теплового шока. Суспензии трансформируемых клеток инкубировали со смесью плазмид при температуре +4 °C, после чего подвергали кратковременному нагреву при температуре +42 °C в течение 90 секунд, что способствовало проникновению плазмидной ДНК внутрь бактериальных клеток. Затем клетки высевали на селективные агаровые чашки, содержащие антибиотик и соответствующие индикаторные субстраты для отбора положительных клонов (X-Gal и IPTG).

Для анализа полученных рекомбинантных конструкций и картирования вставок была использована специализированная программная среда Vector NTI 8 (Thermo Fisher Scientific), предназначенная для биоинформатической работы с векторами, вставками и аннотированными последовательностями. Данный инструмент позволил выполнить виртуальное картирование, подбор праймеров для секвенирования и анализ множественных клонированных образцов.

### 3.6 Секвенирование ДНК по Сэнгеру

С целью подтверждения точности амплифицированных и клонированных фрагментов ДНК, а также для окончательной верификации целевой нуклеотидной последовательности, было проведено прямое секвенирование полученных рекомбинантных плазмид. В качестве платформы для секвенирования использовался автоматический капиллярный генетический анализатор ABI 3500xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems), обеспечивающий высокую точность прочтения нуклеотидных последовательностей в режиме Sanger-секвенирования.

Реакции секвенирования проводились с использованием коммерчески доступного набора BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), содержащего флуоресцентно меченые дидезоксинуклеотиды (ddNTPs), фермент Taq DNA-полимеразу и буферный раствор. Общий объем реакционной смеси составляет 7,5µl, включающего в себя 3µl BigDye Terminator 3.1, 0,5µl Sequencing Buffer 5x, 0,25µl воды и 3,25µl ДНК. Композиция набора позволяет эффективно выполнять цепную реакцию с прекращением удлинения цепи, необходимую для получения сигнала при детекции оснований.

Каждая реакционная смесь включала очищенную плазмидную ДНК в качестве матрицы, специфические праймеры, реагенты набора BigDye, а также соответствующие буферы. Секвенс-реакции проводились в термоциклере с соблюдением температурного профиля, рекомендованного производителем, включающего стадии денатурации, отжига праймеров и удлинения цепи.

Результирующие последовательности сравнивались с ожидаемыми референсными фрагментами с использованием баз данных и инструментов

выравнивания, таких как BLAST (NCBI) и MEGA-X, что позволило оценить соответствие вставки, проверить наличие возможных мутаций или инсерций и подтвердить специфичность амплифицированного и клонированного участка.

### 3.7 Транскрипция *in vitro*

С целью получения стандартизированных РНК-контролей для количественной оценки чувствительности и линейности разработанной RT-qPCR тест-системы были синтезированы транскрипты *in vitro*, представляющие собой точные копии целевых нуклеотидных последовательностей. В качестве матриц для транскрипции использовались рекомбинантные плазмиды, полученные ранее путём молекулярного клонирования ампликонов в вектор pCR™2.1-ТОРО.

Перед началом транскрипции плазмиды подвергались линейризации с использованием фермента рестрикции *EcoRI*. Линейризация обеспечивала точное завершение транскрипции и предотвращала синтез нежелательных транскриптов за пределами целевого участка. Продукты рестрикции проверяли методом гель-электрофореза в агарозном геле, после чего линейные формы плазмид очищались и использовались в качестве шаблонов для синтеза РНК.

Синтез РНК *in vitro* осуществлялся с использованием РНК-полимеразы фага Т7 (Thermo Fisher Scientific), которая иницирует транскрипцию с промотора Т7, встроенного во векторную последовательность вблизи вставки. Реакционная смесь для транскрипции включала линейную плазмидную ДНК 10 µl, NTPs ribo 4 µl, 5x буфер 10 µl, ингибитор РНКаз 0.5 µl и Т7-полимеразу 1 µl, в соответствии с инструкциями производителя. Общий объем реакционной смеси составлял 50 µl. После завершения транскрипции РНК-продукты осаждали с применением 3 М раствора хлорида лития (LiCl), что обеспечивает высокоэффективное осаждение РНК и исключение сопутствующих загрязнений.

Осаждённые и ресуспендированные РНК использовались в качестве положительных контролей на этапах валидации RT-qPCR тест-системы, в частности при построении стандартных кривых и оценке аналитической чувствительности, специфичности и диапазона линейности. Такие контроли позволяли объективно оценить воспроизводимость результатов, а также корректность работы тест-системы при низких концентрациях целевой РНК.

Количественное определение концентрации полученных транскриптов проводилось с использованием флуориметра Qubit™ (Invitrogen) и специализированного набора Qubit™ RNA High Sensitivity (HS) Assay Kit. Метод основан на применении флуоресцентного красителя, селективно связывающегося с РНК, что обеспечивает высокую точность и чувствительность измерений, особенно при низких концентрациях нуклеиновых кислот. Измерения проводились строго в соответствии с протоколом производителя, с построением калибровочной кривой на основе стандартов, входящих в состав набора.

### 3.8 Отработка прототипа ОТ-ПЦР тест-системы в режиме реального времени

Для выполнения ОТ-кПЦР реакции применялся подход, обеспечивающий высокую чувствительность и специфичность амплификации РНК-мишеней. Реакция была реализована с использованием отечественной обратной транскриптазы М-MLV-RT (модифицированная обратная транскриптаза молочнолифотропного вируса, собственного производства) и HotStart-Taq ДНК-полимеразы (СибЭнзим), обладающей повышенной термостабильностью и специфической активацией при высоких температурах, что снижает уровень неспецифической амплификации.

Реакционная смесь готовилась на основе стандартного буферного раствора HS-Taq buffer (СибЭнзим), адаптированного для проведения двухэтапной реакции (синтеза кДНК и амплификации). Для повышения эффективности ферментативных процессов и стабилизации белков в составе реакции дополнительно использовали 0,15 мг/мл BSA, обладающий способностью связывать ингибиторы и улучшать воспроизводимость результатов. Концентрация дезоксинуклеозидтрифосфатов (дНТФ) в реакционной смеси составляла 0,5 мМ каждого нуклеотида, а магния хлорида ( $MgCl_2$ ) — 2 мМ, что соответствовало оптимальным условиям для работы как обратной транскриптазы, так и Taq-полимеразы.

Для обеспечения высокой специфичности детекции мишени применялась гибридизация с использованием зондов TaqMan, меченых флуорофором и гасителем, в концентрации 100 нМ. Пары прямого и обратного праймеров добавлялись в конечной концентрации по 400 нМ, что позволяло достичь эффективного отжига и удлинения даже при низком содержании мишени РНК.

В качестве матрицы использовали тотальную РНК, выделенную из исследуемых биологических образцов, также синтетические контрольные РНК, полученные *in vitro*. Концентрационный диапазон введённой РНК составлял от 1 фемтограмма (фг) до 1 нанограмма (нг) на реакцию, что обеспечивало моделирование условий с различной вирусной нагрузкой и позволяло оценить чувствительность тест-системы вплоть до предела детекции.

### 3.9 Статистический анализ

Статистическая обработка экспериментальных и эпидемиологических данных проводилась с использованием специализированного программного обеспечения EpiInfo (CDC) [119], предназначенного для анализа данных в области общественного здравоохранения и биомедицинских исследований.

Для оценки точности долей и пропорций, в частности при расчете частоты положительных образцов и оценки чувствительности/специфичности

тест-системы, использовались доверительные интервалы (ДИ) с уровнем достоверности 95%. Расчёт 95% доверительных интервалов осуществлялся по методу Клоппера–Пирсона, основанному на интервальном оценивании параметров биномиального распределения через функцию неполного бета-распределения. Данный метод обеспечивает консервативную и строгую оценку границ доверительного интервала, особенно в случаях малых выборок и низкой частоты событий.

Для выявления статистически значимых различий между независимыми выборками, в том числе при сравнении средних значений количественных показателей (например, уровня экспрессии, концентрации РНК или числа положительных реакций), применялся непараметрический t-критерий Стьюдента для независимых выборок. Предварительно проводилась оценка нормальности распределения данных и однородности дисперсий. Критический уровень значимости (альфа-уровень) для всех статистических процедур был установлен на уровне  $p < 0,05$ , что соответствовало общепринятым стандартам биомедицинской статистики. При достижении данного уровня или более низких значений  $p$ , различия между сравниваемыми группами интерпретировались как статистически значимые.

## 4. Результаты исследования

### 4.1 Сбор биологических образцов

Сбор биологических образцов крови и сывороток животных, а также компетентных и механических переносчиков ВТВ был проведен в Жамбылской, Туркестанской и Алматинской областях Республики Казахстан, так как данные области являются наиболее рисковыми по распространению вируса блютанга. Моделирование риска распространения показало, что передача вируса наиболее вероятна в южных регионах весной и летом, с максимальным риском распространения в июле, и практически отсутствует в зимний период. Факторами риска распространения являются высокая плотность восприимчивого скота, благоприятные климатические условия для размножения переносчиков и импорт животных из эндемичных регионов. Места отбора проб у животных и точки сбора потенциальных векторов ВТВ представлены на рисунке 4.

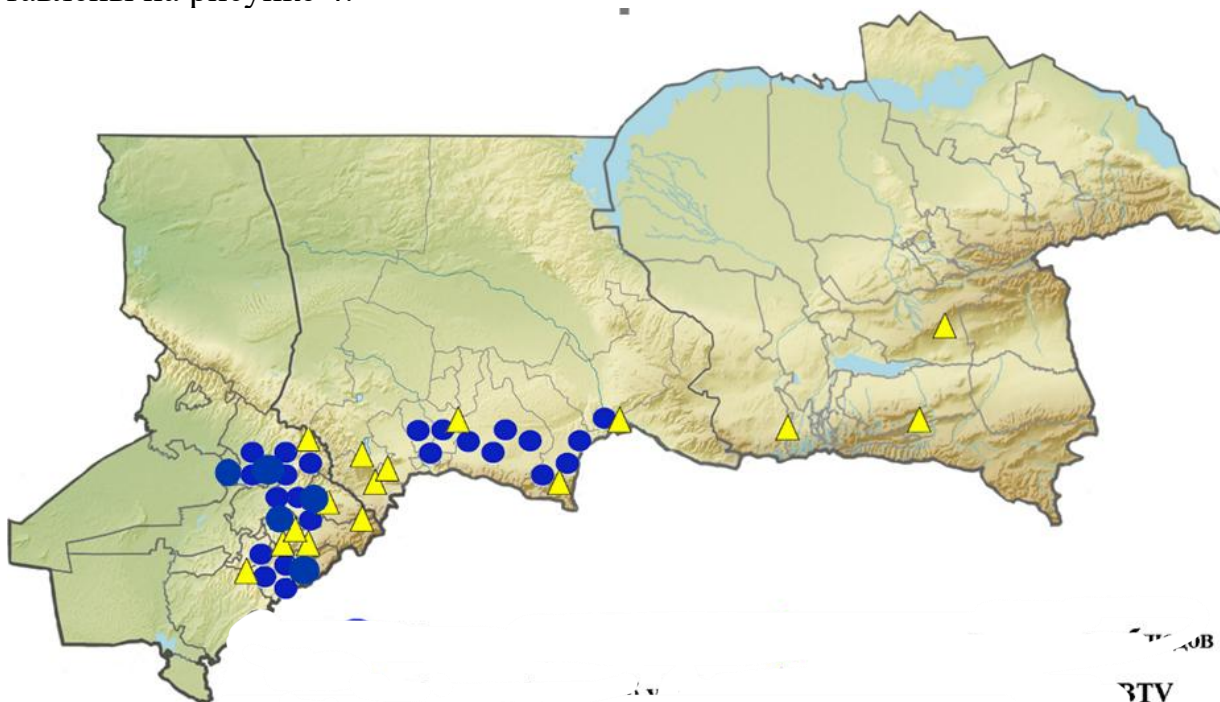


Рисунок 4 - Места отбора проб у животных и точки сбора потенциальных векторов вируса блютанга

В исследование были включены образцы от 520 овец, являющихся наиболее восприимчивых к вирусу блютанга животными, 11 коров, 27 коз и 24 верблюдов. Данные по образцам от восприимчивых к ВТВ животных представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Данные по собранным образцам от восприимчивых к ВТВ животных

Вид	Область	Район	Количество
Овцы ( <i>Ovis aries</i> )	Жамбылская	Байзакский	78



	Туркестанская	Жамбылский	3
		Меркенский	38
		Турар Рыскулов	85
		Байдибекский	118
		Казыгуртский	118
		Сайрамский	80
Козы ( <i>Capra hircus</i> )	Жамбылская	Турар Рыскулов	3
	Туркестанская	Байдибекский	6
		Казыгуртский	7
		Сайрамский	11
Коровы ( <i>Bos tartus</i> )	Туркестанская	Байдибекский	4
		Казыгуртский	2
		Сайрамский	5
Верблюды ( <i>Camelus dromedarius</i> )	Туркестанская	Отрарский	24

Также в исследовании были задействованы образцы от насекомых переносчиков в общей сложности 266 экземпляров. Данные по собранным насекомым-переносчикам представлены таблице 4.

Таблица 4 - Данные по собранным потенциальным насекомым-переносчикам ВТВ.

Область	Район	Переносчик	Надвид (вид)	Кол-во	Пулы
Алма-тинская	Панфиловский	Мокрецы рода <i>Culicoides</i>	<i>Trithecoides</i> spp.	21	1
			<i>Hofmania</i> spp.	40	1
			<i>Oaecata</i> spp.	27	1
			<i>Avaritia</i> spp.	15	1
	Карасайский	Кровососки	<i>Hippobosca equina</i>	3	1
Жамбыл-ская	Шуйский	Мокрецы рода <i>Culicoides</i>	<i>Culicoides</i> spp.	22	1
	Меркенский		<i>Culicoides</i> spp.	15	1
	Байзакский		<i>Culicoides</i> spp.	6	1
	Жуалынский		<i>Culicoides</i> spp.	40	2
Туркес-танская	Тюлькубасский	Мокрецы рода <i>Culicoides</i>	<i>Remia</i> spp.	7	1
	Толебийский		<i>Culicoides</i> spp.	24	1
	Казыгуртский	Кровососки	<i>H. equina</i>	3	2
	Толебийский		<i>H. equina</i>	37	15
	Байдибекский		<i>H. equina</i>	1	1
	Сайрамский		<i>H. equina</i>	5	4
ИТОГО:				266	34

## 4.2 Детекция ВТВ

Из образцов цельной крови сельскохозяйственных животных, а также из гомогенатов кровососущих двукрылых насекомых, собранных в эндемичных по блютангу регионах, была выделена тотальная РНК с применением реагента TRIzol, в строгом соответствии с рекомендациями производителя. Качество и чистота выделенной РНК оценивались с помощью спектрофотометрического анализа на приборе NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). Все образцы

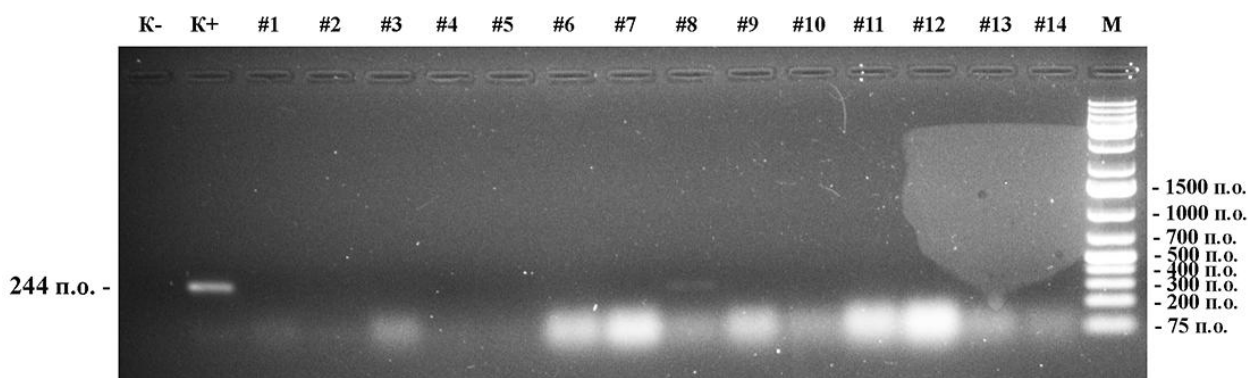
продемонстрировали значения отношения оптической плотности  $A^{260/280} > 1,7$ , что свидетельствует о достаточной степени очистки от белковых примесей и пригодности образцов для последующего анализа ОТ-ПЦР.

