**КЫРГЫЗ РЕСПУБЛИКАСЫНЫН УЛУТТУК ИЛИМДЕР АКАДЕМИЯСЫ
БИОТЕХНОЛОГИЯ ИНСТИТУТУ**

**КЫРГЫЗ РЕСПУБЛИКАСЫНЫН УЛУТТУК ИЛИМДЕР АКАДЕМИЯСЫ
БИЙИК ТОО ФИЗИОЛОГИЯСЫ жана МЕДИЦИНА ИНСТИТУТУ**

Д 03.23.680 диссертациялык кеңеши

Кол жазма укугунда
УДК 578.2.578.832

ДЖЕКЕБЕКОВ КУАНЫШ КАЙРАТОВИЧ

КАНАТТУУЛАРДЫН ТУМОО ВИРУСУН МОНИТОРИНГ ЖҮРГҮЗҮҮДӨГҮ ЗАМАНБАП ЫКМАЛАРДЫ ӨНҮКТҮРҮҮ

03.01.06 – биотехнология

Биология илимдеринин кандидаты окумуштуулук
даражасын изденип алуу үчүн жазылган
диссертациянын автореферааты

БИШКЕК – 2023

Иш Казакстан Республикасынын Саламаттык сактоо министрлигинин «Биологиялык коопсуздук проблемалары боюнча илимий-изилдөө институту» республикалык мамлекеттик ишканасында жана Кыргыз Республикасынын Улуттук илимдер академиясынын Биотехнология институтунда аткарылган.

Илимий жетекчи:	**Жунушов Асанкадыр Темирбекович** ветеринария илимдеринин доктору, профессор, КР УИАнын академиги
Расмий оппоненттер:	**Девришев Давудай Абдулсемедович** биология илимдеринин доктору, РИАнын мүчө-корреспонденти, К. И. Скрябин атындагы Москва мамлекеттик ветеринардык медицина жана биотехнология академиясынын иммунология жана биотехнология кафедрасынын профессору.
	Серикбаева Асия Демеухановна биология илимдеринин доктору, КазНАИУнун технология жана тамак-аш коопсуздугу кафедрасынын профессору
Жетектөөчү мекеме:	Бүткүл россиялык илимий изилдөө жана биологиялык өнөр жай технологиялык институту (БРИИжБӨТИ) (Россия, Москва облусу, Лосино-Петровск шаары)

Диссертациянын коргоосу 2023-жылдын 31-октябрында саат 12-00дө биология илимдеринин доктору (кандидаты) окумуштуулук даражасын коргоо боюнча Кыргыз Республикасынын Улуттук илимдер академиясынын Биотехнология институту жана Кыргыз Республикасынын Улуттук илимдер академиясынын Бийик тоо физиологиясы жана медицинасы институтуна караштуу Д 03.23.680 диссертациялык кеңешинин отурумунда өткөрүлөт, дареги: 720071, Бишкек ш., Чүй проспектиси., 265, 303-кабинет. Диссертацияны коргоодогу видеоконференциянын жеткиликтүү ссылкасы - https:// https://vc.vak.kg/b/032-kpg-yve-qhh.

Диссертация менен Кыргыз Республикасынын Улуттук илимдер академиясынын китепканасынан жана диссертациялык кеңештин сайтынан http://vak.kg/rcl-groups/dissertacionnyy-sovet-d-03-23-680/ таанышууга болот.

Автореферат 2023-жылдын ________________ таркатылды.

Диссертациялык кеңештин
окумуштуу катчысы,
биология илимдеринин кандидаты Казыбекова А. А.

ИШТИН ЖАЛПЫ МҮНӨЗДӨМӨСҮ

Диссертациялык теманын актуалдуулугу. Канаттуулар тумоосу – дем алуу органдарынын депрессиясы менен мүнөздөлүүчү жана ар кандай даражадагы оордуктагы өтө жугуштуу оору. Канаттуулар тумоосунун вирусунун түрү (Influenza virus A) Orthomixoviridae үй-бүлөсүнө кирет жана комплементти бириктирүүчү антигени боюнча адамдын жана жаныбарлардын А тумоосунун вирусуна тиешелүү, ал үч серологиялык түргө бөлүнөт: А, В жана С (Spackman E., 2020; WHO., 2022).

Бул вирустук инфекция канаттуулардын жана сүт эмүүчүлөрдүн бардык түрлөрүн жабыркатат (Timothy K.W. et all, 2007; Широких К.Е. жана соавт., 2015). Эл аралык эпизоотиялык бюро канаттуулардын тумоосун өзгөчө коркунучтуу трансчегаралык антропозооноздук (адамдар, жаныбарлар жана канаттуулар үчүн коркунучтуу) оорулардын тизмесине киргизет (МЭБтин Жер үстүндөгү жаныбарлардын оорулары боюнча колдонмосу, 2014-ж.). Таркалышы жана экономикалык зыяны боюнча канаттуулардын тумоосунун А тибиндеги вирусу дүйнөдө буга чейин катталган бул оорунун бардык белгилүү эпидемияларынан алда канча ашып кетет (Kassenov M.M. жана соавт., 2010; Patapios A.P. et all, 2022).

Учурда дүйнөнүн көптөгөн өлкөлөрүндө куш тумоосунун эпизоотиялык абалы татаалданууда (Кожахметова Т.Е. жана соавт., 2021; БДССУ., 2021). Республиканын территориясынын географиялык абалын эске алып, Казакстандын суу сактагычтары Азиядагы эң маанилүү корук болуп саналат, суу жана жарым сууда жашоочу канаттуулардын түрлөрүн өндүрүүчүлөр болуп саналат (Кожахметова Т.Е. жана соавт., 2021; Нурпейсова А.С., 2020).

Эл аралык эпизоотиялык бюронун маалыматы боюнча, А тибиндеги канаттуулар тумоосу Казакстан Республикасынын аймагында жыл сайын катталып, ири экономикалык зыян алып келет (Kassenov M.M. и соавт., 2010; Кожахметова Т.Е. и соавт., 2021; Нурпейсова А.С., 2020). Ошентип, азыркы дүйнөдө канаттуулар тармагы өнүккөн бир дагы мамлекет канаттуулардын тумоосунан капыстан келип чыгууга туруктуу иммунитетке ээ эмес. Көйгөйдүн маанилүүлүгү бул оорудан келген чоң экономикалык зыян менен гана эмес, ошондой эле патогендин потенциалдуу антропогендик коркунучу менен да баса белгиленет (Li Y. et all., 2019).

Бүгүнкү күндө ПЧР анализи лабораториялык диагностика үчүн кеңири таралган жана динамикалуу өнүгүп жаткан технологиялардын бири болуп саналат (Fouchier A.M. et all, 2000; Lisa F.P. et all, 2006; Tripathi A. et all, 2021).

Ушуга байланыштуу биздин изилдөөбүздүн милдети Казакстан Республикасынын аймагында канаттуулар тумоосуна мониторинг жүргүзүү үчүн А тибиндеги канаттуулар тумоосунун вирусун полимераздык чынжыр

реакциясы (ПЧР) аркылуу аныктоонун тесттик системасын иштеп чыгуу болду.

Диссертациянын темасынын билим берүү жана илимий мекемелер тарабынан жүргүзүүлүүчү ири илимий программалар (долбоорлор), негизги илимий-изилдөөчүлүк иштери менен байланышы. Диссертациялык иш 2018–2020-жылдарга Казакстанда канаттуулар тумоосунун молекулярдык жана эпизоотологиялык мониторинги AR05132659 гранттык каржылоо долбоорлорунун алкагында Казакстан Республикасынын Саламаттык сактоо министрлигинин РМБ РМКда аткарылган. жана 0002/ПЦФ-ДСП-21 "Казакстан Республикасынын биологиялык коопсуздугу: коркунучтарды баалоо, алардын алдын алуунун жана жоюунун илимий-техникалык негиздери" 2021-2023-жылдарга арналган программасы.

Изилдөөнүн максаты. Казакстан Республикасынын аймагында канаттуулар тумоосуна мониторинг жүргүзүү үчүн диагностикалык ПЧР тест системасын иштеп чыгуу.

Изилдөөнүн милдеттери:

1. Канаттуулар тумоосунун вирусун аныктоо үчүн ПЧР тест системасын иштеп чыгуу;
2. Иштелип чыккан ПЧР тест системасынын өзгөчөлүгүн жана сезгичтигин аныктоо. Комиссиялык лабораториялык изилдөөлөрдү жүргүзүү;
3. Казакстан Республикасынын аймагында канаттуулар тумоосуна мониторинг жүргүзүү, вирусту бөлүп алуу жана алардын биологиялык касиеттерин изилдөө;
4. Канаттуулар тумоосунун вирусуна электрондук микроскопиялык анализ;
5. GenBankтын маалыматтарына салыштырмалуу канаттуулар тумоосу вирусунун жаңы штаммдарынын гемагглютинин (НА) жана нейраминидаза (NA) гендеринин молекулярдык-генетикалык анализи.

