

«Описторхоз бен меторхоздың дифференциалды молекулалы-генетикалық диагностикасы» тақырыбында – 8D09102 «Мал шаруашылығы өнімдерінің санитарлық-экологиялық қауіпсіздігі» білім беру бағдарламасы бойынша PhD философия докторы ғылыми дәрежесін алуға Бекенова Айғаным Бекайдаровнаның диссертациясына

АННОТАЦИЯ

Тақырыптың өзектілігі. *Opisthorchiidae* тұқымдасының өкілдері тудыратын инвазивті аурулар тағамдық паразиттердің ішінде 8-ші орынды алады. Описторхид тұқымдасының ең көп таралған түрлері – *Opisthorchis felineus* (*O. felineus*), *Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis viverrini* және *Metorchis spp.* Олардың ішінде *O. felineus* және *Metorchis bilis* (*M. bilis*) тіршілік циклдары ұқсас және дернәсілдік форма - метацеркарийлердің морфологиялық ерекшеліктері бірдей. Дегенмен, марита сатысында описторхидтер дефинитивтік иесінің әртүрлі мүшелерінде орналасады және әртүрлі паразиттік ауруларды тудырады. Мысалы, *O. felineus* бауырішілік өт жолдарында паразиттік тіршілік етеді және описторхозды тудырады, ал *M. bilis* негізінен өт қабында орналасады және иелік организмде меторхозды пайда болуына әкеледі.

Біздің елімізде «описторхоз» диагнозы *Opisthorchiidae* тұқымдасының түріне қарамастан қойылады. Описторхоздың клиникалық диагнозы осы ауруға тән нақты симптомдар мен синдромдардың болмауына байланысты қиын. Ауруды дәл диагностикалау және сапалық және сандық бағалау үшін әртүрлі әдістерді қолданатын кешенді тәсіл қажет. Описторхоздың клиникалық көріністері әртүрлі және инвазияның ұзақтығы мен қарқындылығына, сондай-ақ иесінің жеке ерекшеліктеріне байланысты.

Ветеринариялық және медициналық тәжірибеде описторхозды диагностикалау үшін копровоскопиялық әдіс пен жасанды асқазан сөлінде қорыту сияқты дәстүрлі әдістер қолданылады. Бұл әдістер биологиялық материалдағы паразиттердің жұмыртқаларын микроскопиялық анықтауға негізделген. Дегенмен, гельминттен паразит жұмыртқаларының циклдік шығуы, сондай-ақ жұмыртқалардың ішек қуысында біркелкі емес таралуы жалған теріс нәтижеге әкелуі мүмкін.

Иммунодиагностика описторхозды қосымша диагностикалау әдісі ретінде қолданылады. Дегенмен, бұл әдіс тек жедел описторхоз үшін диагностикалық тұрғыдан өте құнды, ал созылмалы описторхоз кезінде иммундық жауап тек 75% жағдайда ғана байқалады. Сонымен қатар, описторхоз бен меторхоз арасындағы антигендік ұқсастық аралас инвазия жағдайында описторхоздың жалған оң диагнозына әкеледі.

Дефинитивтік иелер метацеркарийлер бар шикі немесе шала пісірілген балықты тұтыну арқылы описторхоз/меторхозды жұқтырады. Описторхоз қоздырғыштарын тексеру үшін балықтардың дорсальды бұлшықеттерін микроскопиялық зерттеу арқылы тексереді. Бұл әдіс көп еңбекті қажет етеді және жоғары білікті мамандарды қажет етеді. Сондай-ақ, *O. felineus* және *M.*

bilis метацеркарияларын ажырату описторхидтердің бірдей морфологиялық сипаттамаларына байланысты қиындық тудырады.

Описторхозды диагностикалау және түрішілік дифференциалдау үшін молекулалық-генетикалық әдістерді қолдану бұл мәселені шеше алады. Полимеразды тізбекті реакция (ПТР) тіршілік циклінің кез келген кезеңінде (жұмыртқа, мирацидий, метацеркария, марита) *O. felineus* және *M. bilis* анықтауға мүмкіндік береді. Описторхидтерді анықтауға арналған жоғары сезімтал және спецификалық ПТР тесттерін әзірлеу ветеринариялық және медициналық маңызы бар маңызды және өзекті мәселе болып табылады. Өз кезегінде, описторхидтерді дифференциациялауға арналған ПТР тестін әзірлеуде қазақстандық изоляттардан алынған ДНҚ-ны пайдалану әзірленген әдістің спецификалық және сезімталдығын жақсартады.