Для выявления генетического материала BTV была проведена амплификация РНК-мишени с использованием специфической пары праймеров “BTV-Seg10-F / BTV-NS3-R”, направленных на 10-й сегмент вирусного генома, кодирующий белок NS3. Ожидаемый размер амплифицированного фрагмента составлял 244 пар оснований, что подтверждалось электрофоретическим анализом продуктов амплификации в агарозном геле.

По результатам ОТ-ПЦР был выявлен один ПЦР-положительный пул насекомых, включающий 24 особи мокрецов рода *Culicoides*, собранных в Туркестанской области. Если учесть, что в исследовании было задействовано 271 особей данного рода мокрецов, то превалентность составила 0,46% (95% ДИ: 0,01–2,54%). Дополнительно, одна особь лошадиной кровососки, собранная в том же географическом районе, также дала положительный результат на присутствие РНК BTV. Превалентность составила 2,04% (1/49; 95% ДИ: 0,05–10,85%)

Из числа образцов РНК, выделенных из крови животных, восприимчивых к BTV, были также зарегистрированы положительные случаи в двух южных регионах Казахстана. В частности, в Жамбылской области был выявлен один ПЦР-положительный образец, тогда как в Туркестанской области — два положительных образца. Все случаи заражения были зафиксированы у овец, что соответствует известной биологии заболевания и восприимчивости этого вида к инфекции BTV.

На рисунке 5 представлен результат гель-электрофореза, демонстрирующий наличие специфического ампликона в образце РНК из гомогената кровососки под номером 8, подтверждающий инфицированность одного из насекомых переносчиков.



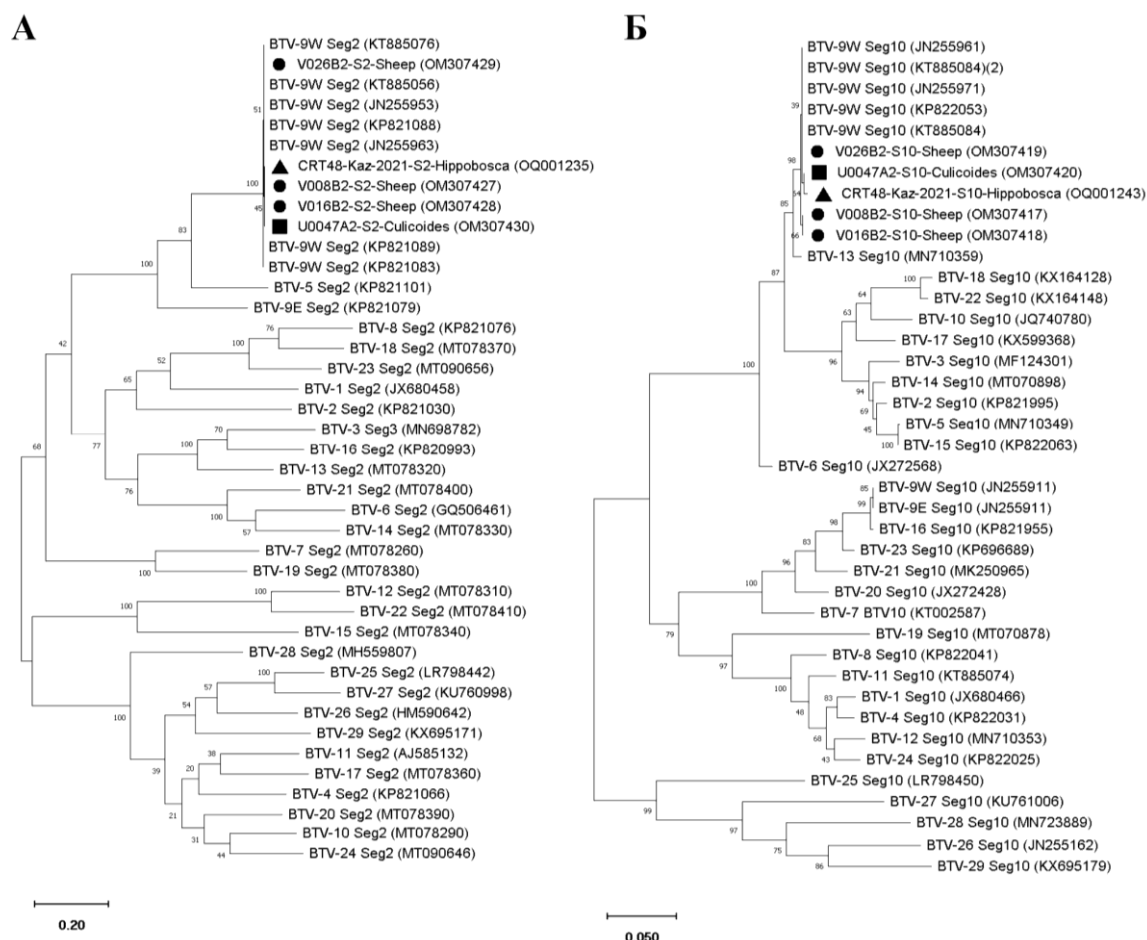
Обозначения: М – ДНК-марке 1kb; «К+» - положительный контроль; «К-» - отрицательный контроль для ОТ-ПЦР; #1–#14 – образцы РНК, выделенные из гомогенатов мух-кровососок.

Рисунок 5 – Электрофоретический анализ в 1,5% агарозном геле продуктов ОТ-ПЦР образцов РНК, выделенных из *Hippobosca equina*

### 4.3 Генетическая характеристика BTV

Для построения филогенетического дерева все выявленные изоляты были частично секвенированы по двум сегментам РНК BTV: Seg-2 и Seg-10, кодирующих соответственно главный и второстепенный поверхностный белки. Именно продукты этих геномных сегментов определяют соответствующий серотип и генотип вируса.

Для первичного установления серотипа были отсекуированы амплификаты, направленные на Seg-10 BTV с последующим проведением BLAST-анализа. Все изоляты были отнесены к серотипу 9. Для определения топотипа вируса и возможности проведения филогенетического анализа были получены амплификаты с использованием праймеров “BTV-9W-2F”/ “BTV-9W-2R”, направленных на Seg-2. Все выявленные вирусы BTV по данным филогенетического анализа, проведенного по двум локусам, были отнесены к мезогенному вакциноподобному топотипу ‘West’ серотипа 9, который крайне редко вызывает серьезные клинические проявления у скота. По результатам проведенного филогенетического анализа были построены филогенетические деревья, представленных на рисунке 6.



Обозначение: А – Филогенетическое дерево по участку (887 п.о.) Seg-2 BTV. Б – Филогенетическое дерево по участку (690 п.о.) Seg-10 BTV. Кругами обозначены изоляты BTV из крови овец, квадратом – из гомогената мокрецов *Culicoides* sp., треугольником – из гомогената *Hippobosca equina*.

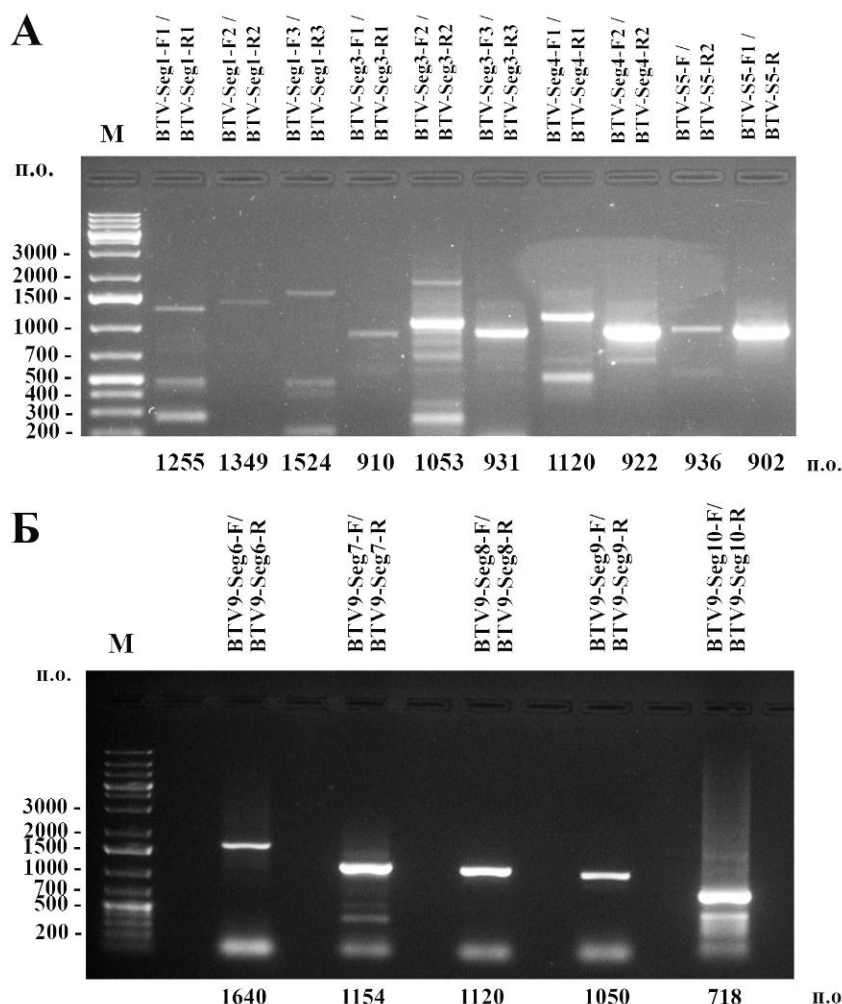
Рисунок 6 – Результаты филогенетического анализа последовательностей участков Seg-2 и Seg-10 вируса блютанга

Тем не менее, учитывая, что реовирусы склонны к появлению ревертантов, содержащих генетический материал различных серотипов, необходимо удостовериться, что циркулирующий по территории Южного Казахстана серотип BTV не является ревертантом. Для этих целей для одного изолятов вируса, выявленного в лошадиной кровососке *H. equina* было получено полное перекрытие амплификацией всего вирусного генома с использованием праймеров, представленных в таблице 5. После чего было проведено секвенирование по Сэнгеру всех десяти сегментов вирусного генома. Электрофоретический анализ амплификации всех сегментов изолята BTV представлен на рисунке 7.

Таблица 5 – Праймеры классической ПЦР, использованные для перекрытия вирусного генома BTV

№	Название праймера	Последовательность праймера	Мишень
1	BTV-Seg1-F1	(5')GTAAAAATGCAATGGTCGCAATC	Seg1
2	BTV-Seg1-R1	(5')TCCCGCGTTAAATCCGAAAC	Seg1
3	BTV-Seg1-F2	(5')AACWATTACYGGATATGGCAG	Seg1
4	BTV-Seg1-R2	(5')CTGATGAGATRATCATCATACGATC	Seg1
5	BTV-Seg1-F3	(5')CAATGATGACRCCWTATTCTGT	Seg1
6	BTV-Seg1-F3	(5')CAATGATGACRCCWTATTCTGT	Seg1
7	BTV-Seg3-F1	(5')GTAAATTTCCGTAGCCATGGC	Seg3
8	BTV-Seg3-R1	(5')GGTAAGCACGTTGCTATATTCAT	Seg3
9	BTV-Seg3-F2	(5')CAAGTAGTGTGGGATGTGCC	Seg3
10	BTV-Seg3-R2	(5')ATCTGGRAACCTTCTCTGCATCA	Seg3
11	BTV-Seg3-F3	(5')GTGATGAARGTAGATATGCGACA	Seg3
12	BTV-Seg3-R3	(5')GTAAGTGTGTTCCCGCTGC	Seg3
13	BTV-Seg4-F1	(5')GTAAAAACATGCCTGAGCCAC	Seg4
14	BTV-Seg4-F2	(5')GTAGATCGYCACATGCATCC	Seg4
15	BTV-Seg4-R2	(5')CATGCCCCCTCACCTAG	Seg4
16	BTV-S5-F	(5')GTAAAAAAAGTTCTCTAGTTGGCA	Seg5
17	BTV-S5-R	(5')GTAAGTTGAAAAGTTCTAGTAGAG	Seg5
18	BTV-S5-R2	(5')TCACCYGATCTYCTACCCG	Seg5
19	BTV-S5-F1	(5')TGATRAGACGCGATTTCCCAAC	Seg5
20	BTV9-S6-R1	(5')AGTATGGTAGATACAACGCTCGG	Seg6
21	BTV9-S6-F1	(5')AAATGCGCTGAGCGGAATTG	Seg6
22	BTV9-S6-F	(5')CCCTTAGCGRAGATGGGTAAAGTCATACG	Seg6
23	BTV9-S6-R	(5')GTAAGTGTAAGYGCTTCCCRCTCGCTGCGT T	Seg6
24	BTV-S7-F	(5')GTAAAAATCTATAGAGATGGAC	Seg7
25	BTV-S7-R	(5')GTAAGTGTAATCTAAGAGACGT	Seg7

26	BTV-S8-F	(5')GTAAAAAAWCCTTGAGTCATG	Seg8
27	BTV-S8-R	(5')GTAAGTGTAATAATCCCCCCC	Seg8
28	BTV-S9-F	(5')GTAAAAAATCGCATATGTCAG	Seg9
29	BTV-S9-R	(5')GTAAGTGTAATAATCCCCCCC	Seg9
30	BTV-Seg10-F	(5')TGCTATCCGGGCTGATCCAAA	Seg10
31	BTV-S10-R	(5')ACCTYGGGGCGCCACTC	Seg10



Обозначения: А – Амплификаты с Seg-1 по Seg-5. Б – Амплификаты с Seg-6 по Seg-10. Сверху под дорожками указаны праймеры, использованные для амплификации, а снизу под дорожками – размеры ожидаемых амплификатов. М – ДНК маркер.

Рисунок 7 – Амплификация всего генома изолята BTV CRT48-Kaz-2021, выявленного в *Hippobosca equina* из Туркестанской области

Нуклеотидные последовательности полных геномных сегментов BTV были депонированы в GenBank под номерами с OQ001234 по OQ001243. Результаты BLAST-анализа для каждого из сегмента генома BTV представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Результаты BLAST-анализа для всех геномных сегментов изолята BTV, выявленного в *Hippobosca equina* из Туркестанской области

Сегмент	Серотип	Топо-тип	Ближайший штамм	Номер GenBank	Позиция, нт.	Степень идентичности, %
---------	---------	----------	-----------------	---------------	--------------	-------------------------

Seg-1	BTV-9	w	ITL2003/01	KP820963	1-3944	99,92
Seg-2	BTV-9	w	BTV-9RSA(vacc)	JN255963	1-2921	99,76
Seg-3	BTV-9	w	2766	JX272531	1-2772	99,93
Seg-4	BTV-9	w	2766	JX272532	1-1981	100,0
Seg-5	BTV-9	w	BTV-9RSA(vacc)	JN255966	1-1772	99,98
Seg-6	BTV-9	w	RSArrrr/09	AJ586708	1-1635	100,0
Seg-7	BTV-9	w	BTV-9RSA(WT)	JN255958	1-1156	100,0
Seg-8	BTV-9	w	RSAvvv1/09	AM900374	1-1125	100,0
Seg-9	BTV-9	w	9/RSAvvv1/09	EU220295	1-1049	100,0
Seg-10	BTV-9	w	BTV-9RSA(vacc)	JN255971	1-822	99,64

Таким образом, результаты молекулярно-генетического анализа, проведенного в рамках данного исследования, свидетельствуют о фактической циркуляции вируса блютанга на территории южных регионов Республики Казахстан, в частности в Жамбылской и Туркестанской областях. Данные результаты подчеркивают необходимость усиленного эпизоотологического мониторинга и мероприятий по биобезопасности с целью предотвращения распространения инфекции на новые территории.