Изилдөөнүн илимий жаңылыгы:

Молекулярдык биологиянын акыркы жетишкендиктерин пайдалануу менен биринчи жолу канаттуулардын тумоосунун А вирусун ПЧР ыкмасы менен диагностикалоо үчүн тесттик система иштелип чыкты. Иштелип чыккан сыноо системасы канаттуулардын тумоосунун вирусунун РНКсы аныктоодо колдонулду.

Казакстан Республикасындагы канаттуулар тумоосунун А вирусунун штаммдарынын молекулярдык-генетикалык мүнөздөмөлөрү изилденди. Жүргүзүлгөн изилдөөлөрдүн натыйжасында Казакстанда канаттуулар тумоосунун эпидемиологиялык абалы аныкталды.

Казакстан Республикасынын аймагындагы келгин да, кыштоочу да канаттуулардын миграциясы жана топтолуу жолдору боюнча маалыматтарды чогултулду жана талданды.

А/борчун/Түндүк Казакстан/5/2018(H3N8)) эпизоотиялык вирусу бөлүнүп алынган, ал Республиканын Саламаттык сактоо министрлигинин «Биологиялык коопсуздук проблемалары боюнча илимий-изилдөө институту» Республикалык мамлекеттик ишканасынын микроорганизмдер коллекциясында. Казакстандын М-12-19/Д каттоо номери менен сакталган.

Изилдөөнүн жаңылыгы Казак Республикасынын Юстиция министрлигинин «Интеллектуалдык менчиктин улуттук институту» Республикалык мамлекеттик ишканасынын № 8365 жана № 8366 боюнча пайдалуу моделдин 2 патенти менен тастыкталган.

Алынган натыйжалардын практикалык маанилүүлүгү. Изилдөөлөрдүн жыйынтыгы боюнча ПЧР ыкмасын колдонуу менен канаттуулардын тумоосунун А тибиндеги вирусун аркылуу аныктоо үчүн сезгич, спецификалык жана практикалык тест системасы иштелип чыккандыгында турат. Диагностикалык препаратка (тест системасы) ченемдик-техникалык документтер (ЧТД) түзүлдү жана бекитилди**.** А гриппинин вирусун аныктоо биология жана биохимия институтунун өндүрүштүк ишмердигинде жана Ижевский өндүрүштүк комплексинде А гриппинин вирусун ПЧР менен аныктоо боюнча иштелип чыккан тесттик системаны колдонуу менен жүргүзүлдү.

Алынган натыйжалардын экономикалык маанилүүлүгү. Канаттуулардын тумоосунун А вирусун ПЧР ыкмасы менен диагностикалоо үчүн тесттик системаны практикага киргизүү инфекциялык процесстин алгачкы баскычында А тибиндеги тумоонун вирусун натыйжалуу жана ишенимдүү аныктоого мүмкүндүк берет, анын натыйжасында толук диагноз коюуга болот, ошондой эле өлкөнүн канаттуулар тармагына келтирилген зыянды олуттуу кыскартуу үчүн зарыл болгон ветеринардык, санитардык жана көзөмөл чараларын көрүүгө болот. Бул технология колдонгон тест-системалардын 1 комплектинин баасы чет өлкөлүк аналогдордон бир нече эсе аз.

Диссертациянын коргоого коюлуучу негизги жоболору:

1. Канаттуулар тумоосунун вирусун аныктоо үчүн ПЧР тест системасын иштеп чыгуу.
2. Иштелип чыккан ПЧР тест системасынын өзгөчөлүгүн жана сезгичтигин аныктоо.
3. Казакстан Республикасынын аймагында канаттуулар тумоосуна мониторинг жүргүзүү, вирусту бөлүп алуу жана алардын биологиялык касиеттерин изилдөө.
4. Канаттуулар тумоосу вирусунун жаңы штаммдарынын канаттуулар тумоо вирусуна электрондук микроскопиялык анализ.

5. GenBank маалыматтарына салыштырмалуу канаттуулар тумоо вирусунун жаңы штаммдарынын гемагглютинин (HA) жана нейраминидаза (NA) гендеринин молекулярдык-генетикалык анализи.

Изденүүчүнүн жеке салымы. Диссертациялык иштин бардык бөлүмдөрү автордун жеке катышуусу менен аткарылган.

Изилдөөнүн натыйжаларын апробациялоо. Диссертациянын негизги материалдары “OpenBio – 2019” жаш окумуштуулардын VI Эл аралык илимий конференциясында (Россия, Наукоград Кольцово, 2019), Республикалык мамлекеттик ишкана “Биологиялык коопсуздук проблемалары боюнча илимий-изилдөө институтунун” “Биотехнология, ветеринария жана медицина үчүн заманбап чакырыктар” эл аралык илимий-практикалык конференциясында (Гвардейский шаарчасы, 2020) баяндалган.

Диссертациянын натыйжаларынын басылып чыгарылышы. Изилдөөнүн натыйжалары 10 илимий эмгекте, анын ичинде 2 макала Scopus маалымат базасында индекстелген журналдарда, 1 макала Кыргыз Республикасынын Улуттук аттестациялык комиссиясынын президиуму тарабынан бекитилген рецензияланган илимий басылмалардын тизмесинде жарыяланган.

Диссертациянын түзүлүшү жана көлөмү. Диссертациялык иш 171 беттен турат жана төмөнкү бөлүмдөрдү камтыйт: киришүү, адабий баяндама, өздүк изилдөөлөрдүн натыйжалары жана аларды талкуулоо, корутунду жана колдонмо. Колдонулган адабияттардын тизмесинде 209 булак, анын ичинде 150 чет элдик авторлордун эмгектери бар. Иш 21 сүрөттөр жана 10 таблица менен иллюстрацияланган. Изилдөөлөрдүн ишенимдүүлүгүн тастыктаган документтер 14 тиркемени камтыйт.

ДИССЕРТАЦИЯНЫН НЕГИЗГИ МАЗМУНУ

Киришүүдө иштин актуалдуулугун жана канаттуулардын тумоосунун А вирусуна мониторинг жүргүзүү үчүн спецификалык жана сезгич диагностикалык ПЧР тест системасын иштеп чыгуунун зарылдыгын көрсөткөн маалыматтар бар.

1-бап. Адабияттык маалыматтарда илдеттин таралышы, экономикалык зыяны, вирустун биологиялык касиеттери, эпизоотиялык абал, канаттуулар тумоосунун вирусун диагностикалоодо молекулярдык-генетикалык методдор, ошондой эле изилдөөлөр боюнча ата мекендик жана чет элдик адабият булактарын сунуштайт жана талдайт. Ошондой эле канаттуулар тумоосунун А тибиндеги вирусун аныктоодо тескери транскрипциялык полимераздык чынжыр реакциясынын (ТТ-ПЧР) колдонуулуусу.

2-бап. Изилдөөнүн материалдары жана методдору. Изилдөө объектилерин жана изилдөө жүргүзүүгө методологиялык ыкмалар каралган. Бул иште А типтеги вирустун эпизоотиялык штаммдар колдонулган:

Изилдөө объектиси. Изилдөөнүн объекттери болуп канаттуулардын тумоосунун А вирусун полимераздык чынжыр реакциясы (ПЧР) аркылуу диагностикалоо үчүн спецификалык, сезгич тесттик системаны иштеп чыгуу жана иштелип чыккан тесттик системаны колдонуу менен канаттуулар тумоосуна мониторинг жүргүзүү саналат.

Изилдөөнүн предмети.

1. М гени үчүн атайын праймерлерди тандоо жана долбоорлоо.
2. ПЧР тест системасынын орнотуу параметрлерин жана компоненттерин оптималдаштыруу.
3. Тест системасынын өзгөчөлүгү жана сезгичтиги.
4. Мониторинг: жапайы жана үй канаттууларынан алынган биологиялык материалдарды талдоо.

Изилдөөнүн методдору. Примерлердин конструкциясы жана синтези. М гени үчүн спецификалык праймерлерди тандоо жана долбоорлоо VectorNTI компьютердик программасынын жардамы менен канаттуулардын тумоосунун А вирусунун М гениниин эталондук ырааттуулугун колдонуу менен ишке ашырылды. Максаттуу праймерлер Synthesizer H-16 олигонуклеотид синтезаторунда өндүрүүчүнүн сунушуна ылайык синтезделди. көрсөтмөлөр. Тазалоо натрий ацетатынын катышуусунда этил спирти менен реципитациялоо жолу менен жүргүзүлдү. Олигонуклеотиддер дистирленген сууда кайрадан суспензияланып, концентрациясы аныкталды. Олигонуклеотиддердин эритмелери 20 pmol жумушчу концентрациясы менен даярдалган. Нуклеиндик кислотаны изоляциялоо коммерциялык комплекттин жардамы менен аткарылган.

