



Алынды: 29.03.2024 Қабылданды: 20.06.2024 Онлайн жарияланды: 29.06.2024

УДК 616-036.21

DOI: 10.26212/2227-1937.2024.18.65.013

Ж.М. Досмағамбет^{1,2}, ORCID <https://orcid.org/0000-0001-6681-4865>

М.М. Куатбек^{1,2} ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4023-4314>

Ж.А. Бердыгулова¹, ORCID <https://orcid.org/0000-0003-0379-2472>

А.Ж. Молдакарызова², ORCID <https://orcid.org/0000-0003-0186-978X>

С.Ә. Куатбекова¹, ORCID <http://orcid.org/0000-0002-1091-0150>

А.В. Жигайлов¹, ORCID <https://orcid.org/0000-0002-9646-033X>

Ю.В. Перфильева¹, ORCID <https://orcid.org/0000-0001-6803-0773>

Е.О. Остапчук¹, ORCID <https://orcid.org/0000-0002-3771-423X>

Э.Р. Мальцева¹, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9198-695X>

Ю.А. Скиба¹, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4895-1473>

¹ ЖШС «Ұлттық биотехнология орталығы» Алматы қаласындағы филиалы, «QazBioPharm» Ұлттық холдингі, Қазақстан

² Асфендияров атындағы Қазақ ұлттық медицина университеті, Алматы, Қазақстан

Автор-корреспондент: Ж.М. Досмағамбет zhaniya.dosmagambet@gmail.com

ДИАГНОСТИКАДАҒЫ НУКЛЕИН ҚЫШҚЫЛЫНЫҢ БӨЛІНУ КЕЗЕҢІНДЕГІ ЗЕРТХАНАЛЫҚ МӘСЕЛЕЛЕРІ

Түйін: Зертханалық тәжірибеде вирустық инфекциялардың диагностикасы өзекті мәселелердің бірі болып келеді. Ветеринарияда бұл тұрақты созылмалы жануарлардың инфекцияларына әкеледі, оларды емдеу өте қиын және экономикалық шығындарға әкеледі. Жаһандық пандемия жағдайында SARS-CoV-2 вирусы тударатын COVID-19 диагнозының уақтылы қойылмауы вирустың таралуына және симптоматикалық емдеудің кеш басталуына әкелді. Вирустық инфекциялардың ПТР диагностикасының негізгі мәселелерінің бірі жалған теріс және жалған оң нәтижелер болып табылады. Бұған көптеген факторлар әсер етуі мүмкін. Мысалы, дұрыс емес сынама алу, сынамадағы вирустың НҚ-ының детекциясына жеткіліксіз мөлшері, материалды дұрыс емес тасымалдау және сақтау, білікті емес зертханалық мамандар, нуклеин қышқылдарын бөліп алу әдістерінің қателіктері, ПТР жиынтығының ерекшелігі мен сезімталдығы жеткіліксіздігі.

Мақсаты: Модельдік вирустардың нуклеин қышқылдарын, SARS-CoV-2 коронавирусының нуклеин қышқылдарын және ірі қара малдың вирустық диареясын тудыратын *Pestivirus* туыс вирусты бөліп алу әдістерін салыстыру.

Зерттеу әдістері мен материалдары: Бұл жұмыста біз әртүрлі нуклеин қышқылдарын экстракциялайтын (сорбциялық, спин-бағандарға және магниттік бөлшектерге) әдістеріне негізделген "SARS-CoV-2 Амплитесті", "PureLink RNA mini kit (Invitrogen)" және "М-Сорб-00М-96 СИНТОЛ" сияқты әртүрлі коммерциялық бөліп алу жиынтықтарын салыстырылды. Салыстыру нақты уақыт режимінде полимеразды тізбекті реакцияны үш рет қою және коронавирустық инфекцияны анықтаудың шекті деңгейлері Ст-мен салыстыру және вирустық диареяға арналған классикалық ПТР реакциясында электрофорезден кейінгі жолақтарды визуалды салыстыру арқылы жүргізілді. Үлгілер панелі ретінде адамның мұрын-жұтқыншақ жағындыларының зертханалық расталған оң және теріс үлгілері, сондай-ақ жалпы РНҚ-лар бөлінген жануарлардан (ірі қара мал) мұрын шайындылары пайдаланылды.

Нәтижелері мен қорытынды: SARS-CoV-2 үлгілері бойынша Ст-нің ең жақсы нәтижелері нуклеин қышқылдарын бөліп алуының сорбциялау әдісі көрсетті. Магниттік бөлшектер мен спин-бағандардағы нуклеин қышқылдарының экстракциясы нақты уақыттағы ПТР амплификация 2-3 шекті көрсеткіш циклі арасындағы айырмашылықты көрсетті. Агарозды гель электрофорезінде анализ жүргізілген вирустық диарея ампликондары үш экстракциялау жиынтығы үшін визуалды айырмашылықты көрсетпеді.

Түйінді сөздер: SARS-CoV-2, вирустық инфекция, ірі қара малдың вирустық диареясы, диагностика, РНҚ, нақты уақыттағы полимеразды тізбекті реакция.

Ж.М. Досмағамбет^{1,2}, М.М. Куатбек^{1,2}, Ж.А. Бердыгулова¹, А.Ж. Молдакарызова², С.А. Куатбекова¹, А.В. Жигайлов¹, Ю.В. Перфильева¹, Е.О. Остапчук¹, Э.Р. Мальцева¹, Ю.А. Скиба¹

¹ Филиал ТОО «Национальный центр биотехнологии» в городе Алматы, Национальный холдинг «QazBioPharm», Казахстан

² Казахский Национальный медицинский университет имени Асфендиярова, Алматы, Казахстан

Автор-корреспондент: Ж.М. Досмағамбет zhaniya.dosmagambet@gmail.com

ПРОБЛЕМЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ НА ЭТАПЕ ВЫДЕЛЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Резюме: Проблемы диагностики вирусных инфекций были и остаются одной из самых острых проблем в лабораторной практике. В ветеринарии это приводит к персистирующим хроническим инфекциям животных, которые достаточно трудно поддаются лечению и приводят к экономическим потерям. В условиях глобальной пандемии несвоевременная диагностика вируса SARS-CoV-2, вызвавшего пандемию COVID-19, приводила к распространению вируса и отсроченному началу симптоматического лечения. Одной из основных проблем ПЦР-диагностики вирусных инфекций являются ложноотрицательные и ложноположительные результаты. На это могут влиять многие факторы, такие как неправильный отбор проб, недостаточное количество нуклеиновых кислот вируса в пробе для детекции, неправильная транспортировка и хранение материала, неквалифицированные лабораторные специалисты, погрешности методов выделения, недостаточная специфичность и чувствительность ПЦР-наборов.

Цель: Сравнить методы выделения нуклеиновых кислот модельных вирусов, нуклеиновых кислот коронавируса SARS-CoV-2 и вируса рода *Pestivirus*, вызывающего вирусную диарею крупного рогатого скота.