#### **4.4 Разработка праймеров и зондов qPCR для детекции и типирования мишеней**

Разработанная ПЦР тест-система основана на использовании двух локусов детекции, обеспечивающих как универсальное выявление BTV, так и его дифференциацию на уровне генетических вариантов. Первый локус нацелен на консервативный участок генома вируса, что позволяет надёжно обнаруживать РНК всех известных серотипов BTV. Вторым локусом, напротив, представляет собой участок с выраженными вариациями последовательностей, специфичный для топотипа BTV-9W, и служит для его дифференциальной идентификации.

В качестве мишени для универсального детектирования BTV был выбран десятый сегмент генома (Seg-10), поскольку он характеризуется наличием как высоко консервативных, так и вариабельных участков нуклеотидной последовательности. Такой выбор обусловлен его важной ролью в формировании вирусных белков, в том числе связанных с антигенными свойствами вируса, и, как следствие, с принадлежностью к определённому топотипу. Установлено, что именно продукт экспрессии Seg-10 участвует в формировании признаков, ассоциированных с топотипом BTV-9W, что делает этот сегмент оптимальным для целей общего выявления вируса.

Для специфического выявления топотипа BTV-9W была выбрана мишень во втором сегменте вирусного генома (Seg-2), который демонстрирует наибольшую степень генетического разнообразия среди всех сегментов BTV. Высокая вариабельность Seg-2 обуславливает его пригодность для дифференциации между различными топотипами и серотипами вируса. Таким

образом, включение данной мишени в тест-систему позволяет проводить точную генетическую типизацию BTV-9W среди других вариантов вируса.

Размер амплифицируемого участка (локуса) в сегменте Seg-10, используемого для детекции РНК BTV, составляет 96 пар оснований (п.о.), что обеспечивает высокую чувствительность и специфичность при проведении ПЦР-анализа. Второй locus, предназначенный для дифференциальной идентификации топотипа BTV-9W и расположенный в составе Seg-2, имеет длину 154 п.о., что является оптимальным для достижения необходимого уровня дифференциации при сохранении эффективности амплификации.

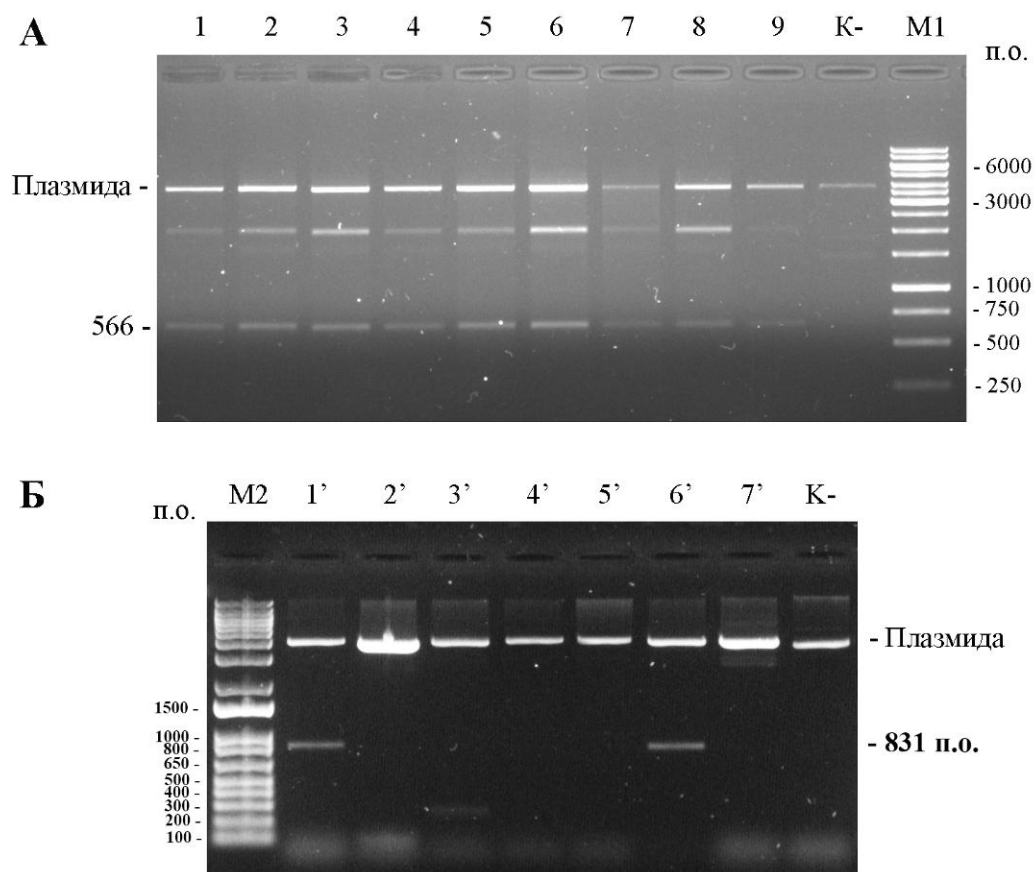
Таким образом, предлагаемая ПЦР-тест-система представляет собой надёжный и высокоэффективный инструмент для молекулярной диагностики вируса блютанга, позволяющий как обнаруживать все известные серотипы вируса, так и проводить дифференциацию его генетических вариантов, включая эпизоотически значимый топотип BTV-9W. Праймеры и зонды представлены в таблице 7.

Таблица 7 - Праймеры и зонды, используемые в наборе реагентов для обнаружения и типирования BTV-9W методом ОТ-кПЦР-РВ.

Название	Последовательность
BTV-9W-S10-qPCR-F	5'-TGGAYAAAGCRATGTCAAA
BTV-9W-S10-qPCR-R	5'-CATCATCACGAAACGCTTC
BTV-9W-S2-qPCR-F	5'-ACCGTTCGGGAAATTCATG
BTV-9W-S2-qPCR-R	5'-GAATGTGTCRAGTCTATCAGC
BTV-9W-S10-qPCR-probe	5'-FAM-GCTGCATTCGCATCGTACGC-BHQ1
BTV-9W-S2-qPCR-probe	5'-JOE-ACCGTTCGCCCCAGTTGAAGAGGCA-BHQ1

#### 4.5 Клонирование участков Seg-2 и Seg-10 BTV-9W и синтез РНК-контролей

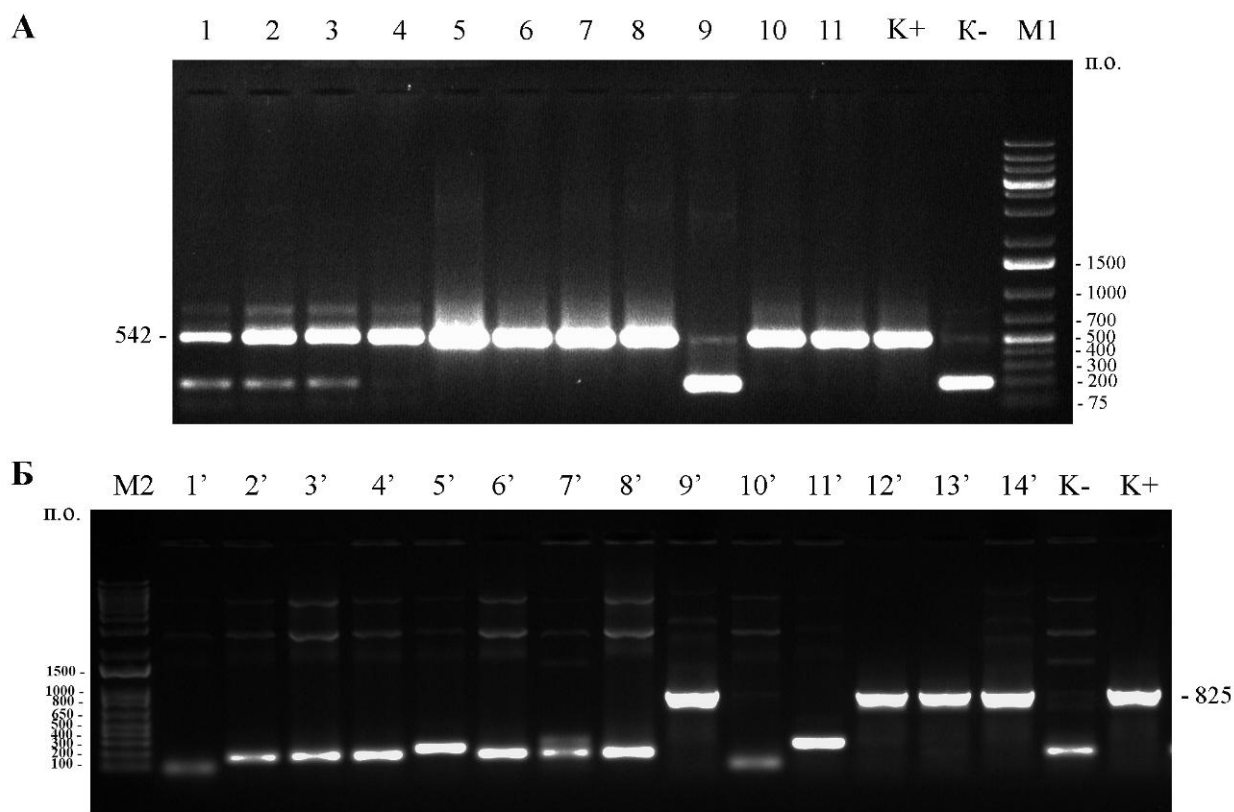
Для получения положительных контролей для тест-системы были клонированы фрагменты вирусного генома, содержащие целевые локусы для детекции и типирования BTV. С этой целью амплификаты размером 825 п.н., синтезированные с использованием праймеров “BTV-S10\_Nhe-Xba-F” (5'-CAGTCGACGTCAGCGTTAAAAAGTGTCTGCTGCCAT) и “BTV-S10\_Sac-Sal\_R” (5'-AATCTAGAGCTCCTCCCCCGTTAKACAGCAG) (Seg-10), и амплификат размером 542 п.н., полученный с использованием праймеров “BTV-9W-2F” и “BTV- BTV-9W-S2-qPCR-R” (Seg-2), были элюированы из агарозного геля и непосредственно клонированы в линейаризованный вектор pCR2.1-TOPO-TA. После лигирования полученные ДНК-клоны анализировались с использованием методов рестрикционного анализа и ПЦР для подтверждения интеграции соответствующих фрагментов ДНК в состав вектора. Данные о проведенных анализах представлены на рисунках 8 и 9 соответственно.



Обозначения: А – Рестрикционный анализ ДНК-клонов с использованием эндонуклеаз *EcoRI* для выявления вставки Seg-2 BTV-9W. Б – Рестрикционный анализ ДНК-клонов с использованием эндонуклеаз *SalI/XbaI* для выявления вставки Seg-10 BTV-9W. M1 – ДНК-маркер GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Sci.); M2 – ДНК-маркер 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Sci.); «К-» - отрицательный контроль (вектор). На дорожках 1-9 – ДНК-клоны после лигирования амплификата Seg-2-BTV9W, на дорожках 1'-7' - ДНК-клоны после лигирования амплификата Seg10-BTV9W.

Рисунок 8 – Рестрикционный анализ ДНК-клонов





Обозначения: А – ПЦР-анализ с праймерами “BTV-9W-2F” / “BTV-Seg2-qPCR-R” для выявления вставки Seg-2 BTV-9W (ожидаемый продукт амплификации - 542 п.о.). Б – ПЦР-анализ с праймерами “BTV-S10\_Nhe-Xba-F” / “BTV-S10\_Sac-Sal\_R” для выявления вставки Seg-10 BTV-9W (ожидаемый продукт амплификации - 825 п.о.). M1 – GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Sci.); M2 – ДНК маркер 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Sci.); «К-» - отрицательный контроль (исходный вектор); «К+» - положительный контроль (ПЦР-положительные кДНК). На дорожках 1-11 – ДНК-клоны после лигирования амплификата Seg2-BTV9W, на дорожках 1'-14' - ДНК-клоны после лигирования амплификата Seg10-BTV9W.

Рисунок 9 – Электрофоретический анализ продуктов ПЦР-анализов ДНК-клонов на наличие вставок «Seg-10 BTV-9W» и «Seg-2 BTV-9W»

Нуклеотидные последовательности клонированных участков ДНК-конструкций pCR2.1-BTV9W-Seg10-825bp и pCR2.1-BTV9W-Seg2-542bp были выверены секвенированием по Сэнгеру. Результаты секвенирования представлены на рисунке 10. В прямом направлении секвенирование проводили с использованием праймера к T7-промотору (5'-TAATACGACTCACTATAGGG), а в обратном направлении – с помощью праймера M13-rev (5'-AGCGGATAACAATTTCACACAGGA). На рисунке 11 представлены карты ДНК-конструкций pCR2.1-T7-BTV9W-Seg10(F)-825bp и pCR2.1-T7-BTV9W-Seg2(F)-542bp.

#### A pCR2.1-BTV9W-Seg10-825bp

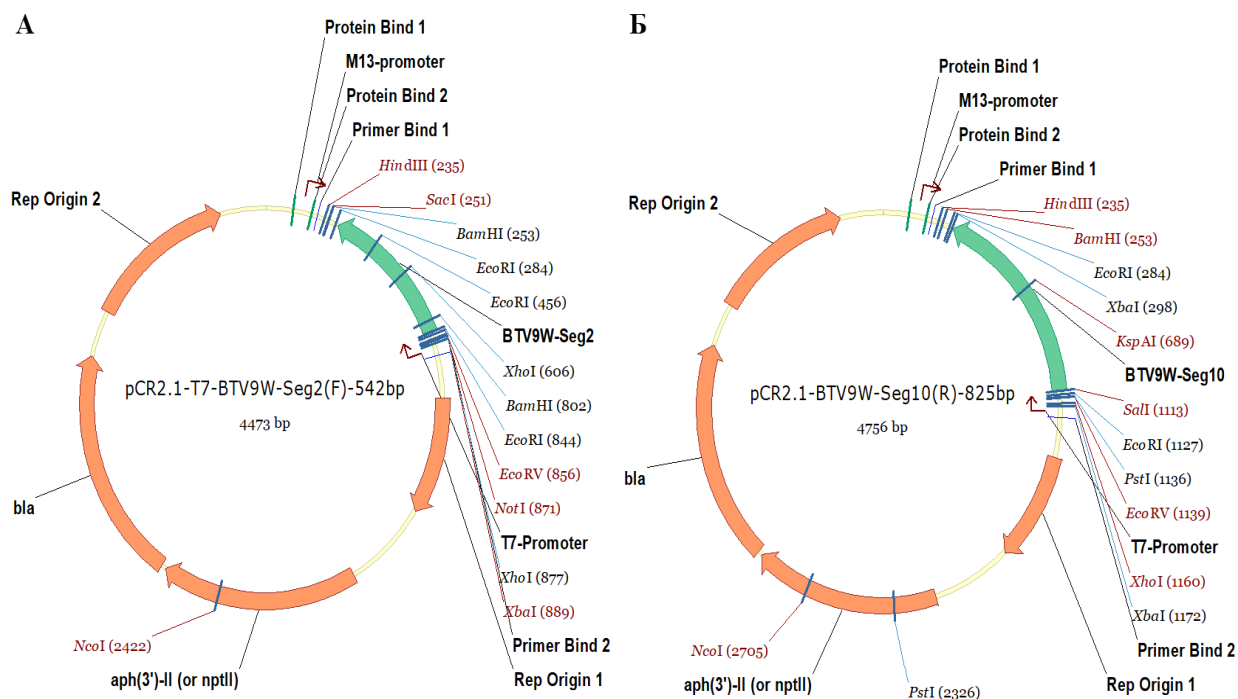
T7→GAATTCGCCCTTCAGTCGACGTCAGCGTTAAAAAGTGTGCTGCCATGCTATCCGGGCTGATCCAAAGGTTCTGAAGAAGAAAAGATGAAACACAATCAAGATAGAGTTGAGGATCTGAGTTTAGTGCGTGTGATGATACCATTTCTCAACCACCGAGGTATGCTCCGACTGCGCCAATGCCATCATCTATGCCGACGGTTGCCCTTGAAATATGGGACAAAGCGATGTCAAAACAACTGGTGCAACGCAAAACACAGAAGGCGGAGAAGGCTGCATTTCGCATCGTACGCTGAAGCGTTTCGTGATGATGTGAGGTTGAGACAAATTAAACGCCATGTAAATGAGCAGATTCTACCCAAACTGAAAAGTGATCTAAGTGGAATTGAAAAAGAAGCGAGCAATCATACATACCACTCTATTGGTAGCAGCTGTGGTTGCGTTGTTAATCATCAGTTTGTACCCTATCAAGTGATATGAGTGTAGCTTTCAAGATAAATGGGACCAAAACGGAAGTGCCTTCGTGGTTTTAAAGCCTAAATCCGATGCTTGGTGTAGTCAATTTGGGAGCAACTTTCTGATGATGGTCTGCGCAAAAAGTGAAAGAGCCTTGAACCAGCAGATTGATATGATAAAGAAAGAAGTGATGAAGAAACAATCTTACAATGATGCGGTGAGGATGAGTTTACAGAGTTCTCGTCAATCCCCTGGATGGTTTTCGAAATGCCATTAACCTGAGGACAGTAGGTAGAGTGGCGCCCCGAGGTTTACGTCGTGCAGGTGGTTGACCTCGCGGCGTAAATTCCTGCTGTATAACGGGGGAGGAGCTCTAGATTAAGGGCGAATTC