кДНК синтези үчүн реагенттердин комплекси иштелип чыкты жана колдонулду, алар төмөнкү чечимдерди камтыган: КТ-аралашма 1, КТ-аралашма 2 (0,03 см^3): грипп вирусунун кДНК (cDNA) синтези үчүн 20 pmol Uni12 праймери, Ревертаза (M-MLV) (0,03 мл): 200 е.а./мкл. кДНК синтези 0,2 см^3 микроцентрифугалык түтүктөрдө жүргүзүлгөн. Агароз гелинде амплификация продуктуларын аныктоо горизонталдык электрофорез аркылуу

ишке ашырылган.

Тест системасынын өзгөчөлүгү КТ-ПЧР тарабынан аныкталган. Өзгөчөлүккө баа берүү үчүн канаттуулардын жугуштуу ооруларын пайда кылуучу вирустардын штаммдарын жана изоляцияларын колдондук. А тумоосунун РНКсын аныктоодо тест системасы башка типтеги вирустардын жана вирустардын башка гетерологиялык түрлөрүнөн РНКсын аныктабашы керек.

Тест системасынын спецификасы спецификалык оң башкаруу элементтерин - грипп вирусунун М гениниин фрагменти камтыган плазмиддик ДНКны колдонуу менен көзөмөлдөндү.

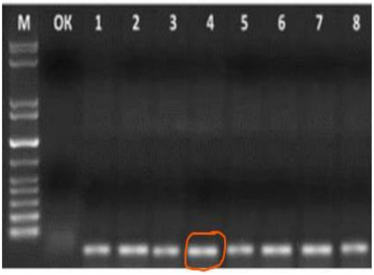
Молекулярдык биологиялык жана вирусологиялык изилдөөлөр үчүн канаттуулардан трахеялык жана клоакалдык тампондор алынды. Сынактарды алуу FAOнун сасык тумоого каршы көрсөтмөлөрүнө ылайык жүргүзүлдү.

3-бап. Жеке изилдөөлөрдүн жыйынтыктары жана аларды талкулоо.

3.1- Канаттуулар тумоосунун вирусун аныктоо үчүн ПЧР тест системасын иштеп чыгуу. КТ-ПЧР үчүн праймерлерди долбоорлоо жана синтездөө. Эксперименттердин жүрүшүндө тумоонун А вирусун аныктоо үчүн 5 жуп спецификалык праймерлер тандалган. Алынган праймерлер менен баштапкы ПЧРден кийин праймерлер тандалды: InfA_780_1F—ACT GGG CAC GGT GAG CGT GA (түз) жана InfA_944_1R—CCC GTC AGG CCC CCT CAA AGC (тескери же кайталануучу). Праймерлерди камтуу 164 базалык жуптан турат.

ПЧР тест системасынын параметрлерин жана компоненттерин орнотууну оптималдаштыруу. Реакция эки этапта жүргүзүлдү**.** Биринчи кадам Uni-12 универсалдуу праймерлеринин жардамы менен 20 pkm концентрациясында кДНКны түзүү болду. Реакция аралашмасы канаттуулар тумоосунун А вирусунун ревертазасы жана жалпы РНК кошулган КТ аралашмасынан турган. Реакция аралашмасы термикалык циклерде 420С температурада 1 саат инкубацияланган, андан кийин температура 650Сге чейин жогорулатылган жана дагы 20 мүнөт инкубацияланыа, 40С чейин муздатылды. Алынган кДНК дароо ПЧР продуктуларын түзүү үчүн жана оптималдаштыруу үчүн колдонулду. Ар кандай праймерди күйгүзүү температуралары, ошондой эле ПЧР реакциясынын аралашмасынын компоненттеринин ар кандай концентрациялары салыштырылды.

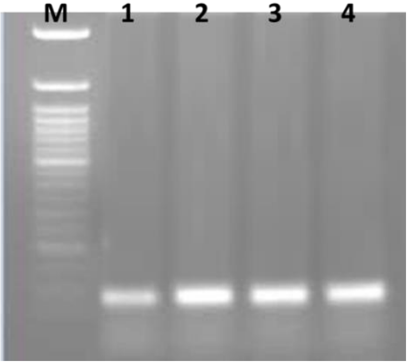
Температура режимин тандоо. ПЧР учурунда продукциянын өзгөчөлүгүн жогорулатуучу негизги фактор болуп праймерди күйгүзүү температурасы саналат. Оптималдуу күйдүрүү температурасын тандоо үчүн төмөнкү градустар тандалды: 50^0C, 52^0C, 54^0C, 55^0C, 57^0C, 59^0C, 61^0C, 63^0C. Андан ары ПЧР үчүн 55^0C температурасы тандалды, бул 3.1-сүрөттө көрсөтүлгөн.



M–1kb маркер, Qiagen;
ОК - терс башкаруу;
1 - 50 ^{0}C;
2 - 52 ^{0}C;
3 - 54 ^{0}C;
4 - 55 ^{0}C;
5 - 57 ^{0}C;
6 - 59 ^{0}C;
7 - 61 ^{0}C;
8 - 63 ^{0}C

3.1 – сүрөт. Ар кандай күйгүзүү температураларындагы амплификация (күчөтүү).

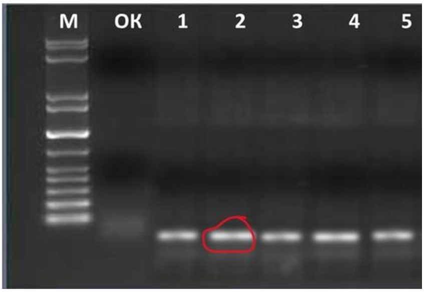
dNTP аралашмасынын концентрациясын оптималдаштыруу. Ошондой эле реакцияга dNTP оптималдуу керектөөсүн аныктоо үчүн ПЧР жүргүзүлдү. Электрофореграммадан көрүнүп тургандай, 5-20 мМ диапазондогу dNTP аралашмасынын ар кандай концентрациясы ПТР продуктунун түшүмдүүлүгүнө таасирин тийгизет. Андан ары ПТР стадиясы үчүн реакция аралашмасында 10 мМ dNTP аралашмалары колдонулган, алар 3.2 - сүрөттө көрсөтүлгөн.



M - 1kb маркер, Qiagen;
1 – 5 мМ дНТФ,
2 – 10 мМ дНТФ,
3 – 15 мМ дНТФ,
4 – 20 мМ дНТФ

3.2 – сүрөт. Ар кандай dNTP концентрацияларындагы амплификация

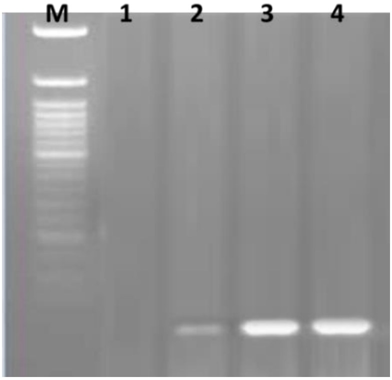
Taq ДНК полимераза концентрациясын оптималдаштыруу. ДНК полимераза ферменти ПЧРде негизги ролду ойнойт. Taq ДНК полимеразасынын концентрациясы акыркы продуктунун түшүмүнө (максаттуу ген) таасирин тийгизет. Салыштыруу үчүн, MgCl2 камтыган 0,25, 0,5, 1, 1,5 жана 2 мкл ДНК полимераза колдонулган. Көрүнүп тургандай, ДНК полимеразанын бардык бирдиктери продуктунун түшүмүнө карата активдүү. Анын баасын эске алуу менен, андан аркы иштер үчүн 0,5 бирдик ДНК полимераза концентрациясы тандалып алынган, алар 3.3- сүрөттө көрсөтүлгөн.



M – 1kb маркер, Qiagen;
1 – 0,25бирд.;
2 – 0,5 бирд.;
3 – 1 бирд.;
4 – 1,5 бирд.;
5 – 2 бирд.

3.3–сүрөт. Taq ДНК полимеразанын ар кандай концентрацияларындагы амплификация

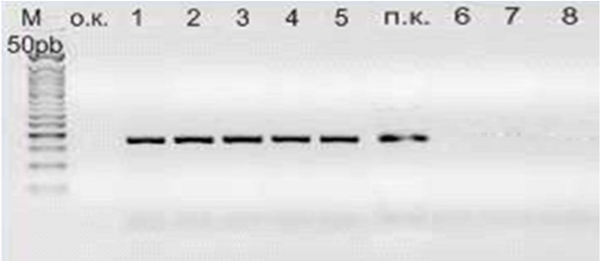
Праймердин концентрациясын тандоо үчүн 5, 10 жана 20 пкм праймер концентрациялары колдонулган. Көрүнүп тургандай, 10 пкм концентрациясындагы праймерлер продуктуну өндүрүү үчүн жетиштүү, алар 3.74- сүрөттө көрсөтүлгөн.



