АҢДАТПА

6D060700 - Биология мамандығы бойынша философия докторы (PhD)
дәрежесін алуға арналған диссертациясы
Бурашев Ербол Досанұлы

«2012 жылы Қазақстан Республикасында оқшауланған жылқы тұмау вирусының өзекті штамдарының биологиялық қасиеттерін зерттеу»

Диссертацияның жалпы сипаттамасы

Диссертация Қазақстан Республикасының аумағында оқшауланған A/H3N8 жылқы тұмауы вирусының (ЖТВ) штамдарының биологиялық және молекулалық-генетикалық қасиеттерін олардың алдын-алудың тиісті құралдарын әрі қарай дамыту үшін олардың филогенетикалық құрамын және антигендік белсенділігін анықтау арқылы зерттеуге арналған.

Зерттеудің өзектілігі

Ежелден бері ат дәстүрлі түрде дала өмірінің ажырамас бөлігі, оның мақтанышына айналды. Жылқы тек тамақ, киім, тұрмыстық заттар ғана емес, ойын-сауықтың да көзі болды. Сонымен қатар, жылқы аң аулауға және күресуге мүмкіндік берді. Қазақ жылқы шаруашылығының негізгі бағыттары әрқашан болған: асылдандыру; ет және сүт (өнімді); жұмыс істейтін - пайдаланушы; спорт. Кеңес Одағы кезінде Қазақстанда 19 асыл тұқымды ферма және ондаған асыл тұқымды жылқы фермалары құрылды, олардың көпшілігі әлі де жұмыс істейді. Қазіргі уақытта Ауыл шаруашылығы министрлігі асыл тұқымды жылқылардың 13 тұқымы мен түрін ұсынды. Ат үстінен - асыл тұқымды жылқы, араб, ахал-теке; атпен жүретіндер - Қостанай, Дон, Ресей жоргасы және Ресейлік ауыр жүк жылқысы; ет және сүт - Мұғалжар, қазақтың бадам түрі, Көшім және Адай жылқылары.

Жылқы шаруашылығы Алматы, Шығыс Қазақстан, Оңтүстік Қазақстан және Қарағанды облыстарында жақсы дамыған. Ең азы Қызылорда, Маңғыстау және Атырау облыстарында.

Қазіргі уақытта жануарлар арасында қауіпті инфекциялар әлемнің көптеген елдері, оның ішінде біздің мемлекет үшін де өзекті мәселеге айналды. Екі ел арасындағы экономикалық, сауда және туристік байланыстардың кеңеюі жануарлар мен құстардың аса қауіпті ауруларын енгізу және тарату мүмкіндігін айтарлықтай арттырады. Осыған байланысты эпизоотологиялық қауіпсіздікті қамтамасыз ету Қазақстандағы әлеуметтік-экономикалық жағдайды жақсартудың маңызды міндеті болып табылады.

Эпизоотологиялық қауіпсіздікті қамтамасыз етудің проблемаларының бірі жылқылардың кең таралған жұқпалы аурулары болып табылады. Бұл бірнеше себептерге байланысты, олардың негізгісі вирустың спецификалық жолмен берілуі және вакцинацияланған жануарлардың қорында инфекцияның таралуы мүмкін.

Жылқының тұмауы (grippus equorum) - бұл қысқа мерзімді безгегімен, жалпы депрессиямен, конъюнктивитпен, жоғарғы тыныс жолдарының катаррозымен,

құрғақ, мылжың, терең және ауыр жөтелмен сипатталатын инфекциялық, өткір ағып кететін өте жоғары инфекциялық жылқы ауруы, ауыр жағдайларда пневмония дамиды.