Материалы и методы: В настоящей работе мы сравнивали различные коммерческие наборы для выделения, такие как «АмплиТест SARS-CoV-2», «PureLink RNA mini kit (Invitrogen)» и «М-Сорб-ООМ-96 СИНТОЛ», основанные на различных методах выделения нуклеиновых кислот (сорбционный, колоночный и на магнитных частицах). Сравнение проводили путем трехкратной постановки полимеразной цепной реакции в режиме реального времени и сравнения Ct, пороговых уровней детекции коронавирусной инфекции, а также путем визуального сравнения бэндов после электрофореза в классической реакции ПЦР для вирусной диареи. В качестве панели образцов использовали лабораторно подтвержденные положительные и отрицательные образцы назо- и орофарингеальных мазков человека, а также назальные смывы от животных (КРС), из которых выделялись тотальные РНК.

Результаты и выводы: Лучшие результаты по Ct для образцов SARS-CoV-2 показал сорбционный метод выделения нуклеиновых кислот набором «АмплиТест SARS-CoV-2». Экстракция нуклеиновых кислот на магнитных частицах набором «М-Сорб-ООМ-96 СИНТОЛ» и спин-колонок набором «PureLink RNA mini kit (Invitrogen)» показывала различие в пределах 2-3 пороговых циклов амплификации методом ПЦР в режиме реального времени. Ампликоны вирусной диареи, проанализированные в агарозном гель-электрофорезе, не показали визуальной разницы для трех наборов для выделения.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, вирусная инфекция, вирусная диарея крупного рогатого скота, диагностика, РНК, ПЦР в режиме реального времени.

Zh.M. Dosmagambet^{1,2}, M.M. Kuatbek^{1,2}, Zh.A. Berdygulova¹, A.Zh. Moldakaryzova², S.A. Kuatbekova¹, A.V. Zhigailov¹, Yu.V. Perfilyeva¹, Ye.O. Ostapchuk¹, E.R. Maltseva¹, Yu.A. Skiba¹

¹ Almaty Branch of the National Center for Biotechnology, National Holding «QazBioPharm», Kazakhstan

² Asfendiyarov Kazakh National Medical University, Almaty, Kazakhstan

Corresponding author: Zh.M. Dosmagambet zhaniya.dosmagambet@gmail.com

PROBLEMS OF LABORATORY DIAGNOSTICS AT THE STAGE OF NUCLEIC ACID ISOLATION

Abstract: The problems of diagnosing viral infections have been and remain one of the most acute problems in laboratory practice. In veterinary medicine, this leads to persistent chronic infections of animals, which are quite difficult to treat and lead to economic losses. In the conditions of a global pandemic, delayed diagnosis of the SARS-CoV-2 virus causing COVID-19 led to the spread of the virus and delayed onset of symptomatic treatment. One of the main problems of PCR diagnosis of viral infections is false negative and false positive results. This can be influenced by many factors such as improper sampling, insufficient amount of virus NAs in the sample, improper transportation and storage of material, unqualified laboratory specialists, errors in isolation methods, and insufficient specificity and sensitivity of PCR kits.

The purpose of the study: To compare the methods of nucleic acids isolation of model viruses, nucleic acids of the SARS-CoV-2 coronavirus and the virus of the genus *Pestivirus*, which causes viral diarrhea in cattle.

Materials and methods: In this work, we compared various commercial isolation kits, such as «AmpliTest SARS-CoV-2», «PureLink RNA mini kit (Invitrogen)», «M-Sorb-OOM-96 SYNTHOL» based on various methods of nucleic acid isolation (sorption, column and magnetic particle). The comparison was carried out by three-fold staging of the polymerase chain reaction in real time and comparing threshold levels of detection of coronavirus infection Ct, as well as by visual comparison of bands after electrophoresis in the classical PCR reaction for viral diarrhea. Laboratory-confirmed positive and negative samples of human naso- and oropharyngeal swabs, as well as nasal flushes from animals (cattle), from which total RNAs were isolated, were used as a panel of samples.

Results and conclusions: The sorption method of nucleic acid isolation with the «SARS-CoV-2 AmpliTest» kit showed the best results of Ct for SARS-CoV-2 samples. The extraction of nucleic acids on magnetic particles with the «M-Sorb-OOM-96 SYNTHOL» kit and spin columns with the «PureLink RNA mini kit (Invitrogen)» showed a difference within 2-3 threshold amplification cycles by real-time PCR. Viral diarrhea amplicons analyzed in agarose gel electrophoresis showed no visual difference for the three isolation kits.

Key words: SARS-CoV-2, viral infection, bovine viral diarrhea, diagnosis, isolation of RNA, real-time PCR.

Кіріспе. Бөліп алу жиынтықтарын салыстыру үшін таңдалған модельдік қоздырғыштар – SARS-CoV-2 коронавирустық инфекциясы және малдың вирустық диареясы (ВД), тез таралатын РНҚ инфекцияларының мысалдары болып табылады. COVID-19-бүгінгі күнге дейін адамның үшінші жоғары патогенді коронавирустық ауруы. Бұл өте жұқпалы аурудың тез таралуы осы ғасырдағы жаһандық денсаулық сақтау үшін ең үлкен қауіп төндірді. Бақыланатын сынақтар мен клиникалық зерттеу нәтижелері туралы деректерге негізделген SARS-CoV-2 инфекциясына күдік бойынша диагностикалық сезімталдық, ерекшелік және дәлдік коронавирустық эпидеттердің ауқымын шектеуде маңызды болды. Ірі қара мал (ІҚМ) ВД вирусы бүкіл әлемде, оның ішінде Қазақстанда кең таралған [1], оған кез-келген жаста ІҚМ сезімтал. Жалған теріс сынақтар белсенді инфекцияны анықтамауы мүмкін, ал жалған оң сынақтар теріс нәтижелерді оң деп қате анықтауы мүмкін, бұл инфекциялармен күресуді қиындатады [2].

Вирустық инфекцияларды диагностикалау мәселелері. Пандемия кезінде көптеген елдер клиникалық расталған COVID-19 ауруы бар науқастарда жалған теріс нәтижелерге тап болды. Денсаулық сақтау министрлігінің әдеби деректері мен есептері COVID-19 типтік белгілері бар көптеген пациенттерде ПТР сынағы теріс нәтижелер болғанын көрсетеді. Жалған оң сынақтары денсаулық сақтау жүйесі үшін белгілі бір қиындықтар мен ауыртпалықтарды тудырды.

Жалған оң тесттердің пайда болуының маңызды себептерінің бірі - сынаманы алу кезінде емханада да, зертханада да бөлінген РНҚ үлгілердің, сондай-ақ бөліп алуға арналған реагенттерді немесе ПТР жиынтықтарының ластануы. Үлгіден үлгіге ластану зертханада үлгілерді тоңазытқышта өңдеу және сақтау кезінде, оң үлгілерден нуклеин қышқылдарын бөліп алу кезінде немесе ПТР қою кезінде оң бақылауды қосу кезінде дұрыс емес жұмыс техникасына байланысты болуы мүмкін [3-5].