M - 1kb маркер, Qiagen;
1 – терс контроль;
2 – 5 пмоль;
3 - 10 пмоль;
4 –20 пмоль.

3.4–сүрөт. Ар кандай праймер концентрацияларындагы амплификация

3.2 - А типтеги грипптин лабораториялык диагностикасынын тесттик системасынын өзгөчөлүгүн изилдөө. Тест-системанын өзгөчөлүгүн баалоо үчүн изилдөөлөрдү жүргүзүү үчүн төмөнкү вирустар колдонулган: штамм A/grey duck/Nort-Kazakhstan/5/2018 (H3N8), штамм A/Greylag goose/Nort-Kazakhstan/62/2019 (H3N8), штамм B/Санкт-Петербург/30/09, сызык B(V), штамм C/Улан-Удэ/34/86, штамм Майкудукский (ИЛТ вирусу). Терс көзөмөл катары деионизацияланган суу колдонулган. Алынган натыйжалар 3.5 - сүрөттө берилген.



3.5–сүрөт. Канаттуулар тумоосунун вирусун колдонуу менен ТТ-ПЧР анализинин өзгөчөлүгүн аныктоо

Эскертүү: M – Marker 50 bp, BioLabs; макул. – терс башкаруу, деионизацияланган суу; PC. – оң контролдук: грипп А тибиндеги cDNA; (1-5) - А типтеги грипп вирусунун

үлгүсүндөгү РНК: 1 - штамм А/борчун / Түндүк-Казакстан/5/2018 (H3N8); 2 - штамм А/боз аз/California/72 (H3N8); 3 – штамм А/чоң чүрөк өрдөк/Корголжын/865/04 (H3N6); 4 - штамм А/Грейлаг казы/Түндүк-Казакстан/62/2019 (H3N8); 5 - штамм. А / кичи чүрөк өрдөк/ Коргалжын / 1797/06 (H3N8); 6 – штамм V/Санкт-Петербург/30/09, V(V) линиясы; 7 - штамм S/Улан-Удэ/34/86; 8 - Майкудук ILT вирусунун штаммы.

InfA_780_1F жана InfA_944_1R праймерлеринин тандалган жана синтезделген жуптары канаттуулардын тумоосунун вирусун идентификациялоо үчүн ылайыктуу жана бул инфекция үчүн өзгөчө. А гриппинде алынган фрагменттердин өлчөмү эсептелген 164 ж.б. Грипп эмес А штаммдары менен терс натыйжалар алынган, б.а. B/Санкт-Петербург/30/09 штамы, В грипп вирусунун B(V) сызыгы, С штаммы C/Улан-Удэ/34/86 штамы, Майкудук ILT вирусунун штамы.

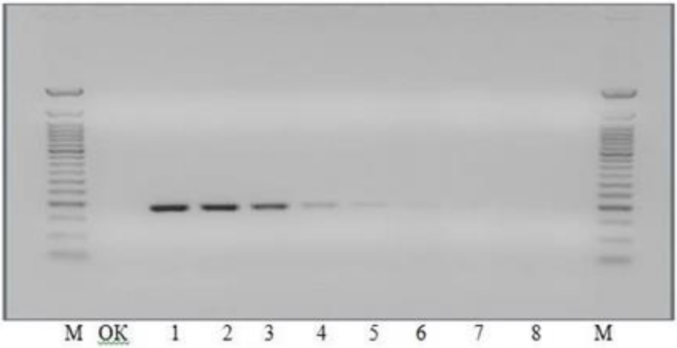
Канаттуулар тумоосун диагностикалоо үчүн ТТ-ПЧР тест-системасынын өзгөчөлүгүн аныктоодо грипп А вирусунун РНКсын камтыган бардык үлгүлөрдө 164 бирдик өлчөмүндөгү ПЧР реакциясынын спецификалык продуктулары топтолгондугу аныкталды. Терс натыйжалар грипптин В тибиндеги вирустарын, B/Санкт-Петербург/30/09 штамм, B(V) линиясын колдонуу менен алынды; штамм C/Улан-Удэ/34/86. Ошондой эле, дем алуу органдарынын ооруларын пайда кылуучу Майкудук ILT вирусунун штаммынын ДНКсын колдонууда терс жыйынтык алынды. Ар кандай күчөтүү продуктуларынын жоктугу деионизацияланган сууда да байкалат (ОК - терс башкаруу).

3.5 - сүрөттөн көрүнүп тургандай, иштелип чыккан тест системасы А тумоосунун вирустарын атайын аныктайт.Башка вирустар РНК/ДНК үлгүсү катары колдонулганда, эч кандай күчөтүү продуктулары пайда болбойт.

Ошентип, тест-системалардын иштелип чыккан эксперименталдык сериясынын спецификасы канаттуулар тумоосунун вирустарын жана канаттуулардын башка вирустарын күчөтүү жолу менен ТТ-ПЧР боюнча грипптин А түрүн лабораториялык диагностикалоо үчүн аныкталган. Натыйжада А тибиндеги грипп вирусунун үлгүлөрүндө ПЧР продуктусу топтолду, ал эми калган үлгүлөрдө эч кандай продуктулар топтолгон эмес, бул тесттик системанын өзгөчөлүгүн көрсөтөт.

ТТ-ПЧР тест системасынын сезгичтигин аныктоодо иштелип чыккан оптималдуу температура-убакыт реакциясынын шарттары жана 100 нг (1х108 РНК көчүрмөсү) дан 0,01 пг (1х10 РНК көчүрмөсү) чейин грипп А вирусунун РНКсынын 10 эсе суюлтуулары колдонулду.

Сыноо үчүн канаттуулардын тумоосунун вирусунун А/боз өрдөк/ Түндүк-Казакстан/5/2018 (H3N8) штаммынын РНКсы төмөнкү 1:10 суюлтууларда колдонулган; 1:100; 1:1000; 1:10 000; 1:100 000; 1: 1 000 000; 1: 10 000 000; 1: 10 000 0000 (3.6 - сүрөт).



3.6 – сүрөт. Канаттуулар тумоосунун вирусун диагностикалоо үчүн КТ-ПЧР тест системасынын сезгичтигин аныктоо

Эскертүү: М – Marker 50 bp, BioLabs; 1 - РНК 1x108 нг; 2 - РНК 1x107 нг; 3 - РНК 1x106; 4 - РНК 1x105; 5 - РНК 1x104; 6 - РНК 1x103; 7 - РНК 1x102; 8 - РНК 1x10.

Изилдөөлөр көрсөткөндөй, тесттик системанын сезгичтик чеги үлгүдөгү вирус РНКсынын 1x102 көчүрмөсүн түзөт. А тибиндеги грипптин вирусун аныктоонун бул ПТР ыкмасы тесттик материалда геномдук вирустук РНКнын 1x102 нускасын камтыса, вирусту диагностикалоого мүмкүндүк берет, бул иштелип чыккан ПТР ыкмасы өтө сезгичтигин көрсөтөт.

3.3 - Мониторинг: жапайы жана үй канаттууларынан алынган биологиялык материалдарды талдоо. Казакстандын аймагы аркылуу канаттуулардын 4 аралаш миграциялык жолу бар: Чыгыш Африка-Евразия, Борбордук Азия-Индия, Чыгыш Азия-Австралия жана Батыш Тынч океан. Борбордук Азия-Индия жана Чыгыш Азия-Австралия миграциялык жолдору. эң чоң мааниге ээ.

Бул изилдөөнүн алкагында Сорбулак көлүндө (Алматы облусу, Иле району) жээк канаттууларына сезондук мониторинг жүргүзүлдү. Жамбыл облусундагы «Шакпак» жана Түндүк-Казакстан облусуна экспедициялык саякат уюштурулду. Канаттуулар тумоосуна мониторинг жүргүзүү үчүн Түндүк Казакстан облусунун көлдөрүнүн сууда сүзүүчү жана сууга жакын канаттуулары текшерилди. Ошондой эле Жамбыл жана Алматы облустарынын тургундарынын жеке короо-сарайлары каралды. 135 баш бакма канаттуулардан үлгү катарында клоакалдык суюктуктары алынды.

Жапайы жана үй канаттууларынан алынган талаа үлгүлөрү ТТ-ПЧР системасы менен талданды. 2018-жылдын жазында чогултулган канаттуулардан алынган биологиялык материалдарды изилдөөнүн жыйынтыгында 7 үлгүдөгү грипптин А тибиндеги вирусу аныкталды. Лабораториялык анализдин натыйжалары 3.1 - таблицада келтирилген.