#### Б pCR2.1-BTV9W-Seg2-542bp

T7→GAATTCGCCCTTGGAACCGAGATAGCCACAGCGAAAAACGCGGATCCAGCAATAAAGCGAACGTTGGCTCCTTTGATGGATGATCCGGTTATGCTTCAATTACGAACGATCGGAACTTATATGACACTCGCCCTGCCATCATGGGCTCTACGTTATCAGCGCGGCAGGCACAGACATCCCTACATAAGACCTCTTGACGAGGCGGAGAATGGAAGATATTATAGATCGAGAGGTCTCGAGAAGCATGCCAATCCGTGCTCGTTTTGTTACACGTCATCCTTCGTCTTACAGAAGGTATCCGAGCTAGTCTTGAGTCTGATGATTTATCACGTTGACCATGATTGGGAGCCGCTTAAGCAATACAACCATCCAGATGTCTTTTCAGAATTCCTCCGAAACCGTTTCGGGAAATTCATGATATATCTCAGCTGATTGTTTTATTAGTTGATTTATTCTTTGAGCAGAGGCGAACCGTTTCGCCCAGTTGAAGAGGCAAGGTACGTCATTTATTCATAACGCGTGGCGAGGGGTGCTGATAGACTTGACACATTCCAAGGGCGAATTC

Обозначения: А – ДНК-конструкция pCR2.1-BTV9W-Seg10-825bp. Б – ДНК-конструкция pCR2.1-BTV9W-Seg2-542bp. Подчеркнуты нуклеотиды, формирующие мишени для праймеров клонирования: одной линией – для прямых (F) праймеров, двойной линией – для обратных (R) праймеров. Синим цветом обозначены нуклеотиды, формирующие мишени для праймеров и пробы для детекции Seg-10 BTV; зеленым цветом – мишени для праймеров и пробы для детекции Seg-2 BTV-9W. Красным цветом выделены нуклеотиды, формирующие сайты рестрицирующей эндонуклеазы *EcoRI*. T7 – местоположение промотора бактериофага T7 в плазидах.

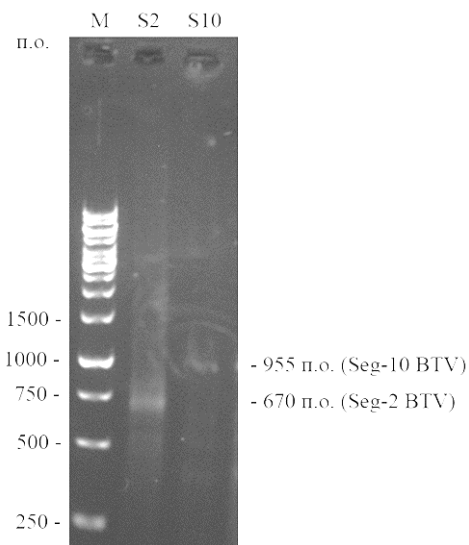
Рисунок 10 – Подтвержденные секвенированием ДНК нуклеотидные последовательности вставок ДНК-конструкций pCR2.1-BTV9W-Seg10-825bp и pCR2.1-BTV9W-Seg2-542bp



Обозначения: А – карта плазмиды pCR2.1-T7-BTV9W-Seg2(F)-542bp;  
Б – карта плазмиды pCR2.1-T7-BTV9W-Seg10(F)-825bp.

Рисунок 11 – Карты ДНК-конструкций, построенные в программе Vector NTI 8

Для получения РНК-контролей, плазмиды pCR2.1-BTV9W-Seg10-825bp и pCR2.1-BTV9W-Seg2-542bp линейаризовали по сайту рестрикции *EcoRI*, после чего использовали в качестве матриц для транскрипции *in vitro* с использованием РНК-полимеразы фага Т7. Нарботанные РНК осаждали 3М LiCL и использовали в качестве положительных контролей, в том числе для оценки линейности тест-системы. Электрофоретический анализ представлен на рисунке 12.



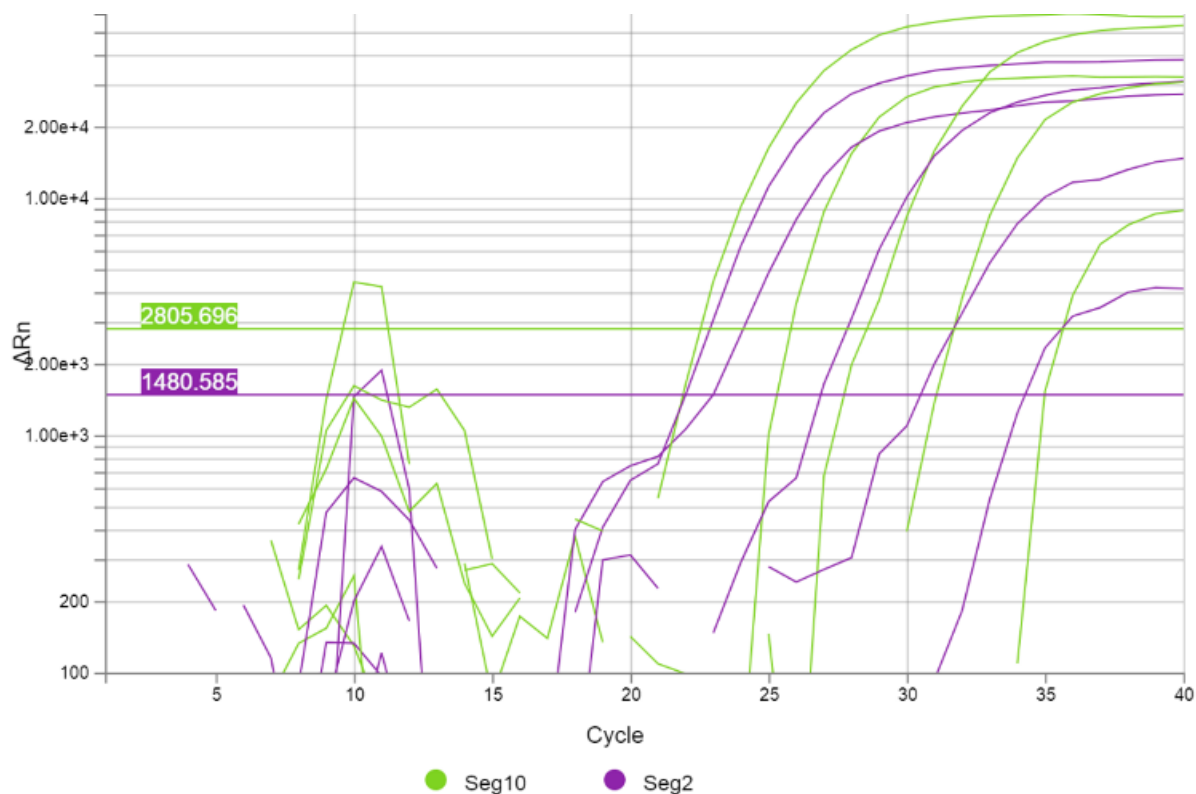
Обозначения: М- РНК-маркер. S2 - BTV9W-Seg2; S10 - BTV9W-Seg10

Рисунок 12 – Электрофоретический анализ в 1% агарозном геле очищенных контрольных РНК BTV9W-Seg2 и BTV9W-Seg10

Далее участки вирусного генома были переклонированы в экспрессионный бактериальный вектор рЕТ23с. Полученными плазмидами рЕТ23с-BTV9W-Seg10-825bp и рЕТ23с-BTV9W-Seg2-542bp трансформировали клетки *E. coli* экспрессионного штамма BL21(DE3), позволяющие нарабатывать РНК BTV9W-Seg10 (S10) и BTV9W-Seg2 (S2) *in vivo* для масштабирования процесса наработки контрольных РНК для ПЦР тест-системы.

#### 4.6 Оценка чувствительности и эффективности для дуоплекса мишеней

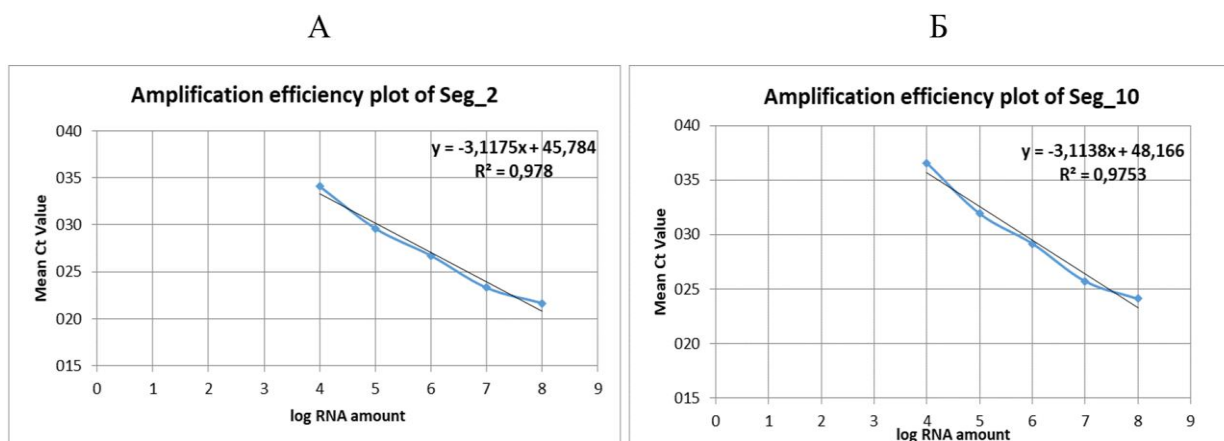
Для оценки аналитической чувствительности набора из концентрированных растворов синтезированных РНК S2 и S10 (с концентрацией  $10^9$  копий/мкл) были подготовлены последовательные 10-кратные разведения с концентрациями от  $10^8$  до  $10^3$  копий/мкл. На рисунке 13 представлены данные пороговых циклов (Ct), полученные в результате ОТ-ПЦР в реальном времени для различных концентраций контрольных РНК.



Обозначения: Seg10 - РНК S10; Seg2 – РНК S2. Анализ проводили на приборе QuantStudio5.

Рисунок 13 – Результаты ОТ-кПЦР-РВ ряда разведений синтезированных контрольных РНК S10 и S2 с обоими наборами праймеров и проб.

Диаграмма эффективности ОТ-кПЦР в реальном времени для четырёх повторов реакции представлена на рисунке 14. Поскольку для графика чувствительности наиболее подходящей аппроксимирующей функцией оказался десятичный логарифм (с высокими коэффициентами детерминации  $R^2 = 0,978$  и  $0,9753$ ), был сделан вывод о высокой эффективности ОТ-кПЦР-РВ при данной конфигурации.



Обозначения: представлен график эффективности ОТ-кПЦР-РВ в виде аппроксимирующей функции (логарифмическая линия тренда). А – для РНК S2; Б – для РНК S10. Количество повторов для каждого разведения  $n = 4$ . Данные получены на приборе QuantStudio 5.

Рисунок 14 – Результаты ОТ-кПЦР-РВ ряда разведений синтезированных контрольных РНК S2 и S10.

#### 4.7 Оценка температурной лабильности ОТ-кПЦР-РВ

Для определения температурной чувствительности и выбора оптимального температурного режима отжига в составе разработанной ОТ-кПЦР тест-системы была проведена оценка температурной лабильности праймеров и флуоресцентных зондов. Испытания проводились на синтетических РНК-контролях, соответствующих сегментам S2 и S10 генома вируса блютанга (BTV), в трех независимых повторах с варьированием температуры отжига в диапазоне от 54 до 62°C.

Результаты, обобщённые в таблице 7, демонстрируют стабильные значения порогового цикла (Ct) во всём указанном температурном диапазоне. Статистическая обработка данных с использованием t-критерия Стьюдента показала отсутствие достоверных различий между средними значениями Ct при разных температурах отжига ( $p \leq 0,05$ ). Это указывает на высокую температурную устойчивость и универсальность праймерных последовательностей, а также на воспроизводимость реакции при умеренной варьированности условий ПЦР.

Таблица 7 – Данные Ct ОТ-кПЦР-РВ ряда разведений синтезированных контрольных РНК S2 и S10 при варьировании температуры отжига праймеров и проб для детекции РНК BTV.

Разведения матриц	Исследованные температуры отжига, Ct		
	62°C	60°C	54°C
Seg10+ Seg2 1:50	8,44 ± 0,64	9,27 ± 0,01	6,38 ± 2,19
Seg10+ Seg2 1:500	13,09 ± 0,59	12,03 ± 0,14	12,46 ± 0,03
Seg10+ Seg2 1:5000	15,72 ± 0,51	14,91 ± 0,70	15,53 ± 0,08

Результаты представлены в виде  $\bar{X} \pm md$ , где  $md$  – стандартная ошибка.

Таким образом, установлено, что рабочий температурный диапазон для реакции отжига праймеров и зондов в данной тест-системе может быть гибко варьирован в пределах 54–62°C без статистически значимого влияния на эффективность амплификации. Это предоставляет дополнительные возможности для адаптации тест-системы к различным термоциклам и платформам, включая полевые или модифицированные лабораторные условия.

На рисунке 15 представлены репрезентативные амплификационные кривые, полученные при проведении ОТ-кПЦР в реальном времени на ряду десятичных разведений синтетических РНК S10 и S2, при температуре отжига, установленной на 60°C. Данные результаты демонстрируют как высокую чувствительность тест-системы, так и линейность амплификационного сигнала в зависимости от концентрации мишени, что служит дополнительным подтверждением корректного выбора температурных параметров.

Следовательно, результаты температурной оптимизации подтверждают функциональную устойчивость и диагностическую надёжность разработанной RT-qPCR тест-системы, а также обеспечивают основу для последующего внедрения в эпизоотологический и ветеринарно-диагностический мониторинг.

