

«Қазақстанда таралатын құтыру вирусының штамдарын молекулярлық – генетикалық талдау» тақырыбында – 8D09101 «Жануарлардың ветеринариялық жайлылығы» оқу бағдарламасы бойынша PhD философия докторы ғылыми дәрежесін алуға Әбенова Әсем Жандарбекқызының диссертациясына

АННОТАЦИЯ

Тақырыптың өзектілігі. Құтыру – *Lyssavirus* туысына, *Rhabdoviridae* тұқымдасына жататын *Rabies virus* құтыру вирусымен қоздырылатын, табиғи ошақты, аса қауіпті, өлімге әкелетін жұқпалы ауру [1].

Құтырық әлемнің 150-ден астам елдері мен аймақтарында кездесетін вирустық ауру. Біріккен Ұлттар Ұйымының Азық-түлік және ауыл шаруашылығы ұйымы (ФАО) келтірген мәлімет бойынша, жыл сайын шамамен 55 мың адамның өліміне себепкер болады, оның 95 пайызы Африка мен Азия елдеріне тиесілі. Статистикалық деректердің жеткіліксіздігі бұл көрсеткіштің нақты көлемі бұдан жоғары болуы мүмкін екенін аңғартады.

Құтыру – жұқтырған жануарлардың тістеуі арқылы адамдарға негізінен берілетін өлімге әкелетін вирустық зооноздық ауру. Ауру клиникалық белгілер пайда болғаннан кейін 100% өлім көрсеткішімен сипатталатын нейроэнцефалитпен өтеді. Жыл сайын әлем бойынша құтырудан 55 000-нан астам адам және 1 миллионнан астам жануар қаза табады. Құтырудан болатын тікелей шығындар жыл сайын 4 миллиард еуродан асады.

Көптеген эндемиялық елдер сияқты, Қазақстан аумағында да жануарлар арасындағы құтыру жыл сайын тіркеледі. Сонымен қатар, үй иттері мен мысықтарын, сондай-ақ ауыл шаруашылығы жануарларын вакцинациялау бағдарламасы және вакцинамен сіңдірілген жемдерді тарату арқылы түлкілерді вакцинациялаудың шектеулі бағдарламасы жүргізіледі. Алайда жануарлар арасындағы аурушандықтың төмендеуі байқалмай отыр. Осыған байланысты аталған зерттеудің мақсаттарының бірі ел аумағында жануарлар арасындағы құтырудың географиялық таралуын зерттеу арқылы оның эпидемиологиясын тереңірек түсіну және күрес шараларын бағалау болды [2].

Қазақстандағы құтырықтың эпизоотологиялық жағдайы әлеуметтік және экономикалық тұрғыдан маңызды мәселе ретінде қалып отыр. 2019 жылы 58 ошақ, 2020 жылы 124 ошақ, ал 2021 жылдың алғашқы сегіз айында 71 ошақ анықталған. 2020 жылғы 31 желтоқсанға дейін жалпы 131 ошақ тіркеліп, олардың жетеуі 2019 жылдан бері жойылмай сақталған. Індет ошақтарының 65 пайызы 15 облыстың төртеуіне тиесілі: Түркістан (38), Шығыс Қазақстан (22), Павлодар (14) және Батыс Қазақстан облыстары (11). Бұл өңірлер ондаған жылдар бойы эпизоотологиялық тұрғыда құтырық бойынша тұрақсыз аймақ болып келеді: 2013–2020 жылдар аралығында республикадағы барлық құтырық ошақтарының 45 пайызы дәл осы өңірлерде тіркелген.

Құтырықтың әлеуметтік қауіптілігі эпизоотологиялық жағдайды тұрақты бақылау мен нақты мониторинг жүргізуді қажет етеді. Шұғыл алдын алу шараларын қабылдау үшін толыққанды эпизоотологиялық деректер маңызды. Өртүрлі ошақтардағы ауру таралуының өзіндік ерекшеліктері көп жағдайда вирус изоляттарының қасиеттерімен байланысты болғандықтан, ветеринариялық шаралардың тиімділігі эпизоотологиялық мониторинг пен вирус изоляттарының қасиеттерін терең талдауға тәуелді.