Таблица 3.1. – 2018-жылдын жазында чогултулган үлгүлөрдүн А тип гриппинин ОТ-ПЧР анализинин жыйынтыгы

Рег. №	Канаттуулардын түрлөрү	Үлгү алынган аймак	Координаттары	А тип грипптин ТТ-ПЧР анализи
1	2	3	4	5
12	Испан таранчысы (Passer hispaniolensis)	"Шакпак" орнитологиялык станциясы (Жамбул обл.)	N42^0 57,095 E070^{0}64,366	+
21	Бакча камышчысы (Acrocephalus dumetorum)	Сорбулак көлү (Иле району, Алматы облусу)	N43^0 66,766 E076^{0}52,453	+
28	Бакча камышчысы (Acrocephalus dumetorum)	Сорбулак көлү (Иле району, Алматы облусу)	N43^0 66,766 E076052,453	+
30	Бакча камышчысы (Acrocephalus dumetorum)	Сорбулак көлү (Иле району, Алматы облусу)	N43^0 66,766 E076^{0}52,453	+
31	Бакча камышчысы (Acrocephalus dumetorum)	Сорбулак көлү (Иле району, Алматы облусу)	N43^0 66,766 E076^{0}52,453	+
34	Бакча камышчысы (Acrocephalus dumetorum)	Сорбулак көлү (Иле району, Алматы облусу)	N43^0 66,766 E076^{0}52,453	+
36	Бакча камышчысы (Acrocephalus dumetorum)	Сорбулак көлү (Иле району, Алматы облусу)	N43^0 66,766 E076^{0}52,453	+

Изилдөөнүн жыйынтыгы боюнча А тибиндеги грипп вирустарынын эң көп саны Алматы облусунун Сорбулак көлүнөн алынган бакча камышчасы (Acrocephalus dumetorum) үлгүлөрүндө 17% учурда аныкталган.

2018-жылдын күз айларында лабораториялык изилдөө үчүн Түндүк Казакстан облусунан жапайы канаттуулардан 90 жана Алматы облусунан үй

канаттууларынан 80 даана клоакалдык суюктуктардын үлгүлөрү алынып, бул суюктуктар ТТ-ПЧРде тумоонун А вирусун аныктоо үчүн колдонулду.

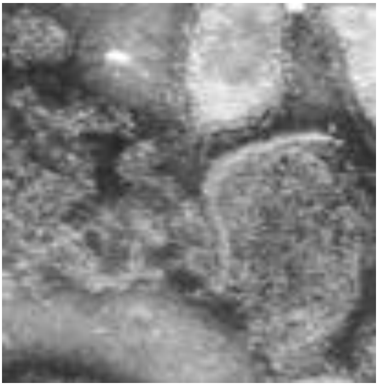
2018-жылдын күзүндө чогултулган жапайы канаттуулардан 8 үлгүсүндөгү биологиялык материалдарды изилдөөнүн жыйынтыгында тумоонун А тибиндеги вирусу аныкталган, натыйжалар 3.2 - таблицада келтирилген.

Таблица 3.2. – 2018-жылдын күз мезгилинде алынган үлгүлөрдүн грипптин А тибинин ОТ-ПЧР анализинин жыйынтыгы

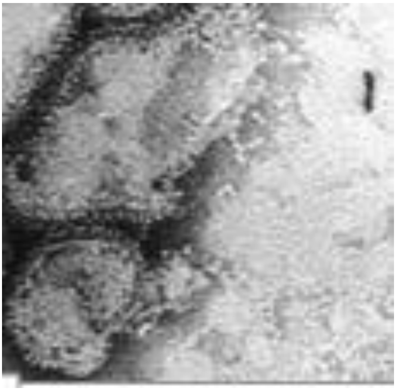
Рег. №	Канаттуулардын түрлөрү	Үлгү алынган аймак	Координаттары	А тиби үчүн ТТ-ПЧР
1	2	3	4	5
5	Борчун (*Anas strepera*)	Алуа көлү, Явленка конушу, Есильский району, Түндүк Казакстан облусу	54°22' 50,6" 68°17' 06,6"	+
8	Кайырма өрдөк (*Anas platyrhynchos*)	Алуа көлү, Явленка конушу, Есильский району, Түндүк Казакстан облусу	54°22' 50,6" 68°17' 06,6"	+
9	Кичи чүрөк өрдөк (*Anas crecca*)	Алуа көлү, Явленка конушу, Есильский району, Түндүк Казакстан облусу	54°22' 50,6" 68°17' 06,6"	+
13	Кайырма өрдөк (*Anas platyrhynchos*)	Алуа көлү, Явленка конушу, Есильский району, Түндүк Казакстан облусу	54°22' 50,6" 68°17' 06,6"	+
20	Жазы тумшук өрдөк (*Anas clypeata*)	Алуа көлү, Явленка конушу, Есильский району, Түндүк Казакстан облусу	54°22' 50,6" 68°17' 06,6"	+
45	Чон чүрөк өрдөк (*Anas querquedula*)	Түндүк Казакстан облусу, Жамбыл району, Пресновка, Займище көлү	54°42' 40,6" 67°20' 50,6"	+
62	Боз каз (Greylag goose)	Түндүк Казакстан облусу, Жамбыл району, Пресновка, Займище көлү	54°42' 40,6" 67°20' 50,6"	+
59	Кашкалдак (*Fulica atra*)	Түндүк Казакстан облусу, Жамбыл району, Пресновка, Займище көлү	54°42' 40,6" 67°20' 50,6"	+

Изилдөөнүн жыйынтыгы боюнча грипптин А тибиндеги вирусу Түндүк Казакстан облусунун майда көлдөрүнүн борчун (Anas strepera), кайырма өрдөк (Anas platyrhynchos), кичи чүрөк өрдөк (Anas crecca), жазы тумшук өрдөк (Anas clypeata), чоң чүрөк өрдөк (Anas querquedula), кашкалдак (Fulica atra) канаттууларынын изилденген үлгүлөрүнүн 8,5% да аныкталды.

3.4 – Канатттулардын вирустук тумоосунун А тибиндеги оң үлгүлөрдүн электрондук микроскопиялык анализи. Алынган натыйжаларды тастыктоо үчүн канаттуулардын тумоосуна оң болгон үлгүлөр - №5 (Алуа көлү, Түндүк Казакстан облусу) жана №62 (Займище көлү, Түндүк Казакстан облусу) кошумча электрондук микроскопиялык изилдөөлөргө дуушар болгон (3.7-сүрөт).



Вирусту камтыган № 62 материал
Чон чүрөк өрдөк
(Anas querquedula), Займище көлү,
Пресновка айылы, Түндүк Казакстан
облусу, Жамбыл району



Вирусту камтыган №5 материал
Борчун (Anas strepera),
Алуа көлү, Явленко айылы,
Түндүк Казакстан облусу

3.7 – сүрөт. Канаттуулар тумоосунун А тибиндеги вирусунун биоүлгүлөрүнүн электрондук микросүрөттөрү.

№ 5 жана № 62 вирусту камтыган материалдарда өлчөмү 80ден 200 нмге чейинки тегерек жана узун вирустук бөлүкчөлөр табылды. Вириондордун бети 7-9 нм узундуктагы тикенектер менен капталган, бул сүрөттөмө илимий адабияттардагы тумоо вирусу менен толук дал келет.

3.5 - Канаттуулар тумоо вирусунун жаңы штаммдарынын гемагглютинин (НА) жана нейраминидаза (NA) гендеринин молекулярдык-генетикалык анализи GenBank маалыматтарына салыштыруу.

Канаттуулар тумоосунун вирусунун ар кандай штаммдарынын беттик гендеринин нуклеотиддик ыраттуулугун салыштырып талдоо. Секвенирлөө жүргүзүлдү жана ПЧР оң үлгүлөрүндөгү канаттуулар тумоосу вирусунун H3N8 чакан тибиндеги изоляттарынын НА жана NA 2 гендеринин негизги нуклеотиддик ыраттуулугу аныкталды. Казакстандын АТВ изоляттарынын ГА жана НА генинин белгиленген нуклеотиддик тизмеги GenBank электрондук эл аралык маалымат базасына депонирленген: A/grey duck/North-Kazakstan/5/2018(H3N8) - HA (MN945305), NA (MN945306); A/greylag goose/Түндүк-Казакстан/62/2018(H3N8) - HA (MN945304), NA (MN945303).