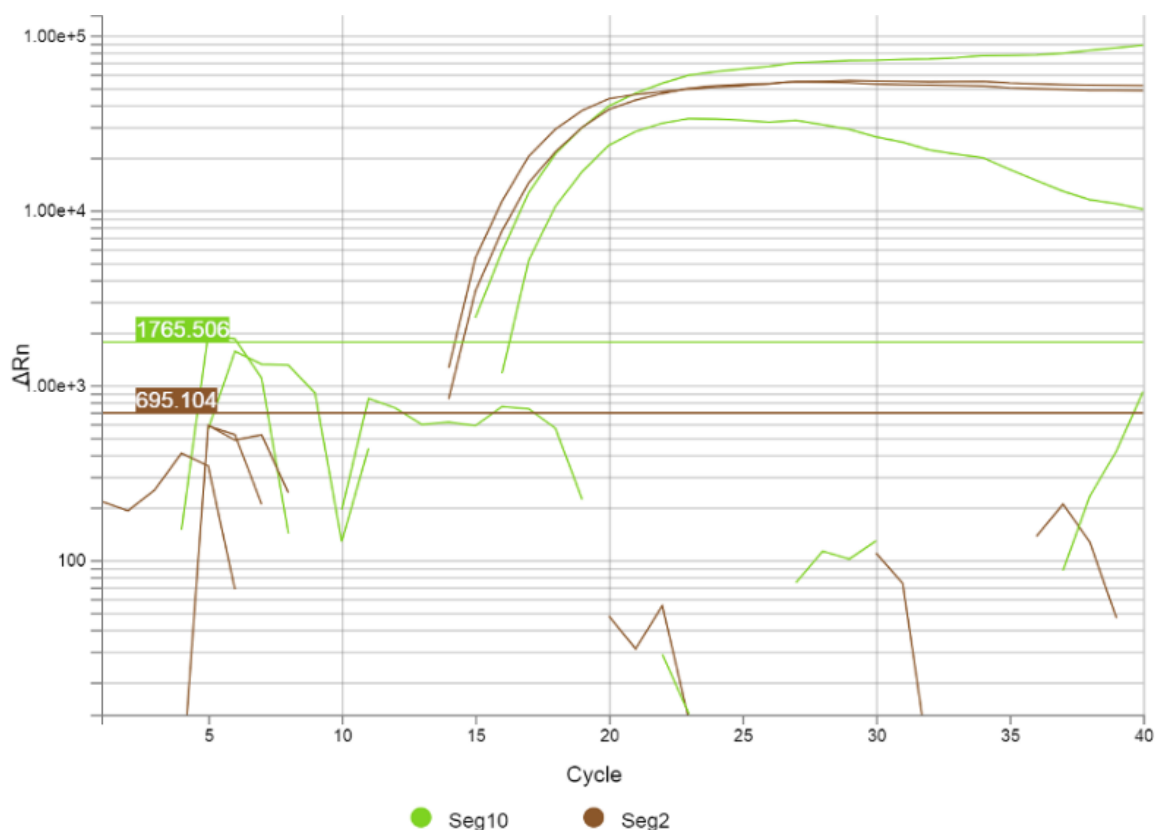


Рисунок 15 - Результаты обработки температурной лабильности ОТ-ПЦР-РВ разведений синтезированных контрольных РНК S2 и S10 на амплификаторе QuantStudio 5.

#### 4.8 Оценка специфичности ОТ-кПЦР-РВ

Аналитическая специфичность тест-системы в отношении возможных перекрестных реакций была исследована на генетическом материале вирусов, поражающих копытных млекопитающих, для диагностики которых планируется использовать данную систему. Тестирование проводилось с использованием архивных образцов, содержащих генетический материал вируса вирусной диареи КРС (BVDV) 1 и 2 типов (BVDV-1 и BVDV-2), вируса оспы овец (SPPV), вируса контагиозной эктимы овец (ORFV), вируса нодулярного дерматита (LSDV), вируса папулезного стоматита КРС (BPSV), вируса инфекционного ринотрахеита (IBR), вируса парагриппа-3 (PI3) и бычьего респираторного синцитиального вируса (BRSV). При анализе данных образцов не было выявлено ложноположительных результатов по обоим целевым локусам (Seg-2 BTV и Seg-10 BTV), что подтверждено репрезентативными результатами анализа, представленными на рисунке 16.



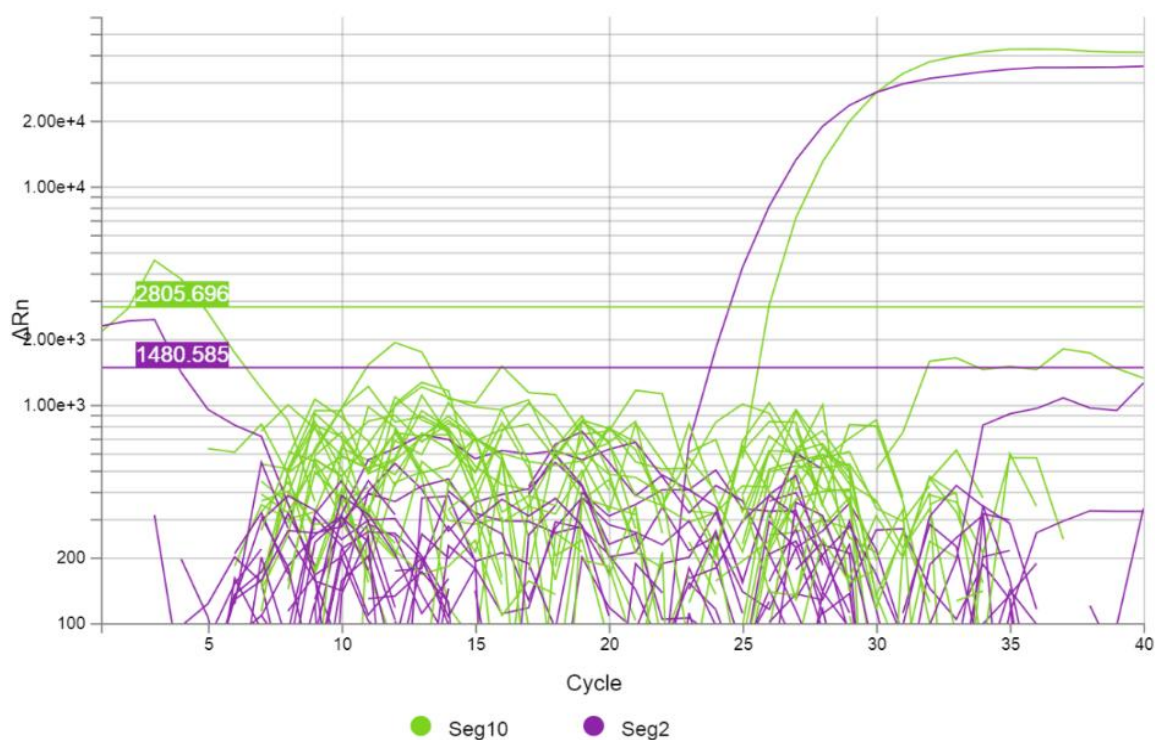


Рисунок 16 – Результаты ОТ-кПЦР-РВ анализа различных образцах, содержащих ДНК и РНК родственных и неродственных вирусов скота, и синтезированных контрольных РНК S2 и S10 на амплификаторе QuantStudio 6

В качестве родственных вирусов были использованы штаммы BTV-4, BTV-14 и BTV-9W. В таблице 8 представлены результаты анализа специфичности разработанной ОТ-кПЦР в реальном времени с использованием образцов, содержащих РНК родственных штаммов вируса блютанга (BTV-4, BTV-14, BTV-9W (вакцинный и полевой штаммы)), а также генетический материал неродственных вирусов KРС и МРС. Как и ожидалось, положительный сигнал по каналу JOE (S2) и FAM (S10) был получен только для топотипа BTV-9W, а для штаммов BTV-4 и BTV-14 положительный результат был только по каналу FAM (S10). При анализе образцов, содержащих нуклеиновые кислоты неродственных вирусов ложноположительных результатов по целевым локусам (Seg-2 BTV и Seg-10 BTV) не обнаружено. Таким образом, специфичность разработанной дуплексной ОТ-кПЦР-РВ тест-системы составила 100%.

Таблица 8 - Исследование специфичности разработанного набора праймеров и флуоресцентных проб (n = 4).

Вид вируса	Значение Ct, канал FAM (Seg-10)	Значение Ct, канал JOE (Seg-2)	Результат анализа
Родственные вирусы (вирусы блютанга, BTV)			
BTV-4	24,54±1,01	Отр.	+
BTV-14	23,15±1,25	Отр.	+
BTV-9W (вакцинный штамм)	21,28±0,95	21,06±0,98	+
BTV-9W (полевой штамм)	22,45±0,90	22,73±0,89	+



Неродственные вирусы крупного и мелкого рогатого скота			
BVDV-1	Отр.	Отр.	—
BVDV-2	Отр.	Отр.	—
PI3	Отр.	Отр.	—
IBR	Отр.	Отр.	—
SPPV	Отр.	Отр.	—
ORFU	Отр.	Отр.	—
LSDV	Отр.	Отр.	—
BPSU	Отр.	Отр.	—

По результатам проведённого анализа была подтверждена высокая чувствительность разработанного дуплексного набора праймеров и флуоресцентных зондов для детекции генетического материала BTV (около 2,093 генома, что соответствует аналитической чувствительности  $1,0 \times 10^4$  копий на реакцию), а также высокая точность дифференциального обнаружения топотипа BTV-9W (около 2,0948 генома, с такой же аналитической чувствительностью).

## 5 Обсуждение результатов

В ходе выполнения магистерской диссертации были выполнены следующие работы:

1) Проведена лабораторная диагностика архивных образцов, собранных в ходе мониторинговых работ в период 2018–2020 гг. Всего в исследовании было задействовано 582 образца от животных (520 овец, 27 коз, 11 коров и 24 верблюдов) и 266 потенциальных насекомых-переносчиков (217 мокрецов рода *Culicoides* sp. и 49 лошадиных кровососок *Hippoboska equina*). Методом ОТ-ПЦР проанализировано 582 РНК от животных, выявлено три ПЦР-положительных образца. Превалентность составила 0,5%. Также выявлено по одному ПЦР-положительному пулу среди лошадиных кровососок *Hippoboska equina* и мокрецов рода *Culicoides* sp. Превалентность составила 2,4% и 0,46% соответственно.

2) Проведена генетическая характеристика BTV, циркулирующего на территории Южного Казахстана. Частично методом Сэнгера секвенированы сегменты дцРНК Seg-2 и Seg-10 для пяти выявленных ПЦР-положительных образцов. Для ПЦР-положительного образца, выявленного в лошадиной кровососке, проведено секвенирование полного генома. Проведен BLAST и филогенетический анализ. Все изоляты отнесены к мезогенному топотипу “west” серотипа 9 BTV (BTV-9W). Нуклеотидные последовательности депонированы в базе GenBank.

3) Разработан прототип ОТ-ПЦР тест-системы в режиме реального времени для детекции и типирования BTV топотипа “west” серотипа 9. Клонированы участки сегментов Seg-2 и Seg-10 BTV-9W, использованные в качестве матрица для синтеза РНК для получения положительного ПЦР-контроля. Проведена оценка эффективности реакции ОТ-кПЦР-РВ, подтверждена линейность тест-системы. Проведена оценка температурной лабильности функционирования сетов Seg-2 и Seg-10. Проведена оценка чувствительности и специфичности ПЦР тест-системы.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Катаральная лихорадка овец (КЛО) остается одной из наиболее значимых инфекций среди жвачных животных, вызывая тяжелые экономические потери и представляя угрозу для благополучия животноводства. Основным резервуаром вируса являются овцы, которые обычно переносят инфекцию бессимптомно. Однако передача вируса восприимчивым видам развивает тяжелую и часто летальную болезнь. Несмотря на отсутствие официально зарегистрированных вспышек вируса блютанга в Казахстане, ряд научных исследований указывает на наличие серопозитивных животных в южных регионах страны. Данное исследование было направлено на ПЦР-тестирование восприимчивых животных, а также компетентных и механических переносчиков вируса, полную генетическую характеристику генетических вариантов BTV, циркулирующих на территории Южного Казахстана и разработку прототипа ОТ- ПЦР тест-системы в режиме реального времени для дифференциальной диагностики генетических вариантов BTV. Разработанный прототип ОТ-кПЦР-РВ позволяет решить сложную проблемы по дифференциации мезогенного вакциноподобного штамма BTV (BTV-9W) от других штаммов, которые могут попасть на территорию Казахстана с импортированным скотом от других стран, где вспышки КЛО фиксируются ежегодно.

Основные выводы:

1 Проведена генетическая характеристика вируса блютанга, циркулирующего на территории Южного Казахстана и филогенетический анализ показал, что все изоляты относятся к мезогенному вакциноподобному штамму топотипа “west” серотипа 9 (BTV-9W). Полногеномное секвенирование изолята BTV показывает то, что штамм не является реассортантом. Это указывает на то, что данный штамм не представляет существенной угрозы для животноводства, однако проведение эпизоотического мониторинга остается необходимым с целью своевременного реагирования на возможные изменения верулентности и появления на территории страны возможных новых серотипов.

2 Проведен анализ геномной структуры BTV с целью выбора оптимальных участков для амплификации. В качестве мишеней были выбраны сегменты 2 и 10, обладающие высокой типоспецифичностью. На основании нуклеотидных последовательностей этих сегментов были разработаны праймеры и флуоресцентные зонды, обеспечивающие высокую специфичность при амплификации.

3 Осуществлено молекулярное клонирование сегментов 2 и 10 в векторные системы. Полученные ДНК-конструкции были использованы в качестве матрицы для синтеза РНК для дальнейшего получения положительного ПЦР-контроля. Это позволило обеспечить стабильность и воспроизводимость результатов в проведении амплификации.

4 Проведена оптимизация параметров амплификации, включая температурный режим и концентрацию реагентов, обеспечивающая максимальную эффективность реакции. Выполнена валидация разработанной прототипной ОТ-ПЦР тест-системы в режиме реального времени с оценкой аналитической чувствительности и специфичности. Полученные результаты подтвердили высокую точность и надежность метода при детекции и типировании BTV-9W.

Результаты диссертационной работы свидетельствуют о возможности практического применения разработанного прототипа ОТ-ПЦР тест-системы в целях эпизоотического мониторинга, лабораторной диагностики и типирования BTV-9W.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Mertens P.P.C., Maan S., Batten C.A., Darpe K.E., Shaw A.R., Maan N.S. (2009). Bluetongue virus diagnosis. In: Mellor P.S., Baylis M., Mertens P.P.C., editors. Bluetongue. Ist ed. London: “Elsevier, Academic Press”. – 101–125.
- 2 Schwartz-Cornil, I.; Mertens, P.P.C.; Contreras, V.; Hemati, B.; Pascale, F.; Bréard, E.; Mellor, P.S.; MacLachlan, N.J.; Zientara, S. (2008). Bluetongue virus: Virology, pathogenesis and immunity. *Vet. Res*, 39, 46.
- 3 Labadie T., Sullivan E., Roy P. (2020). Multiple Routes of Bluetongue Virus Egress. *Microorganisms*, 8(7), 965.
- 4 Saminathan M., Singh K.P., Khorajiya J.H., Dinesh M., Vineetha S. (etd.) (2020). An updated review on bluetongue virus: epidemiology, pathobiology, and advances in diagnosis and control with special reference to India. *Veterinary Quarterly*, 40(1), p. 258-321.
- 5 MacLachlan N.J., Drew C.P., Darpe K.E., Worwa G. (2009). The Pathology and Pathogenesis of Bluetongue. *Journal of Comparative Pathology*, 141(1), 1-16
- 6 Coetzee P., Stokstad M., Venter E.H., Myrmel M., Vuuren M. V. (2012). Bluetongue: a historical and epidemiological perspective with the emphasis on South Africa. *Virology Journal*, 9, Article 198.
- 7 Schalkwyk A.V., Coetzee P., Ebersohn K., Teichman B.V., Venter E. (2023). Widespread Reassortment Contributes to Antigenic Shift in Bluetongue Viruses from South Africa. *Viruses*, 15(7), 1611.
- 8 Gibbs J. Paul E., Greiner C. Ellis (2002). The epidemiology of bluetongue. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Disease*, 17(3-4), 207-220.
- 9 Venter G.J (2015). Culicoides spp. (Dipteria: Ceratopogonidae) as vectors of Bluetongue virus in South Africa – a review. *Veterinaria Italiana*, 51(4), 325-333.
- 10 Purse B.V., Mellor P.S., Rogers D.J., Samuel A.R., Mertens P.C., Baylis M. (2005). Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 171-181
- 11 Wilson A.J., Mellor P.S. (2009). Bluetongue in Europe: past, present and future. *Philosophical Transactions of the Royal Society, Biological Sciences*, 364(1530), 2669-2681.
- 12 Schulz C., Eschbaumer M., Rudolf M., König P., Keller M., Bauer C., Gauly M., Grevelding C.G., Beer M., Hoffmann B. (2012). Experimental infection of South American camelids with bluetongue virus serotype 8. *Veterinary Microbiology*, 154(3-4), 257-265.
- 13 Zanella G., Durand B., Sellal E., Breard E., Sailleau C., Zientara S., Batten C.A., Mathevet P., Audeval C. (2012). Bluetongue virus serotype 8: Abortion and transplacental transmission in cattle in the Burgundy region, France, 2008-2009. *Theriogenology*, 77(1), 65-72.

