Кыргыз Республикасынын билим берүү жана илим министрлиги

К.И. Скрябин атындагы Кыргыз улуттук агрардык университети

Диссертациялык кеңеш Д 06.16.538

Кол жазма укугунда
УДК 619:578.2

Боронбаева Аида Ильичевна

А, О ТИПТЕРИНДЕГИ ШАРП ВИРУСУНУН МОЛЕКУЛАЛЫК – ГЕНЕТИКАЛЫК МҮНӨЗДӨМӨСҮ

06.02.02 – ветеринардык микробиология, виросология, эпизоотология, микология менен бирге микотоксикология жана иммунология.

Биология илимдеринин кандидаты окумуштуу даражасын алууга диссертациянын автореферати

Бишкек – 2018

Жумуш А. Дүйшеев атындагы Кыргыз ветеринария илим-изилдөө институтунун вирусология жана биотехнология лабораториясында аткарылды.

Илимий жетекчиси:	ветеринария илимдеринин доктору, КР УИАнын мүчө-корреспонденти, профессор **Нургазиев Рысбек Зарылдыкович**
Расмий оппоненттер:	биология илимдеринин доктору, профессор **Дөөлөткелдиева Тинатин Дөөлөткелдиевна** биология илимдеринин кандидаты **Султангазиева Куляйсан Турлыбаевна**
Жетектөөчү уюм:	Тажик айыл-чарба илимдер Академиясынын биологиялык коопсуздук маселелер институту

Диссертацияны коргоо 2018 – жылдын “16” февралында саат 14:00 К. И. Скрябин атындагы Кыргыз улуттук агрардык университетине караштуу Д. 06.16.538 диссертациялык отурумунда өткөрүлөт (кошо уюмдаштыруучу Кыргыз-Түрк “Манас” университети) дареги: 720005, Бишкек шаары, Медеров көчөсү, 68. E-mail: knau-info@mail.ru

Диссертация менен К.И. Скрябин атындагы Кыргыз улуттук агрардык университетинин китепканасында таанышууга болот. Дареги: 720005, Бишкек шаары, Медеров көчөсү, 68.

Автореферат 2018-жылдын “__” ______________ таратылды.

Диссертациялык кеңештин окумуштуу катчысы, ветеринария илимдеринин кандидаты, доцент **Крутская Е.Д.**

Эмгектин жалпы мүнөздөмөсү

Теманын актуалдуулугу. Шарп – үй жана ача туяктуу жаныбарлардын коркунучтуу жогорку контагиоздук, курч өтүүчү вирустук ылаңы.

Шарптын козгогучу бир катар типтерге жана подтиптерге бөлүнөт, ошондуктан аларды табууну жана идентификациялоону кыйла татаалдандырат.

Шарп вирусунун көп сандагы типтеринин ичинен Кыргыз Республикасынын аймагында А жана О деген эки тиби акыркы жылдарда катталууда. Жугууга жакын малды жылыга массалык түрдө эмдөөнүн натыйжасында акыркы 5 жылдын ичинде шарп боюнча эпизоотиялык туруктуулук сакталууда, бирок локалдуу ылаңдоолор жылыга белгиленет.

Шарпка каршы ийгиликтүү күрөшүүнүн негизги козгоочуну эрте диагностикалоо жана типтештирүү болуп эсептелет. Ветеринардык практикада мурда колдонулуп жүргөн диагностикалык ыкмалардын өз ара бул эки факторлору генотиптин жана субгенотиптердин деңгээлинде вирустарды жогорку тактыкта дифференциялоого мүмкүндүк бербейт, бул диагнозду коюну жана спецификалуу алдын алуу үчүн вакциналардын тибин тандоону татаалдандырат.

Шарп вирусун типтештирүү үчүн лабораториялык диагностикалоо талап кылынат, ал так жана тез натыйжаны берүүгө тийиш. Мурда шарпты лабораториялык аныктоону иммуноферменттик анализ (ИФА), комплементтерди байланыштыруу реакциясы (КБР), нейтрализация реакциясы (НР) серологиялык ыкмалар менен өткөрүшчү. Бул ыкмалардын ар биринин өзүнүн артыкчылыгы жана айрым кемчиликтери бар. Алардын негизги кемчилиги реакцияны коюнун оордугу жана узактыгы болуп эсептелет. Шарптын вирусун өз маалында жана диагностоо, типтерин идентификациялоо үчүн жеткиликтүү, өтө өзгөчөлүү ыкмалар зарыл.

Демек, молекулалык-биологиялык мүнөздөмөнүн негизинде полимераздык чынжыр реакция (ПЧР) технологиясын колдонуу менен шарптын вирусунун типтерин идентификациялоо ветеринардык жана биологиялык илимдердин актуалдуу маселеси болуп эсептелет.

Ушуга байланыштуу, биздин алдыбызда Кыргыз Республикасынын аймагында шарп ылаңынын очокторун табуу максатында айланып жүрүүчү вирустун мониторингин өткөрүү үчүн спецификалык праймерлерин иштеп чыгуу маселеси коюлду.

Диссертациянын темасынын негизги илимий программалар менен байланышы. Диссертациялык жумуш вирусология жана биотехнология лабораториясынын базасында аткарылды, диссертациянын темасы боюнча өткөрүлгөн илимий изилдөөлөр А.Дүйшеев атындагы Кыргыз ветеринария илим-изилдөө институтунун вирусология жана биотехнология лабораториясынын илимий изилдөө иштеринин (ИИИ) “Айыл чарба малдарынын шарпынын мониторингин, диагностикасын жана спецификалуу алдын алууну өркүндөтүү” (2010-2014-ж.), мамлекеттик

каттоо номери 0004028; “Айыл чарба малдарынын өзгөчө коркунучтуу вирустук ылаңдарын диагностикалоонун серологиялык жана молекулалык – биологиялык ыкмаларын иштеп чыгуу жана өркүндөтүү” (2015 – 2018-ж.), мамлекеттик каттоо нимери 0007146 тематикалык планынын курамдык бөлүгү болуп эсептелет.

Изилдөөлөрдүн максаты жана милдеттери. Илимий жумуштун максаты шарптын вирусун табуу менен типтештирүү үчүн түрспецификалык праймерлерди иштеп чыгуу жана оптималдаштыруу, молекулалык-генетикалык ыкмаларды колдонуу менен вирустун катталуучу типтеринин генетикалык касиеттерин изилдөө (секвендештирүү жана ПЧР) болду. Алдыга коюлган максаттарга жетүү үчүн төмөндөгүдөй милдеттерди чечүү зарыл эле:

- эпизоотиянын очогунан шарптын вирусунун изолятын бөлүү;
- бөлүнгөн изоляттын культуралык касиеттерин изилдөө;
- А, О типтериндеги шарптын вирустарын типтештирүү үчүн спецификалык (өзгөчө) праймерлерин иштеп чыгуу;
- классикалык ыкманы ПЧР диагностикалоо жана шарптын вирусун типтештирүү үчүн Реал-Тайм параметрлерин оптималдаштыруу;
- ПЧР азыктарын секвендештирүү – филогенетикалык анализ үчүн иштелип чыккан праймерлерди колдонуу.

Иштин илимий жаңылыгы:

- шарп вирусунун бөлүнгөн изолятынын культуралдык касиеттери изилденди;
- Кыргыз Республикасында биринчи жолу А, О типтериндеги шарптын вирусуна спецификалык праймерлер иштелип чыкты;
- шарпты диагностикалоо үчүн ПЧРдин классикалык ыкмасы жана Реал-Таймды коюнун технологиясы оптималдаштырылды;
- вирус секвендештирилди жана А, О типтериндеги шарптын вирусунун нуклеотиддик ырааттуулугу анализденди;
- Кыргызстандын жана алыскы чет өлкөлөрдүн аймактарында айланып жүрүшкөн А, О типтеринин изоляттарынын ортосундагы филогенетикалык байланыштын келип чыгышы аныкталды.

Алынган натыйжалардын практикалык маанилүүлүгү. Өткөрүлгөн изилдөөлөрдүн натыйжалары боюнча “ПЧР анализин колдонуу менен А, О типтериндеги шарптын вирусун типтештирүү боюнча методикалык сунуштар” иштелип чыкты. Методикалык сунуштар А. Дуйшеев атындагы Кыргыз ветеринария илим-изилдөө институтундагы окумуштуу кеңеши тарабынан 2017 – жылдын 17 мартында №2 протоколу менен талкууланган жана бекитилген, жана Кыргыз Республикасынын өкмөтүнө караштуу ветеринария жана фитосанитария коопсуздугу боюнча Мамлекеттик испекциянын Башкы ветеринардык инспектору К.Т. Жумаканов тарабынан 2017-жылдын 5 июнунда бекитилген.

А, О типтериндеги шарп вирусун типтештирүү үчүн спецификалык праймерлер иштелип чыккан жана ветеринардык диагностика борборлоруна

сунуш кылынган. NCBI маалыматтык базаны салыштыруу менен жергиликтүү изоляты анализдөө өткөрүлгөн, бул спецификалык профилактика үчүн диагностикалык препараттарды жана биопрепараттарды иштеп чыгууда жана даярдоодо пайдаланууга мүмкүндүк берет.

Алынган натыйжалардын экономикалык маанилүүлүгү. ПЧР, АКТ-ПЧР, ПЧР-реалдуу убагындагы даярдалган праймерлерди жана оптималдаштырылган технологияны коюну лабораториялык практикага киргизүү шарптын диагностикасын чоң тактык менен жана өз учурунда өткөрүүгө мүмкүндүк берет. Бул Кыргыз Республикасынын аймагында шарптын очокторун табууга жана аларды жоюу менен дарылоонун максаттуу чараларын көрүүгө мүмкүндүк берет. Сунуш кылынган праймерлер таасирдүүлүгү боюнча чет элдик аналогдордон калышпайт.