GenBank маалыматтары менен Казакстанда бөлүнүп алынган жаңы канаттуулар тумоосунун А штаммдарынын HA жана NA гендеринин филогенетикалык анализи. Канаттуулар тумоосунун вирусунун беттик гендерин ген банкынын маалымат базасында канаттуулар тумоосу вирусунун башка штаммдары менен салыштыруу аркылуу генетикалык вариацияларды аныктоо.

НА гендердин филогенетикалык анализи H3N8 канаттуулар тумоосу вирусунун казакстандык изоляттары Азия жана Европа вирустарынын топторуна киргендигин көрсөттү. Бул эки генетикалык линиянын H3N8 канаттуулар тумоосунун вирусунун казакстандык өкүлдөрүнүн ортосундагы гемагглютининдин нуклеотиддик тизмегиндеги айырмачылыктар 5,75%га жетет.

Нейраминидазанын нуклеотиддик ыраттуулугун анализдөө жапайы канаттуулардан бөлүнүп алынган АТВ/H3N8 казакстандык изоляттары евразиялык эволюциялык тармакка киерин көрсөттү. Бөлүнгөн изоляттар 2010, 2011, 2015, 2018-жылдары Монголияда, 2013-жылы Швецияда жана 2003-жылы Норвегияда изоляцияланган вирустар менен бир эле субкладияга киргизилген. Эволюциялык дивергенцияны баалоо казакстандык АТВ/ H3N8 изоляттарынын популяцияларынан алынган үлгүлөр Генбанкта көрсөтүлгөн Азия жана Европа штаммдарынан алыс экенин көрсөттү.

АТВ/H3N8 штаммдарынын генетикалык байланышын баалоо. Казакстандык штаммдардын ыраттуулугу менен Генбанк маалыматтарынын ортосундагы эволюциялык айырмачылык MEGA7.0 программасы аркылуу бааланган. Казакстан АТВ/H3N8 штаммдарынын жана Генбанктан Азия жана Европа штаммдарынын нуклеотиддик тизмегинин ортосундагы негизги айырмачылыктардын саны талданды.

HAV/H3N8 изоляцияланган штаммдары жана евразиялык генетикалык бутагынын штаммдары да нейраминидазанын нуклеотиддик тизмегиндеги филогенетикалык окшоштуктарды көрсөттү. Ошол эле учурда Казакстандын HAV/H3N8 штаммдары менен эң жакын азиялык A/duck/Mongolia/566/2018(H3N8) MK978954 штаммынын ортосундагы

генетикалык аралык D≥0,015 болгон. Казак штаммдары Европанын A/mallard/Sweden/141811/2013 (H3N8) KT725427 штаммдарынан D мааниси ≥0,027 менен алыстайт.

Сезондук миграция учурунда табияттагы канаттуулар тумоосунун вирусунун табигый резервуары болгон жапайы канаттуулар вирусту бир топ аралыкка алып жүрүүгө жөндөмдүү.

Дүйнөнүн ар кайсы региондорунда – Европада, Африкада, Жакынкы Чыгышта жана Борбордук Азияда кыштаган канаттуулардын миграциялык агымдары бириккен Казакстандын аймагында адамдардын жана жаныбарлардын сасык тумоосунун вирустарынын ортосунда реассорттук штаммдардын пайда болуу ыктымалдыгы жогору.

Казакстанда канаттуулардын түрлөрүнүн саны кыйла көп жана ар бир түрдүн өзүнө тиешелүү өзгөчөлүктөрү, кыштоо аймактары, миграция багыттары жана андагы жүрүм-туруму бар. Ошондуктан Казакстандагы канаттуулардын миграциясынын толук картинасын түзүү өтө кыйын.

Казакстан Республикасынын аймагында жапайы канаттуулардын А гриппинин вирусу менен жугушу боюнча алынган маалыматтар жана бул аймактагы канаттуулардан бөлүнүп алынган грипп вирусунун штаммдарынын филогенетикалык анализинин маалыматтары канаттуулар тумоосу боюнча эпизоотиялык кырдаалды болжолдоо үчүн пайдаланылышы мүмкүн.

АТВ/H3N8 эки генетикалык линиясынын азиялык жана европалык эки линиясынын бир эле аймактагы жапайы канаттууларда бир убакта айлануусу алардын ар башка географиялык жерлерден интродукцияланышы менен шартталган. АТВ/H3N8 беттик гендеринин нуклеотиддик ырааттуулугун пайдалануу менен аныкталган генетикалык аралыктар казак штаммдары азиялык жана европалык АТВ/H3N8 штаммдарынан алыстап, прототип штаммдарынан айырмаланган өзүнчө бутагы түзөрүн көрсөтөт.

КОРУТУНДУ

1. А тибиндеги тумоонун вирусун ПЦР аркылуу аныктоо үчүн тест-системалардын 6 эксперименталдык сериясы иштелип чыккан. Бул үчүн конкреттүү олигонуклеотиддик праймерлер иштелип чыккан жана синтезделген: InfA_780_1F—ACT GGG CAC GGT GAG CGT GA, InfA_944_1R—CCC GTC AGG CCC CCT CAA AGC ар бир М гени менен күчөтүлгөн продукт өлчөмү 164 ж.б.. КТ-ПЧР орнотуу параметрлери оптимизацияланды жана күйүү температурасы - 55^{0}C болду. Реакциядагы dNTP аралашмасынын оптималдуу агымы 10 мМ деп аныкталып, ДНК полимеразанын концентрациясы 0,5 мкл түздү. Продукцияны иштеп чыгуу үчүн 10 pmol концентрациясындагы праймерлер жетиштүү болду.
2. Тест системасынын өзгөчөлүгү жана сезгичтиги аныкталды. Канаттуулардын биоматериалында (былжырлуу кабыкчалардын

суютуктары), кан сывороткасы жана инфекция жуккан клетка культураларында полимераздык чынжыр реакциясы (ПЧР) аркылуу А тумоо вирусун аныктоо үчүн спецификалык жана сезгич тесттик система иштелип чыкты. А тумоосунда алынган фрагменттердин өлчөмү 164 ж.б эсептелинди. Сыноо системасынын сезгичтик чеги үлгүдөгү вирустук РНК 1x102 көчүрмөсүн түздү.

3. Казакстандын аймагындагы келгин канаттуулардын негизги миграциялык жолдоруна мониторингдик изилдөөлөр жүргүзүлдү. Жапайы жана үй канаттууларынан алынган үлгүлөрдү иштелип чыккан тесттик системанын жардамы менен изилденди. Штаммы А/борчун/Түндүк-Казакстан/5/2018 (H3N8), сертификацияланган жана Биологиялык коопсуздук проблемалары илимий изилдөө институтунун "Микроорганизмдердин коллекциясы" лабораториясында сакталды. Мониторингдин натыйжалары географиялык информациялар системасынын (ГИС) технологияларын колдонуу менен электрондук картада көрсөтүлдү.
4. Канаттуулар тумоосунун вирустарына электрондук микроскопиялык анализ жүргүзүлдү, ал М генинин канаттуулардын вирустук тумоосунун А тиби 9 нм болушу үчүн ПЧР жүргүзүлгөндө оң натыйжаларды көрсөттү, бул илимий адабияттардагы грипп вирусунун сүрөттөлүшү менен толук дал келет.
5. Канаттуулар тумоосу вирусунун жаңы штаммдарынын гемагглютинин (HA) жана нейраминидаза (NA) гендеринин молекулярдык-генетикалык анализи GenBankтын маалыматтарын колдонуу менен жүргүзүлдү. Натыйжада H3N8 типтеги канаттуулар тумоосунун вирус изоляттарынын HA жана NA гендеринин алгачкы нуклеотиддик ырааттуулугу секвенирленип, аныкталды жана GenBank маалымат базасына төмөнкү ырааттуулуктар сакталган: A/grey duck/North-Kazakhstan/5/2018(H3N8) - HA (MN945305), NA (MN945306); A/greylag goose/Түндүк-Казакстан/62/2018(H3N8) - HA (MN945304), NA (MN945303). HA жана NAнын генетикалык структурасындагы өзгөрүүлөр, эки штамм жана алардын филогенетикалык тиешелүүлүгү да талданды. А вирустук тумоонун (АВТ) H3N8 эки генетикалык линиясынын бир эле аймактагы жапайы канаттууларда азиялык жана европалык эки генетикалык линиясынын бир убакта айлануусу алардын ар башка географиялык жерлерден интродукцияланышы менен шартталган. АВТ H3N8 беттик гендеринин нуклеотиддик ырааттуулугун пайдалануу менен аныкталган генетикалык аралыктар казак изоляттары азиялык жана европалык АВТ H3N8 штаммдарынан алыстап, прототип штаммдарынан айырмаланган өзүнчө бутагы түзөрүн көрсөттү. Бул казакстандык изоляттар H3N8 А тумоосунун вирусунун жаңы варианттары болушу мүмкүн.