Инкубациялық кезең 1-6 күнге созылады. Ауру әдетте өткір. Ауру белгілерінің көріну дәрежесіне жануарлардың ұсталуы, жұмыс істеуі және жеке төзімділігі әсер етеді. Жылқыларда тұмаудың алғашқы белгілері жиі диагноз қойылмайды. ауру ринит пен жөтелдің белгілерімен оңай дамиды, бұл тыныс алу жолдарының шырышты қабығын ауа мен жем шаңымен тітіркендірумен байланысты. Ауру жануарларда тәбеті төмендейді, олар тез шаршайды, мұрын қуысы мен көзден шырышты бөліну, қабақтың ісінуі, фотофобия пайда болады. Көздің, мұрын жолдарының шырышты қабаты қызарған, ісінген, аз мөлшерде мөлдір шырышпен жабылған. Жақасты лимфа түйіндері үлкейген, көбінесе пальпация кезінде ауырады. Жануарларда импульс, тыныс алу жылдамырақ болады. Жылқылардағы тұмау көбінесе жақсы дамиды және 2-4 күннен кейін клиникалық қалпына келтірумен аяқталады. Кейбір жағдайларда аурудың алғашқы күндерінде жануардың кенеттен қайтыс болуы мүмкін.

Теңіз тұмауының қоздырғышы - диаметрі 80-120 нм *Orthomyxoviridae* тұқымдасына жататын РНҚ-лы вирус. Ол жедел антигендік өзгеруді қамтамасыз ететін өте өнімді рекомбинация механизміне ие.

Аурудың кең таралуына байланысты Халықаралық қауымдастық аталық тұмауға қарсы күрестің негізгі бағыттары бойынша ұсыныстар қабылдады: заңнамалық актілер мен тәрбие жұмыстарын дайындау, эпидемиология және эпизоотология, диагностикалық әдістер, биологиялық қауіпсіздікті қамтамасыз ету және вакцинация.

Бұл ұсыныстардың орындалуы аймақта таралатын вирустың штамдарын зерттеуге тікелей байланысты, өйткені олардың сипаттамасы тиімді диагностикалық тест жүйелерін құрудың негізі болып табылады, сонымен қатар вирусқа қарсы вакциналар өндірісінің технологиясының ажырамас бөлігі болып табылады. Сондықтан, Қазақстан Республикасының аумағында оқшауланған тұмау вирусының биологиялық және молекулалық-генетикалық қасиеттерін зерттеу өзекті болып табылады.

Ауру тұмауы вирусының өзгергіштігі мамандардан әр түрлі аймақтарды үнемі бақылап отыруды, жаңа жағдайларды анықтауды, қоздырғыштың оқшауланuын және зерттелуін талап етеді. Елімізде және аймақта таралатын тұмау вирусының кіші түрлерін уақтылы құру бұл аурумен тиімді күресуге мүмкіндік береді. Антигендік қасиеттерін өзгерту қабілетімен гемагглутинин мен нейраминидазаның өзгеруі тұмау вирустарының жаңа штамдарының пайда болуына әкеліп соғады және мезгіл-мезгіл пайда болатын эпидемиялар мен пандемиялардың себебі болып табылады. Осы себептерге байланысты НА және NA молекулалық, иммунобиологиялық және биохимиялық зерттеулердің, тұмаумен күресудің тиімді әдістерін табуға бағытталған негізгі объектілерінің бірі болып табылады.

Мақсаты: Қазақстан Республикасының аумағында оқшауланған жылқы тұмауы вирусының штамдарының биологиялық және молекулалық-генетикалық қасиеттерін зерттеу.

Осы мақсатқа жету үшін келесі **міндеттер** тұжырымдалды:

1. Қазақстан Республикасының аумағында аталық тұмауға эпизоотологиялық мониторинг жүргізу, одан әрі оқшауланумен және сәйкестендірумен.

2. Жасушалық культурада және дамушы тауық эмбрионында ЖТВ штамдарын өсірудің оңтайлы параметрлерін анықтау.

3. ЖТВ морфометриялық сипаттамаларын зерттеу.

4. Толық өлшемді сегменттерді жасаңыз және ЖТВ штамдарының геномды-кеңістігін жүргізу.