Алайда эпизоотиялық көрсеткіштер аурудың таралу қарқынын сипаттағанымен, індеттің шығу тегі мен таралу жолдарын нақты анықтау үшін молекулалық-генетикалық зерттеулер қажет.

Қазақстанда құтырық вирусының молекулалық - генетикалық және антигендік ерекшеліктері жүйелі түрде толық геномдық масштабы зерттелмеген. Алғаш рет Қазақстан аумағындағы жануарлардан бөлініп алынған құтырық вирусы изоляттарының бірқатары үшін толық геномдық нуклеотидтік тізбектер анықталды. Бұған дейін жүргізілген зерттеулер негізінен алдын алу шаралары мен диагностикалық тест - жүйелерді жетілдіруге бағытталған болатын. Бұл зерттеулердің маңыздылығы жоғары, себебі вирус генотиптеу әдістері құтырықтың алдын алу стратегиясын жетілдірудің негізгі элементіне айналып отыр.

Нуклеотидтік тізбектерді талдау вирустың эволюциялық тарихын, генетикалық нұсқаларын және таралу мерзімін анықтауға мүмкіндік береді. Мұндай тәсіл індеттік бақылауды күшейтіп, аурудың таралу динамикасын терең түсінуге жол ашады.

2020 – 2022 жылдар аралығында жүргізілген зерттеу Қазақстандағы құтырыққа шалдыққан жануарлардан алынған үлгілердің географиялық таралуы, вирус изоляттарының нуклеотидтік тізбектері және олардың генетикалық айырмашылықтары туралы толық дерек берді. Сонымен қатар көршілес елдердегі изоляттармен филогенетикалық байланысы да анықталды.

Осылайша, Қазақстан аумағында құтырық вирусының генетикалық әртүрлілігін сипаттайтын деректердің жеткіліксіздігі бұл бағыттағы зерттеулердің өзектілігін айқындайды. Алынған генетикалық мәліметтер эпизоотологиялық мониторингті жетілдіруге, аурудың таралу жолдарын нақтылауға және құтырыққа қарсы профилактикалық бағдарламаларды ғылыми негізде оңтайландыруға мүмкіндік береді.

Зерттеудің негізгі мақсаты – Қазақстан аумағынан оқшауланған *Rabies lyssavirus* штамдарын молекулалық - генетикалық тұрғыдан сипаттау және олардың айналымдағы вакцина штамдарымен генетикалық сәйкестігін бағалау.

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

1. *Rabies lyssavirus* штамдарының кДНК-ны синтездеу үшін үлгілерді жинақтау.
2. Құтырық вирусының *N* және *G* гендеріне тиесілі фрагменттердің нуклеотидтік тізбектерін анықтау.

3. Қазақстанның әртүрлі өңірлерінен алынған вирус изоляттарының нуклеотидтік тізбектеріне генотиптік және филогенетикалық талдау жүргізу, өзара генетикалық байланысын анықтау және дендрограммалар құрастыру.

4. Алынған геномдық және жартылай геномдық нуклеотидтік тізбектер негізінде *Rabies lyssavirus* изоляттарын қамтитын деректер қорын қалыптастыру.

Зерттеу материалдары. Зерттеу жұмысы 2020–2022 жылдары «Қазақстан Республикасының аумағында айналымдағы құтырық вирусын молекулярлық-биологиялық талдау» (AP08053353), 2023-2025 жылдары AP19679670 «Ақпараттық-коммуникациялық технологияларды қолдану негізінде жануарлардың инфекциялық ауруларына қарсы дауалау шараларын жетілдіру (құтырық үлгісінде)» атты ғылыми жоба аясында жүргізілді. Зерттеу материалы ретінде Қазақстанның әртүрлі өңірлерінен 2020 – 2022 жылдар аралығында жиналған құтырыққа клиникалық күдік тудырған жануарлардан алынған 117 ми үлгісі пайдаланылды. Үлгілер түлкі, қасқыр, ит, мысық, ірі қара мал, ұсақ мал және жылқыдан алынды.