Зертханаға тасымалдау кезінде үлгілерді дұрыс сақтамау жалған теріс нәтижелерге әкелуі мүмкін. Әсіресе, егер бастапқы жағындысы бар тупфер вирустарды сақтау үшін арнайы ортаға емес, жай фосфат-тұз буферіне немесе реагенттердің жетіспеушілігіне байланысты суға салынса. Үлгілерді дереу талдау әрқашан мүмкін емес еді, сондықтан талдау алдында қысқа немесе ұзақ сақтау қажет болуы мүмкін. Жануарлардан үлгілерді алу сонымен қатар оларды бірнеше фирмалардан немесе кәсіпорындардан жинап, зертханаға дейін тасымалдауды қамтиды, бұл ұзақ уақыт алуы мүмкін. Температура вирустық РНҚ-ның деградация жылдамдығының маңызды факторы болып табылады, ыдырау жылдамдығы 4-15°C-пен салыстырғанда 25°C-та және 37°C-та әлдеқайда жоғары.

Зерттеуде 4°C-та 28 күндік сақтау SARS-CoV-2 РНҚ-ның сызықтық ыдырауын тудыратынын және осылайша жалған теріс қателер қауіпін арттыратынын көрсетті. Алайда -20°C немесе -80°C температурада сақталған үлгілерде РНҚ ыдырауы аз болды [6].

Нақты уақыттағы кері транскрипциясы бар полимеразды тізбекті реакцияны (НУ-КТ-ПТР) сандық талдаудың молекулалық әдісіне негізделген SARS-CoV-2 анықтау үшін диагностикалық «алтын стандарт» сынағы болып табылады. SARS-CoV-2 РНҚ геномы НУ-КТ-ПТР талдауының көптеген ықтимал нысандарын ұсынады. Әрбір генетикалық аймақ үшін көптеген сынақ жүйелері әзірленді. Дүниежүзілік Денсаулық сақтау ұйымы (ДДҰ) ұсынған бірнеше гендерге (яғни E, N, ORF1 және RdRp) бағытталған тоғыз праймер-зонд комбинациясының тиімділігін салыстыру жүргізілді. Бұл салыстыру стандартты анықтамалық материалдар мен клиникалық үлгілерде жүргізілді. Вирустың төмен концентрациясында (1-10 вирустық РНҚ көшірмесі/мкл) барлық талдаулар оң нәтиже бермегені көрсетілді [7]. SARS-CoV-2 вирусының жылдам эволюциясы көптеген мутациялардың жиналуына әкеледі, әсіресе S спайк протеинінің генінде. ПТР жиынтықтарының проблемалары туралы айтатын болсақ, жалған теріс нәтижелер праймерлердің немесе зондтардың нысанды аймақтарындағы мутацияларға байланысты болуы мүмкін [11]. Олар көбінесе вирустық геномның ең консервативті аймақтарына таңдалғанымен, шамалы өзгергіштік ПТР талдауының тиімділігін төмендетуі мүмкін. Олар сондай-ақ SARS-CoV-2-мен байланысты емес РНҚ-ны анықтайтын арнайы әзірленбеген ПТР праймерлері мен зондтарынан туындауы мүмкін [8].

Әр түрлі экстракция жиынтықтарымен қышқылдардың тиімсіз бөлінуіне байланысты РНҚ вирустар анықталмауы мүмкін. Бөліп алу жиынтықтары әдетте әмбебап болып табылады, бірақ экстракция түріне байланысты бастапқы бөліп алу материалының түрі, көлемі, әртүрлі сезімталдығы бойынша ерекшеленеді. Пандемияға байланысты, бастапқыда КВИ диагностикасы үшін қандай бөліп алу әдістері, қай тіндердің қайсысы жақсы екендігі туралы аз мәлімет болды. COVID-19 пандемиясына байланысты SARS-CoV-2 сынағы үшін материалдар мен реагенттерге үлкен сұраныс болды, өндірушілердің жетіспеушілігі және жеткізілім проблемалары. Мұның бәрі зертханалардан қол жетімді реактивтер мен жиынтықтарды оқшаулау және пайдалану мәселелерін шешу үшін жұмыс процестерін әдістерді жылдам өзгертуді талап етті [9, 10]. Ветеринарияға келетін болсақ, нақты уақыт режимінде НУ-ПТР жиынтықтарының нарығына қарамастан, ветеринарлық зертханалардағы әдеттегі диагностика әлі де классикалық ПТР әдістерімен жүзеге асырылады, олардың сезімталдығы нақты уақыт жиынтықтарының қымбаттығына байланысты

әлдеқайда төмен, сондықтан НК-дарын сапалы бөлінуі диагностиканың маңызды нүктесі болып қала береді.

Материалдар мен әдістер. Зерттеуді жүргізуге "Ұлттық биотехнология орталығының" жергілікті этикалық комиссиясы мақұлдады.

Мұрын-жұтқыншақ жағындыларды алуды кәсіби медициналық қызметкерлері ерікті донорлардың ақпараттандырылған келісімінен кейін асептика ережелерін сақтай отырып, стандартты хаттамаға сәйкес арнайы тупферлерді (велюр-тампонмен) және тыныс алу жағындыларын сақтауға және тасымалдауға арналған арнайы ортасы бар пробиркамен жүзеге асырылды.

14 оң және 8 теріс үлгілерден тұратын зерттеу сынамалары Алматы қаласындағы «Ұлттық биотехнология орталығы» ЖШС филиалының үлгілер жинағынан алынды. Оң сынамалар үшін Ct 25 циклге дейінгі 6 ашық оң үлгі және Ct=37-45 мәндері бар 8 әлсіз оң үлгі таңдалды. Базадағы барлық үлгілер кодталған және анонимдендірілген, пациент туралы деректерді ашпайтын коды болған. Қолданылғанға дейін бастапқы материалдар -80 °C температурада сақталып, нуклеин қышқылдарын бөліп алу алдында үлгілер +4°C ерітілді.

Малдардан алынған үлгілер-ІҚМ ВД-сына 2 оң және 1 теріс мұрын жағындылары орындалатын АФ ҰБО бағдарламасы шеңберінде алынды.

Нуклеин қышқылдарын бөліп алу үш түрлі экстракция әдісіне негізделген үш коммерциялық жиынтықтың көмегімен: «SARS-CoV-2 Амплитесті» (Cat. № T-V002-FRT; ФГБУ «ЦСП» ФМБА Россия) жиынтығымен сорбция әдісі; «PureLink RNA mini kit (Invitrogen)» (Cat. № 12183018A; Thermo Fisher Scientific) жиынтығындағы мембраналық спин-бағандарда және «AutoMag» нуклеин қышқылдарын бөлетін автоматты станцияда магниттік бөлшектердің көмегімен «M-Corb-00M-96 СИНТОЛ» (Cat. № 00M-502л2-96; ООО «НПФ Синтол»)

реагенттер жиынтығы өндірушілердің нұсқауларына сәйкес жүзеге асырылды.