ПРАКТИКАЛЫК СУНУШТАР

Даярдалган ПЧР тест системасы жапайы жана үй канаттууларынын арасында грипптин А тибиндеги вирусуна мониторинг жүргүзүү жана аныктоо үчүн ветеринардык биотехнологияда колдонуу сунушталууда. Тест системасы үчүн илимий техникалык документтердин (ИТД) топтому иштелип чыгып жана белгиленген тартипте бекитилди:

- СТ 405-1919-04 ГП-134-2023 тест-система боюнча уюмдун стандарты Полимераздык чынжыр реакциясы (ПЧР) аркылуу А тумоосунун вирусун аныктоо үчүн тест системасы;
- полимераздык чынжыр реакциясы (ПЧР) аркылуу А тумоо вирусун аныктоо үчүн тесттик системаны даярдоо жана контролдоо боюнча убактылуу нускама;
- полимераздык чынжыр реакциясы (ПЧР) менен А тумоосунун вирусу аныктоо үчүн тесттик системаны колдонуу колдонмосу.

ДИССЕРТАЦИЯНЫН ТЕМАСЫ БОЮНЧА ЖАРЫККА ЧЫККАН ЭМГЕКТЕРДИН ТИЗМЕСИ

1. Джекебеков, К.К. Разработка тест-системы для лабораторной диагностики гриппа А методом полимеразной цепной реакции [Текст] / Джекебеков К.К., Акылбаева К.К., Тайлакова Э.Т., Садикалиева С.О., Бурашев Е.Д., Жунушов А.Т., Касенов М.М., Султанкулова К. Т. // Материалы VI Международной конференции молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологовю -Новосибирск Наукоград Кольцово. - 2019. - С. 68-69. https://openbio.ru/openbio_tezis_2019.pdf.
2. Джекебеков, К.К. Complete Coding Genome Sequence of an Avian Influenza A/H3N8 Virus Strain Detected in North Kazakhstan in 2018 [Text] / K. Sultankulova, M. Orynbayev, N. Kozhabergenov, K. Akylbayeva, A. Melisbek, K. Jekebekov, A. Zhunushov, K. Zakarya, Y. // J. Microbiol Resour Announc. – 2020. – Vol.9 Issue 29 e00441-20. doi: 10.1128/MRA.00441-20. https://journals.asm.org/doi/10.1128/MRA.00441-20.
3. Джекебеков, К.К. Молекулярно-генетический анализ новых изолятов вируса гриппа птиц субтипа H3N8, выделенных в северных регионах Казахстана [Текст] / Султанкулова К.Т., Акылбаева К.К., Джекебеков К.К., Жунушов А.Т., Мелисбек А.М., Зубань И.А., Орынбаев М.Б., Закарья К.Д. // Вестник КазНУ, серия биологическая. – 2020. - №1(82). - С.120-132. https://bb.kaznu.kz/index.php/biology/issue/view/77/ISSN%201563-0218.
4. Джекебеков, К.К. Генетическое разнообразие штаммов вируса гриппа птиц A/H3N8 [Текст] / Джекебеков К.К., Акылбаева К.К., Мелисбек А.М., Жунушов А.Т., Бурашев Е.Д., Орынбаев М.Б., Султанкулова К.Т. // Вестник КазНУ, серия биологическая. – 2020. - №4(85). - С. 86-95. https://bb.kaznu.kz/index.php/biology/article/view/1548/1431.
5. Джекебеков, К.К. Конструирование праймеров для выявления вируса гриппа птиц [Текст] / Джекебеков К.К., Акылбаева К.К., Садикалиева С.О.,

Бурашев Е.Д., Жунушов А.Т., Султанкулова К.Т. // материалы Международной научно-практической конференции «Современные вызовы для биотехнологии, ветеринарии и медицины» -пгт. Гвардейский. - 2020. – С. 162-165. https: //www.biosafety.kz/wp-content/uploads/2020/06/%D0%A1%D0% 91%D0%9E%D0%A0%D0%9D%D0%98%D0%9A-%D0%9C%D0%90%D0% A 2%D0%95%D0%A0%D0%98%D0%90%D0%9B%D0%9E%D0%92.
6. Джекебеков, К.К. Evidence for flock transmission of individual subtypes and strains of avian influenza viruses: A monitoring study of wild birds in Kazakhstan [Text] / K. T. Sultankulova, K. K. Dzhekebekov, M. B. Orynbayev, Y. D. Burashev, A. M. Melisbek, S. M. Barmak, N. S. Kozhabergenov, A. U. Issabek, O. V. Chervyakova, A. M. Namet, K. D. Zakarya, S. Fereidouni // J.Virus Research – 2022. -№320. DOI: 10.1016/j.virusres.2022.198898. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35995240/.
7. Джекебеков, К.К. ОТ-ПЦР тест-система для диагностики вируса гриппа птиц [Текст] / Джекебеков К.К., Жунушов А..Т., Элина Жакыт қызы, Шыныбекова Г.О., Арай Құралбек қызы, Наханов А. К. // Известия НАН КР. - 2023. - №2. – С. 40-50. https://ilim.naskr.kg/index.php/main/issue/view/39/41.
8. Джекебеков, К.К. Биологические и морфологические характеристики штамма А/Серая утка/СКО/5/2018 (H3N8) вируса гриппа птиц, выделенного в Казахстане [Текст] / К. Джекебеков, М. Орынбаев, Н. Кожабергенов, А. Жунушов, Э. Калимолда, К. Султанкулова // Международная научно-практическая конференция «Биотехнология и биологическая безопасность: достижения и перспективы развития», посвященная 65-летию Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности (бывший НИСХИ)» - 2023. - С. 38-39. https://biosafety.kz/%d1%82%d0%b5%d0%b7%d0%b8%d1%81 %d1%8b/.
9. Джекебеков, К.К. «Тест-система для обнаружения вируса гриппа А методом полимеразной цепной реакции» [Текст] / Джекебеков К.К., Абдураимов Е.О., Орынбаев М.Б., Султанкулова К.Т., Шораева К.А., Кожабергенов Н.С., Шыныбекова Г.О. // Пат. на полезную модель № 8365. – 2023. – рег. №2023/0459.2. http://ebulletin.kazpatent.kz/#/bulletin?timestamp =2023-08-18&bull_num=33&data_source=bulletin&language=ru
10. Джекебеков, К.К. «Эпизоотический штамм А/серая утка/СКО/5/2018(H3N8) вируса гриппа птиц, предназначенный для производства диагностических, профилактических препаратов против гриппа птиц подтипа H3N8 и изучения биологии вируса» [Текст] / Джекебеков К.К., Орынбаев М.Б., Султанкулова К.Т., Керимбаев А.А., Копеев С.К., Бурашев Е.Д., Акылбава К.К., Исабек А.У., Мелисбек А.М. // Пат. на полезную модель № 8366. – 2023. - рег. №2023/0641.2. http://ebulletin.kazpatent.kz/#/bulletin? timestamp=2023-08-18&bull_num=33&data_source=bulletin&language=ru

Джекебеков Куаныш Кайратовичтин «Канаттуулар тумоосунун вирусуна мониторинг жүргүзүүнүн заманбап методун иштеп чыгуу» темасында 03.01.06 – биотехнология адистиги боюнча биологиялык илимдердин кандидаты окумуштуулук даражасын изденип алуу үчүн жазылган диссертациясынын

РЕЗЮМЕСИ

Негизги сөздөр: канаттуулардын тумоосу, тест системасы, диагностика, өзгөчөлүк, сезгичтик, мониторинг, вирус, штамм.

Изилдөөнүн объектиси: канаттуулар тумоосунун А тибиндеги вирусуна, канаттуулар тумоосу вирусуна, жапайы жана үй канаттууларына мониторинг жүргүзүү үчүн диагностикалык ПЦР тест системасы иштелип чыккан.

Изилдөөнүн предмети: М гени үчүн спецификалык праймерлерди тандоо жана долбоорлоо, ПЦР тест системасынын формулалык параметрлерин жана компоненттерин оптималдаштыруу, тесттик системанын өзгөчөлүгү жана сезгичтиги.

Иштин максаты: Казакстан Республикасынын аймагында канаттуулар тумоосуна мониторинг жүргүзүү үчүн диагностикалык ПЦР тест системасын иштеп чыгуу.

Изилдөөнүн ыкмалары: молекулярдык генетикалык, вирусологиялык, биотехнологиялык.

Алынган натыйжалар жана илимий жаңылыгы: Казакстанда биринчи жолу молекулярдык биологиянын акыркы жетишкендиктерин пайдалануу менен канаттуулар тумоосунун А тибиндеги вирусун ПЧР методу менен диагностикалоонун тесттик системасы иштелип чыкты.