Инфекциялық жағдайды эпизоотологиялық бағалау, картографиялық және статистикалық талдау жұмыстары С.Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық зерттеу университетінің «Ветеринариялық санитария» кафедрасында орындалды. Вирустық РНҚ-ны бөліп алу Қазақстан Республикасы Ауыл шаруашылығы министрлігінің «Ветеринария бойынша ұлттық референттік орталығы» базасында (Астана қ., «Инфекциялық ауруларды диагностикалау» зертханасы) жүргізілді. Кері транскрипцияланған кДНҚ үлгілерімен жұмыс және молекулалық-генетикалық зерттеулер «Ұлттық биотехнология орталығы» ЖШС-нің қолданбалы генетика зертханасында жүзеге асырылды.

Зерттеу әдістері. Зерттеу барысында құтырық вирусын анықтау және молекулалық-генетикалық сипаттау үшін молекулалық - биологиялық, жоғары өнімді секвенирлеу (NGS), биоинформатикалық, филогенетикалық және эпизоотологиялық әдістер кешені қолданылды.

Вирустық РНҚ-ны бөліп алу «Фрактал Био» ЖШС өндірген коммерциялық тест - жүйелерді пайдалана отырып, өндіруші ұсынған нұсқаулыққа сәйкес жүргізілді. Бөліп алынған РНҚ негізінде кері транскрипция әдісімен комплементарлы ДНҚ (кДНҚ) синтезделді. Құтырық вирусының бастапқы анықталуы нақты уақыт режиміндегі полимеразалық тізбекті реакция әдісімен Rotor - Gene амплификаторында орындалды.

Құтырық вирусының геномын толық ампликондық жабуға арналған праймерлер *NCBI Virus* деректер қорындағы тізбектерге сүйене отырып, *MAFFT* және *Primer3* бағдарламалары арқылы *in silico* жобаланды. Праймерлердің жұмысқа қабілеттілігі тәжірибелік амплификация арқылы тексерілді.

Тиімді праймерлер негізінде алынған ампликондардан ДНҚ кітапханалары *Illumina DNA Prep* бойынша дайындалып, толық геномдық секвенирлеу *Illumina MiSeq* платформасында жүргізілді. Жекелеген фрагменттерді растау үшін Сэнгер секвенирлеу әдісі қолданылды.

Секвенирлеуден алынған бастапқы деректерді сапалық бақылау оқылым сапасын бағалау әдісі арқылы *FastQC* бағдарламасында жүргізілді. Оқылымдарды алдын ала өңдеу және сапалық сүзгілеу read trimming және filtering әдістері негізінде Seqtk және Sickle бағдарламаларын қолдану арқылы жүзеге асырылды. Вирустың толық геномдық тізбектерін қалпына келтіру de novo жинақтау әдісімен SPAdes бағдарламасында орындалды.

Алынған геномдық тізбектерді референстік геноммен салыстыру оқылымдарды туралау әдісі арқылы BWA бағдарламасында жүргізілді, ал нуклеотидтік варианттарды анықтау және консенсус тізбектерін қалыптастыру variant calling әдісі негізінде FreeBayes, BCFtools және SAMtools құралдарын пайдалану арқылы жүзеге асырылды.

Құтырық вирусы изоляттарының генотиптік тиесілігі генотиптеу әдісімен RABV - GLUE платформасында анықталды. Филогенетикалық қатынастарды бағалау Neighbor - Joining және Байес әдістеріне негізделген филогенетикалық талдау арқылы MEGA X және BEAST бағдарламаларында жүргізілді. Филогенетикалық ағаштарды визуализациялау және аннотациялау графикалық интерпретация әдісімен iTOL веб - платформасында жүзеге асырылды.