Коргоого коюлуп жаткан диссертациянын негизги жоболору:

- ВНК-21 жана УБ (улактын бөйрөгүнүн) клеткаларынын кыйыштыруучу культурасынан шарптын вирусун бөлүү жана адаптациялоо;
- шарптын вирусунун бөлүнгөн изолятынын культуралык касиеттери;
- ПЧР анализ ыкмасы менен шарптын вирусун диагностикалоо үчүн түроспецификалык праймерлерди иштеп чыгуу жана оптималдаштыруу;
- Кыргыз Республикасынын аймактарында катталуучу А жана О ттиптериндеги шарптын вирусун типтештирүү үчүн түроспецификалык праймерлерди колдонуу;
- алынган изолятты молекулалык-генетикалык жана филогенетикалык анализдөө.

Талапкердин кошкон жеке салымы. Диссертациялык иштин бардык бөлүмдөрү автордун жеке катышуусу менен аткарылды. Түроспецификалык праймерлерди иштеп чыгуу, шарптын вирусун типтештирүү, ПЧР анализди коюнун шарттарын оптималдаштыруу, ошондой эле шарптын вирусунун геномун секвендештирүү боюнча татаал молекулалык-генетикалык изилдөөлөрдүн сериясы аткарылды. Бул жумуш ветеринария илимдеринин доктору, КР УИАнын мүчө-корреспонденти, профессор Р.З. Нургазиевдин жетекчилиги алдында аткарылды

Изилдөөлөрдүн натыйжаларын апробациялоо. Диссертациянын негизги жоболору «XXI кылымдын илими: жаңыча мамиле», Ж. Баласагын атындагы КУУ (Бишкек ш., 2014-ж.) жаш окумуштуулардын ЖОЖдор аралык илимий-практикалык конференциясында; Кыргыз Республикасынын мамлекеттик жана саясий ишмери Ж.Б. Аманбаевдин 70 жылдык юбилейине арналган илимий-практикалык конфенренцияда (К.И. Скрябин атындагы КУАУ, Бишкек ш., 2016-ж.); А. Дүйшеев атындагы Кыргыз ветеринария илим-изилдөө институтунун Окумуштуулар кеңешинин отурумунда талкууланган (2008-2016-жылдар).

Диссертациянын натыйжаларынын басылмаларда чагылдырылышынын толуктугу. Диссертациянын материалдары боюнча Кыргыз Республикасынын Жогорку аттестациялык комиссиясы сунуш кылган басылмаларда 10 илимий макала, анын ичинде РИНЦке кирген

журналда 2 макала жарыяланган. “ПЧР анализди колдонуу менен А, О типтериндеги шарптын вирусун типтештирүү боюнча методикалык сунуштар” иштелип чыккан.

Диссертациянын түзүмү жана көлөмү. Диссертация компьютердик тексттин 133 бетинде баяндалган да, ага шарттуу белгилердин, символдордун жана терминдердин тизмеси, темалары, киришүү, адабияттардын обзору, өздүк изилдөөлөр, изилдөөлөрдүн натыйжаларын талкуулоо, тыянактар, практикалык сунуштар, пайдаланган адабият булактарынын тизмеси, сунуштар камтылган. Жумуш 27 сүрөт, 17 таблицалар менен иллюстрацияланган. Пайдаланган адабият булактарынын тизмеси 197 аталышты, анын ичинде чет элдик авторлордун 67 аталышты камтыйт.

ИШТИН НЕГИЗГИ МАЗМУНУ

Кириш сөз бөлүмүндө Кыргызстанда жана чектеш республикалардагы малдын шарп ылаңынын абалына, вирустун бөлүнгөн типтерине, шарптан тарткан зыяндар; ылаңды диагностикалоонун колдонулуп жаткан методдору, алардын спецификасы жана начар жактарына обзор берилген. Шарптын вирусунун (ШВ) ар түрдүү типтеринин биологиялык касиеттерин терең изилдөөнүн зарылдыгы негизделет.

“Адабияттар обзору” деген I главада ата мекендик жана чет элдик авторлордун адабий булактары боюнча республикалык аймагында катталуучу шарптын вирусунун типтери жөнүндө жалпы маалыматтар берилет. Вирустарды табуунун колдонуп жаткан серологиялык жана молекулалык-биологиялык методдор, классикалык вирусологиялык методикаларды колдонуу менен алардын морфологиялык мүнөздөлүшү келтирилген.

“Изилдөөлөрдүн материалдары жана методдору” деген II главасында изилдөөлөрдүн объекттерине мүнөздөмө берилген, анда шарп боюнча таза болбогон фермердик жана дыйкан чарбаларында колдонулуп жаткан изилдөөлөрдүн методдору, вирустардын биологиялык касиеттерин изилдөө баяндалат. Эмгекте классикалык серологиялык, вирусологиялык жана молекулалык-генетикалык методдор колдонулду. Изоляттарды бөлүү үчүн жана штаммдар менен иштөөдө жогорку техникалык жана MEGA 6, BLAST, Clustal W компьютердик программалар пайдаланылды.

Ири жана майда малдардын, топоздордун канынын сары суусун изилдөөлөрдү ИФА, CHEKIT FMD 3ABCbo-ov шайманынын жардамы менен айыл чарба малдарынын канынын сары суусундагы ИФА 3АВС-тагы структуралык эмес белокторду табуу үчүн өткөрдүк (IDEXX Laboratories, Нидерланды).

Вирусту адаптациялоо жана ВНК-21, УБ клеткалардын культураларында пассаждоо метод менен зарыл титрлерде алардын топтолушу өткөрүлдү.

NCBI маалыматтардын биомаалыматтык базасынын жардамы менен республиканын аймагында катталуучу шарптын вирусун типтештирүү үчүн праймерлер иштелип чыкты.

ДНКны бөлүп чыгууну «Axygen» шайманы менен өткөрдүк. РНКнын артка кайтаруу транскрипциясы үчүн Qiagen фирмасынын атайын шайманы пайдаланылды. Амплификациянын оптималдуу температуралык режим үчүн Mini Opticon (Bio-Rad) температуралык градиент функциялуу амплификатор пайдаланылды. Реакциянын учётун агароздук гелдеги электрофарез методу менен өткөрүлдү. Реалдуу убакыттагы ПЧРди коюну «СИНТОЛ» атайын шайманы менен өткөрүлдү. ПЧР РТ натыйжаларынын учётун Rotor-Gene Q (QIAGEN) аппаратынын жардамы менен өткөрдүк. Алынган ПЧР азыкты секвендештирүү ABIPRISM 310 GeneticAnalyzer (AppliedBiosystems, АКШ) генетикалык анализаторлорунда өткөрдүк.

ӨЗДҮК ИЗИЛДӨӨЛӨРДҮН НАТЫЙЖАЛАРЫ

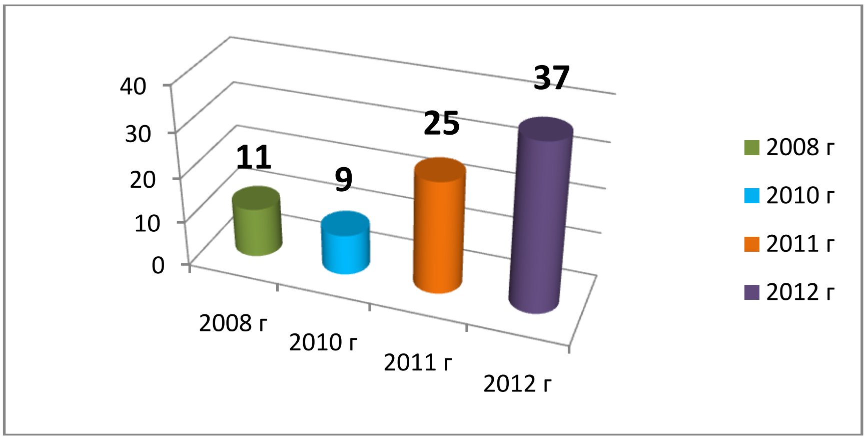
“Өздүк изилдөөлөрдүн натыйжалары” аттуу III главасында 2008-2014-жылдардын ичиндеги малдын шарп менен ылаңдашынын мониторингдик изилдөөлөр боюнча материалдар баяндалган. Диаграммалар формасында республиканын ар кайсы областтарындагы шарптын очокторунун саны анализделген, ылаңдын клиникалык белгилери жазылган, ошону менен шарптын баштапкы диагнозу коюлган. Инфекциянын очокторунан ИФА, КБР серологиялык методдорду колдонуу менен биологиялык материал алынды, шарпка диагноз такталды.

Республиканын аймагында малдын шарп менен ылаңдашы боюнча мониторинг.

Кыргызстанда шарп боюнча эпизоотиялык кырдаал акыркы жылдардын ичинде мезгил-мезгили менен локалдуу ылаңдоолор менен мүнөздөлгөн. Алсак, 2008-жылы шарп боюнча таза болбогон 11 пункт болгон. 2009-жылы республикада шарп боюнча жагымдуу кырдаал сакталган, инфекциянын чыгуу фактысы катталган эмес. 2010-жылы ири жана майда мүйүздүү малдардын арасында шарп боюнча таза болбогон 9 пункт катталган. Шарп ылаңынан малдын өлүм-житими катталбаган, бирок ылаңдап айыккан мал азыктуулугун 20-25 %ке төмөндөткөн.

2011-жылы шарп боюнча 25 очок катталган. Диагностикалык лабораториялардын маалыматтары боюнча шарптын вирусунун А жана О 2 тиби айланып турган.