Нуклеин қышқылдарының сандық және сапалық экстракциясын әртүрлі жиынтықтармен салыстыру үшін NanoDrop (Thermo FS) құралында РНҚ концентрациясы спектрофотометриялық түрде өлшенді. Толқын ұзындығындағы сіңіру коэффициенті нуклеин қышқылдары үшін 260, белоктар үшін 280 және тұздар үшін 230 нуклеин қышқылдары ретінде экстракция кезінде тазалық шарасы ретінде пайдаланылды. A260/280≈1,8 қатынасы ДНҚ үшін «таза» болып саналды; ~2,0 қатынасы РНҚ үшін «таза» болып саналды. Сол сияқты, A260/230 қатынасы тұздың ластануының көрсеткіші ретінде қарастырылды. A260/230 күтілетін мәндер 2,0–2,2 диапазонында қарастырылды [11].

Бір сатылы НУ-КТ-ПТР қою «SARS-CoV-2 Амплитесті» (Cat № C-V0002(1)-FRT; ФГБУ «ЦСП» ФМБА Россия) бір жиынтығымен үш рет қайталануымен жүргізілді. Реакция қоспасын дайындау және амплификациясы бағдарламасы - өндірушінің нұсқауларына сәйкес жасалды. Жиын JOE арнасы арқылы ORF генінің вирустық нысанасын анықтайды, сонымен қатар FAM арнасы арқылы кері транскрипцияны бақылайды.

Бұл жұмыста үлгілерде адамның РНҚ бар екенін жағындылардың сапасын растау үшін RPS23 рибосомалық ақуыз гені пайдаланылды. Эндогендік бақылауға арналған праймерлер мен флуоресцентті сынама Астана қаласындағы «Ұлттық биотехнология орталығы» ЖШС Органикалық синтез зертханасында синтезделді және реакцияға 200-400 pmol соңғы концентрациясында қосылды (Кесте 1) [12]. Референтті генге арналған ПТР шарттары праймерлер мен анықтамалық ген сынамасы аталған COVID-19 диагностикалық жинағымен бөлек және мультиплексте жұмыс істейтіндей етіп оңтайландырылды.

Кесте 1 –ПТР-ларда қолданылған праймерлер.

Атауы	Тізбек
Тура праймер RPS23-F	5'-TGGAGGTGCTTCTCATGCAA-3'
Кері праймер RPS23-R	5'-AATGGCAGAATTTGGCTGTTTG-3'
Сынақ RPS23-P	FAM-TTCCTACCGAAACCTGCAAC-BHQ
Тура праймер BVDV_UTR_DL1F	5' GCCATGCCCTTAGTAGGACTAGC
Кері праймер BVDV_UTR_DL4R	5' CAACTCCATGTGCCATGTACAGC

ПТР қойылымдары QuantStudio 5 (Thermo FS) амплификациясы жүргізілді. Деректерді талдау және өңдеу Design and Analysis software v1.5.1 (Thermo FS) бағдарламасында жүргізілді.

Нәтижелер және талқылау. Бұл жұмыста бастапқы шарттар барлық әдістер үшін бірдей болды, өйткені экстракциялау бірдей үлгілерден жүргізілді. Зерттеуде ПТР қойылымдары үш рет қайталанды. Бөліп алынған

SARS-CoV-2 РНҚ-мен экстракциясың тиімділігін бағалау үшін нақты уақыт режимінде бір сатылы НУ-КТ-ПТР жүргізілді және референтті геннің флуоресценциясын (ол бойынша нормализациясын) ескере отырып, Ct шекті циклдарының деңгейі есептелді (А, Б, В қосымшалары).

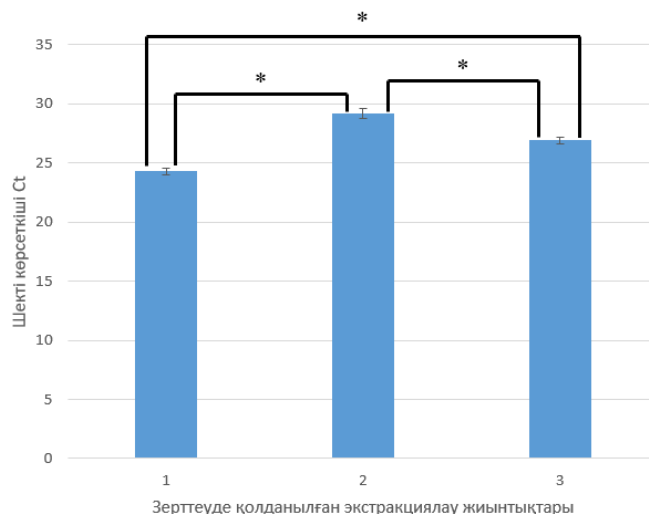
Нуклеин қышқылдарының әртүрлі жиынтықтармен сандық және сапалық экстракциясын салыстыру үшін



аспаптағы спектрофотометриялық өлшенген РНҚ концентрациясы орташа есеппен: $A_{260/280}=1,82$ тазалық қатынасы бар магниттік бөлшектермен бөлінген РНҚ үшін $24,0 \pm 2,1$ нг/мкл; $A_{260/280}=1,90$ тазалық қатынасы бар сорбция әдісімен бөлінген РНҚ үшін $12,5 \pm 0,9$ нг/мкл және $A_{260/280}=1,57$ тазалық қатынасы бар спин-бағандарда бөлінген РНҚ үшін $2,6 \pm 0,5$ нг/мкл көрсетті.

Алынған НУ-КТ-ПТР нәтижелері бойынша осы үш жиынтықпен бөлінген оң SARS-CoV-2 РНҚ сәйкесінше 100% жағдайда анықталды. Адамның РНҚ барлық оң және теріс үлгілерде анықталды.

Сондай-ақ, сорбция әдісімен, спин-бағандарда және магниттік бөлшектермен бөліп алынған РНҚ үлгілерінің НУ-КТ-ПТР қойылымдарының СТ орташа көрсеткіштерін салыстыру үшін гистограмма салынды (сурет 1).

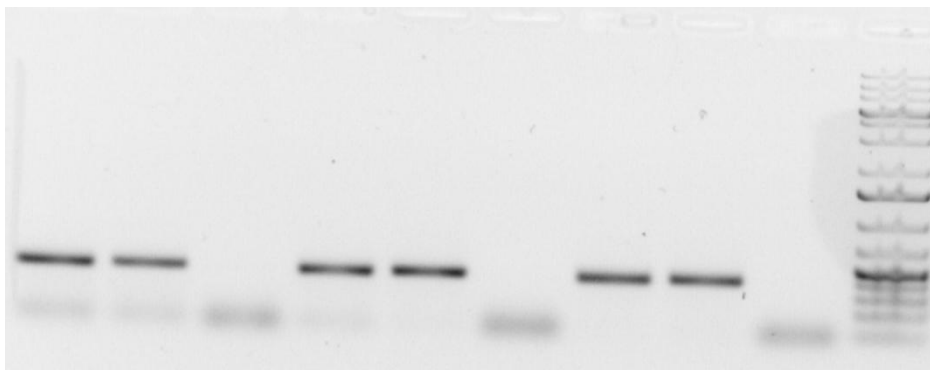


Сурет 1 – Экстракцияның әртүрлі әдістерімен бөлініп алынған үлгілердің НУ-КТ-ПТР қойылымдарының Ct орташа көрсеткіштері: №1 – «SARS-CoV-2 Амплитесті» жиынтығымен сорбция әдісімен нуклеин қышқылдарының бөлінуі; №2 – «PureLink RNA mini kit (Invitrogen)» жиынтығымен спин – бағандарда нуклеин қышқылдарының бөлінуі; №3 – «М-Сорб-ОМ-96 СИНТОЛ» жиынтығымен магниттік бөлшектермен нуклеин қышқылдарының бөлінуі. Ескерту: * – топтар арасындағы $p < 0,001$ сенімділік деңгейі

