АННОТАЦИЯ

диссертации на соискание степени доктора философии (PhD) по специальности 6D060700 – Биология

Бурашева Ербола Досановича

на тему: **«Изучение биологических свойств актуальных штаммов вируса гриппа лошадей, выделенных на территории Республики Казахстан в 2012 году»**

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертационная работа посвящена изучению биологических и молекулярно-генетических свойств штаммов ВГЛ A/H3N8, выделенных на территории Республики Казахстан путём определения их филогенетической принадлежности и антигенной активности для последующей разработки актуальных средств специфической профилактики.

Актуальность исследования

С незапамятных времен лошадь была традиционно неотъемлемой частью жизни степняка, предметом его гордости. Лошадь была источником не только пищи, одежды, домашней утвари, но и развлечения. Кроме того, лошадь давала возможность охотится и сражаться. Основными направлениями казахского коневодства всегда были: племенное; мясомолочное (продуктивное); рабочее – пользовательное; спортивное. В советский период в Казахстане было создано 19 племенных конных заводов и десятки племенных коневодческих ферм, многие из которых функционируют до сих пор. В настоящее время министерством сельского хозяйства рекомендовано к разведению 13 пород и типов лошадей. Из верховых – чистокровная верховая, арабская, ахалтекинская; верхово-упряжных – костанайская, донская, русская рысистая и русская тяжеловозная; мясомолочных – мугалжарская, казахская типа жабе, кушумская, адаевская и кабинский мясной тип.

Наиболее развитое коневодство отмечается в Алматинской, Восточно-Казахстанской, Южно-Казахстанской и Карагандинской областях. Наименьшее в Кызылординской, Мангистауской и Атырауской областях.

В настоящее время ситуация по опасным инфекциям среди животных стала актуальной проблемой для многих стран мира, в том числе и для нашего государства. Расширение экономических, торговых и туристических связей между странами существенно повышают возможность заноса и распространения особо опасных болезней животных и птиц. В связи с этим, обеспечение эпизоотологической безопасности является важной задачей для улучшения социально-экономической обстановки в РК.

Одной из проблем обеспечения эпизоотологической безопасности является широкое распространение инфекционных заболеваний лошадей. Это обусловлено рядом причин, основной из которых является возможность межвидового переноса вируса и распространение инфекции у поголовья вакцинированных животных.

Грипп лошадей (*grippus equorum*) – инфекционная, остро протекающая высококонтагиозная болезнь лошадей, характеризующаяся кратковременной

лихорадкой, общим угнетением, конъюнктивитом, катаральным воспалением верхних дыхательных путей, сухим, отрывистым, глубоким и болезненным кашлем, в тяжелых случаях развивается пневмония.

Инкубационный период длится 1-6 дней. Болезнь протекает, как правило, остро. На степень проявления признаков заболевания большое влияние оказывают условия содержания, эксплуатации, индивидуальная резистентность животных. Первые симптомы гриппа у лошадей часто не диагностируются, т.к. заболевание протекает легко, с признаками ринита и кашля, что связывают с раздражением слизистых оболочек дыхательных путей пылью воздуха и корма. У больных животных снижается аппетит, они быстро утомляются, появляются слизистые истечения из носовой полости и глаз, отек век, светобоязнь. Слизистая оболочка глаз, носовых ходов покрасневшая, набухшая, покрыта незначительным количеством прозрачной слизи. Подчелюстные лимфоузлы увеличены, нередко болезненны при пальпации. У животных учащается пульс, дыхание. Грипп у лошадей часто протекает доброкачественно и заканчивается клиническим выздоровлением через 2-4 дня. В отдельных случаях может наступить внезапная гибель животного в течение первых дней болезни.

Возбудитель гриппа лошадей – РНК-содержащий вирус, относящийся к семейству *Orthomyxoviridae* 80-120 нм в диаметре. Обладает чрезвычайно продуктивным механизмом рекомбинаций, обеспечивающим быструю антигенную изменчивость.

В связи с широким распространением заболевания Международным сообществом приняты рекомендации по основным направлениям борьбы с гриппом лошадей: подготовка законодательства и просветительская работа, эпидемиология и эпизоотология, методы диагностики, обеспечение биологической безопасности и вакцинация.

Выполнение этих рекомендаций напрямую зависит от изучения штаммов вирусов, циркулирующих в регионе, т.к. их характеристика является основой для создания эффективных диагностических тест-систем, а также являются неотъемлемой частью разработки технологии изготовления противовирусных вакцин. Поэтому работа по изучению биологических и молекулярно-генетических свойств вирусов гриппа лошадей, выделенных на территории Республики Казахстан, является актуальной и своевременной.

Изменчивость вируса гриппа лошадей требует от специалистов проведения постоянного мониторинга в различных регионах, выявления новых случаев заболевания, выделение и изучение происхождения возбудителя. Своевременное установление подтипов вируса гриппа циркулирующих в стране и регионе позволит более эффективно бороться с данным заболеванием. Изменчивость гемагглютинина и нейраминидазы со способностью менять антигенные свойства, приводят к возникновению новых штаммов вирусов гриппа, и являются причиной периодически возникающих эпидемий и пандемий. По этим причинам HA и NA являются одними из главных объектов молекулярных, иммунобиологических и биохимических исследований, направленных, в конечном счете, на изыскание эффективных методов борьбы с гриппом.