2012-жылы Кыргыз Республикасынын 6 областында шарп боюнча таза болбогон 37 пункту катталган, ошондо 889 баш уй жана 200 баш кой-эчки ылаңдаган. Ветеринардык лабораториялардын маалыматтарына караганда шарп вирусунун А жана О тиби айланган (1-сүрөт).



1-сүрөт. 2008-2012-жылдардын ичинде ири малдарынын арасындагы шарптын очокторунун болушу.

2013-жылы Кыргызстанда кабыл алууга жакын малдын арасында шарп ылаңы байкалган эмес. Шарп эпизоотиясына жол бербөө максатында мамлекеттик ветеринардык кызмат тарабынан үч валенттүү вакцина менен 863,7 миң баш ири мүйүздүү мал эмделген.

Ылаңдын таза эмес жана кооптуу региондордо ылаңды болтурбоо боюнча профилактикалык, ветеринардык-санитардык чаралар өткөрүлгөн. Азыркы кезде шарп боюнча эпизоотиялык кырдаал туруктуу абалда турат, айрым гана локалдуу ылаң очогу болушу мүмкүн.

2014-жылы республиканын аймагында шарп боюнча 5 таза болбогон очок катталган, шарпка каршы 884,2 миң баш кара мал жана 4,0 миң баш кой эмделген.

Ветеринардык кызматы көрүп жаткан чараларга карабастан 2014-жылы Нарын облусунун, Ак-Талаа районунда 1 ылаңдуу пункт пайда болуп, анда 28 баш кара мал шарп менен ылаңдаган, Баткен облусунун Лейлек районунда 2 таза эмес пункт катталып, анда шарптын клиникалык белгисине 25 баш кара мал чалдыккан, Чүй районунда 1 пунктта 1 уй ылаңдаган, Талас районунда 1 ылаңдуу пункт болуп, 1 баш мал ооруган (2-сүрөт).

2-сүрөт. 2014-жылда республикада шарп боюнча таза болбогон пункттар

Инфекциялуу очоктордун малынан патологиялык материал, асыресе шилекей, афта алынып, ылаңдын себептерин аныктоо үчүн диагностикалык изилдөөлөр өткөрүлгөн.

Шарптын А, О типтерине каршы поствакциналык иммунитеттин узактыгы. Лабораториялык изилдөө жумуштары малдагы поствакциналык иммунитеттин узактыгын изилдөөдөн башталган. Чүй облусунун Москва районундагы «Александр» жеке фермасында ар түрдүү жыныс-жаштык топтогу эмделген ири мүйүздүү малдын 20 башынан кандын сары суусу алынды. Вирустардын А, О типтерине антителолор титринин максималдуу мааниси КБР – 1:4 жана ИФА 1:8 түздү. Алынган серологиялык изилдөөлөр жетишсиз иммундук фонду көрсөттү.

Бул учурда аныкталгандай, ИФА методу менен лабораториялык изилдөөлөр КБР методуна салыштырганда сары суунун массалуу үлгүлөрүн спецификалык антителолордун болушуна күнүмдүк анализдөөгө ыңгайлуу жана жеңил. ИФА ири мүйүздүү малдын вирустук ылаңдарына массалык эпизоотологиялык текшерүүлөрдү өткөрүүдө малдын канынын сары суусун изилдөөнүн келечектүү методу болуп эсептелет.

Лабораториялык изилдөөлөр көрсөткөндөй, «Александр» жеке фермасындагы эмделген кара малдын канында малды шарптан коргоого жөндөмдүү болгон антителолордун жетиштүү деңгээли табылган жок.

Поствакцинациянын узактыгына «МИС» ААКтын, Ысык-Ата районунун 1-сүт-товар фермасындагы, 2-СТФ жана Кара-Кужурдагы жеке менчик кара малдын, майда малдардын жана топоздордун арасында массалуу изилдөөлөр өткөрүлдү. Иммуноферменттик анализдеги бодо малдын канынын сары суусунда шарпка каршы антителолордун болушуна, ошондой эле вирустун конкретүү типтерине антителолордун чогулушунун деңгээлин мүнөздөөчү структурасыз белоктордун (СБ) болушуна изилдөөлөр өткөрүлгөн.

Шарптын вирусуна антителолордон эмдөө учурунда иштелип чыккан антителолорду дифференциациялоо үчүн 3АВС СБ ШВ болушуна малдын канынын сары суусун изилдөө өткөрүлгөн. Тажрыйба үчүн Нарын облусунун жайкы жайыттарындагы кара малдын, топоздордун жана майда малдардын канынан үлгүлөр алынган (1-табл.).

1-таблица – Малдын канынын сары суусундагы шарп вирусунун структурасыз белокторунун 3АВС болушу.

Малдын түрү жана эмдөө жөнүндө маалымат	Ылаңдап чыккандан 4 айдан кийин		Ылаңдап чыккандан 8 айдан кийин		Ылаңдап чыккандан 12 айдан кийин	
	изил-денген проба-лардын саны	оң проба-лардын саны	изил-денген проба-лардын саны	оң проба-лардын саны	изил-денген проба-лардын саны	оң проба-лардын саны

уландысы						
Топоздор (эмделген эмес)	15	11	15	10	15	8
Кара мал (эмделген)	6	6	6	6	6	6
Майда жандык (эмделген эмес)	13	4	13	5	13	6

Лабораториялык изилдөөлөр көрсөткөндөй, изилденген малдын бардыгынын канында шарп вирусунун структурасыз белоктор табылды, бул малдын организминде патогендик вирустун айланып жүрүшүн далилдейт. Демек, изилденген бардык мал вирусту алып жүрүүчүлөр болуп эсептелди. СБ ШВ эмделген малдан да табылды.

Вирусту алып жүрүүчүлүктүн биологиялык аспектери молекулалык-генетикалык деңгээлде изилдөөлөрдү уланта берүүнү талап кылат.

Шарптын вирусун бөлүү. 2010- жана 2014-жылдарда Чүй облусунда шарп менен ылаңдаган малдан патологиялык материал, алсак шилекей, мурун шүүшүндөрү, афталар диагностикалык изилдөөлөр үчүн алынган (2-табл.).

2-таблица – 2010-2014-жылдары ШВ типтештирүү боюнча патологиялык материалды изилдөө

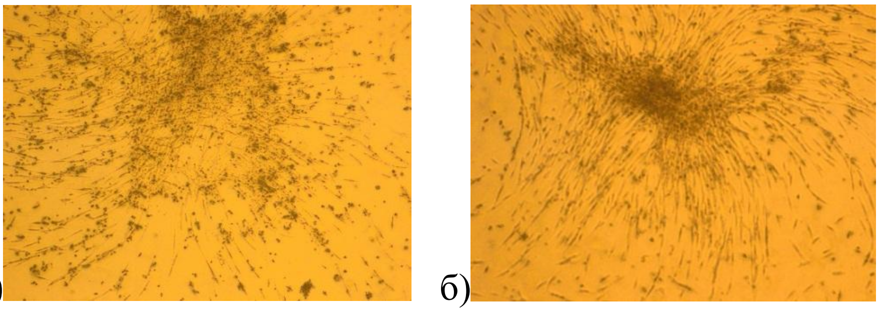
Материалдын аталышы	ИФА			ПЧР		
	Тип А	Тип О	Тип Азия-1	Тип А	Тип О	Тип Азия-1
Шилекей	+	+	-	+	+	-
Афталар	+	+	-	+	+	-
Мурундун шүүшүндөрү	-	-	-	-	-	-

2-таблицадан көрүнүп тургандай, ылаңдаган малдан алынган патологиялык материалды изилдөөдөн О жана А шарптын тиби табылган, бул ушул жылдарда республиканын аймагында шарптын вирусунун айланып жүргөнүн билдирет.

Алынган пробаларды -20дан минус 40°С чейинки температурада тоңдуруп, баштапкы абалына кайтардык, антибиотиктерди киргиздик. Тандалып алынган, суспензияланган материалды клеткалардын культурасын жугузууда жана бөлүнгөн изоляттардын молекулалык-биологиялык касиеттерин изилдөөдө пайдаландык.

Шарптын вирусун клеткаларда өстүрүүнү ВНК-21 жана УБ клеткаларынын культураларында өткөрүлдү. Бул эксперименттин максаты

ушул изолятка клеткалардын өтө сезгич культурасын табуу болду. Бул үчүн клеткалардын ар бир культурасында бештен пассаж өткөрүлдү жана вирустун биологиялык активдүүлүгү аныкталды. Жугузулгандын 2-күнүндө ВНК-21 матрасында үстүнүн цитопатологиялык таасири (ЦПТ) 20% түздү УБ матрасына салыштырганда, ЦПТ-10% болду. ЦПТнын активдүүлүгү өтө ыкчам көрүндү. Төртүнчү күнү ВНК-21 матрасындагы ЦПТ бардык матрастын 40% түздү. УБ болгону 20% түздү. Алтынчы күнү ВНК-21 матрасында ЦПТ 70% түздү, УБ 50%ке жакын болду (3-сүрөт).



а) б)

3-сүрөт. Шарп вирусу жугузулгандан кийинки 6-күндөгү ВНК-21 жана УБ матрастары

Эскертүү: а) - ВНК-21
б) – УБ

Биздин байкоолор боюнча, шарптын вирусу ВНК-21 матрасында клеткаларды УБ матрасына салыштырганда кыйла активдүү жугуздурган (3-табл.).

3-таблица – Шарптын вирусунун цитопатологиялык таасир этүүсүнүн ургаалдуулугун баалоо

Клеткалардын культурасы	Байкоо күндөрү					
	2-күн	монокатмарга % менен	4-күн	монокатмарга % менен	6-күн	монокатмарга % менен
ВНК-21	+	20	++	40	+++	70
Улактын бөйрөктөрү	-	10	+	20	++	50

Эксперименттер көрсөткөндөй, шарптын вирусу ВНК-21 клеткалардын культурасына активдүүрөөк адаптацияланды. Биздин байкоолор көрсөткөндөй, шарп вирусунун ВНК-21 цитопатологиялык таасири активдүүрөөк болду. Клеткалардын бул культурасы шарптын вирусун культуралоо бардыгына караганда көбүрөөк туура келет.