НУ-КТ-ПТР қою кезінде сорбциялық әдіспен экстракциялау автоматты станциядағы магниттік бөлшектердің әдістерімен және спин-бағандарда бөліп алуды салыстырғанда коронавирустық РНҚ детекциясымен орташа мәндерде статистикалық маңызды айырмашылық байқалды: орташа ауысым 2-3 реттік болды, ең жақсы нәтиже «АмплиТест SARS-CoV-2» жиынтығы көрсетті, бұдан әрі «М-Сорб-ОМ - 96 СИНТОЛ», бұдан әрі «PureLink RNA mini kit (Invitrogen)» көрсетті.

Жануарлардың (ІҚМ) мұрын жағындыларынан экстракцияланған РНҚ үлгілері үшін спектрофотометрия жүргізілмеген. ІҚМ ВД-сының РНҚ-сы электрофорездегі жағдайлардың 100%-да анықталды. Алайда, үш түрлі жиынтықпен бөлінген РНҚ-мен жеткізілген ПТР нәтижелері бойынша визуалды айырмашылық табылған жоқ (Сурет 2).

№1 №2 №3 №4 №5 №6 №7 №8 №9
М



Сурет 2 – ІҚМ ВД-сының РНҚ-сын анықтау үшін BVDV_UTR_DL1F/ BVDV_UTR_DL4R праймерлерін қолдана отырып, ПТР өнімдерін электрофоретикалық талдау. Белгілері: М – 1kb Plus ДНҚ маркері, №1-3 – Амплитест жиынтығымен, №4-6 –

PureLink жиынтығымен, №7-9 – Синтол жиынтығымен экстракциялау, ВД-ға арналған ІҚМ мұрын жағындыларынан 2 оң және 1 теріс РНҚ үлгілері.

НУ-КТ-ПТР қою кезіндегі Сt нәтижелері бойынша сорбциялық экстракция әдісімен мұрын-жұтқыншақ үлгілерінен РНҚ экстракциялау 1 орында, содан кейін автоматты бөліп алу станциясындағы магниттік бөлшектерде және 3 орында спин-бағандарда экстракция болып шықты.

Сондай-ақ, экстракцияланған үлгілердің спектрофотометриясының нәтижелерін салыстыра отырып, магниттік бөлшектердің экстракциялауы бөлінген нуклеин қышқылдарының (НК) ең көп мөлшерін ($24,0 \pm 2,1$ нг/мкл) көрсеткенімен экстракция кезінде тазалықтың A260/280 қатынасы сорбция әдісімен экстракциялауға тазалық коэффициенті $12,5 \pm 0,9$ нг/мкл нуклеин қышқылдарының бөлінуімен орташа есеппен $A260/280 = 1,90$ қарағанда төмен. Дегенмен, сандық және сапалық таңдауды салыстыру кезінде спин-бағандармен бөліп алу әдісі ең төмен нәтиже көрсетті. Бұл сорбциялық экстракция хаотропты тұздың қатысуымен селективті сорбцияға негізделген әдіс болғандықтан болуы мүмкін. Үлгінің ингибиторлары мен басқа компоненттері ерітіндіде қалады. Центрифугалау арқылы НК тұнбаға түседі, ал ПТР ингибиторлары бар супернатант алынып тасталады. Бұл әдістің артықшылығы-тазалықтың жоғарылауы және бөлінген НК-ның жақсы сапасы, сондай-ақ жоғары өндірушілік. Магниттік

бөлшектердің экстракциясы туралы айтатын болсақ, бұл НК-ны магниттік бөлшектерді жабатын затпен байланыстыруға негізделген ең жылдам НК экстракцияларының бірі. Сонымен қатар, магниттік бөлшектердің бөлінуін автоматтандыру оңай. Орта және ірі зертханаларға арналған, олар көп уақытты қажет ететін қолмен жұмыс әдісіне балама болып табылады. Бұл технология зертхананың өнімділігін едәуір арттырады. Сонымен қатар, НК шығымы және материалдың тазалығы, эксперименттің қайталануы мен болжамдылығы максималды болады (жалпы талдаудың жылдамдығы, дәлдігі және сенімділігі сияқты) және кросс-ластану (айқас ластану) қаупі азаяды. Спин-бағандардағы НК бөліп алу - бұл силикті бөлшектермен экстракцияның жетілдірілген әдісі. Спин-бағандар бағанға жасушалық лизаттың түсуі және центрифугалау кезінде НК бағандарда қалатындай етіп жасалған, ал қалғанының бәрі бағандардан арқылы өтеді. Бұл әдістің артықшылығы - бөлінген НК тазалығы мен жақсы сапасы. Алайда, зерттеу нәтижелері бойынша бұл жұмыста спин-бағандардағы НК бөліп алу әдісі басқа бөліп алу әдістерімен салыстырғанда ең нашар нәтиже көрсетті, бұл қолмен экстракциялау қателіктерімен, бағандардан РНҚ-ның біркелкі емес элюциясымен, сондай-ақ бағандардың физикалық күйімен байланысты болуы мүмкін.

А қосымшасы

Сорбция әдісіне негізделген «SARS-CoV-2 Амплитесті» жиынтығымен экстракцияланған SARS-CoV-2 РНҚ детекциясының орташа Сt мәндері

№	Бақылау	Вирустық ген
Үлгі №1	$27,1 \pm 0,2$	$24,3 \pm 0,2$
Үлгі №2	$26,9 \pm 0,1$	$26,5 \pm 0,1$
Үлгі №3	$26,5 \pm 0,2$	$26 \pm 0,4$
Үлгі №4	$26,3 \pm 0,2$	$22,6 \pm 0,1$
Үлгі №5	$26,5 \pm 0,2$	$19,5 \pm 0,6$
Үлгі №6	$26,5 \pm 0,2$	$25,7 \pm 0,2$
Үлгі №7	$26,1 \pm 0,1$	$22,2 \pm 0,2$
Үлгі №8	$26,3 \pm 0,1$	$27,2 \pm 0,2$
Үлгі №9	$26,3 \pm 0,3$	$22,5 \pm 0,3$
Үлгі №10	$26,3 \pm 0,2$	$26,5 \pm 0,1$
Үлгі №11	$26,1 \pm 0,1$	$25,4 \pm 0,2$
Үлгі №12	$26,1 \pm 0,1$	$25,7 \pm 0,1$
Үлгі №13	$26,2 \pm 0,1$	$22,7 \pm 0,1$
Үлгі №14	$26 \pm 0,1$	$23,6 \pm 0,2$
Үлгі №15	$26,0 \pm 0,1$	Теріс
Үлгі №16	$26,0 \pm 0,2$	Теріс