Зерттеудің негізгі мақсаты – *Opisthorchiidae* тұқымдасының трематодтарын анықтау және дифференциациялаудың молекулалық-генетикалық әдісін әзірлеу.

Қойылған мақсатқа жету үшін төмендегідей ғылыми **міндеттер** айқындалды:

- Балықтарды *Opisthorchiidae* тұқымдасының патогендеріне ветеринариялық-санитариялық тексеру;
- ДНҚ бөліп алу үшін *Opisthorchiidae* тұқымдасын бөліп алу;
- *Opisthorchiidae* тұқымдасының генетикалық маркерлерін ПТР талдауын, секвенирлеуін және биоинформатикалық талдауын жүргізу;
- Патогендерді анықтау және дифференциалды анықтау үшін праймерлерді жобалау және синтездеу;
- *O. felineus* және *M. bilis* анықтау және дифференциалды диагностикалау үшін ПТР талдауының сезімталдығы мен ерекшелігін анықтау, оңтайлы жағдайларды анықтау;
- Зертханалық тәжірибеде ПТР-тестін әзірлеу және қолдану бойынша ғылыми-техникалық құжаттаманы әзірлеу.

Зерттеу материалдары. Зерттеу 2018 жылдан 2020 жылға дейін «Описторхоз және меторхоз қоздырғыштарын анықтау және дифференциалды диагностикалау үшін ПТР тесті» (AP05131132) ғылыми жобасының аясында және 2024 жылдан 2026 жылға дейін «Азық-түлік қауіпсіздігін жақсарту» бюджеттік бағдарламасының (BR22885795) аясында жүргізілді.

Зерттеу С.Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық зерттеу университетінің Ауыл шаруашылығы биотехнологиясының ғылыми-зерттеу платформасында жүргізілді.

Зерттеу әдістері. Зерттеуде паразитологиялық, молекулалық-генетикалық және статистикалық әдістердің үйлесімі қолданылды.

Балық бұлшықеттерінде описторхоз және меторхоз патогендерінің анықтау компрессиялық әдіс қолданылды.

Метацеркарийлердің ДНҚ фенол-хлороформ әдісімен бөлініп алынды, сынақ үлгілері экстракция буферімен және *Proteinase K* алдын ала өңделді. *Opisthorchiidae* патогендерінің метацеркарийлерінен алынған ДНҚ

амплификациясы 25 мкл реакция қоспасында жүргізілді. ПТР өнімдері қалдық олигонуклеотидтерден сілтілі фосфатаза SAP (*shrimp alkaline phosphatase*) және эндонуклеазаны пайдаланып дефосфорлау арқылы тазартылды. ПТР өнімдері өндірушінің нұсқауларына сәйкес *BigDye Terminator* жинағын (*Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, АҚШ*) пайдаланып Sanger әдісімен секвенирленді. Алынған секвенирлеу өнімдері *ABI 3130XL* генетикалық анализаторында (*Applied Biosystems, АҚШ*) талданды, ал хроматограмманы өңдеу және редакциялау *Sequencing Analysis 5.2, Patch 2* бағдарламалық жасақтамасын (*Applied Biosystems, АҚШ*) пайдаланып жүргізілді. Секвенирлеуден кейін өнімдер ацетат-спирт қоспасымен тазартылды. Алынған нуклеотидтік тізбектерді туралау *Nucleotide Blast* онлайн ресурсын (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) пайдаланып орындалды. Праймер дизайны және картаға түсіру *Ultra Edit 32* бағдарламалық жасақтамасын пайдаланып орындалды. Жобаланған праймерлердің ерекшелігі *Nucleotide Blast* (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) көмегімен тексерілді. Праймердің дизайны мен карталау *SeqState* бағдарламалық жасақтамасын пайдаланып орындалды. Гомо- және гетеродимерлердің пайда болуын, GC құрамын және оңтайлы күйдіру температурасын талдау *Oligo Analyzer* бағдарламалық жасақтамасын пайдаланып тексерілді.

Алынған деректердің статистикалық талдауы вариациялық статистиканы қолдану арқылы жүргізілді. Инвазияның таралуы жұқтырған балықтар санының тексерілген даралардың жалпы санына қатынасы ретінде пайызбен көрсетілді. Санаттық айнымалылар арасындағы айырмашылықтардың маңыздылығын бағалау үшін Пирсонның χ^2 сынағы қолданылды.

Зерттеу объектісі. *O. felineus* және *M. bilis* патогендерінің метацеркарийлері, сондай-ақ зерттелген трематод түрлерінің ДНҚ-ның нуклеотидтік тізбектері.