4-таблица – А тибиндеги шарптын вирусунун изолятынын клеткалардын культураларына биологиялык активдүүлүгү

№	Клеткалардын культурасы	А тибиндеги шарп вирусунун изолятынын пассаждык деңгээли жана биологиялык активдүүлүгү				
		1	2	3	4	5
1	ВНК-21	4,5 log	5 log	5,5 log	6 log	7,25 log
2	УБ	1,5log	2,5 log	3 log	4 log	5,5 log

Таблицада көрсөтүлүп тургандай, ВНК-21 культурасында вирустун титрлери биринчиден бешинчи пассажга чейин жогору болду, бул дагы бир жолу шарптын вирусу ВНК-21 клеткалардын культурасында активдүү адаптацияланышын ырастайт, ВНК-21де шарптын вирусунун цитопатологиялык таасири активдүүрөөк болот да, 70%ке жетет, культуралык вирустун биологиялык активдүүлүгү 7,25 lg ТЦД$_{50/см}{}^{3}$ түзөт.

Жугуштуу ылаңдар боюнча, анын ичинде шарп боюнча эпизоотиялык кырдаалды көзөмөлдөө жана туруктуулукту камсыз кылуу үчүн ылаңга өз учурунда жана так диагноз коюу, айланып жүрүүчү козгогучту жана анын тибин аныктоо маанилүү. Ошондуктан изилдөөнүн максатына А жана О тибиндеги айланып жүргөн шарптын вирусун типтештирүү үчүн спецификалык праймерлерди иштеп чыгуу кирген.

Шарпты диагностикалоонун колдонуп жаткан ПЧР методдору боюнча адабият булактары изилденди жана анализденди. ПЧР анализдөөдө шарптын вирусунун нуклеотиддерин идентификациялоонун ырааттуулугуна өзгөчө көңүл бурулду. Нуклеотиддик ырааттуулук боюнча жакын тектештик жана жогорку гомологиялык козгогучту идентификациялоого жана бул ылаңды башка жугуштуу ылаңдардан дифференциациялоого мүмкүндүк берген методу иштеп чыгууну татаалдандырат.

Түрспецификалык праймерлерди тандоо үчүн NCBI (National Center Biotechnological Information, USA) маалыматардын биомаалыматтык базасын пайдаландык. Олигонуклеотиддик ырааттуулукту анализдөөнү BLAST программасынын жардамы менен GenBank өткөрүлдү. Праймерлерди синтездөөнү «BioBasic» (Канада) коммерциялык компаниясынын программасын колдонуу менен аткардык. Аныкталган консервативдик бөлүгүнөн праймерлерди тандоодо төмөндөгүдөй критерияларды жетекчиликке алдык: G+C болушу 30-60%ти түзүүгө тийиш, праймерлерге өзүнүн ичинде, ошондой эле өзүлөрүнүн ортосунда өзүн комплементардык бөлүктөр кирбөөгө тийиш; бир жуптун праймерлери ээрүүнүн температурасы жогору жана бирдей же ага жакын болгону зарыл.

Гендин консервативдик бөлүктөрүн алгандан кийин праймерлерди кол менен кошумча программаларды колдонбой жасадык, бирок праймерлердин конструкциясы бардык талапка жооп беришин катуу эске алдык. Праймерлерди тандоонун кол менен жасалышынын себеби шарптын

вирусунун генинин жогорку варианттуулугу болду. Мына ошентип, 2 праймер конструкцияланган, алар шарптын вирусунун айрым типтерине ылайыктуу болушту (5-табл.)

5-таблица – Иштелип чыккан праймерлердин мүнөздөлүшү

Праймер-дин аталышы	Алардын ырааттуулугу	ПЧР азыктын өлчөмү
FMD-OF	5’–CCACTGTTGAGA ACT ACG GTG G –3’	539 bp.
FMD-O R	5’–CCA AAG AGG CCG GGG GCA GTA–3’	
FMD-A F	5’–TCA GCA GAC CCT GTC ACC ACC –3’	519bp.
FMD-A R	5’–GCG CAC GAG AAG CTC GTG GA –3’	

Изилдөөлөрдүн кийинки этабы биз иштеп чыккан праймерлердин тууралыгын текшерүү, вирустук материалды иштеп чыгуу жана шарптын РНК вирусун бөлүү болду. Америкалык өндүрүштүн Axygen (Axy Prep TM Body Fluid, Viral DNA/RNA miniprepkit, cat. № AP-MN-BF-VNA-250) коммерциялык шайманы менен иштелген вирустук материалдан аны колдонуу боюнча эрежелерге ылайык шарптын РНК вирусу бөлүндү.

ПЧРди коюунун шарттарын оптималдаштыруу үчүн бир катар алдын ала эксперименттер өткөрүлүп, аларда төмөндөгүдөй факторлор эске алынды: праймерлердин отжиг температурасы, денатурациянын синтездин убактысы, праймерлерди, магнийдин иондорун жана матрицанын санын топтоо. Эксперименттерди жүргүзүүдөн шарптын вирусунун геномунун фрагменттерин амплификациялоону өткөрүү учурунда ПЧРдин оптималдуу температуралык режими тандалып алынды.

Андан кийин ПЧРдин артка кайтаруу транскрипциясын ревертазанын (артка кайтаруу транскриптаза) жардамы менен колдонуу ДНКнын бир чынжырдуу молекуласын синтездөө өткөрүлдү. Натыйжада РНК вирусуна артка кайтаруу транскрипциянын жардамы менен шарп вирусунун комплементардык ДНК курулган.

ДНКны бөлүү боюнча андан кийинки жумуштар үчүн иштеп чыккан праймерлерди пайдалануу менен ПЧР микске реакциялык аралашманын курамын жана катнашын эсептеп чыктык. Эксперименттер аныктагандай, даярдалган реакциялык аралашма бардык компоненттери жана алардын ылайыктуулугу боюнча ПЧР миксти коюу үчүн талаптарга жооп берди. Реакциялык аралашма ПЧРдин кийинки стадиясында – амплификацияда пайдаланылды.

Амплификациянын спецификалуулугу үчүн праймерлерди күйгүзүүнүн температурасын, циклдин узактыгы менен санын тандап алуу манилүү шарт болуп эсептелет. Эксперименттик жол менен аталган белгилер жана алардын параметрлери иштелип чыкты. Амплификациянын бардык стадиялары үчүн оптималдуу убакыт жана температуралык параметрлерди пайдалануу менен ПЧРди коюу режими иштелип чыккан (6-табл.).

6-таблица – Шарптын вирусунун геномунун фрагменттерин амплификациялоонун температуралык режими

Амплификациянын стадиялары	Температура	Убакыт	Циклдердин саны
Баштапкы денатурация	94°С	1 мин	1
Денатурация	94°С	30 сек	
Отжиг	55°С	45 сек	36
Элонгация	72°С	45 сек	
Финалдык элонгация	72°С	5 мин	1

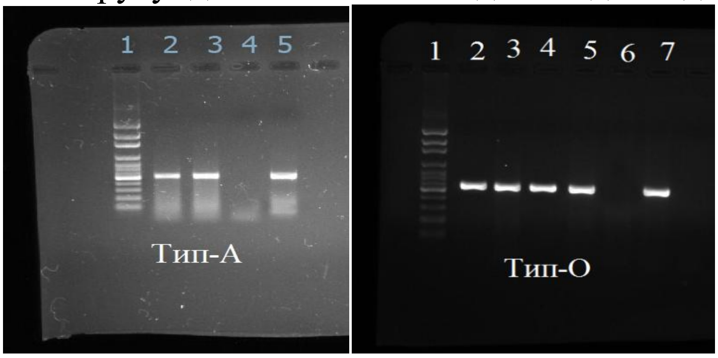
ПЧРдин реакциясынын сезимдүүлүгүн күчөтүү жана кошумча азыктарды кыскартуу үчүн биз амплификациянын "nested" (уялык) методун да колдондук. Натыйжада агароздук гелде амплификация азыгынын так сүрөтү алынды.

ПЧР азыгынын натыйжаларын детекциялоону (тазалоону) агароздук гелде электрофорездин жардамы менен өткөрдүк. Детекция үчүн абдан таралганы электрофорез методу болуп эсептелет, ал ДНК молекуласын өлчөмү боюнча бөлүштүрүүгө негизделген. Натыйжалардын учётун BIO–RAD GelDoc XRTM + imagingsystem гель-документтөөчү системасы боюнча өткөрдүк.

Алынган ПЧР азыгын детекциялоо үчүн 2,5%тик агароздук гелди 1х ТАЕ бромдуу этидий менен буферде пайдаландык.

Электрофорез бүткөндөн кийин гелди трансиллюминатордун чыпкасына жайгаштырдык, ал ультракөгүлтүр диапазондогу шооланы чыгарат. А тиби – 519 жана О тиби - 539 нм тармагында ДНК алуучу ультракөгүлтүрдүн энергиясы боёгучка берилет да, аны көрүнүүчү спектр тармагында флуоресцировка жасоого мажбур кылат. Электрофорездин натыйжаларын видеосистеманын жардамы менен эсепке алдык.

ПЧР азыгында узундугу 519 п.н. жана 539 п.н. гелдеги фрагменттердин болушу изилденип жаткан пробаларда А (519 п.н.) жана О (539 п.н.) типтеги шарптын вирусунда РНК катышкандыгын далилдейт (4-сүрөт).