Зерттеу объектісі. Қазақстанның әртүрлі өңірлерінде құтырыққа клиникалық күдік туғызған жануарлардан алынған патологиялық материалдар мен олардан оқшауланған Rabies lyssavirus штамдары.

Зерттеу пәні. Құтырық вирусы изоляттарының молекулалық-генетикалық ерекшеліктері, генотиптік және филогенетикалық сипаттамалары, сондай-ақ олардың Қазақстан аумағында таралу заңдылықтары.

Зерттеудің ғылыми жаңалығы. Осы зерттеу барысында Қазақстан аумағында 2020–2022 жылдары айналымда болған құтырық вирусы изоляттарының генетикалық құрылымы алғаш рет толық геномдық нуклеотидтік тізбектер негізінде сипатталды. Алынған деректер вирустың космополиттік мажор кладаға және CA1 минор класына жататынын, сондай - ақ жекелеген изоляттардың генетикалық тұрғыдан ерекшеленетін тармақтар түзетінін көрсетті.

Зерттеу аясында N, P, M және G гендерінің толық кодтайтын аймақтарын амплификациялауға және секвенирлеуге мүмкіндік беретін зертханалық хаттама алғаш рет апробацияланды. Ұсынылған хаттама құтырық вирусының молекулалық-генетикалық мониторингін жүргізу үшін қолданбалы маңызға ие.

Зерттеу нәтижесінде құтырық вирусының 31 толық және жартылай геномдық нуклеотидтік тізбегі алғаш рет анықталып, халықаралық GenBank дерекқорына тіркелді. Аталған тізбектер PRJNA832888 BioProject шеңберінде жүйеленіп, OP477379–OP477391 және ON366706–ON366710 тіркеу нөмірлерімен жарияланды. Нәтижесінде Қазақстан аумағында айналымдағы Rabies lyssavirus штамдарының молекулалық-генетикалық сипаттамаларын қамтитын құрылымданған ұлттық деңгейдегі деректер жиынтығы алғаш рет қалыптастырылды.

Жұмыстың тәжірибелік маңыздылығы. Бұл зерттеу құтырықты диагностикалауда қолданылатын молекулалық-генетикалық әдістерді тиімді пайдалануды ғылыми тұрғыдан негіздейді. Құтырық вирусының генетикалық құрылымын сипаттау айналымда жүрген аймақтық штамдарды ажыратуға және олардың эпизоотиялық маңызын бағалауға мүмкіндік береді.

Молекулалық - генетикалық талдау нәтижелері үй және жабайы жануарлар популяцияларындағы вирус айналымының ерекшеліктерін анықтауға, инфекцияның таралу бағыттарын нақтылауға жағдай жасайды.

Алынған деректер Қазақстан Республикасында құтырыққа қарсы профилактикалық шараларды жоспарлау барысында, соның ішінде вакцинацияны ұйымдастыруды ғылыми негіздеу, эпизоотиялық ошақтарда жедел әрекет ету алгоритмдерін жетілдіру және тәуекел аймақтарын айқындау кезінде тікелей қолданылуы мүмкін.

Қорғауға шығарылатын негізгі қағидалар:

1 Зерттеу барысында Қазақстан аумағында айналымда жүрген құтырық вирусының генетикалық әртүрлілігі мен эволюциялық ерекшеліктері алғаш рет кешенді түрде сипатталды, бұл аймақтық штамдардың молекулалық-эпидемиологиялық мониторингін жетілдіруге негіз болады.

2 Құтырық вирусының филогенетикалық құрылымы мен географиялық таралуы арасындағы өзара байланыс анықталып, вирус циркуляциясының негізгі ошақтары мен таралу бағыттары айқындалды.