Цель работы: изучить биологические и молекулярно-генетические свойства штаммов вируса гриппа лошадей, выделенных на территории Республики Казахстан.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи:**

1. Провести эпизоотологический мониторинг гриппа лошадей на территории РК с последующим выделением и идентификацией изолятов ВГЛ.
2. Определить оптимальные параметры культивирования штаммов ВГЛ в культуре клеток и развивающихся куриных эмбрионах.
3. Исследовать морфометрические характеристики ВГЛ.
4. Наработать полноразмерные сегменты и провести полногеномное секвенирование штаммов ВГЛ.
5. Провести филогенетический анализ поверхностных генов (HA, NA), для определения филогенетического родства с другими штаммами.
6. Разработать систему диагностики и субтипирования новых выделенных штаммов ВГЛ с использованием биологического микрочипа и метода цепной полимеразной реакции в реальном времени.

Объекты исследования

Объектами исследований являлись штаммы *A/equine/Baizak/09/2012, A/equine/Kostanai/09/2012, A/equine/Matybulak/10/2012* и *A/equine/LKZ/09/2012* ВГЛ, выделенные в 2012 году на территории Казахстана, и их нуклеотидные последовательности, депонированные в базе данных *GenBank.*

Предмет исследования

Определение филогенетической принадлежности и антигенной активности штаммов ВГЛ A/H3N8, выделенных на территории Республики Казахстан, для последующей разработки актуальных средств специфической профилактики.

Методы исследования

Классические вирусологические и молекулярно-генетические методы как: РГА, РТГА, ПЦР, секвенирование и филогенетический анализ с помощью программ *BioEdit, Mega7.0* и аналитической базы данных *NCBI.*

Научная новизна исследования

Научная новизна и оригинальность исследований заключается во впервые установленной филогенетической принадлежности новых эпизоотических штаммов ВГЛ: *A/equine/Baizak/09/2012, A/equine/Kostanai/09/2012, A/equine/Matybulak/10/2012* и *A/equine/LKZ/09/2012* к клайду *American,* субклайду *Florida 2*, с антигенной формулой H3N8.

Определены основные биологические свойства, позволяющие культивировать вирус с высокой антигенной активностью, что является главным критерием при разработке средств специфической профилактики.

Впервые определена и опубликована в международной базе данных *GenBank* нуклеотидная последовательность полного генома штаммов ВГЛ *A/equine/Baizak/09/2012, A/equine/Kostanai/09/2012* и генов (HA, NA, M, NP, NS) штаммов *A/equine/Matybulak/10/2012, A/equine/LKZ/09/2012.*

Проведен сравнительный и генетический анализ, в результате которого установлена возможность применения изученных штаммов при разработке современных диагностических тест-систем и вакцин.

Теоретическая значимость работы

Теоретическая значимость работы заключается в определении и публикации в международной базе данных *GenBank* нуклеотидной последовательность полного генома штаммов ВГЛ *A/equine/Baizak/09/2012, A/equine/Kostanai/09/2012* и генов (HA, NA, M, NP, NS) штаммов *A/equine/Matybulak/10/2012, A/equine/LKZ/09/2012*, которая находится в свободном доступе для других учёных и может быть применена при проведении сравнительного и филогенетического анализа.

Практическая ценность исследования заключается в изоляции штаммов ВГЛ *A/equine/Baizak/09/2012, A/equine/Kostanai/09/2012, A/equine/Matybulak/10/2012* и *A/equine/LKZ/09/2012*, относящихся клайду *American*, субклайду *Florida 2*, что позволяет установить филогенетическую изменчивость изолятов относительно предыдущих эпизоотий и рекомендовать их при разработке актуальных вакцинных препаратов.

Получены вируссодержащие материалы с высокой инфекционной и гемагглютинирующей активностью, которые обеспечат напряженный иммунитет в случае использования как вакцинных кандидатов.

Изготовленные экспериментальные серии олигонуклеотидных микрочипов могут быть использованы при диагностике вируса гриппа A/H3N8. Отработаны методы ранней диагностики и субтипирования штаммов ВГЛ методом ОТ-ПЦР на подтип вируса гриппа A/H3N8.

Основные положения, выносимые на защиту:

Изоляты ВГЛ из различных регионов Республики Казахстан принадлежат к подтипу ВГЛ A/H3N8.

Подбор параметров культивирования позволил получить вируссодержащие материалы с инфекционной активностью 7,8–8,3 lg ЭИД50/см^3, и гемагглютинирующим титром 1:1024–2048 ГАЕ, что соответствует требованиям вакцинных штаммов, для разработки средств специфической профилактики.

По данным филогенетического анализа нуклеотидной последовательности генов гемагглютинина HA и нейраминидазы NA, штаммы *A/equine/Baizak/09/2012, A/equine/Kostanai/09/2012, A/equine/Matybulak/10/2012 и A/equine/LKZ/09/2012* относятся к клайду *American*, субклайду *Florida 2*.