5. Басқа гендік штамдармен филогенетикалық байланысын анықтау үшін беттік гендерге (HA, NA) филогенетикалық талдау жасау.

6. Биологиялық микрочипті және нақты уақыттағы полимеразды тізбекті реакция әдісін қолдана отырып, оқшауланған ЖТВ жаңа штаммдарын диагностикалау жүйесін құру.

Зерттеу нысандары

2012 ж. оқшауланған *A/equine/Bayzak/09/2012, A/equine/Қостанай/09/2012, A/equine/Matybulak/10/2012* және *A/equine/LKZ/09/2012 ЖТВ* штаммдары зерттеу объектілері болды. Қазақстан аумағы және олардың нуклеотидтік тізбегі GenBank мәліметтер базасында сақталған.

Зерттеу заты

Қазақстан Республикасының аумағында оқшауланған A/H3N8 штаммдарының филогенетикалық құрамын және антигендік белсенділігін анықтау.

Зерттеу әдістері

РГА, РТГА, ПТР сияқты классикалық вирусологиялық және молекулалық-генетикалық әдістер, BioEdit, Mega7.0 бағдарламаларын және NCBI аналитикалық базасын қолдана отырып филогенетикалық талдау.

Зерттеудің ғылыми жаңалығы

Зерттеудің ғылыми жаңалығы мен өзіндік ерекшелігі ЖТВ жаңа эпизоотикалық штамдарының алғашқы құрылған филогенетикалық байланысына негізделген: *A/equine/Bayzak/09/2012, A/equine/Қостанай/09/2012, A/equine/Matybulak/10/2012* және *A/equine/LKZ/09/2012 A/H3N8* антигендік формуласы бар 2-ші Флорида қосалқы клайдына жатқызылды.

Нақты профилактиканың дамуындағы басты өлшем болып табылатын жоғары антигендік белсенділігі бар вирустың өсуіне мүмкіндік беретін негізгі биологиялық қасиеттер анықталды.

A/equine/Bayzak/09/2012, A/equine/Қостанай/09/2012, A/equine/Matybulak/10/2012 және *A/equine/LKZ/09/2012* штамдарының гендері (HA, NA, M, NP, NS) толық геномының нуклеотидтік тізбегі алғаш рет анықталып, GenBank халықаралық мәліметтер базасында жарияланды.

Салыстырмалы және генетикалық талдау жүргізілді, бұл зерттелген штамдарды заманауи диагностикалық тест жүйелері мен вакциналарды жасау кезінде пайдалану мүмкіндігін анықтады.

Жұмыстың теориялық маңызы

Жұмыстың теориялық маңыздылығы ЖТВ штаммдарының толық геномының *A/equine/Bayzak/09/2012, A/equine/Қостанай/09/2012 және A/equine/Matybulak/10/2012, A/equine/LKZ/09/2012* штаммдарының (HA, NA, M, NP, NS) гендері тізбегін халықаралық GenBank мәліметтер базасында анықтау және жариялау болып табылады және басқа ғалымдарға еркін қол жетімді және салыстырмалы және филогенетикалық талдауларда қолдануға болатын.

Зерттеудің практикалық құндылығы - *A/equine/Bayzak/09/2012, A/equine/Қостанай/09/2012, A/equine/Matybulak/10/2012, A / equine / LKZ / 09/2012* клайдқа байланысты Американдық, *Florila 2* субклайдына оқшауланған. Бұл бізге алдыңғы эпизоотияға қатысты изоляттардың филогенетикалық өзгергіштігін анықтауға және өзекті вакциналарды жасау кезінде ұсынуға мүмкіндік береді.

Вакциналарға кандидат ретінде қолданылса, жоғары иммунитетті қамтамасыз ететін жоғары инфекциялық және гемагглютинациялық белсенділігі бар вирустық материалдар алынды.