4-сүрөт. ПЧР азыгы агароздук гелде

А тиби:1-маркер,
2,3-үлгүлөр,4-терс контроль(К),
5 – оң контроль (К),

О тиби: 1-маркер,
2-5-үлгүлөр, 6-терс контроль (К),
7-оң контроль(К).

Талданган праймерлер менен реакциянын спецификалуулугун текшерүү үчүн биз шарпты козгоочу А жана О типтери менен катар шарп вирусунун башка типтерине изилдөөлөрдү өткөрдүк.

Бирок иштелип чыккан праймерлердин жардамы менен биз шарпты козгоочу А жана О типтерин гана таптык, калган башка типтерге терс натыйжалар алынды.

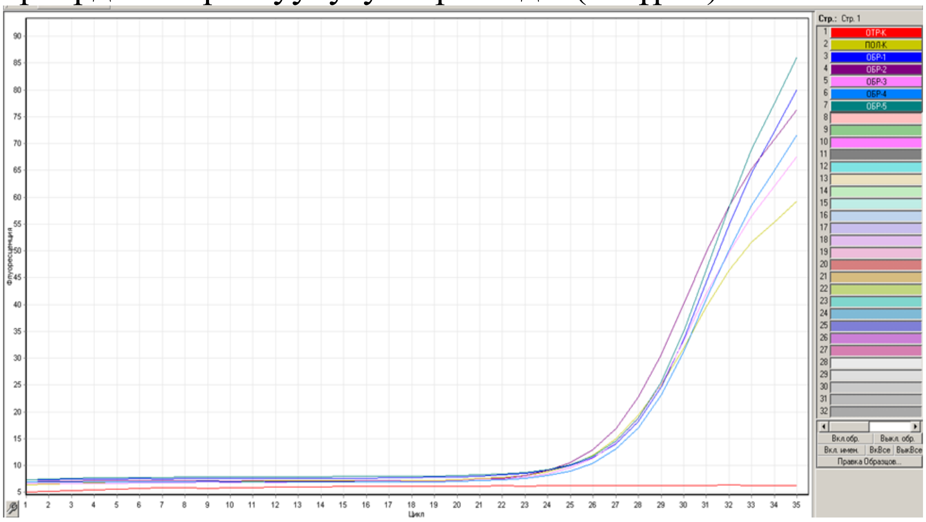
Тажрыйбалардын натыйжалары биз иштеп чыккан праймерлердин спецификалуулугун ырасташты, бул А жана О типтеги шарптын коргоочусунун айланып жүрүүчү типтерин аныктоо үчүн аларды пайдаланууга мүмкүндүк берет.

Реал Таймдагы (РТ ПЧР) полимераздык чынжырлуу реакцияны коюунун параметрлерин оптималдаштыруу. Изилдөөлөрдүн андан аркы этабы ПЧР РТ реакциясындагы иштелип чыккан праймерлердин аныктыгын изилдөө болду. Бул үчүн ПЧР РТ карата реакциялык аралашманын курамын жана технологиялык циклдердин температуралык-убакыттык параметрлерин оптималдаштыруу болду (7-табл.).

7-таблица – ПЧР РТдагы А тибиндеги шарптын вирусунун геномунун амплификациялык фрагменттеринин температуралык режими

Амплификациянын стадиялары	Температура	Убакыт	Циклдердин саны
Кармап туруу	95ºC	1 мин.	
Денатурация	94°C	15 сек	35
Отжиг	60°C	20 сек	
Элонгация	72°C	15 сек	

Эксперимент аныктагандай, реалдуу убакытта ПЧР жана ПЧР молекулалык-биологиялык методдорунун бул эки варианты иштелип чыккан праймерлердин жарактуулугун ырастады (5-сүрөт).



5-сүрөт. Реалдуу убакытта алынган ПЧР азыгынын мүнөздөмөсү

1 – терс контроль

2 – оң контроль

3-7 – изилденген үлгүлөр

Изилдөөлөрдүн кийинки этабы А жана О типтериндеги шарптын вирусунун молекулалык-генетикалык мүнөздөмөсүн изилдөө болду. Бул үчүн А, О тибиндеги вирустун геномунун нуклеотиддик ырааттуулугун этап боюнча аныктадык:

- изилденип жаткан ДНКнын праймер менен гибриддештирүү;
- алынган азыкты формамид менен денатурациялоо;
- төрт жолдогу гелдеги электрофорез (нуклеотиддердин типтеринин саны боюнча) же натыйжаларды автоматтык жол менен анализдөө.

Секвендештирүүнүн реакциясын Сенжердин методу боюнча BigDye® Terminatorv 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, АКШ) шайманынын жардамы менен өндүрүүчүнүн сунушуна ылайык аткардык.

Вирустун ДНКсынын алынган фрагментин секвендештирүүнүн натыйжалары боюнча вирустун типтик жана штаммдык таандыгын аныкталды.

Секвендештирүүнүн натыйжаларын иштп чыккандан кийин А жана О типтериндеги шарптын вирусунун нуклеотиддик ырааттуулугун алдык.

«А» тибиндеги шарп вирусунун нуклеотиддик алынган ырааттуулугу:
GATGGTCGTGGCCTTAATTGCACCAAAGTTGAAAGAGCTGGGTAGCTGTG
CGGCGACCCGCGCCGCAAGTGACCCCAGGTCGCCCCTTCTACCACCACTA
GTTGTGGAGTACTTGCTCACTCCGTTGTACACTGTTGCCAACACTCGGTGC
GGTGCGGTGTAAGGGAGTGCAAGTCTCGTAAATGGCTGTTTGTGGTAGGC
GGTGGGGTTGCTTGTGTTGGCCAAGGCTTCCACAGGTGCTCCATTGGGCA
CCCACGTCAAATTGCCATCGTGACGCACCACGATCTCCAGGTCAGAGAAG
TAGTACGTGGCTGCACGCAAAAGGGCACCCACCAACGCGTGTTGGTGTGT
TTGCATGAGGTCGATGACATGCGTGGGGCTCACAGGGTTGATTTTTACAA
ACCTGTCCATGATGAAGCCGACGTCAGTGTGGTGACGCCGCTGAGCCTGT
GTCTCACCACCGTAGTTCTCGACAGTGGTGGTGAA.

«О» тибиндеги шарп вирусунун нуклеотиддик алынган ырааттуулугу:
TACGGTGGCGAGACGCAGGTCCAGAGACGCCAGCACACGGACGTCTCGT
TCATATTGGACAGATTTGTGAAAGTGACACCAAAAGACCAAATTAATGTG
TTGGACCTGATGCAAACCCCCGCCCATACTTTGGTAGGAGCGCTCCTCCG
CACCGCCACCTACTACTTCGCAGATCTAGAGGTGGCAGTGAAACACGAGG
GGAACCTCACCTGGGTCCCGAATGGGGCGCCCGAGACAGCGTTGGATAA
CACCACCAATCCAACGGCTTACCATAAGGCACCGCTCACCCGACTTGCAC
TGCCTTACACGGCACCACACCGTGTCTTGGCTACCGTATACAACGGGAAC
TGCAAGTATGGCGAGAGCCACACAACCAGTGTGAGAGGTGACCTGCAAG
TGTTGGCCCAAAAGGCGGCGAGGACGCTGCCTACCTCCTTCAACTACGGT
GCTATCAAAGCTACCCGGGTGACTGAATTGCTTTACCGCATGAAGAGGGC
TGAAACATACTG.

Изилдөөлөрдүн акыркы этабы филогенетикалык даракты түзүү үчүн шарп вирусунун геномунун алынган нуклеотиддик ырааттуулугун анализдөө болду.

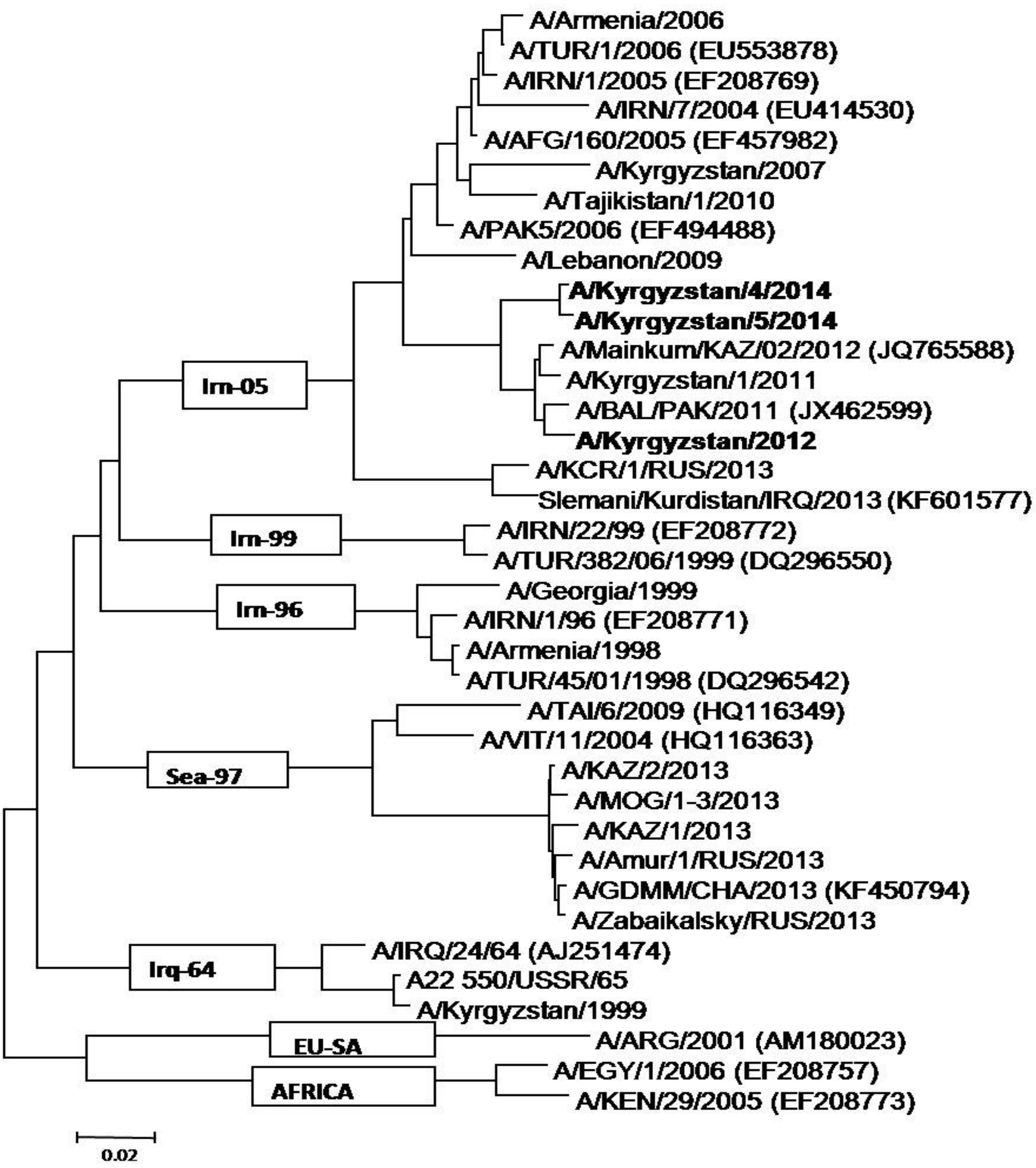
Алынган ПЧР азыгын филогенетикалык анализдөө өткөрүлүп жаткан амплификациянын тактыгын аныктоого жана А жана О тибиндеги шарптын вирусунун РНКсын табууга зарыл эле. MEGA 6 программасынын пакетин