Үлгі №17	26,2±0,2	Теріс
Үлгі №18	26,5±0,2	Теріс
Үлгі №19	25,9±0,2	Теріс
Үлгі №20	25,7±0,2	Теріс
Үлгі №21	25,9±0,1	Теріс
Үлгі №22	26,2±0,2	Теріс

Б қосымшасы

Магниттік бөлшектермен экстракциялау әдісіне негізделген «М-Сорб-ООМ-96 СИНТОЛ» жиынтығымен бөлініп алынған SARS-CoV-2 РНҚ детекциясының орташа Ct мәндері

№	Бақылау	Вирустық ген
Үлгі №1	27±0,2	27±0,2
Үлгі №2	27±0,3	27±0,3
Үлгі №3	26,4±0,2	26,4±0,2
Үлгі №4	26,7±0	26,7±0
Үлгі №5	26,7±1,1	26,7±1,1
Үлгі №6	26,6±0,2	26,6±0,2
Үлгі №7	28±0,2	28±0,2
Үлгі №8	25,9±0,3	25,9±0,3
Үлгі №9	26,1±0,5	26,1±0,5
Үлгі №10	27,5±0	27,5±0
Үлгі №11	26±0,2	26±0,2
Үлгі №12	26,4±0,3	26,4±0,3
Үлгі №13	27,9±0,3	27,9±0,3
Үлгі №14	25,9±0,2	25,9±0,2
Үлгі №15	26,9±0,2	Теріс
Үлгі №16	26,2±0,2	Теріс
Үлгі №17	27,3±0,2	Теріс
Үлгі №18	26,7±0,1	Теріс
Үлгі №19	26,9±0,2	Теріс
Үлгі №20	26,7±0,2	Теріс
Үлгі №21	26,7±0,3	Теріс
Үлгі №22	27,2±0,1	Теріс

Б қосымшасы

Спин-бағандармен экстракциялауға негізделген «PureLink RNA mini kit (Invitrogen)» жиынтығымен бөлініп алынған SARS-CoV-2 РНҚ детекциясының орташа Ct мәндері

№	Бақылау	Вирустық ген
Үлгі №1	28,1±0,2	27±0,3
Үлгі №2	28,7±0,2	31,6±1,4
Үлгі №3	29,2±0,3	31,1±0,9
Үлгі №4	28,1±0,6	27,2±0,2
Үлгі №5	29,4±1,1	24,7±0,2
Үлгі №6	27,6±0,5	29±0,4
Үлгі №7	28,1±0,4	27±0,3
Үлгі №8	27,4±0,5	31,3±0,1
Үлгі №9	28,5±0,6	26,6±0,3
Үлгі №10	29,4±0,5	31,4±0,6
Үлгі №11	29±0,2	27,8±0,1
Үлгі №12	28,4±0,2	31,9±0,4
Үлгі №13	29,5±0,2	27,1±0,4
Үлгі №14	28,5±0,1	29,9±0,1
Үлгі №15	28,2±0,2	Теріс
Үлгі №16	27,9±0,2	Теріс
Үлгі №17	28,8±0,3	Теріс
Үлгі №18	28,4±0,9	Теріс
Үлгі №19	29,4±0,1	Теріс
Үлгі №20	25,9±3,3	Теріс
Үлгі №21	29,5±0,3	Теріс
Үлгі №22	28,5±0,1	Теріс

Қорытынды. SARS-CoV-2 вирусын анықтаудың ең жақсы нәтижелері - Ст-ның ең жақсы шекті циклы және РНҚ экстракциясының жақсы концентрациясы мен тазалығы «SARS-CoV-2 Амплитест» жиынтығын көрсетті. Ст нәтижелерімен салыстыра отырып, "SARS-CoV-2 Амплитесті" жиынтығы «М-Сорб-ООМ-96 СИНТОЛ» жиынтығымен және «PureLink RNA mini kit (Invitrogen)» жиынтығымен салыстырғанда жақсы нәтиже берді. Осылайша, пандемия кезінде коронавирустық инфекцияны диагностикалау үшін қолданылған барлық үш әдіс зертханалық диагностикаға жарамды, алынған Ст нәтижелері мен NanoDrop-тағы өлшенген концентрацияларға және тазалығына сәйкес, соның ішінде автоматты бөліп алу станциясы болған жағдайда «М-Сорб-ООМ - 96 СИНТОЛ» жинағымен үлгілерден НК бөліп алу - бұл зертханалық диагностиканы айтарлықтай жеңілдетеді. Әрбір НК бөліп алу жинағы анықтаған РНҚ мөлшерін

дәлірек есептеу үшін белгілі бастапқы концентрациясы бар бақылау оң сынама үлгілері қажет.

Ірі қара малдан үлгілерді бөліп алу және оларды классикалық ПТР әдісімен тексеру үшін барлық үш жиынтық жарамды нәтиже көрсетті және агарозды гель электрофорезінде визуализацияланды, бұл сонымен қатар зертханалық ветеринариялық диагностика үшін автоматты оқшаулау станциясын пайдалану мүмкіндігін растайды, бұл мониторингтік зерттеулер кезінде жануарлардан көптеген үлгілерді өңдеуді айтарлықтай жеңілдетеді.

ӘДЕБИЕТТЕР ТІЗІМІ

1 Zhigailov AV, Perfilyeva YV, Ostapchuk YO, Kan SA, Lushova AV, Kuligin AV, Ivanova KR, Kuatbekova SA, Abdolla N, Naizabayeva DA, Maltseva ER, Berdygulova ZA, Mashzhan AS, Zima YA, Nizkorodova AS, Skiba YA, Mamadaliyev SM. Molecular and serological survey of bovine viral diarrhoea virus infection in cattle in Kazakhstan.

Res Vet Sci. 2023 Sep;162:104965. doi: 10.1016/j.rvsc.2023.104965. Epub 2023 Jul 24. PMID: 37516041.

2 Yang J, Zheng Y, Gou X, Pu K, Chen Z, Guo Q, Ji R, Wang H, Wang Y, Zhou Y. Prevalence of comorbidities and its effects in patients infected with SARS-CoV-2: a systematic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis.* 2020 May;94:91-95. doi: 10.1016/j.ijid.2020.03.017. Epub 2020 Mar 12. PMID: 32173574; PMCID: PMC7194638.

3 Mögling R, Meijer A, Berginc N, Bruisten S, Charrel R, Coutard B, Eckerle I, Enouf V, Hungnes O, Korukluoglu G, Kossyvakis T, Mentis A, Molenkamp R, Muradrasoli S, Papa A, Pigny F, Thirion L, van der Werf S, Reusken C. Delayed Laboratory Response to COVID-19 Caused by Molecular Diagnostic Contamination. *Emerg Infect Dis.* 2020 Aug;26(8):1944-1946. doi: 10.3201/eid2608.201843. Epub 2020 May 20. PMID: 32433015; PMCID: PMC7392437.