Өндірілген олигонуклеотидті микроэкранның тәжірибелік серияларын A/H3N8 тұмауы вирусын диагностикалау кезінде қолдануға болады. A/H3N8 тұмауының кіші түріне арналған РТ-ПТР арқылы ЖТВ штамдарын ерте диагностикалау және субтиптеу әдістері жасалды.

Қорғалатын негізгі ережелер:

Қазақстан Республикасының әртүрлі аймақтарындағы бөлінген жылқы тұмау вирусының изоляттары A/H3N8 түріне жатады.

Өсіру параметрлерін таңдау инфекциялық белсенділігі 7,8–8,3 лг EID50 / см3 болатын вирусы бар материалдарды және вакциналық штаммдардың талаптарына сәйкес келетін 1: 1024–2048 GAE гемагглютинациялық титрін алуға мүмкіндік берді, бұл нақты профилактикалық агенттерді әзірлеуге мүмкіндік берді.

Гемагглютинин және НА нейраминидаза гендерінің нуклеотидтер тізбегінің филогенетикалық талдауы бойынша *A/equine/Bayzak/09/2012, A/equine/Қостанай/09/2012, A/equine/Matybulak/10/2012 және A/equine/LKZ/09/2012* американдық Клайдқа, 2-ші Florila субклайдына тиесілі.

Жасалған диагностикалық жүйе, оның ішінде ПТР және олигонуклеотид микрочипі, A/H3N8 тұмауын вирустарды анықтауға және оларды балауға мүмкіндік береді.

Зерттеудің негізгі нәтижелері мен қорытындылары:

A/equine/Bayzak/09/2012, A/equine/Қостанай/09/2012, A/equine/Matybulak/10/2012 және A/equine/LKZ/09/2012 штамдарының морфометриялық, антигендік және молекулалық-генетикалық сипаттамаларын кешенді зерттеу / 09/2012 ж., Қазақстан аумағында оқшауланған жылқылардың тұмау вирусы оларды филогенетикалық талдауға мүмкіндік берді. Штаммдардың

Флорида-2 тұқымқуалаушылық тектес вирустар тобына жататындығы анықталды. Штаммдардың толық геномының нуклеотидтер тізбегін анықтау олигонуклеотидті микрожарықты дамытуда A/H3N8 тұмауының диагнозы мен ішкі түрін анықтау үшін қолданылды.

Алынған нәтижелер келесі қорытынды жасауға мүмкіндік береді:

1. Эпизоотологиялық мониторинг жүргізу кезінде Қазақстан Республикасының әртүрлі аймақтарынан жеткізілген қан сарысуының 1563, мұрын-жұтқыншақтың 857 сынамасы талданды. Төрт штамм оқшауланды: *A/equine/Bayzak/09/2012, A/equine/Қостанай/09/2012, A/equine/Matybulak/10/2012 және A/equine/LKZ/09/2012* жылқы тұмауы вирусына қарсы.

2. Тауық эмбриондары мен MDCK клеткалық культурасында атиндік тұмау вирусын өсірудің оңтайлы шарттары (температура - 34 ° C, инкубация уақыты - 72 сағат және инфекцияның дозасы 1000 EID50 / 0.2 см3, 0,1 TCD50) осы параметрлерге сәйкес анықталды. Кемінде 1: 256 гемагглютинаторлық белсенділігі бар вирустық суспензия және 7,25 лг жұқпалы титр алынды.

3. *A/equine/Bayzak/09/2012, A/equine/Қостанай/09/2012 және A/equine/Matybulak/10/2012* (H3N8) штаммдары морфометриялық (вириондардың пішіні мен мөлшері) және физикалық жағынан да ерекшеленеді. сипаттамалары (шөгінділердің тұрақты және өзгермелі тығыздығы). Дөңгелектелген вириондардың мөлшері 80-200 нм, вирустық бөлшектердің кейбір филаментті формаларының ұзындығы 750 нм немесе одан да көп, вирустық бөлшектердің беті 6-8 нм биіктіктегі омыртқалармен жабылатындығы анықталды.