- 14 Santman-Berends I.M.G.A., Wuijckhuise L.V., Vellema P., van Rijn P.A. (2010). Vertical transmission of bluetongue virus serotype 8 virus in Dutch dairy herds in 2007. *Veterinary Microbiology*, 141(1-2), 31-35.
- 15 Hofmann M.A., Renzullo S., Mader M., Chaignat V., Worwa G., Thuer B. (2008). Genetic Characterization of Toggenburg Orbivirus, a New Bluetongue Virus, from Goats, Switzerland. *Emerging Infectious Disease*, 14(12), 1855–1861.
- 16 Maan S, Maan NS, Belaganahalli MN, Potgieter AC, Kumar V, Batra K, et al. (2016). Development and Evaluation of Real Time RT-PCR Assays for Detection and Typing of Bluetongue Virus. *PLoS ONE*, 11(9), e0163014.
- 17 Meiswinkel R., Gomulski L.M., Delecolle J.-C., Goffredo M., Gasperi G. (2004). The taxonomy of *Culicoides* vector complexes – unfinished business. *Veterinaria Italiana*, 40, 151–159.
- 18 Purse B.V., Carpenter S., Venter G.J., Bellis G., Mullens B.A. (2014). Bionomics of Temperate and Tropical *Culicoides* Midges: Knowledge Gaps and Consequences for Transmission of *Culicoides* -Borne Viruses. *Annual Review of Entomology*, 60(1), 373-392.
- 19 Carpenter S., Groschup M.H., Garros C., Felipe-Bauer M.L., Purse B.V. (2013). *Culicoides* biting midges, arboviruses and public health in Europe. *Antiviral Research*, 100(1), 102-113.
- 20 Макаров В.В., Василевич Ф.И. (2014). Мокрецы рода *Culicoides* – эмерджентные векторы блютанга в Европе. *Инфекционные и паразитарные болезни*, 2, 14-21.
- 21 Mellor, P. S., Boorman, J., & Baylis, M. (2000). *Culicoides* biting midges: their role as arbovirus vectors. *Annual Review of Entomology*, 45(1), 307–340.
- 22 Anne E. Jones & Joanne Turner & Cyril Caminade & Andrew E. Heath & Maya Wardeh & Georgette Kluiters & Peter J. Diggle & Andrew P. Morse & Matthew Baylis (2019). Bluetongue risk under future climates. *Nature Climate Change*, 9(2), 153-157.
- 23 Mayo C., McDermott E., Kopanke J., Stenglein M., Lee J., Mathiason C., Carpenter M., Reed K. and Perkins T.A. (2020). Ecological Dynamics Impacting Bluetongue Virus Transmission in North America. *Veterinary Science*, 7, Article 186.
- 24 Durand B., Zanella G., Biteau-Coroller F., Locatelli C., Baurier F., Simon C., Dréan E.L., Delaval J., Prengère E., Beauté V., Guis H. (2010). Anatomy of Bluetongue virus Serotype 8 Epizootic Wave, France, 2007-2008. *Emerging Infectious Disease*, 16(12), 1861-1868.
- 25 Maria Bourquia, Claire Garros, Ignace Rakotoarivony, Laetitia Gardes, Karine Huber, et al.. (2020). Update of the species checklist of *Culicoides* Latreille, 1809 biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) of Morocco. *Parasites & Vectors*, 12 (1), 13 p.

26 Searle K.R., Barber J., Stubbins F., Labuschagne K., Carpenter S., Butler A., et al. (2014). Environmental Drivers of *Culicoides* Phenology: How Important Is Species-Specific Variation When Determining Disease Policy? *PLoS ONE*, 9(11), e111876.

27 Li N., Meng J., He Y., Wang W. and Wang J. (2024). Potential roles of *Culicoides* spp. (*Culicoides imicola*, *Culicoides oxystoma*) as biological vectors of bluetongue virus in Yuanyang of Yunnan, P. R. China. *Cellular and Infection Microbiology*, 13, 1-11.

28 Federici, V., Goffredo, M., Mancini, G., Quaglia, M., Santilli, A., Di Nicola, F., De Ascentis, M., Cabras, P., Volpicelli, C., De Liberato, C., Satta, G., Federico, G., Leone, A., Piscicella, M., Portanti, O., Pizzurro, F., Teodori, L., & Savini, G. (2019). Vector Competence of Italian Populations of *Culicoides* for Some Bluetongue Virus Strains Responsible for Recent Northern African and European Outbreaks. *Viruses*, 11(10), 941.

29 Ежегодный бюллетень мониторинга состояния и изменения климата Казахстана: 2021 год / Министерство экологии, геологии и природных ресурсов. Республиканское государственное предприятие «Казгидромет». Нурсултан: 2022. В электронной форме доступен на сайте: <https://www.kazhydromet.kz/ru/klimat/ezhegodnyy-byulleten-monitoringa-sostoyaniya-i-izmeneniya-klimata-kazahstana>

30 Zhigailov A.V., Perfilyeva Y.V., Ostapchuk Y.O., Kulemin M.V., Ivanova K.R., Abdolla N., Kan S.A., Maltseva E.R., Berdygulova Zh.A., Naizabayeva D.A., Skiba Y.A., Mamadaliyev S.M. (2023). Molecular detection and characterization of bovine viral diarrhea virus type 2 and bluetongue virus 9 in forest flies (*Hippobosca equina*) collected from livestock in southern Kazakhstan. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Report*, 45, 100932.

31 Иванова К.Р., Найзабаева Д.А., Жигайлов А.В., Скиба Ю.А. (2024). Выявление и характеристика генома вируса блютанга серотипа 9 в лошадиных кровососках (*Hippobosca equina*) из Южного Казахстана. *Eurasian Journal of Applied Biotechnology*, (3S), 152.

32 Mayo C., McDermott E., Kopanke J., Stenglein M., Lee J., Mathiason C., Carpenter M., Reed K., Perkins T.A. (2020). Ecological Dynamics Impacting Bluetongue Virus Transmission in North America. *Veterinary Science*, 7, 186.

33 Roy P. (2020). Bluetongue virus assembly and exit pathways. *Advances in Virus Research*, 108, 249–273.

34 Rodríguez-Martín D., Louloudes-Lázaro A., Avia M., Martín V., Rojas J.M., Sevilla N. (2021). The Interplay between Bluetongue Virus Infections and Adaptive Immunity. *Viruses*, 13(8), 1511.

35 Rojas J.M., Martín V., Sevilla N. (2021). Vaccination as a Strategy to Prevent Bluetongue Virus Vertical Transmission. *Pathogens*, 10(11), 1528.

- 36 Petra C. F., Fauziah M. J., Carrie B., Houssam A., Saunders K., Lomonossoff G.P., Reid E., Horton D., Maan S., Haig D., Daly J.M., Mertens P.P.C. (2021). Serological Cross-Reactions between Expressed VP2 Proteins from Different Bluetongue Virus Serotypes. *Viruses*, 13(8), 1455.
- 37 Maan N.S., Maan S., Belaganahalli M.N., Ostlund E.N., Johnson D.J., Nomikou K., Mertens P.P.C. (2012). Identification and Differentiation of the Twenty Six Bluetongue Virus Serotypes by RT–PCR Amplification of the Serotype-Specific Genome Segment 2. *PLoS One*, 7(2), e32601.
- 38 Xie S., Shi Y., Gong R., Cui W., Jiang Y., Liu M., Zhou H., Qiao X., Li Y., Xu Y., Tang L. (2018). Identification of antigenic epitopes of monoclonal antibodies against the VP2 protein of the 25 serotype of bluetongue virus. *Veterinary Microbiology*, 219, 136-143.
- 39 Yang H., Xiao L., Wang J., Meng J., Lv M., Liao D., Song J., Gao L., Xiong H., He Y., Niu B., Chuang X., Li H. (2016). Phylogenetic Characterization Genome Segment 2 of Bluetongue Virus Strains Belonging to Serotypes 5, 7 and 24 Isolated for the First Time in China During 2012 to 2014. *Transboundary and Emerging Diseases*, 64(4), 1317-1321.
- 40 Jacquot M., Rao P. P., Yadav S., Nomikou K., Maan S., Jyothi Y.K., Reddy N.Y., Putty K., Hemadri D., Singh K. P., Maan N., Hegde N., Mertens P.P.C., Biek R. (2019). Contrasting selective patterns across the segmented genome of bluetongue virus in a global reassortment hotspot. *Virus Evolution*, 5(2), vez027.
- 41 Biswas S.K., Chand K., Rehman W., Reddy Y.N., Moldal B. (2015). Segment-2 sequencing and cross-neutralization studies confirm existence of a neutralization resistant VP2 phenotypic variant of bluetongue virus serotype 1 in India. *Veterinary Microbiology*, 176(3-4), 358-364.
- 42 Janowicz A., Caporale M., Shaw A., Gulletta S., Gialleonardo L.D., Ratnieri M., Palmarini M. (2015). Multiple Genome Segments Determine Virulence of Bluetongue Virus Serotype 8. *Journal of Virology*, 89(10), 5238–5249.
- 43 Rajko-Nenow P., Christodoulou V., Thurston W., Ropiak H.M., Savva S., Brown H., Qureshi M., Alvanitopoulos K., Gubbins S., Flannery J., Batten C. (2020). Origin of Bluetongue Virus Serotype 8 Outbreak in Cyprus, September 2016. *Viruses*, 12(1), 96.
- 44 Attoui H., Monsion B., Klonjowski B., Zientara S., Mertens P.P.C., Mohd Jaafar F. (2021). Identification of the Genome Segments of Bluetongue Virus Type 26/Type 1 Reassortants Influencing Horizontal Transmission in a Mouse Model. *Viruses*, 13(11), 2208.
- 45 Yang H., Gu W., Li Zh., Zhang L., Liao D., Song J., Shi J., Hasimu J., Li Z., Yang Z., Zhong Q., Li H. (2020). Novel putative bluetongue virus serotype 29 isolated from inapparently infected goat in Xinjiang of China. *Transboundary and Emerging Diseases*, 68(4), 2543–2555.



- 46 Bumbarov V., Golender N., Jenckel M., Wernike K., Beer M., Khinich E., Zalesky O., Erster O. (2019). Characterization of bluetongue virus serotype 28. *Transboundary and Emerging Diseases*, 67(1), 171-182.
- 47 Batten C.A., Henstock M.R., Steedman H.M., Waddington S., Edwards L., Oura C.A.L. (2013). Bluetongue virus serotype 26: Infection kinetics, pathogenesis and possible contact transmission in goats. *Veterinary Microbiology*, 162(1), 62-67.
- 48 Dadawala A.I., Biswas S.K., Rehman W., Chand K., De A., Mathapati B.S., Kumar P., Chauhan H.C., Chandel B.S., Mondal B. (2011). Isolation of Bluetongue Virus Serotype 1 from Culicoides vector Captured in Livestock Farms and Sequence Analysis of the Viral Genome Segment-2. *Transboundary and Emerging Diseases*, 59(4), 361-368.
- 49 Zientara S., Sailleau C., Dauphin G., Roquier C., Rémond E.M., Lebreton F., Hammoumi S., Dubois E., Agier C., Merle G., Bréard E. (2002). Identification of bluetongue virus serotype 2 (Corsican strain) by reverse-transcriptase PCR reaction analysis of segment 2 of the genome. *Veterinary Record*, 150(19), 598–601.
- 50 Jacquot M., Rao P.P., Yadav S., Nomikou K., Maan S., Jyothi Y.K., Reddy N., Putty K., Hemadri D., Singh K.P., Maan N.S., Hegde N.R., Mertens P., Biek R. (2019). Contrasting selective patterns across the segmented genome of bluetongue virus in a global reassortment hotspot. *Virus Evolution*, 5(2), vez027.
- 51 Rahman S.K., Kerviel A.B., He Y., Zhou Z.H., Roy P. (2020). A Calcium Sensor Discovered in Bluetongue Virus Nonstructural Protein 2 Is Critical for Virus Replication. *Journal of Virology*, 94(10), 1128.
- 52 Wu W., Roy P. (2022). Sialic Acid Binding Sites in VP2 of Bluetongue Virus and Their Use during Virus Entry. *Journal of Virology*, 96, e01677-21.
- 53 Maan S., Maan S.N., Samuel A.R., Rao S., Attoui H., Mertens P.P.C. (2007). Analysis and phylogenetic comparisons of full-length VP2 genes of the 24 bluetongue virus serotypes. *Journal of General Virology*, 88(2), 621–630.
- 54 Lee J.W., Roy P. (1986). Nucleotide sequence of a cDNA clone of RNA segment 10 of bluetongue virus (serotype 10). *Journal of General Virology*, 67(12), 2833–2837.
- 55 Sung P.Y., Phelan J.E., Luo D., Kulasegaran-Shylini R., Bohn P., Smyth R.P., Roy P. (2024). Recruitment of multi-segment genomic RNAs by Bluetongue virus requires a preformed RNA network. *Nucleic Acids Research*, 52(14), 8500–8514.
- 56 Pierce C.M., Balasuriya U.B.R., MacLachlan N.J. (1998). Phylogenetic analysis of the S10 gene of field and laboratory strains of bluetongue virus from the United States. *Virus Research*, 55(1), 15-27.
- 57 Chauveau E., Doceil V., Lara E., Breard E., Sailleau C., Vidalain P., Meurs E.F., Dabo S., Schwartz-Cornil I., Zientara S., Vitour D. (2013). NS3 of Bluetongue Virus Interferes with the Induction of Type I Interferon. *Journal of General Virology*, 87(14), 8241–8246.

58 de Mattos C.A., de Mattos C.C., Osburn B.I.(1989). Recombinant cDNA probe from bluetongue virus genome segment 10 for identification of bluetongue virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1(3), 237–241.

59 Rao C.D., Kiuchi A., Roy P. (1983). Homologous terminal sequences of the genome double-stranded RNAs of bluetongue virus. *Journal of Virology*, 46(2), 378-383.

60 Sung P.Y., Roy P. (2014). Sequential packaging of RNA genomic segments during the assembly of Bluetongue virus. *Nucleic Acids Research*, 42(22), 13824–13838.

61 van Rijn P.A., van de Water S.G., van Gennip H.G. (2013). Bluetongue virus with mutated genome segment 10 to differentiate infected from vaccinated animals: a genetic DIVA approach. *Vaccine*, 31(44), 5005–5008.

62 Gollapalli S.R., Mallavarapu S., Uma M., Rao P.P., Susmitha B., Prasad P.U., Chaitanya P., Prasad G., Hegde N.R., Reddy Y.N. (2012). Sequences of genes encoding type-specific and group-specific antigens of an Indian isolate of bluetongue virus serotype 10 (BTV-10) and implications for their origin. *Transboundary and Emerging Diseases*, 59(2), 165–172.