Зерттеудің ғылыми жаңалығы. Ядролық рибосомалық гендер кластерінің *ITS2* аймағының нуклеотидтік тізбектері және митохондриялық *COX1* генінің фрагментіне негізделген праймерлер жасалды. Осы праймерлерді пайдаланып, екі маңызды описторхид трематодтары – *O. felineus* және *M. bilis* үшін түрге тән және мультиплексті ПТР талдауы жасалды.

Жұмыстың тәжірибелік маңыздылығы. Рибосомалық маркер *ITS2* аймағына негізделген ПТР-тест *O. felineus* және *M. bilis* патогендерінің ДНҚ-сын төмен үлгі концентрацияларында анықтайды. Митохондриялық *COX1* генін амплификациялауға арналған праймерлерге негізделген ПТР-тест түрлерді дифференциациялауға өте қолайлы, бұл бір үлгіде екі патогеннен де ДНҚ-ны анықтауға мүмкіндік береді. Өзірленген ПТР-тест кез келген өмірлік кезеңде, соның ішінде балықтарды паразиттерге ветеринарлық-санитарлық тексеру кезінде описторхоз бен меторхоз патогендерін анықтау үшін пайдалануға болады.

Зертханалық тәжірибеде ПТР-тест пайдалану бойынша ғылыми-техникалық құжаттама әзірленді:

- «*Opisthorchis felineus* және *Metorchis bilis* бактерияларын анықтау және дифференциалды диагностикалауға арналған ПТР тест жүйесі» (ПЦР-тест система для детекции и дифференциальной диагностики *Opisthorchis felineus* и *Metorchis bilis*) зертханалық регламенті;

- Описторхоз бен меторхоздың дифференциалды диагностикасы бойынша әдістемелік ұсыныстар.

Осы диссертация аясында алынған зерттеу нәтижелері С. Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық зерттеу университетінің оқу процесінде 6B05102 – «Биотехнология» білім беру бағдарламасының студенттеріне «Биотехнологияның молекулалық генетикалық негіздері» және «Молекулалық генетика және гендік инженерия» пәндері бойынша дәрістер мен зертханалық-практикалық сабақтар өткізу үшін қолданылады.

Қорғауға шығарылатын негізгі қағидалар:

- Патогендердің ядролық (*ITS2*) және митохондриялық (*COX1*) гендерінің маркерлік аймағына негізделген *Opisthorchiidae* тұқымдасының паразиттерін анықтауға арналған арнайы праймерлер;

- *O. felineus* және *M. bilis* анықтауға арналған рибосомалық кластерге негізделген түрге тән ПТР-тест жүйесі;

- Митохондриялық *COX1* геніне негізделген *O. felineus* және *M. bilis* анықтау және ажыратуға арналған мультиплексті ПТР-тест жүйесі.

Диссертация нәтижелерінің жариялануы мен апробациядан өтуі. Зерттеудің негізгі нәтижелері 13 (он үш) мақалада жарияланған, Қазақстан Республикасы Ғылым және Жоғары Білім министрлігінің Ғылым және жоғары білім беру саласындағы сапаны қамтамасыз ету комитеті ұсынған төрт басылымда, *Scopus* дерекқорына кіретін журналдардың мақалаларында көрсетілген: «*Advances in Animal and Veterinary Sciences*» (2020), 32 пайыздық көрсеткіш; «*Veterinary World*» (2025), 87 пайыздық көрсеткіш және халықаралық конференциялар материалдарында, Қазақстан Республикасының өнертабысына патент алынды.

Автордың жеке үлесі. Диссертация тақырыбы аясында орындалған жұмыстардың басым бөлігі автордың тікелей қатысуымен жүзеге асырылды. Әдеби деректерді жинау және талдау, зерттеу бағытын қалыптастыру, мақсат пен міндеттерді анықтау, тәжірибелік зерттеулерді жүргізу, алынған нәтижелерді өңдеу мен интерпретациялау, ғылыми мақалаларды әзірлеу және диссертация мәтінін дайындау автордың жеке үлесі болып табылады. Қолжазбаны рәсімдеу және алынған нәтижелерді ғылыми айналымға енгізу автордың жауапкершілігінде болды.

Диссертациялық жұмыстың құрылымы мен көлемі. Жұмыс 90 беттік компьютерлік мәтінде ұсынылған. Диссертация келесі бөлімдерден тұрады: кіріспе, әдебиетке шолу, материалдар мен әдістер, зерттеу нәтижелері, нәтижелерді талқылау, қорытынды, әдебиеттер тізімі және қосымшалар. Диссертацияда 6 кесте және 38 сурет бар. Әдебиеттер тізіміне 127 дереккөз кіреді, оның ішінде 102 шет тілінде.