Таңдалған нақты праймерлердің көмегімен зерттелетін штамдар геномының толық өлшемді сегменттері жасалды. Секвенирлеу арқылы алынған толық штамм геномының нуклеотидтер тізбегі GenBank халықаралық деректер базасында жарияланған. A/equine/LKZ/09/2012 штаммына қол жетімділік нөмірлері: MH173319, MH173320, MH173321, KP202378, KP202382, MH173322, KP202374, KP202386, штаммға A/equine/Қостанай/09/2012: MH173056, MH173058, MH173058, MH173058, MH173058, MH173058, MH173058, MH173058, MH173058, MH173058, MH173058, MH173058, MH173058, MH173321, KP202378, KP202382, MH173322, KP202374, KP202386. KP202384, MH173059, KP202376 және KP202388.

5. Филогенетикалық талдау нәтижесінде *A/equine/Bayzak/09/2012, A/equine/Қостанай/09/2012, A/equine/Matybulak/10/2012 және A/equine/LKZ/09/2012* (штаммдары) анықталды H3N8) Флорида-2 тұқымдас тектес вирустардың американдық желісіне жатады. Аминқышқылдарының 387 және 394 позицияларындағы айырмашылықтар 2012 жылы жеке филогенетикалық сала ретінде оқшауланған атмосфералық тұмау вирусын анықтауға қызмет ете алатындығы анықталды.

6. A/H3N8 тұмауына арналған нақты олигонуклеотидті зондтар мен праймерлер таңдалған және синтезделген. Биологиялық микрочипті және РТ-ПТР қолданып зерттелген тұмау вирустары штамдарының диагностикасы және қосалқы түрлері

жасалды. Платформада зондтардың орналасуының оңтайлы дизайны жасалды. Микрочиптердің тәжірибелік сериялары шығарылды.

Диссертацияда көрсетілген барлық тапсырмалар орындалды.

Негізгі ғылыми жұмыс жоспарымен байланысы

Диссертация «О.0534 жылқылардың тұмауы: эпизоотологиялық бақылау, арнайы алдын-алу және диагностикалық құралдарды әзірлеу» бағдарламасы аясында 2010-2012 жж. орындалды.

Жұмысты сынақтан өткізу

Диссертацияның материалдары келесі конференцияларда баяндалды және талқыланды:

- «Еуропалық ғылым және технологиялар» 7-ші халықаралық ғылыми конференцияда, Германия, Мюнхен (1), 2014 ж .;
- Еуразиялық биоәртүрлілік бойынша симпозиум, 23-27 мамыр, 2016, Анталия, TURKIYE;
- «Ғылыми форум: медицина, биология және химия» халықаралық ғылыми конференциясында Мәскеу, Ресей, 2018 ж.

Жарияланымдар

Диссертациялық материалдардың негізінде 9 жұмыс жарияланды, оның ішінде 2 мақала Web of Science немесе Scopus мәліметтер базасында индекстелген нөлдік импакт-фактормен қарастырылған шетелдік ғылыми журналдарда; Қазақстан Республикасы Білім және ғылым саласындағы бақылау комитеті тізімінен республикалық журналдардағы 3 мақала; РҒЗИ тізіміне енген журналдағы 1 мақала; 3 халықаралық конференция материалдары мен 4 Қазақстан Республикасының патенті.

Диссертацияның көлемі мен құрылымы

Диссертация компьютерлік мәтіннің 115 бетінде ұсынылған және келесі бөлімдерден тұрады: белгілеулер мен қысқартулар, кіріспе, әдебиетке шолу, зерттеу материалдары мен әдістері, нәтижелер мен талқылау, қорытынды, 180 тармақтан алынған әдебиеттер тізімі. Жұмыс 29 кестеден, 35 суреттен және 4 қосымшадан тұрады.