колдонуу менен амплификациянын азыктарын чогултуу жана нуклеотиддик ырааттуулукту көп санда тегиздөө жана филогенетикалык даракты куруу, нуклеотиддик ырааттуулуктун шайкештигин анализдөө өткөрүлдү.

Секвендештирүүнүн натыйжаларын NCBI маалыматтык базадагы BLAST аркылуу текшердик. Кыргызстанда 2012- жана 2014-жылдарда бөлүнгөн А тибиндеги шарп вирусун филогенетикалык анализдөө вирустун айланып жүргөн талаалык штаммдары Iran-05 линиясына таандык экендигин көрсөттү (5-сүрөт).

Шарптын вирусунун бул сублиниясы биринчи жолу Ирандын аймагында 2003-жылы идентификацияланган. Ал 2005-2006-жылдарда Сауд Аравиясына, Иорданияга, Түркияга, андан кийин Фракиянын европалык бөлүгүнө жеткен. 2004-2007-жылдарда ал Афганистанда жана Пакистанда (2006-2007-ж.) катталган. 2008-жылы бул сублиния Түркияда ылаң очогун тутандырды. Кыргызстанда 2012- жана 2014-жылдарда жарым-жарты учур катталган. Филогенетикалык изилдөөлөрдүн маалыматтары көрсөткөндөй, бөлүнгөн штаммдар ушул сублинияга таандык болуп чыкты. Бул сублиниянын кызыктуу факторлорунун бири Iran-05 өзүнүн антигендик касиеттери боюнча мурда Ирандын аймагында табылган Iran-96 сублиниясынан айырмаланганы болду. Бул Iran-05 субтибинин табылган штаммдары изилдөөдө жана бул субтип айланып жүргөн вакциналык штаммдарды иштеп чыгууда өзгөчө көңүл бурууну талап кылаарын далилдейт.

Кыргыз Республикасынын аймагында ар кайсы жылдарда пайда болгон шарп ылаңынын очокторун изилдөө менен анын бардыгы генетикалык жана серотиптик жактан ар кандай экендигин, демек, ар кайсы серотиптерге жана топотиптерге таандык болгонун белгилөө керек. Бул жагдай шарп инфекциясына каршы күрөшүүнүн ыкмаларын татаалдандырат, шарп вирусунун чыгышын жана ташып келүүнүн жолдорун филогенетикалык жактан изилдөө объективдүү зарылдыгын туудурат.



5-сүрөт. Кыргыз Республикасынын аймагында табылган А тибиндеги шарп вирусунун филогенетикалык мүнөздөлүшү.

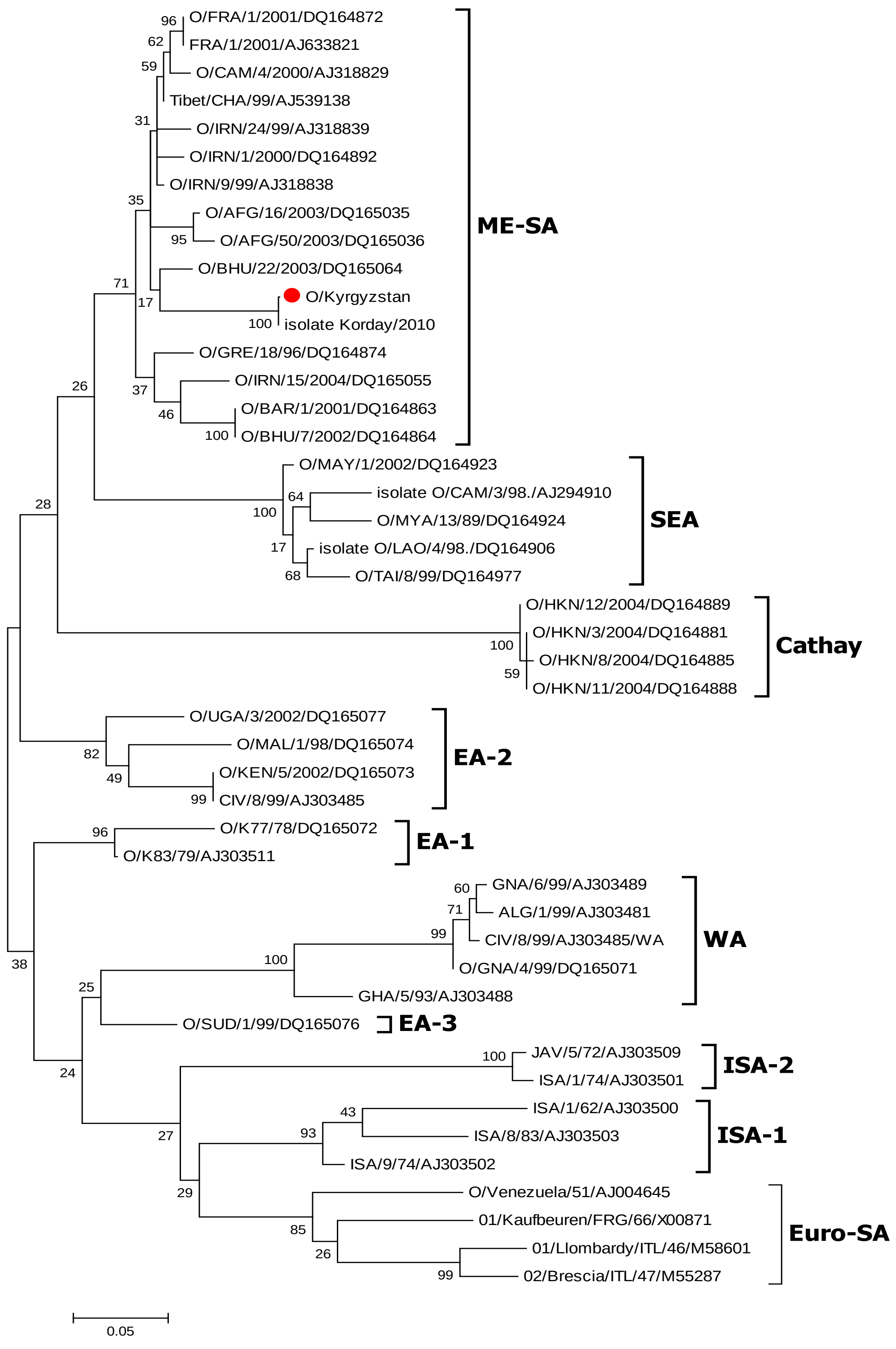
Бул сүрөттөн көрүнүп тургандай, республиканын аймагында бөлүнгөн О тибидеги шарп вирусунун штаммы ME-SA (Орто чыгыш-түштүк Азия) топтибине таандык. Бул топотип 1995-жылы Малайзияда табылган. Кийинчерээк ал Индиянын аймагында, андан ары жакын чыгышта табылган. Жакын чыгышка вирустун таралышы Индиядан малды ташып келүүгө байланыштуу мүмкүн. 1999-2000-жылдарда бул топотип кайрадан Азиянын түштүк чыгыш бөлүгүнөн табылган. ME-SA топотибиндеги вирусту ташып келүү балким Кытай аркылуу болушу мүмкүн, анткени Кытайда ошол жылдарда тышкы жана ички соода байланыштары интенсивдүү өнүгүп жаткан. Кытайдын тышкы дүйнө менен соода байланыштарынын активдүүлүгүнүн

натыйжасында түштүк-чыгыш Азиянын ылаң жугузулган өлкөлөрүнөн ал Кытайдын түндүк аймактарына, андан кийин Кыргызстанга келген (6-сүрөт).