4 Tahamtan A, Ardebili A. Real-time RT-PCR in COVID-19 detection: issues affecting the results. *Expert Rev Mol Diagn.* 2020 May;20(5):453-454. doi: 10.1080/14737159.2020.1757437. Epub 2020 Apr 22. PMID: 32297805; PMCID: PMC7189409.

5 Westhaus S, Weber FA, Schiwy S, Linnemann V, Brinkmann M, Widera M, Greve C, Janke A, Hollert H, Wintgens T, Ciesek S. Detection of SARS-CoV-2 in raw and treated wastewater in Germany - Suitability for COVID-19 surveillance and potential transmission risks. *Sci Total Environ.* 2021 Jan 10;751:141750. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.141750. Epub 2020 Aug 18. PMID: 32861187; PMCID: PMC7434407.

6 Espinosa MF, Sancho AN, Mendoza LM, Mota CR, Verbyla ME. Systematic review and meta-analysis of time-temperature pathogen inactivation. *Int J Hyg Environ Health.* 2020 Sep;230:113595. doi: 10.1016/j.ijheh.2020.113595. Epub 2020 Aug 16. PMID: 32814236.

7 Vogels CBF, Brito AF, Wyllie AL, Fauver JR, Ott IM, Kalinich CC, Petrone ME, Casanovas-Massana A, Catherine Muenker M, Moore AJ, Klein J, Lu P, Lu-Culligan A, Jiang X, Kim DJ, Kudo E, Mao T, Moriyama M, Oh JE, Park A, Silva J, Song E, Takahashi T, Taura M, Tokuyama M, Venkataraman A, Weizman OE, Wong P, Yang Y, Cheemarla NR, White EB, Lapidus S, Earnest R, Geng B, Vijayakumar P, Odio C, Fournier J, Bermejo S, Farhadian S, Dela Cruz CS, Iwasaki A, Ko AI, Landry ML, Foxman EF, Grubaugh ND. Analytical sensitivity and efficiency comparisons of SARS-CoV-2 RT-qPCR primer-probe sets. *Nat Microbiol.* 2020 Oct;5(10):1299-1305. doi: 10.1038/s41564-020-0761-6. Epub 2020 Jul 10. PMID: 32651556; PMCID: PMC9241364.

8 Phan T. Genetic diversity and evolution of SARS-CoV-2. *Infect Genet Evol.* 2020 Jul;81:104260. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104260. Epub 2020 Feb 21. PMID: 32092483; PMCID: PMC7106203.

9 Li D, Zhang J, Li J. Primer design for quantitative real-time PCR for the emerging Coronavirus SARS-CoV-2. *Theranostics.* 2020 Jun 1;10(16):7150-7162. doi: 10.7150/thno.47649. PMID: 32641984; PMCID: PMC7330846.

13 Iker BC, Bright KR, Pepper IL, Gerba CP, Kitajima M. Evaluation of commercial kits for the extraction and purification of viral nucleic acids from environmental and fecal samples. *J Virol Methods.* 2013 Jul;191(1):24-30. doi:

10.1016/j.jviromet.2013.03.011. Epub 2013 Apr 8. PMID: 23578704.

10 Zhang D, Lou X, Yan H, Pan J, Mao H, Tang H, Shu Y, Zhao Y, Liu L, Li J, Chen J, Zhang Y, Ma X. Metagenomic analysis of viral nucleic acid extraction methods in respiratory clinical samples. *BMC Genomics.* 2018 Oct 25;19(1):773. doi: 10.1186/s12864-018-5152-5. PMID: 30359242; PMCID: PMC6202819.

11 Matlock B. Assessment of Nucleic Acid Purity, Thermo Fisher Scientific Technical Note 52646. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/Product-Bulletins/TN52646-E-0215M-NucleicAcid.pdf>

12 Yegorov S, Goremykina M, Ivanova R, Good SV, Babenko D, Shevtsov A, MacDonald KS, Zhunussov Y; COVID-19 Genomics Research Group on behalf of the Semey COVID-19 Epidemiology Research Group. Epidemiology, clinical characteristics, and virologic features of COVID-19 patients in Kazakhstan: A nation-wide retrospective cohort study. *Lancet Reg Health Eur.* 2021 May;4:100096. doi: 10.1016/j.lanepe.2021.100096. Epub 2021 Apr 16. PMID: 33880458; PMCID: PMC8050615.

REFERENCES

1 Zhigailov AV, Perfilyeva YV, Ostapchuk YO, Kan SA, Lushova AV, Kuligin AV, Ivanova KR, Kumatbekova SA, Abdolla N, Naizabayeva DA, Maltseva ER, Berdygulova ZA, Mashzhan AS, Zima YA, Nizkorodova AS, Skiba YA, Mamadaliyev SM. Molecular and serological survey of bovine viral diarrhoea virus infection in cattle in Kazakhstan. *Res Vet Sci.* 2023 Sep;162:104965. doi: 10.1016/j.rvsc.2023.104965. Epub 2023 Jul 24. PMID: 37516041.

2 Yang J, Zheng Y, Gou X, Pu K, Chen Z, Guo Q, Ji R, Wang H, Wang Y, Zhou Y. Prevalence of comorbidities and its effects in patients infected with SARS-CoV-2: a systematic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis.* 2020 May;94:91-95. doi: 10.1016/j.ijid.2020.03.017. Epub 2020 Mar 12. PMID: 32173574; PMCID: PMC7194638.

3 Mögling R, Meijer A, Berginc N, Bruisten S, Charrel R, Coutard B, Eckerle I, Enouf V, Hungnes O, Korukluoglu G, Kossyvakis T, Mentis A, Molenkamp R, Muradrasoli S, Papa A, Pigny F, Thirion L, van der Werf S, Reusken C. Delayed Laboratory Response to COVID-19 Caused by Molecular Diagnostic Contamination. *Emerg Infect Dis.* 2020 Aug;26(8):1944-1946. doi: 10.3201/eid2608.201843. Epub 2020 May 20. PMID: 32433015; PMCID: PMC7392437.

4 Tahamtan A, Ardebili A. Real-time RT-PCR in COVID-19 detection: issues affecting the results. *Expert Rev Mol Diagn.* 2020 May;20(5):453-454. doi: 10.1080/14737159.2020.1757437. Epub 2020 Apr 22. PMID: 32297805; PMCID: PMC7189409.

5 Westhaus S, Weber FA, Schiwy S, Linnemann V, Brinkmann M, Widera M, Greve C, Janke A, Hollert H, Wintgens T, Ciesek S. Detection of SARS-CoV-2 in raw and treated wastewater in Germany - Suitability for COVID-19 surveillance and potential transmission risks. *Sci Total Environ.* 2021 Jan 10;751:141750. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.141750. Epub 2020 Aug 18. PMID: 32861187; PMCID: PMC7434407.

6 Espinosa MF, Sancho AN, Mendoza LM, Mota CR, Verbyla ME. Systematic review and meta-analysis of time-temperature pathogen inactivation. *Int J Hyg Environ Health.* 2020 Sep;230:113595. doi:

10.1016/j.ijheh.2020.113595. Epub 2020 Aug 16. PMID: 32814236.