63 Maan S., Maan N.S., Pullinger G., Nomikou K., Morecroft E., Guimera M., Belaganahalli M.N., Mertens P.P. (2012). The genome sequence of bluetongue virus type 10 from India: evidence for circulation of a western topotype vaccine strain. *Journal of Virology*, 86(10), 5971–5972.

64 Rocchigiani A.M., Tilocca M.G., Portanti O., Vodret B., Bechere R., Di Domenico M., Savini G., Lorusso A., Puggioni G. (2020). Development of a Digital RT-PCR Method for Absolute Quantification of Bluetongue Virus in Field Samples. *Veterinary Science*, 7:170.

65 de Mattos C.A., de Mattos C.C., Osburn B.I. (1989). Recombinant cDNA probe from bluetongue virus genome segment 10 for identification of bluetongue virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1(3), 237–241.

66 Ain K.U., Biswas S.K., Inbaraj S., Chand K., Saxena A., Ramakrishnan M.A., Sunder J., Kundu A., Pandey A.B. (2020). Deciphering type-specific neutralizing antibodies to bluetongue virus in goats of Andaman and Nicobar Islands, India. *Tropical Animal Health and Production*, 52, 2715–2719.

67 Mohandas S.S., Muthuchelvan D., Pandey A.B., Biswas S.K., Chand K., Venkatesan G., Choudhary D., Ramakrishnan M.A., Mondal B. (2015). Development of reverse transcription loop mediated isothermal amplification assay for rapid detection of bluetongue viruses. *Journal of Virological Methods*, 222, 103–105.

68 Sultanov A.A., Sarsenbayev D.K., Temirbekova A.R., et al. (2021). Modelling bluetongue risk in Kazakhstan. *Parasites & Vectors*, 14, 1–12.

69 Zhigailov A.V., Perfilyeva Y.V., Maltseva E.R., Ostapchuk Y.O., Cherusheva A.S., Naizabayeva D.A., et al. (2022). Identification and

characterization of bluetongue virus in *Culicoides* spp. and clinically healthy livestock in southeastern Kazakhstan. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, Vol. 90–91. Article 101895.

70 Zhugunissov K., Muzarap D., Sarsenkulova N., Mambetaliyev M., Kilibayev S., Azanbekova M., Kenzhebayeva M., Tabys S., Abayeva M., Melisbek A., Rametov N., Sultankulova K., Babiuk S., Ambagala A., Kerimbayev A. (2025). Prevalence of Bluetongue and the distribution of *Culicoides* species in northern and southern regions of Kazakhstan in 2023–2024. *Frontiers in Veterinary Science*, 12:1559636.

71 Yapici O., Bulut O., Avci O., Kale M., Tursumbetov M., Yavru S., Simsek A., Abdykerimov K. (2014). First report on seroprevalence of bluetongue, border disease and peste des petits ruminants virus infections in sheep in Kyrgyzstan. *Indian Journal of Animal Research*, 48(5), 469–472.

72 Kirkland P.D., Zhang N., Hawkes R.A., Li Z., Zhang F., Davis R.J., Sanders D.A., Li H., Zhang K., Ben J., He G.F., Hornitzky C.L., Hunt N.T. (2002). Studies on the epidemiology of bluetongue virus in China. *Epidemiology Infection*, 128(2), 257–268.

73 Douangngeun B., Theppangna W., Soukvilay V., Senaphanh C., Phithacthep K., Phomhaksa S., Yingst S., Lombardini E., Hansson E., Selleck P.W., Blacksell S.D. (2016). Seroprevalence of Q Fever, Brucellosis, and Bluetongue in Selected Provinces in Lao People's Democratic Republic. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 95(3), 558–561.

74 Duan Y., Yang Z., Bellis G., Xie J., Li L. (2022). Full Genome Sequencing of Three *Sedoreoviridae* Viruses Isolated from *Culicoides* spp. (Diptera, Ceratopogonidae) in China. *Viruses*, 14(5), 971.

75 Liao D., Yang H., Xiao L., Zhu J., Wang J., Li Z., Zhang N., Li H. (2018). Complete Genome Sequence of a Bluetongue Virus Serotype 15 Strain Isolated from China in 1996. *Genome Announcements*, 6(26), 1128.

76 Zhong J., Shu E., Zhang S., Yang Q., Chen Q., Niu B. (2024). Prediction and transmission analysis of bluetongue disease in China. *Preventive Veterinary Medicine*, 230, 106290.

77 Ma J., Gao X., Liu B., Chen H., Xiao, Wang H. (2019). Epidemiology and spatial distribution of bluetongue virus in Xinjiang, China. *PeerJ Open Advances in Zoology*, 7, e6514.

78 Maclachlan N.J., Mayo C.E., Daniels P.W., Savini G., Zientara S., Gibbs E.P. (2015). Bluetongue. *Revue Scientifique et Technique (OIE)*, 34(2), 329–340.

79 Thabet S., Lajnef R. (2024). Potential mechanisms underlying bluetongue virus emergence and spread. *Frontiers in Virology*, 4:1448192.

80 Díaz-Cao J.M., Lorca-Oró C., Pujols J., Cano-Terriza D., de los Ángeles Risalde M., Jiménez-Ruiz S., Caballero-Gómez J., García-Bocanegra I. (2020). Evaluation of two enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of bluetongue

virus in wild ruminants. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 70, 101461.

81 Bréard E., Turpaud M., Beaud G., Postic L., Fablet A., Beer M., Sialleau C., Caignard G., Viarouge C., Hoffmann B., Vitour D., Zientara S. (2021). Development and Validation of an ELISA for the Detection of Bluetongue Virus Serotype 4-Specific Antibodies. *Viruses*, 13, 1741.

82 Vandebussche F., Vanbinst T., Verheyden B., Van Dessel W., Demeestere L., Houdart P., Bertels G., Praet N., Berkvens D., Mintiens K., Goris N., De Clercq K. (2008). Evaluation of antibody-ELISA and real-time RT-PCR for the diagnosis and profiling of bluetongue virus serotype 8 during the epidemic in Belgium in 2006. *Veterinary Microbiology*, 129(1-2), 15-27.

83 Bréard E., Gorlier A., Viarouge C., Donnet F., Sailleau C., Schulz C., Hoffmann B., Comtet L., Beer M., Zientara S., Vitour D. (2018). Evaluation of an IGM-specific ELISA for early detection of bluetongue virus infections in domestic ruminants sera. *Transboundary and Emerging Diseases*, 66(1), 537–545.

84 Chand K., Biswas S.K., Ramakrishnan M.A. (2019). A multi-species indirect ELISA for detection group-specific antibodies against VP7 protein of bluetongue virus. *Small Ruminant Research*, 180, 6-8.

85 Eschbaumer M., Schulz C., Wäckerlin R., Gauly M., Beer M., Hoffmann B. (2011). Limitations of sandwich ELISAs for bluetongue virus antibody detection. *Veterinary Record*, 168(24), p.643.

86 Chand K., Biswas S.K., Pandey A.B., Saxena A., Tewari N., Mondal B. (2017). A competitive ELISA for detection of group specific antibody to bluetongue virus using anti-core antibody. *Biological*, 46, 168-171.

87 Mahaparta C.S., Sharma P., Biswas S.K., Chand K. (2022). Development of ELISA for the detection of antibodies against VP2 protein of bluetongue virus serotype-1. *Journal of Immunological Methods*, 511, 113386.

88 Rubbo A.D., Agnihotri K., Bowden T.R., Giles M., Newberry K., Peck G.R., Shiell B.J., Zamanipereshkaft M., White J.R. (2024). Challenges of BTV-Group Specific Serology Testing: No One Test Fits All. *Viruses*, 16, 1810.

89 Clavijo A., Heckert R.A., Dulac G.C., Afshar A. (2000). Isolation and identification of bluetongue virus. *Journal of Virological Methods*, 87(1-2), 13-23.

90 Rojas J.M., Rodríguez-Martín D., Martín V., Sevilla N. (2018). Diagnosing bluetongue virus in domestic ruminants: current perspectives. *Veterinary Medicine: Research and Reports*, 10, 17–27.

91 Jime'nez-Clavero M.A., Agüero M., Miguel E.S., Mayoral T., Lo'pez M.C., et al. (2006). High throughput detection of bluetongue virus by a new real-time fluorogenic reverse transcription–polymerase chain reaction: Application on clinical samples from current Mediterranean outbreaks. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 18(1), 7–17.

- 92 Nunamaker R.A., Mecham J.O., Wigington J.G., Ellis J.A. (1997). Bluetongue Virus in Laboratory-Reared *Culicoides variipennis sonorensis*: Applications of Dot-Blot, Elisa, and Immunoelectron Microscopy. *Journal of Medical Entomology*, 34(1), 18–23.
- 93 Goacher E., Randell R., Williams B., Treanor D. (2017). The Diagnostic Concordance of Whole Slide Imaging and Light Microscopy: A Systematic Review. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 141(1), 151–161.
- 94 Peter Kirkland, B. Farrugia, M.J. Frost, et al. (2022). Multiplexed serotype-specific real time PCR assays -- a valuable tool to support large scale surveillance for bluetongue virus infection. *Transboundary and emerging diseases*.
- 95 Saxena V.K., Deb R., Shrivastava S., Kantaraja c., Kumar A., Kumar S. (2012). Functionalizing gold nanoparticles with bluetongue virus multiple peptide antigens utilizing gold–thiol interaction: A novel approach to develop pen side test. *Research in Veterinary Science*, 93(3), 1531-1536.
- 96 Kühnemund M., Wei Q., Darai E., Wang M., Wei Q., Darai E., Wang., Hernández-Neuta I., Yang Z., Tsen D., Ahlford A., Mathor L., Sjöblom T., Ozcan A., Nilsson M. (2017). Targeted DNA sequencing and in situ mutation analysis using mobile phone microscopy. *Nature Communication*, 8, Article 13913.
- 97 Batten C.A., Bachanek-Bankowska K., Bin-Tarif A., Kgosana L., Swain A.J., Darpel K., Mellor P.S., Elliott H.G., Oura C.A.L. (2008). Bluetongue virus: European Community inter-laboratory comparison tests to evaluate ELISA and RT-PCR detection methods. *Veterinary Microbiology*, 129(1–2), 80–88.
- 98 Orłowska, A., Żmudziński, J.F., Smreczak, M., Trębas, P. & Marzec, A. (2017). Diagnostic reliability of different RT-PCR protocols for the detection of bluetongue virus serotype 14 (BTV-14). *Journal of Veterinary Research*, 61(4), 391–395.
- 99 Peng-wei, Z., Charlg-yuan“, D., Pan, T., Shu-fang, G., Xian, C., & Yin-fang, Y. (2001). Development of RT-PCR Assay for the De tection of Bluetongue Virus. *Virologica Sinica*, 16, 393–396.
- 100 Ries C., Beer M., Hoffmann B. (2020). BlueTYPE – A low density TaqMan-RT-qPCR array for the identification of all 24 classical Bluetongue virus serotypes. *Journal of Virological Methods*, 280, Article 113881.
- 101 Chacko N., Biswas S.K., Mohanty N.N., Chand K., Pandey A.B., Moldal B., Shivachandra S.B. (2019). Comparative immuno-reactivity of recombinant non-structural protein 2 fragments (N- and C- terminus) to detect bluetongue viral antibodies in small ruminant serum samples. *Small Ruminant Research*, 172, 8-15.
- 102 Curini V., Marcacci M., Tonelli A., Teodoro G.D., Domenico M.D., D'Alterio N., Portanti O., Ancora M., Savini G., Panfili M., Camma` C., Lorusso A. (2019). Molecular typing of Bluetongue virus using the nCounter® analysis system platform. *Journal of Virological Methods*, 269, 64–69.

- 103 Orrù G., Ferrando M.L., Meloni M., Liciardi M., Savini G., Santis P.D. (2006). Rapid detection and quantitation of Bluetongue virus (BTV) using a Molecular Beacon fluorescent probe assay. *Journal of Virological Methods*, 137(1), 34–42.
- 104 Singer R.S., Boyse W.M., Gardner I.A., Johnson W.O., Fisher A.S. (1998). Evaluation of bluetongue virus diagnostic tests in free-ranging bighorn sheep. *Preventive Veterinary Medicine*, 35(4), 265–282.
- 105 Chacko N., Biswas S.K., Mohanty N.N., Chand K., Mondal B., Pandey A.B., Shivachandra S.B. (2017). Immuno-reactivity of recombinant non-structural protein 3 N-terminus (rNS3Nt) in indirect-ELISA for detection of bluetongue viral antibodies in serum samples. *The Indian Journal of Animal Sciences*, 87(11), 1304–1309.
- 106 Biswas S.K., Hosamani M., Chand K., Chauhan A., Ain K.U., Selvarajan V., Nautiyal S., Bashir M., Hemadri D., Sharma G.K., Sreenivasa B.P. (2025). Expression of bluetongue virus full-length VP7 protein in insect cells and its diagnostic utility for detection of antibodies to the virus infection. *Journal of Immunological Methods*, 538, Article 113801
- 107 Xie G., Chen H., He X., Liang J., Deng W., He Z., Ye Y., Yang Q., Bi X., Liu X., Li D., Fan Z. (2016). Black-blood thrombus imaging (BTI): a contrast-free cardiovascular magnetic resonance approach for the diagnosis of non-acute deep vein thrombosis. *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance*, 19(1), Article 4
- 108 Golender N., Bumbarov V., Eldar A., Lorusso A., Kenigswald G., Varsano J.S., David D., Schainin S., Dagoni I., Gur I., Kaplan A., Gorohov A., Koren O., Oron E., Khinich Y., Sclamovich I., Meir A., Savini G. (2020). Bluetongue Serotype 3 in Israel 2013–2018: Clinical Manifestations of the Disease and Molecular Characterization of Israeli Strains. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, Article 112.
- 109 Xu Q.Y., Sun E.C., Yang T., Feng Y.F., Geng H.W., Wei T., Li J.P., Sun L., Sun J., Xi N., Zhang Q., Wang H.X., Luo E.Z., Bu Z.G., Wu D.L. (2014). Isolation of a Bluetongue virus group-specific monoclonal antibody and application to a diagnostic competitive ELISA. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 729–739.
- 110 Wilson W.C., Daniels P., Ostlund D.E., Oberst R.D., Hairdrove T.B., Mediger J., McIntosh M.T. (2015). Diagnostic Tools for Bluetongue and Epizootic Hemorrhagic Disease Viruses Applicable to North American Veterinary Diagnosticians. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 15(6), 364–373.
- 111 Armillotta G., Febo T.D., Ulisse S., Laguardia C., Ioroi M., Krasteva I., Tittarelli M., Mercante M.T., Luciani M. (2022). Production and Characterization of Monoclonal Antibodies Against the VP7 Protein of Epizootic Hemorrhagic Disease Virus. *Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy*, 41(4), 181–187.