Мына ошентип, Кытай тоскоол болбой көпүрөгө айланды да, ал боюнча шарптын вирусу түштүк өлкөлөрдөн түндүк өлкөлөргө оңой таралып, мурда бул ылаң боюнча таза деп эсептелген Кореяга, Японияга, Монголияга жана Россияга чейин жетти. Мындай учурларда филогенетикалык анализ вирустун чыгышын изилдөөнүн эң бир таасирдүү методу болуп эсептелет. Ал трансчектеш инфекциялардын, анын ичинде шарптын пайда болуу булагына тиешелүү маселелерге жооп бере алат. ME-SA топотиби өз ичине көп сублинияларды камтыйт: PanAsia, PanAsia-2, Ind 2001, Iran 2001, PAK 98, Branch A жана Branch B, ал Азиянын өлкөлөрүндө ар кандай жылдарда эндемикалуу болгон.

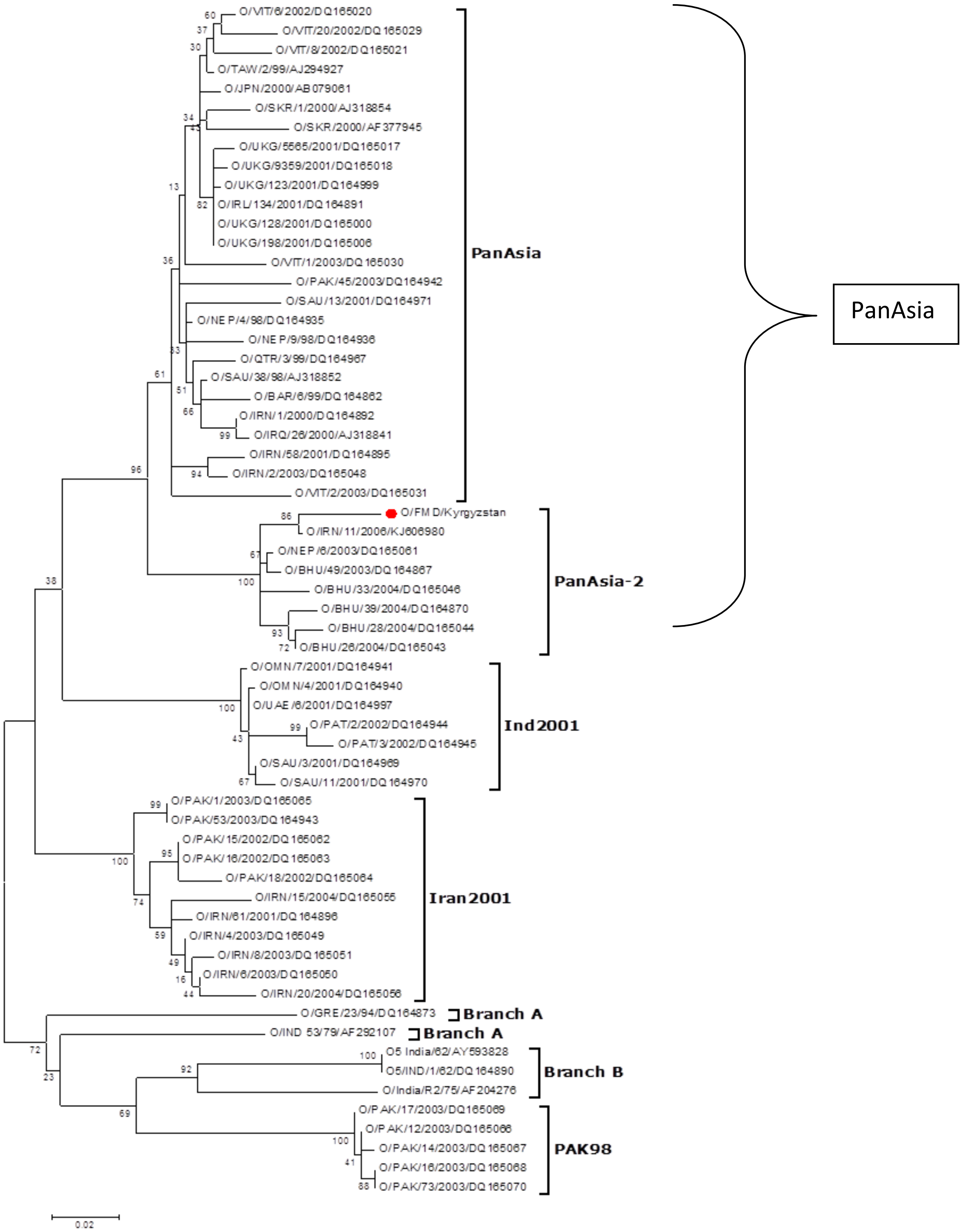
Шарптын вирусунун генетикалык линияларын бөлүштүрүү көрсөткөндөй, шарптын вирусунун катталуучу штаммы ME-SA топотиптин ичиндеги PanAsia-2 сублиниясына таандык. Филогенетикалык изилдөөлөрдүн натыйжалары 7-сүрөттө көрсөтүлгөн.

Бөлүнгөн изолят филогенетикалык маалыматтары боюнча ME-SA линиясынын бирөө болгон PanAsia тобуна туура келет. PanAsia линиясы мурда дүйнөнүн көптөгөн өлкөлөрүндө айланып жүргөн бардык башка линияларды сүрүп чыгарды. Ал Түштүк Америкадан башка бардык дүйнө жүзүнө тарады. Биринчи жолу PanAsia линиясы 1982-жылы Индиядан табылган, 90-жылдарга чейин шарптын бул линиясы жалгыз гана Индиянын аймагы менен чектелген. Кийинчерээк ал акырындап түндүккө жылып, 1990-жылы вирус Непалдан табылган. 1997-жылы PanAsia линиясы Азиянын көптөгөн өлкөлөрүндө, Бутанда 1998-1999-жылдарда, 1998-жылы Бахрейнде, Кувейтте, Сауд Аравиясында, Сирияда, Йеменде, Иранда жана Ливанда, андан ары 1999-жылы БАЭ, Израилде жана Түркияда идентификацияланган. 1999-жылы бул линия Кытайга жана Азиянын Түштүк-Чыгыш өлкөлөрүнө таралып, Тайланда (1999-ж.), Малайзияда жана Лаосто (2000-ж.), Въетнамда (2002-ж.) шапртын пайда болушун туудурган. Ошондой эле вирус 2000-жылы Түштүк Корея менен Японияда ылаң өртүн тутандырган, ал өлкөлөрдө мурда андай болгон эмес. Ошондуктан PanAsia деген аталыш кыскартылган эки сөздөн турат, Pan англисче «pandemic», ал которулганда пандемияны билдирет жана Asia кадимки Азияны түшүндүрөт. Ал адегенде Азия өлкөлөрүндө пандемиялык кырдаалды түзгөнү үчүн аталган.



6-сүрөт. О тибиндеги шапр вирусунун VP1 генинин филогенетикалык мүнөздөлүшү.

Эскертүү: Кыргыз Республикасында бөлүнгөн изолят кызыл чекит менен белгиленген. Филогенетикалык даракты куруу үчүн төмөндөгүдөй параметрлердеги MEGA 6 аналитикалык пакети пайдаланылды: Statistical Method Maximum Likelihood; Testof Phylogeny Bootstrapmethod; No. Of Bootstrap Replications 500; Model/Method Kimura 2-parameter model.



7-сүрөт. ME-SA топотибинин филогенетикалык мүнөздөлүшү

Эскертүү: Кыргыз Республикасынын аймагында бөлүнгөн изолят PanAsia-2 сублиния тобунда кызыл чекит менен белгиленген.

2000-жылы PanAsia вирусу Өзбекстанда, Монголияда, Арменияда, Грузияда жана Россияда, 2001-жылы Кыргызстанда, 2001-2003-жылдарда Тажикстанда табылган. Ошол эле жылдарда PanAsia линиясы төмөндөгүдөй африкалык жана европалык мамлекеттерден табылган: Ирландия, Франция, Нидерланды, Улуу Британия. Сүрөттө көрсөтүлгөндөй, PanAsia линиясы эки

сублиниядан турат: PanAsia жана PanAsia-2. PanAsia-2 сублиниясы салыштырмалуу жакында эле пайда болду.

Шарпты козгоочунун бул штаммы 2009-жылы Пакистанда табылган, андан кийин Түркияда, Израилде, Ливияда жана Болгарияда катталган. 2010-жылы Болгариянын аймагында жапайы жаратылышта (каман) биринчи жолу табылган. Кыргыз Республикасынын аймагында бөлүнгөн штамм да филогенетикалык жактан PanAsia-2 тобуна кирет (7-сүрөт). Бул вирустун таралышынан бир да өлкө толук корголо албайт дегенди ырастайт. Ошондуктан шарпка каршы күрөшүү үчүн кошуна өлкөлөрдүн бирдиктүү күч-аракеттери зарыл.

ПЧР азыктарын секвендентирүүнүн праймерлердин жардамы менен алынган натыйжалары да алынган маалыматтардын аныктыгын ырасташат. Секвендештирилген ПЧР азыктары чындыгында шарп вирусунун геномуна таандык. Вирустун геномунун амплификацияланган бөлүктөрү шарп вирусунун А жана О типтерине киришет. Бул тандалган праймерлердин жана жалпы эле реакциянын спецификалуулугун далилдейт.

Жыйынтыктары

1. Молекулалык-генетикалык изилдөөлөрдүн натыйжасында бөлүнгөн шарп вирусу А жана О типтерине таандык экендиги аныкталды.
2. УБ клеткаларынын баштапкы культурасындагы жана ВНК-21 клеткаларынын көчүрмө линияларындагы изоляттардын культуралык касиеттери изилденди, шарптын вирусу ВНК-21 клеткаларынын культурасында жандуу адаптацияланат, шарптын вирусунун ЦПТ активдүүлүккө ВНК-21 жетишет да, 70 %ке жетет, культуралык вирустун биолгиялык активдүүлүгү 7,25 lg $ТЦД_{50/см^3}$.
3. Кыргыз Республикасында биринчи жолу 2 праймер иштелип чыккан, алар КРде айланган шарп вирусунун А жана О типтерине спецификалуу.
4. Иштелип чыккан праймерлерге карата реакциялык аралашмалардын курамы оптималдаштырылган, АКТ-ПЧР, ПЧР үчүн температуралык-убакыттык режимин анализдөө классикалык жана ПЧР реалдуу убакытта шарп вирусунун А жана О типтеринин ДНК геномун табуу үчүн иштелип чыккан.
5. Ампликондорду секвендештирүү жана нуклеотиддик ырааттуулукту филогенетикалык анализдөө менен аныкталгандай, А тибиндеги вирустар ар кандай серотиптерге жана топотиптерге таандык да, Iran-05 генетикалык линиясына киришет. Бөлүнгөн О тибинин штаммы ME-SA топотибине таандык.