3 Зерттеу нәтижесінде алынған нуклеотидтік тізбектер халықаралық дерекқорларға (GenBank және т.б.) енгізіліп, жаһандық ғылыми қауымдастық үшін қолжетімді референстік база қалыптастырылды.

4 Құтырық вирусының анықталған генетикалық варианттары диагностикалық жүйелердің сезімталдығы мен нақтылығын арттыру үшін қолданылуы мүмкін екендігі негізделді.

5 Жүргізілген зерттеулер нәтижелері Қазақстан аумағында құтырыққа қарсы вакциналардың тиімділігін бағалау және қажет болған жағдайда оларды жаңарту стратегиясын ғылыми тұрғыдан негіздеуге мүмкіндік береді.

6 Құтырық вирусының циркуляция ерекшеліктерін ескере отырып, эпизоотиялық қадағалау мен тәуекел аймақтарын болжаудың ғылыми негіздері ұсынылды.

Диссертация нәтижелерінің жариялануы мен апробациядан өтуі. Диссертацияның негізгі ғылыми нәтижелері 11 жарияланымда жарияланды. Олардың ішінде 2 мақала *Web of Science* және *Scopus* базаларына тіркелген журналда жарық көрді [3, 4] (Қосымша А). 3 мақаланы Қазақстан Республикасы Ғылым және жоғары білім министрлігі ұсынған журналдар қабылдады [5, 6] (Қосымша Ә), 1 методикалық нұсқаулық (Қосымша Б) жарық көрді. Оқу үрдісіне ғылыми-зерттеу жұмыс нәтижелерін енгізу бойынша 2 акт енгізілді (Қосымша В).

Диссертациялық жұмыстың негізгі нәтижелері жыл сайын С. Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық зерттеу университетінің Ғылыми кеңесінде 2020 – 2023 жылдары ұсынылып, есептерде талқыланды.

Сонымен қатар зерттеу материалдарының бір бөлігі 3 халықаралық ғылыми конференцияларда (Қосымша Г), 2 форумдарда баяндалды:

- международной научно-практической конференции «Сейфуллинские чтения – 18: «Молодежь и наука – взгляд в будущее» - 2022 [7].

- Международной научно-практической конференции «Сейфуллинские чтения - 18(2): «Наука XXI века – эпоха трансформации» 2022 [8].

- 12-й международной научно-практической конференции «Сибирская деревня: 200 лет развития Омской области – от реформ М.М. Сперанского до агропромышленного центра Сибири» проходившей на базе ФГБОУ ВО Омский ГАУ 21 - 23 сентября 2022 года [9] (Қосымша Ғ).

- The 1st China Kazakhstan Veterinary Medicine Science and Technology Postgraduate Academic Forum Co - organized by Harbin Veterinary Research Institute, Seifullin Kazakh Agro Technical University, China-Kazakhstan Belt and Road Joint Laboratory on Agricultural Sciences, Belt and Road Joint Center for Animal Infectious Diseases Prevention and Control. 28 May 2022 (Қосымша Ғ).

- Международной научно-практической конференции, посвященной 120-летию со дня основания казахского научно-исследовательского ветеринарного института, 2025 г. [10].

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 де автордың жауапкершілігінде болды.

Диссертациялық жұмыстың құрылымы мен көлемі. Жұмыс жалпы көлемі 100 беттен тұрады. Құрамына нормативтік сілтемелер, анықтамалар, белгілеулер мен қысқартулар, кіріспе, әдебиеттерге шолу, материалдар мен әдістер, зерттеу нәтижелері және олардың талқылануы, қорытынды және қолданылған 118 әдебиеттен тұратын тізім кіреді.

Диссертацияның негізгі мәтінінде 31 сурет пен 16 кесте берілген, ал қосымшаларда 29 сурет келтірілген. Барлық иллюстрациялық материалдар мәтінде жүргізілген талдауларды толық ашуға және алынған нәтижелерді көрнекі түрде көрсетуге мүмкіндік береді.