- 112 Bissett S.L., Roy P. (2024). Impact of VP2 structure on antigenicity: comparison of BTV1 and the highly virulent BTV8 serotype. *Journal of Virology*, 98(10).
- 113 Billinis C., Koumbati M., Spyrou V., Nomikou K., Mangana O., Panagiotidis C.A. (2001). Bluetongue virus diagnosis of clinical cases by a duplex reverse transcription-PCR: a comparison with conventional methods. *Journal of Virological Methods*, 98(1), 77–89.
- 114 Martin A. Hofmann, Sandra Renzullo, Markus Mader, Valérie Chaignat, Gabriella Worwa, and Barbara Thuer. (2008). Genetic Characterization of Toggenburg Orbivirus, a New Bluetongue Virus, from Goats, Switzerland. *Emerging infectious diseases*, 14(12), 1855–1861.
- 115 Maan N.S., Maan S., Belaganahalli M.N., Ostlund E.N., Johnson D.J., Nomikou K., Mertens P.P. C. (2012). Identification and Differentiation of the Twenty Six Bluetongue Virus Serotypes by RT–PCR Amplification of the Serotype-Specific Genome Segment 2. *PloS One*, 7(2), e32601.
- 116 <https://www.megasoftware.net/>
- 117 Reuter J.S., Mathews D.H. (2010). RNAstructure: software for RNA secondary structure prediction and analysis. *BMC Bioinformatics*, <http://rna.urmc.rochester.edu/RNAstructure.html>.
- 118 <https://www.thermofisher.com/kz/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html>
- 119 <https://www.cdc.gov/epiinfo/index.html>



## Отчет подобия

### Метаданные

Название организации

**Satbayev University**

Название

**Генетическая характеристика вируса блютанга BTV-9W, циркулирующего в Южном Казахстане, и клонирование сегментов 2 и 10 вируса для разработки ПЦР тест-систем**

Автор

Научный руководитель / Эксперт

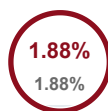
**Иванова Карина Руслановна Куаныш Тастамбек**

Подразделение

**ИГИНГД**

### Объем найденных подоби

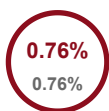
КП-ия определяют, какой процент текста по отношению к общему объему текста был найден в различных источниках. Обратите внимание! Высокие значения коэффициентов не означают плагиат. Отчет должен быть проанализирован экспертом.



КП1

**25**

Длина фразы для коэффициента подоби 2



КП2

**12502**

Количество слов



КЦ

**94015**

Количество символов

### Тревога

В этом разделе вы найдете информацию, касающуюся текстовых искажений. Эти искажения в тексте могут говорить о ВОЗМОЖНЫХ манипуляциях в тексте. Искажения в тексте могут носить преднамеренный характер, но чаще, характер технических ошибок при конвертации документа и его сохранении, поэтому мы рекомендуем вам подходить к анализу этого модуля со всей долей ответственности. В случае возникновения вопросов, просим обращаться в нашу службу поддержки.

Замена букв		24
Интервалы		0
Микропробелы		16
Белые знаки		0
Парафразы (SmartMarks)		21

### Подобия по списку источников

Ниже представлен список источников. В этом списке представлены источники из различных баз данных. Цвет текста означает в каком источнике он был найден. Эти источники и значения Коэффициента Подоби не отражают прямого плагиата. Необходимо открыть каждый источник и проанализировать содержание и правильность оформления источника.

#### 10 самых длинных фраз

Цвет текста

ПОРЯДКОВЫЙ НОМЕР	НАЗВАНИЕ И АДРЕС ИСТОЧНИКА URL (НАЗВАНИЕ БАЗЫ)	КОЛИЧЕСТВО ИДЕНТИЧНЫХ СЛОВ (ФРАГМЕНТОВ)
1	<a href="https://biocenter.kz/ru/proekty-ru/ap09259102-geneticheskaya-harakterizatsiya-izolyatov-virusa-blyutanga-vyavlyaemyh-v-kazahstane-i-razrabotka-otechestvennoj-test-sistemy-dlya-ih-differentsialnoj-detektsii/">https://biocenter.kz/ru/proekty-ru/ap09259102-geneticheskaya-harakterizatsiya-izolyatov-virusa-blyutanga-vyavlyaemyh-v-kazahstane-i-razrabotka-otechestvennoj-test-sistemy-dlya-ih-differentsialnoj-detektsii/</a>	35 0.28 %



2	<a href="https://biocenter.kz/ru/proekty-ru/ap09259102-geneticheskaya-harakterizatsiya-izolyatov-virusa-blyutanga-vyavlyaemyh-v-kazahstane-i-razrabotka-otechestvennoj-test-sistemy-dlya-ih-differentsialnoj-detektsii/">https://biocenter.kz/ru/proekty-ru/ap09259102-geneticheskaya-harakterizatsiya-izolyatov-virusa-blyutanga-vyavlyaemyh-v-kazahstane-i-razrabotka-otechestvennoj-test-sistemy-dlya-ih-differentsialnoj-detektsii/</a>	33 0.26 %
3	Микробиологическая характеристика сальмонеллеза кур в условиях промышленного производства 6/17/2024 Satbayev University (ИГиНГД)	27 0.22 %
4	<a href="https://biocenter.kz/ru/proekty-ru/ap09259102-geneticheskaya-harakterizatsiya-izolyatov-virusa-blyutanga-vyavlyaemyh-v-kazahstane-i-razrabotka-otechestvennoj-test-sistemy-dlya-ih-differentsialnoj-detektsii/">https://biocenter.kz/ru/proekty-ru/ap09259102-geneticheskaya-harakterizatsiya-izolyatov-virusa-blyutanga-vyavlyaemyh-v-kazahstane-i-razrabotka-otechestvennoj-test-sistemy-dlya-ih-differentsialnoj-detektsii/</a>	17 0.14 %
5	<a href="https://biocenter.kz/ru/proekty-ru/ap09259102-geneticheskaya-harakterizatsiya-izolyatov-virusa-blyutanga-vyavlyaemyh-v-kazahstane-i-razrabotka-otechestvennoj-test-sistemy-dlya-ih-differentsialnoj-detektsii/">https://biocenter.kz/ru/proekty-ru/ap09259102-geneticheskaya-harakterizatsiya-izolyatov-virusa-blyutanga-vyavlyaemyh-v-kazahstane-i-razrabotka-otechestvennoj-test-sistemy-dlya-ih-differentsialnoj-detektsii/</a>	12 0.10 %
6	Development of Differentiating Infected from Vaccinated Animals (DIVA) Real-Time PCR for African Horse Sickness Virus Serotype 1 Oi Wing Ng, Jasmine Ong, Siow Foong Chang, Jeslyn P.S. Wong, Kanokwan Puangjinda, Charlene Judith Fernandez, Tapanut Songkasupa, Eileen Y. Koh, Lee Ching Ng, Taoqi Huangfu, Yifan Wang, Him Hoo Yap;	11 0.09 %
7	<a href="https://biocenter.kz/ru/proekty-ru/ap09259102-geneticheskaya-harakterizatsiya-izolyatov-virusa-blyutanga-vyavlyaemyh-v-kazahstane-i-razrabotka-otechestvennoj-test-sistemy-dlya-ih-differentsialnoj-detektsii/">https://biocenter.kz/ru/proekty-ru/ap09259102-geneticheskaya-harakterizatsiya-izolyatov-virusa-blyutanga-vyavlyaemyh-v-kazahstane-i-razrabotka-otechestvennoj-test-sistemy-dlya-ih-differentsialnoj-detektsii/</a>	10 0.08 %
8	Оптимизация ПЦР протокола для диагностики анаплазмоза животных. 5/12/2023 North Kazakhstan State University named after Manash Kozybayev ((АФ) Кафедра "Агрономия и лесоводство")	9 0.07 %
9	Development of Differentiating Infected from Vaccinated Animals (DIVA) Real-Time PCR for African Horse Sickness Virus Serotype 1 Oi Wing Ng, Jasmine Ong, Siow Foong Chang, Jeslyn P.S. Wong, Kanokwan Puangjinda, Charlene Judith Fernandez, Tapanut Songkasupa, Eileen Y. Koh, Lee Ching Ng, Taoqi Huangfu, Yifan Wang, Him Hoo Yap;	8 0.06 %
10	<a href="https://biocenter.kz/ru/proekty-ru/ap09259102-geneticheskaya-harakterizatsiya-izolyatov-virusa-blyutanga-vyavlyaemyh-v-kazahstane-i-razrabotka-otechestvennoj-test-sistemy-dlya-ih-differentsialnoj-detektsii/">https://biocenter.kz/ru/proekty-ru/ap09259102-geneticheskaya-harakterizatsiya-izolyatov-virusa-blyutanga-vyavlyaemyh-v-kazahstane-i-razrabotka-otechestvennoj-test-sistemy-dlya-ih-differentsialnoj-detektsii/</a>	7 0.06 %


#### из базы данных RefBooks (0.15 %)

ПОРЯДКОВЫЙ НОМЕР	НАЗВАНИЕ	КОЛИЧЕСТВО ИДЕНТИЧНЫХ СЛОВ (ФРАГМЕНТОВ)
<b>Источник: Paperity - abstrakty</b>		
1	Development of Differentiating Infected from Vaccinated Animals (DIVA) Real-Time PCR for African Horse Sickness Virus Serotype 1 Oi Wing Ng, Jasmine Ong, Siow Foong Chang, Jeslyn P.S. Wong, Kanokwan Puangjinda, Charlene Judith Fernandez, Tapanut Songkasupa, Eileen Y. Koh, Lee Ching Ng, Taoqi Huangfu, Yifan Wang, Him Hoo Yap;	19 (2) 0.15 %

#### из домашней базы данных (0.22 %)

ПОРЯДКОВЫЙ НОМЕР	НАЗВАНИЕ	КОЛИЧЕСТВО ИДЕНТИЧНЫХ СЛОВ (ФРАГМЕНТОВ)
1	Микробиологическая характеристика сальмонеллеза кур в условиях промышленного производства 6/17/2024 Satbayev University (ИГиНГД)	27 (1) 0.22 %

#### из программы обмена базами данных (0.11 %)

ПОРЯДКОВЫЙ НОМЕР	НАЗВАНИЕ	КОЛИЧЕСТВО ИДЕНТИЧНЫХ СЛОВ (ФРАГМЕНТОВ)
1	<p>Оптимизация ПЦР протокола для диагностики анаплазмоза животных.</p> <p>5/12/2023</p> <p>North Kazakhstan State University named after Manash Kozybayev ((АФ) Кафедра "Агрономия и лесоводство")</p>	14 (2) 0.11 %
из интернета (1.40 %)		
ПОРЯДКОВЫЙ НОМЕР	ИСТОЧНИК URL	КОЛИЧЕСТВО ИДЕНТИЧНЫХ СЛОВ (ФРАГМЕНТОВ)
1	<a href="https://biocenter.kz/ru/proekty-ru/ap09259102-geneticheskaya-harakterizatsiya-izolyatov-virusa-blyutanga-vyyavlyaemyh-v-kazahstane-i-razrabotka-otechestvennoj-test-sistemy-dlya-ih-differentsialnoj-detektsii/">https://biocenter.kz/ru/proekty-ru/ap09259102-geneticheskaya-harakterizatsiya-izolyatov-virusa-blyutanga-vyyavlyaemyh-v-kazahstane-i-razrabotka-otechestvennoj-test-sistemy-dlya-ih-differentsialnoj-detektsii/</a>	157 (14) 1.26 %
2	<a href="https://cyberleninka.ru/article/n/k-mehanizmu-antiaritmicheskogo-deystviya-fabomotizola-digidrohlorida-pri-alkogolnoy-kardiomiopatii">https://cyberleninka.ru/article/n/k-mehanizmu-antiaritmicheskogo-deystviya-fabomotizola-digidrohlorida-pri-alkogolnoy-kardiomiopatii</a>	18 (3) 0.14 %

### Список принятых фрагментов (нет принятых фрагментов)

ПОРЯДКОВЫЙ НОМЕР	СОДЕРЖАНИЕ	КОЛИЧЕСТВО ИДЕНТИЧНЫХ СЛОВ (ФРАГМЕНТОВ)
---------------------	------------	---

## РЕЦЕНЗИЯ

на магистерскую диссертацию  
(наименование вида работы)

Ивановой Марины Руслановны  
(Ф.И.О. обучающегося)

7M05105 - Биотехнология  
(шифр и наименование ОП)

На тему: Генетическая характеристика вируса блютанга BTV-9W, циркулирующего в Южном Казахстане, и клонирование сегментов 2 и 10 вируса для разработки ПЦР тест-систем

Выполнено:

- а) графическая часть интерпретирована в 16 рисунках и 8 таблицах
- б) пояснительная записка на 63 страницах

## ЗАМЕЧАНИЯ К РАБОТЕ

Актуальность. Данная магистерская диссертационная работа является актуальной, так как направлена на изучение и генетическую характеристику вируса блютанга BTV-9W, циркулирующего на территории Южного Казахстана, а также клонирование сегментов 2 и 10 для разработки прототипа отечественной ПЦР тест-системы.

Научная новизна. С использованием методов молекулярной биологии и биоинформатического анализа была проведена генетическая характеристика вируса блютанга штамма BTV-9W, обнаруженного на территории Южного Казахстана, и осуществлено клонирование его сегментов 2 и 10 с целью разработки специфической ПЦР тест-системы, способной отличать вакцинные штаммы вируса от полевых.

Оценка содержания работы и полнота раскрытия темы. Для достижения поставленной цели и решения задач соискатель провела молекулярно-генетическую диагностику образцов из крови животных и гомогенатов насекомых-переносчиков, построение генетических деревьев, подтверждающих принадлежность вируса блютанга к серотипу 9 топотипу "west", а также с использованием методов молекулярного клонирования получила положительные ПЦР контроли для дальнейшей разработки отечественной ПЦР тест-системы.

Результаты полученных исследований могут стать основой для дальнейшего изучения вируса блютанга и разработки полноценной отечественной ПЦР тест-системы, способной детектировать и типировать BTV-9W, повышая уровень продовольственной и биологической безопасности Республики Казахстан.

## Оценка работы

Считаю, что представленная на защиту магистерская диссертационная работа Ивановой Марины на тему «Генетическая характеристика вируса блютанга BTV-9W, циркулирующего в Южном Казахстане, и клонирование сегментов 2 и 10 вируса для разработки ПЦР тест-систем» оценена на 98% и соискатель достойна получения степени магистр.

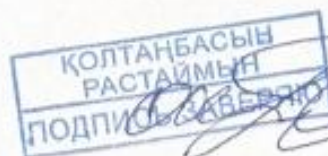
### Рецензент

PhD, профессор кафедры биотехнологии  
КазНУ им. аль-Фараби

Акимосков Н.Ш.

(подпись)

«12» июня 2025 г.





**ОТЗЫВ**  
**НАУЧНОГО РУКОВОДИТЕЛЯ**  
на магистерскую диссертацию  
(наименование вида работы)  
**Ивановой Марины Руслановны**  
(Ф.И.О. обучающегося)  
**7M05105 - Биотехнология**  
(шифр и наименование ОП)

Тема: Генетическая характеристика вируса блютанга BTV-9W, циркулирующего в Южном Казахстане, и клонирование сегментов 2 и 10 для вируса для разработки ПЦР тест-систем

Магистерская диссертация Ивановой Марины посвящена актуальной проблеме ветеринарной вирусологии — изучению генетических характеристик вируса блютанга серотипа 9, циркулирующего в Южном Казахстане. В работе особое внимание уделено сегментам 2 и 10, которые играют ключевую роль в идентификации серотипа вируса и его молекулярной диагностике. Проведённое исследование направлено на разработку основ для высокоспецифичных ПЦР-тест-систем, что имеет большое прикладное значение для ветеринарной диагностики и эпизоотического мониторинга.

В процессе работы Иванова Марина продемонстрировала высокий уровень теоретической подготовки, самостоятельности, а также владение современными методами молекулярной биологии, включая выделение РНК, обратную транскрипцию, ПЦР, гель-электрофорез, клонирование и трансформацию. Также следует отметить грамотный подход к анализу нуклеотидных последовательностей, работе с биоинформатическими ресурсами и интерпретации полученных данных.

Работа выполнена на высоком научном уровне, имеет логичную структуру, содержит достаточный объём экспериментальных данных, подтверждающих поставленные задачи и цели. Результаты, полученные в ходе исследования, могут быть использованы в дальнейших разработках ПЦР-диагностики блютанга, а также при эпидемиологическом мониторинге в регионах, подверженных риску заноса вируса.

Иванова Марина проявила себя как ответственный, дисциплинированный и целеустремленный исследователь, способный к самостоятельному проведению научной работы и анализу полученных результатов.

Считаю, что магистерская диссертационная работа Ивановой Марины соответствует требованиям, предъявляемым к квалификационным работам магистров, а её автор заслуживает присуждения степени магистра по направлению «Биотехнология».

Научный руководитель

PhD

(подпись)

«12» июня 2023 г.

Тастамбек Қ.Т.