Разработанная диагностическая система, включающая ПЦР и олигонуклеотидный микрочип, позволяет идентифицировать и субтипировать вирусы гриппа A/H3N8.

Основные результаты исследований и выводы:

Проведение комплексных исследований, посвященных изучению морфометрических, антигенных и молекулярно-генетических характеристик штаммов *A/equine/Baizak/09/2012, A/equine/Kostanai/09/2012, A/equine/Matybulak/ 10/2012* и *A/equine/LKZ/09/2012* вируса гриппа лошадей, выделенных на территории Казахстана, позволило осуществить их

филогенетический анализ. Установлено, что штаммы относятся к Американской линии семейству Флорида-2 вирусов гриппа лошадей. Определение нуклеотидной последовательности полного генома штаммов, использовано при разработке олигонуклеотидных микрочипов для диагностики и субтипирования вируса гриппа A/H3N8.

Полученные результаты позволяют сделать следующие выводы:

1. При проведении эпизоотологического мониторинга проанализировано 1563 проб сывороток крови и 857 пробы носоглоточных смывов, доставленных из различных регионов Республики Казахстан. Выделено четыре штамма: *A/equine/Baizak/09/2012, A/equine/Kostanai/09/2012, A/equine/Matybulak/ 10/2012 и A/equine/LKZ/09/2012* вируса гриппа лошадей.

2. Подобраны оптимальные условия культивирования вируса гриппа лошадей на развивающихся куриных эмбрионах и в культуре клеток MDCK (температура – 34 °С, длительность инкубации – 72 часов и дозой заражения 1000 ЭИД50/0,2 см3, 0,1 ТЦД50) с соблюдением этих параметров получена вирусная суспензия с высокой гемагглютинирующей активностью не менее 1:256 и инфекционным титром порядка 7,25 lg.

3. Штаммы *A/equine/Baizak/09/2012, A/equine/Kostanai/09/2012, A/equine/Matybulak/10/2012* (H3N8) отличаются как по морфометрическим (форма и размеры вирионов), так и по физическим характеристикам (константа седиментации и плавучая плотность). Установлено, что размер округлых вирионов составляет 80-200 нм, длина некоторых нитевидных форм вирусных частиц достигает 750 нм и более, а поверхность вирусных частиц покрыта шипиками высотой 6-8 нм.

4. С использованием подобранных специфических праймеров наработаны полноразмерные сегменты генома исследуемых штаммов. Полученная путем секвенирования нуклеотидная последовательность полного генома штаммов опубликована в международной базе данных *GenBank*. Номера доступа для штамма *A/equine/LKZ/09/2012*: MH173319, MH173320, MH173321, KP202378, KP202382, MH173322, KP202374, KP202386, для штамма *A/equine/Kostanai/09/2012*: MH173056, MH173057, MH173058, KP202380, KP202384, MH173059, KP202376 и KP202388.

5. В результате филогенетического анализа установлено, что штаммы *A/equine/Baizak/09/2012, A/equine/Kostanai/09/2012, A/equine/Matybulak/10/2012 и A/equine/LKZ/09/2012* (H3N8) относятся к клайду American, субклайду *Florida 2* вируса гриппа лошадей. Установлено, что различия аминокислот в позиции 387 и 394 могут служить для определения вирусов гриппа лошадей, выделенных в 2012 году в отдельную филогенетическую ветвь.

6. Подобраны и синтезированы специфические олигонуклеотидные зонды и праймеры на грипп A/H3N8. Проведена диагностика и субтипирование исследуемых штаммов вирусов гриппа лошадей с использованием биологического микрочипа и методом ОТ-ПЦР. Разработан оптимальный дизайн расположения зондов на платформе. Изготовлена экспериментальная серия микрочипов.

Все поставленные в диссертации задачи выполнены.

Связь с планом основных научных работ

Диссертационная работа была выполнена в рамках программы «О.0534 Грипп лошадей: эпизоотологический мониторинг, разработка средств специфической профилактики и диагностики на 2010-2012 годы».

Апробация работы

Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на следующих конференциях:

- на 7-ой Международной научной конференции «Европейская наука и технологии», Германия, Мюнхен (1), 2014;
- Symposium on Eurasian Biodiversity, 23-27 May 2016, Antalya, TURKIYE;
- на Международной научной конференции “Научный форум: Медицина, биология и химия” Москва, РФ, 2018 г.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 9 работ, в том числе 2 статьи в рецензируемых зарубежных научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science или Scopus с ненулевым импакт-фактором; 3 статьи в республиканских журналах из перечня Комитета по контролю в сфере образования и науки РК; 1 статья в журнале, входящем в перечень РИНЦ; 3 тезиса в материалах международных конференций и 4 патента Республики Казахстан.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 115 страницах компьютерного текста и состоит из следующих разделов: обозначения и сокращения, введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и их обсуждение, заключение, список использованных источников из 180 наименований. Работа включает 29 таблицы, 35 рисунков и 8 приложений.