Казакстандын эпидемиялык маанидеги аймактарынан канаттуулардан алынган биологиялык материалдар иштелип чыккан тесттик системанын жардамы менен чогултулуп, талдоого алынган, анын натыйжасында А/борчун /Түндүк-Казакстан/5/2018(H3N8) жана А/боз каз/Түндүк жаңы штаммдары табылган. аныкталган жана изоляцияланган - Казакстан/62/2018(H3N8).

А тибиндеги вирустун изоляциясы электрондук микроскопиянын (ЭМ) натыйжалары менен тастыкталды, анда өлчөмү 80ден 200 нмге чейин тегеректелген жана узун вирустук бөлүкчөлөр табылган; вириондордун бети 7-9 нм узундуктагы тикенектер менен капталган, алар илимий адабияттардагы грипп вирусунун сүрөттөлүшү менен толук дал келет.

Секвенирлөө жолу менен А типтеги вирустун субтипинин H3N8 изоляттарынын НА жана NA гендердин негизги нуклеотиддик ырааттуулугу аныкталып, GenBank маалымат базасына төмөнкү ыраатуулуктар сакталган: A/grey duck/North-Kazakhstan/5/2018(H3N8) - HA (MN945305), NA (MN945306); - HA (MN945304), NA (MN945303). НА жана NA эки штаммдын генетикалык структурасындагы өзгөрүүлөр анализденип, алардын

филогенетикалык тиешелүүлүгү аныкталган. Жапайы канаттууларда H3N8 A вирусунун тиби эки азиялык жана европалык эки генетикалык линиясынын бир аймакта бир убакта айланууcу, алардын ар кайсы географиялык жерлерден интродукцияланышы менен шартталган. Жер үстүндөгү гендердин нуклеотиддик ыраатуулугун пайдалануу менен аныкталган генетикалык аралыктар Казакстан изоляциясынын А типтеги H3N8 азиялык жана европалык штаммдарынан алыстап, прототип штаммдарынан айырмаланган өзүнчө бутагы түзөрүн көрсөттү. Бул казакстандык изоляттар H3N8 гриппинин жаңы варианттары болушу мүмкүн.

Колдонуу боюнча сунуштар: Канаттуулар тумоосунун А тибиндеги вирусун ПТР ыкмасы менен диагностикалоо үчүн тесттик системаны ишке ашыруу инфекциялык процесстин алгачкы стадиясында А тибиндеги грипптин вирусун натыйжалуу жана ишенимдүү аныктоого мүмкүндүк берет, анын натыйжасында зарыл болгон ветеринардык-санитардык толык бакма канаттууларды багып жаткан елкелерге келтирилген зыянды бир кыйла кыскартууга мумкундук бере турган жана конкреттуу куреш жургузууге болот.

Колдонуу тармагы: биотехнология, вирусология, ветеринардык практика.

РЕЗЮМЕ

диссертации Джекебекова Куаныша Кайратовича на тему: «Разработка современного метода мониторинга вируса гриппа птиц» на соискание кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология

Ключевые слова: грипп птиц, тест-система, диагностика, специфичность, чувствительность, мониторинг, вирус, штамм.

Объект исследования: разработанная диагностическая ПЧР тест-система для мониторинга вируса гриппа птиц типа А, вирус гриппа птиц, дикие и домашние птицы.

Предмет исследования: выбор и дизайн специфических праймеров на М ген, оптимизация параметров постановки и компонентов ПЧР тест-системы, специфичность и чувствительность тест-системы.

Цель работы: разработка диагностической ПЧР тест-системы для мониторинга гриппа птиц на территории Республики Казахстан.

Методы исследования: молекулярно-генетический, вирусологический, биотехнологический.

Полученные результаты и их новизна: Впервые в Казахстане с использованием последних достижений молекулярной биологии разработана тест-система для диагностики вируса гриппа птиц типа А методом ПЧР. Для этого были сконструированы и синтезированы специфические олигонуклеотидные праймеры: InfA_780_1F – ACT GGG CAC GGT GAG CGT

GA, InfA_944_1R – CCC GTC AGG CCC CCT CAA AGC на M ген с размером амплифицрованного продукта 164 п.о.

Определена специфичность и чувствительность разработанной тест-системы. Размер полученных фрагментов при гриппе А соответствует расчетному значению 164 п.о. Порог чувствительности тест-системы составляет $1x10^2$ копий РНК вирусов в пробе.

Собраны биологические материалы от птиц из эпидемически значимых регионов Казахстана и анализированы с применением разработанной тест-системы, в результате которого были выявлены и выделены новые штаммы A/grey duck/North-Kazakhstan/5/2018(H3N8) и A/greylag goose/North-Kazakhstan/62/2018(H3N8).

Подтверждением выделения ВГП свидетельствовали результаты электронной микроскопии (ЭМ), в которых были обнаружены вирусные частицы округлой и удлиненной формы размером от 80 до 200 нм, поверхность вирионов покрыты шипиками длиной 7-9 нм, что полностью совпадает с описанием вируса гриппа в научной литературе.

Секвенированием были определены первичные нуклеотидные последовательности генов НА и NA изолятов ВГП подтипа H3N8, и депонированы базу данных GenBank следующие последовательности: A/grey duck/North-Kazakhstan/5/2018(H3N8) - HA (MN945305), NA (MN945306); - HA (MN945304), NA (MN945303). Проанализированы изменения в генетической структуре HA и NA, обеих штаммов и определены их филогенетическая принадлежность. Одновременная циркуляция азиатской и европейской двух генетических линий ВГП типа А H3N8 у диких птиц в одной местности обусловлена занесением их из разных географических мест. Генетические расстояния, выявленные с помощью нуклеотидных последовательностей поверхностных генов, свидетельствуют о том, что казахстанские изоляты дистанцируется от Азиатских и Европейских штаммов ВГП типа А H3N8 и образовывают отдельную ветвь, отличающихся от прототипных штаммов. Возможно, данные казахстанские изоляты являются новыми вариантами вируса гриппа А H3N8.

Область применения: биотехнология, вирусология, ветеринарная практика.

SUMMARY

dissertation of Jekebekov Kuanysh on the title: "Development of a modern method for monitoring the avian influenza virus" for the competition of a candidate of biological sciences in the specialty 03.01.06 – Biotechnology.

Key words: avian influenza, test system, diagnostics, specificity, sensitivity, monitoring, virus, strain.

Object of study: developed diagnostic PCR test system for monitoring avian influenza A virus, avian influenza virus, wild and domestic birds.

Subject of study: selection and design of specific primers for the M gene, optimization of setting parameters and components of the PCR test system, specificity and sensitivity of the test system.

Purpose of the work: development of a diagnostic PCR test system for monitoring avian influenza in the territory of the Republic of Kazakhstan.

Research methods: molecular genetics, virological, biotechnological.

The results obtained and their novelty: For the first time in Kazakhstan, using the latest advances in molecular biology, a test system has been developed for diagnosing avian influenza A virus by PCR. For this, specific oligonucleotide primers were designed and synthesized: InfA_780_1F—ACT GGG CAC GGT GAG CGT GA, InfA_944_1R—CCC GTC AGG CCC CCT CAA AGC per M gene with the amplified product size of 164 bp.

The specificity and sensitivity of the developed test system was determined. The size of the obtained fragments in influenza A corresponds to the calculated value of 164 bp. The sensitivity threshold of the test system is 1x102 virus RNA copies in the sample.

Biological materials were collected from birds from epidemically significant regions of Kazakhstan and analyzed using the developed test system, which resulted in the identification and isolation of new strains A/grey duck/North-Kazakhstan/5/2018(H3N8) and A/greylag goose/North - Kazakhstan/62/2018(H3N8).

The isolation of AIV was confirmed by the results of electron microscopy (EM), in which rounded and elongated viral particles 80 to 200 nm in size were found, the surface of the virions is covered with spines 7–9 nm long, which fully coincides with the description of the influenza virus in the scientific literature.

Sequencing determined the primary nucleotide sequences of the HA and NA genes of H3N8 subtype AIV isolates, and deposited the following sequences in the GenBank database: A/grey duck/North-Kazakhstan/5/2018(H3N8) - HA (MN945305), NA (MN945306); - HA (MN945304), NA (MN945303). Changes in the genetic structure of HA and NA, both strains, were analyzed and their phylogenetic affiliation was determined. Simultaneous circulation of the Asian and European two genetic lines of AIV type A H3N8 in wild birds in the same area is due to their introduction from different geographical locations. Genetic distances identified using the nucleotide sequences of surface genes indicate that Kazakhstani isolates distance themselves from Asian and European strains of AIV type A H3N8 and form a separate branch that differs from the prototype strains. It is possible that these Kazakh isolates are new variants of the H3N8 influenza A virus.

Scope: biotechnology, virology, veterinary practice.