Практикалык сунуштар

1. Диагностикалык лабораториялык изилдөөлөрдөн аныкталгандай, республиканын аймагында мезгил-мезгили менен шарп ылаңынын тутанышы А жана О типтериндеги шарп вирусунан пайда болот. Вирустун айланып жүргөн

типтерин билүү вакциналык дары-дармектерди тандоону жеңилдетет жана профилактикалык иш-чаралардын таасирдүүлүгүн жогорулатат.

2. Республиканын аймагында айланып жүргөн шарп вирусун диагностикалоо жана типтештирүү үчүн жогорку спецификалуу праймерлер иштелип чыккан. Аларды колдонуу шарп вирустарын типтештирүүнү жогорку аныктык менен өткөрүүгө мүмкүндүк берет.

3. Шарптын вирусунун айланып жүргөн типтерин табуунун классикалык методдун жана ПЧР реалдуу убакыт режимдин жардамы менен тездетилген жана спецификалуу методдорун киргизүү республиканын аймагында бул инфекцияга ийгиликтүү каршы күрөшүүнү камсыз кылат.

4. “ПЧР анализин колдонуу менен А жана О тибиндеги шарп вирусун типтештирүү боюнча методикалык сунуштар” иштелип чыкты (ал КР Өкмөтүнүн алдындагы ГИВФБ тарабынан 2017-жылдын 5-июнунда бекитилген).

Жарыяланган иштердин тизмеси

1. Боронбаева, А.И. Продолжительность поствакцинального иммунитета у овец, привитых вакциной Bp.RakshaovacTrivalent (Индия). [Текст] / А.И.Боронбаева, Е.Д.Крутская//Вестник Сельскохозяйственной науки//№8, 2013г. Бишкек, С. 92-95.

2. Боронбаева, А.И. Приготовление гипериммуных ящурных сывороток, используемых в диагностических целях. [Текст] / А.И. Боронбаева,Р.З. Нургазиев, Н.К. Султаналиев, Е.Д. Крутская//Вестник Сельскохозяйственной науки // №3, 2008г. Бишкек, С. 177-180.

3. Боронбаева, А.И.Контроль иммунного фона у вакцинированных животных к вирусу ящура. [Текст] /А.И. Боронбаева//Вестник КНУ им. Ж. Баласагына, 2014г., Бишкек, С. 86-88.

4. Боронбаева, А.И. Анализ вспышек ящура в Кыргызской Республике. [Текст] /А.И. Боронбаева, Р.З. Нургазиев, Н.Т. Джапаралиев//Вестник КНУ им. Ж. Баласагына, 2014г., Бишкек, С. 98-107.

5. Боронбаева, А.И. Исследование вирусоносительства среди различных видов животных вакцинированных и переболевших ящуром. [Текст] / А.И. Боронбаева, Е.Д. Крутская// Вестник КНАУ им. К.И. Скрябина - Бишкек.- 2015.- № 1 (33) Март 2015. – стр. 34-38.

6. Боронбаева, А.И. Адаптация вируса ящура, выделенного в Чуйской области, на различных культурах клеток.[Текст] /А.И. Боронбаева//Научный журнал «Ізденістер, нәтижелер – Исследования и результаты», КазНАУ, №02 (062) 2014 г., г. Алматы, С. 14-18.

7. Боронбаева, А.И. Выявление изолята вируса ящура типа Ос помощью полимеразной цепной реакции. [Текст] / А.И.Боронбаева,Р.З.Нургазиев, Е.Д.Крутская, М.Узакбаева// Вестник КНАУ им. К.И. Скрябина - Бишкек.- 2016.

8. Боронбаева, А.И.Подбор и оптимизация праймеров для типизации вируса ящура типов А, О. [Текст] / А.И.Боронбаева,М.К.Исакеев,

А.Т.Мамытова, А.Р.Нургазиева// Вестник Алтайского государственного аграрного университета №7 (141), С. 139-143. Алтай. – 2016.

9. Боронбаева, А.И.Оптимизация ПЦР в режиме реального времени для выявления вируса ящура типа О. [Текст] / А.И.Боронбаева, Р.З.Нургазиев, Е.Д.Крутская // Вестник Алтайского государственного аграрного университета №3 (149), 2017. С. 132-136. Алтай. – 2017.

10. «Методические рекомендации по типизации вируса ящура типов А, О с применением ПЦР анализа».– Бишкек. 2017. – 10 с.

Боронбаева Аида Ильичевнанын«А, О типтериндеги шарп вирусунун молекулалык – генетикалык мүнөздөмөсү»темасында 06.02.02 – ветеринардык микробиология, вирусология, эпизоотология, микология менен бирге микотоксикология жана иммунология адистиги боюнча биология илимдеринин кандидаты даражасын коргоочу диссертациясынын

КОРУТУНДУСУ

Негизги сөздөр: шарп вирусу, А, О типтери, изолят, клетка өстүрмөсү, ИФА, ПЧР, ПЧР реалдуу убагындагы режим, секвендештирүү.

Изилдөөнүн объектиси: ийри мүйүздүү мал, патологиялык материал (мурундун шүүшүндөрү, афталар).

Изилдөөнүн максаты: шарп вирусун бөлүп алуу жана типизациялоо үчүн спецификалык праймерлерди иштеп чыгуу жана оптимизациялоо, молекулалык-генетикалык метод жана секвендештирүү менен шарп вирусунун катталган типтеринин генетикалык касиеттерин изилдөө.

Изилдөөнүн ыкмалары: серологиялык, вирусологиялык, молекулалык-биологиялык.

Алынган натыйжалар жана алардын жаңычылыгы: шарп вирусунун изолятынын А тиби эпизоотия очогунан бөлүнүп алынган. Шарп вирусунун изолятынын А тибинин культуралдык каситетери УБ жана ВНК-21 өстүрмө клеткаларында изилденген. Кыргыз Республикасында биринчи жолу шарп вирусунун А, О типтерин типизациялоо үчүн праймерлер иштелип чыккан жана конструкцияланган. Шарп вирусунун А, О типтеринин ДНК геномдорун бөлүп алуу үчүн АКТ-ПЧР, ПЧР классикалык анализинде жана ПЧР реалдуу убагындагы реакциялык эритмелердин кошулмасы жана температурдук убакыттын параметрлери оптималдаштырылган.

Колдонуу чөйрөсү: вирусология, биотехнология, ветеринардык тажрыйба.

РЕЗЮМЕ

диссертации Боронбаевой Аиды Ильичевны на тему: «Молекулярно-генетическая характеристика вируса ящура типов А, О» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 06.02.02. – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

Ключевые слова: вирус ящура, типы А, О, изолят, культура клеток, ИФА, полимеразная цепная реакция (ПЦР), ПЦР в режиме реального времени, секвенирование.

Объект исследования: крупный рогатый скот, патологический материал (носовые смывы, афты).

Цель работы: разработка и оптимизация видоспецифических праймеров для выявления и типизации вируса ящура, изучить генетические свойства регистрируемых типов вирусов ящура с применением молекулярно-генетических методик и секвенирования.

Методы исследования: серологические, вирусологические, молекулярно-биологические.

Полученные результаты и их новизна. Из очагов эпизоотии выделен изолят вируса ящура типа А. Изучены культуральные свойства изолята вируса ящура типа А в культурах клеток ПК и ВНК-21. Впервые в Кыргызской Республики разработаны и сконструированы праймеры для типизации вируса ящура типов А, О. Оптимизированы состав реакционных смесей и температурно-временные параметры ОТ-ПЦР, ПЦР анализа в классическом и ПЦР в реальном времени, для выявления геномной ДНК вируса ящура типов А, О.

Область применения: вирусология, биотехнология, ветеринарная практика.

SUMMARY

Boronbaeva Aida Ilyichevna dissertation on the theme: "Molecular genetic characteristic of foot and mouth disease virus of types A, O" for the degree of candidate of biological sciences in specialty 06.02.02. - Veterinary microbiology, virology, epizootology, mycology with mycotoxicology and immunology

Key words: foot and mouth disease virus, types A, O, isolate, cell culture, ELISA, polymerase chain reaction (PCR), real-time PCR, sequencing.

Object of research: cattle, pathological material (nasal washings, aphthae).

Objective: development and optimization of species-specific primers for detection and typification of foot-and-mouth disease virus, to study the genetic properties of registered types of foot and mouth disease viruses using molecular genetic techniques and sequencing.

Methods of investigation: serological, virological, molecular-biological.

The results obtained and their novelty. From the outbreaks of the epizootic, the isolate of foot and mouth disease virus type A was isolated. The cultural properties of the virus isolate of foot and mouth disease type A in cultures of cells of PC and BHK-21 were studied.For the first time in the Kyrgyz Republic, primers have been designed and constructed to typify the foot and mouth disease virus types A, O.The composition of reaction mixtures and the temperature-time parameters of RT-PCR, PCR analysis in classical and PCR in real time, for genomic DNA detection of foot and mouth disease virus types A, O were optimized.

Field of application: virology, biotechnology, veterinary practice.