7 Vogels CBF, Brito AF, Wyllie AL, Fauver JR, Ott IM, Kalinich CC, Petrone ME, Casanovas-Massana A, Catherine Muenker M, Moore AJ, Klein J, Lu P, Lu-Culligan A, Jiang X, Kim DJ, Kudo E, Mao T, Moriyama M, Oh JE, Park A, Silva J, Song E, Takahashi T, Taura M, Tokuyama M, Venkataraman A, Weizman OE, Wong P, Yang Y, Cheemarla NR, White EB, Lapidus S, Earnest R, Geng B, Vijayakumar P, Odio C, Fournier J, Bermejo S, Farhadian S, Dela Cruz CS, Iwasaki A, Ko AI, Landry ML, Foxman EF, Grubaugh ND. Analytical sensitivity and efficiency comparisons of SARS-CoV-2 RT-qPCR primer-probe sets. *Nat Microbiol.* 2020 Oct;5(10):1299-1305. doi: 10.1038/s41564-020-0761-6. Epub 2020 Jul 10. PMID: 32651556; PMCID: PMC9241364.

8 Phan T. Genetic diversity and evolution of SARS-CoV-2. *Infect Genet Evol.* 2020 Jul;81:104260. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104260. Epub 2020 Feb 21. PMID: 32092483; PMCID: PMC7106203.

9 Li D, Zhang J, Li J. Primer design for quantitative real-time PCR for the emerging Coronavirus SARS-CoV-2. *Theranostics.* 2020 Jun 1;10(16):7150-7162. doi: 10.7150/thno.47649. PMID: 32641984; PMCID: PMC7330846.

13 Iker BC, Bright KR, Pepper IL, Gerba CP, Kitajima M. Evaluation of commercial kits for the extraction and purification of viral nucleic acids from environmental and fecal samples. *J Virol Methods.* 2013 Jul;191(1):24-30. doi: 10.1016/j.jviromet.2013.03.011. Epub 2013 Apr 8. PMID: 23578704.

10 Zhang D, Lou X, Yan H, Pan J, Mao H, Tang H, Shu Y, Zhao Y, Liu L, Li J, Chen J, Zhang Y, Ma X. Metagenomic analysis of viral nucleic acid extraction methods in respiratory clinical samples. *BMC Genomics.* 2018 Oct 25;19(1):773. doi: 10.1186/s12864-018-5152-5. PMID: 30359242; PMCID: PMC6202819.

11 Matlock B. Assessment of Nucleic Acid Purity, Thermo Fisher Scientific Technical Note 52646. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/Product-Bulletins/TN52646-E-0215M-NucleicAcid.pdf>

12 Yegorov S, Goremykina M, Ivanova R, Good SV, Babenko D, Shevtsov A, MacDonald KS, Zhunussov Y; COVID-19 Genomics Research Group on behalf of the Semey COVID-19 Epidemiology Research Group. Epidemiology, clinical characteristics, and virologic features of COVID-19 patients in Kazakhstan: A nation-wide retrospective cohort study. *Lancet Reg Health Eur.* 2021 May;4:100096. doi: 10.1016/j.lanepe.2021.100096. Epub 2021 Apr 16. PMID: 33880458; PMCID: PMC8050615.

Авторлардың үлесі. Барлық авторлар осы мақаланы жазуға тең дәреже қатысты.

Мүдделер қақтығысы - мәлімделген жоқ.

Бұл материал басқа басылымдарда жариялау үшін бұрын мәлімделмеген және басқа басылымдардың қарауына ұсынылмаған.

Қаржыландыру - Бұл BR218004/0223 "Қазақстандағы биологиялық қауіпсіздікті қамтамасыз ету бойынша шараларды жетілдіру: қауіпті және аса қауіпті инфекцияларға қарсы іс-қимыл" және AP09259103 "COVID-19 диагностикасына ғылыми негізделген тәсілдемелерді дамыту мақсатында Қазақстан аумағында таралған SARS-CoV-2 штаммдарының геномды және субгеномды сипаттамаларын анықтау" зерттеу гранттары шеңберінде жүргізілді.

Вклад авторов. Все авторы принимали равносильное участие при написании данной статьи.

Конфликт интересов - не заявлен. Данный материал не был заявлен ранее, для публикации в других изданиях и не находится на рассмотрении другими издательствами.

Финансирование - Это исследование проведено в рамках BR218004/0223 «Совершенствование мер обеспечения биологической безопасности в Казахстане: противодействие опасным и особо опасным инфекциям» и AP09259103 "Выявление геномных и субгеномных характеристик циркулирующих в РК штаммов SARS-CoV-2 для разработки научно-обоснованных подходов к диагностике COVID-19".

Authors' Contributions. All authors participated equally in the writing of this article.

No conflicts of interest have been declared. This material has not been previously submitted for publication in other publications and is not under consideration by other publishers.

Funding - This study was conducted within the framework of BR218004/0223 "Improving measures to ensure biological security in Kazakhstan: countering dangerous and especially dangerous infections" and AP09259103 "Identification of genomic and subgenomic characteristics of SARS-CoV-2 strains circulating in the Republic of Kazakhstan for the development of scientifically based approaches to the diagnosis of COVID-19".

Сведения об авторах:

№	ФИО (полностью)	Должность, место работы	Телефон	Эл.почта
1	Досмағамбет Жания Маратқызы	Магистрант КазНМУ им. С.Д. Асфендиярова; Лаборант референтного центра по секвенированию и геномному анализу возбудителей опасных и особо опасных инфекций АФ НЦБ		zhaniya.dosmagambet@gmail.com



2	Куатбек Молдир Малибеккызы	Магистрант КазНМУ им. С.Д. Асфендиярова; Лаборант лаборатории экспертизы и диагностики АФ НЦБ		moldirkuatbek698@gmail.com
	Бердыгулова Жанна Амировна	Старший научный сотрудник отдел инноваций и разработок АФ НЦБ		berdygulova@gmail.com
3	Молдакарызова Айжан Жанарбековна	Заведующий кафедры молекулярной биологии и медицинской генетики КазНМУ им. С.Д. Асфендиярова		aijan202@mail.ru
	Қуатбекова Салтанат Әлімбекқызы	Научный сотрудник лаборатории экспертизы и диагностики АФ НЦБ		kuatbek9205@gmail.com
4	Жигайлов Андрей Викторович	Заведующий лабораторией молекулярной биологии АФ НЦБ		andrzhig@gmail.com
	Перфильева Юлия Викторовна	Ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии и иммунобиотехнологии АФ НЦБ		perfilyevayulya@gmail.com
	Остапчук Екатерина Олеговна	Заведующий лабораторией иммунологии и иммунобиотехнологии АФ НЦБ		katyostapchuk@gmail.com
	Мальцева Элина Романовна	Начальник отдела биобезопасности и биозащиты АФ НЦБ		elina_m@inbox.ru
	Скиба Юрий Александрович	Руководитель филиала АФ НЦБ		yuriy.skiba@gmail.com