

АННОТАЦИЯ

диссертации на соискание степени доктор философии (Ph.D.)
по специальности «8D05105- Биотехнология»

Байкара Баршагул Тенизбайкызы

на тему: «Генотипирование штаммов гриппа птиц, распространенных на территории Республики Казахстан»

Общая характеристика диссертационного исследования. Работа посвящена идентификации и выделению штаммов вируса гриппа птиц, циркулирующих на территории Республики Казахстан в 2020-2022 годах, изучению их вирусологических и молекулярно-биологических свойств и выявлению признаков филогенетического родства с целью выяснения его распространения и эволюции.

Актуальность исследования. Вспышки гриппа на птицефабриках наносят значительный экономический ущерб во всем мире, приводя к полному уничтожению поголовья птицы. Перелетные птицы, особенно водоплавающие, являются естественным резервуаром вирусов птичьего гриппа (ВГП). Таким образом, инфекция попадает в водоемы и через домашних водоплавающих птиц может передаваться другой домашней птице. Для того чтобы предугадать возможность заноса вируса и предотвратить его широкое распространение важным является прогнозирование. Внедрение в практику прогнозирования различной длительности позволяет значительно усовершенствовать стратегию и тактику эпизоотологического мониторинга по гриппу птиц, минимизировать негативные последствия роста эпизоотической активности очагов.

Грипп вызывают вирусы, принадлежащие к роду *Influenza virus* семейства *Orthomyxoviridae*. Выделяют четыре типа вируса гриппа - А, В, С и D. Геном птичьего гриппа типа А представляет собой одноцепочечный РНК-содержащий вирус с сегментированным геномом. Их классифицируют на подтипы на основе антигенности гликопротеинов гемагглютинина (НА) и нейраминидазы (НА). В настоящее время известны 19 подтипов гемагглютинина и 11 подтипов нейраминидазы вирусов, которые встречаются во многих различных комбинациях. Вирус гриппа поражает не только птиц, но и человека и разные виды млекопитающих. Зарегистрированы случаи заражения людей ВГП подтипом H1-N3, H5, H7 и H9. Молекулярные изменения в геноме РНК происходят за счет двух основных механизмов: точечной мутации (антигенного дрейфа) и реассортации сегментов РНК. Точечные мутации вызывают незначительные изменения антигенной природы вируса и являются основной причиной ежегодной вакцинации против гриппа А. Рекомбинация происходит при инфицировании клетки-хозяина двумя и более типами вируса птичьего гриппа, что приводит к появлению нового типа.

В последние годы резко возросло число вспышек высокопатогенного гриппа птиц среди домашних и диких птиц. Несколько подтипов ВГП, а именно H5, H7 и H9, преодолевают межвидовой барьер инфицируя людей и других млекопитающих.

В Казахстане летом 2005 года была зарегистрирована первая вспышка высокопатогенного вируса птиц H5N1 на птицефабрике Нан, расположенной в селе Голубовка Павлодарской области. Последнее крупное распространение

ВГС, вызвавшее массовую гибель домашней птицы на птицефабриках, зарегистрировано в семи регионах Казахстана в 2020 году. В этом году вспышки заболевания зарегистрированы в десятках стран мира, нанеся огромный ущерб птицеводству. В результате генетического анализа возбудителя было установлено, что вирус представляет собой реассортант, близкородственный к вирусу гриппа, зарегистрированный в Ираке в мае того же года.

Эпизоотическая ситуация среди птицы во многих странах мира, в том числе Республики Казахстан, остается напряженной, и время от времени возникают вспышки инфекционных вирусных болезней. Мониторинг эпизоотической ситуации является основным элементом противоэпизоотических мероприятий по предупреждению появления и распространения гриппа птиц среди сельскохозяйственных птиц. Некоторые виды птичьего гриппа могут быть зоонозными и поэтому представлять серьезную угрозу для птицеводства Казахстана. Поскольку вирус птичьего гриппа постоянно эволюционирует посредством мутаций и рекомбинации, он оказывает значительное влияние на здоровье и продуктивность животных.

Распространению вируса способствуют широкие ареалы гнездования многих птиц, встречающиеся во время сезонных миграций. В республике в период гнездования, линьки, сезонных миграций и зимовки зарегистрировано 130 видов птиц. Каждый год численность гнездящихся видов птиц достигает 10 миллионов, на линьку прилетают 2-3 миллиона птиц, а около 50 миллионов перелетных птиц останавливаются на водоемах в период весенних и осенних миграций. При этом перелетные птицы пролетают и гнездятся практически на всей территории республики. Особую угрозу представляют пути полета птиц и места их массового скопления. Поэтому вспышка птичьего гриппа, которая регистрируется в больших масштабах, привлекает особое внимание к необходимости борьбы с распространением ВГП и требует своевременных и эффективных профилактических мер.

Систематический молекулярно-биологический скрининг биологических образцов, собранных от диких птиц во время весенне-летней миграции и от домашних птиц содержащихся в личных подсобных хозяйствах вблизи пути миграции птиц в различных регионах Казахстана, значительно расширяют знания в области выявления закономерностей распространения в продолжающейся эволюции ВГП, а также может способствовать подбору актуальных вакцинных штаммов и минимизировать роль птиц, как источника возникновения новых, потенциально опасных вариантов гриппа птиц.

Объекты исследования: вирус гриппа птиц типа А (*Influenza virus*) выделенный из носоглоточных и клоакальных смывов, а также патологического материала заболевших птиц.

Цель исследования. Изучение молекулярно-биологических характеристик и филогенетический анализ штаммов гриппа птиц, циркулирующих среди диких и домашних птиц в Республике Казахстан в 2020-2022 годах.

Задачи исследования:

1. Отбор проб от домашних птиц, содержащихся в личных подсобных хозяйствах вблизи пути миграции птиц в различных регионах Казахстана с целью мониторинга ВГП. Провести Серологический и молекулярно-биологический скрининг собранных проб.

2. Проведение отбора проб у птиц во время вспышки ВГП и определение подтипа вируса с помощью ПЦР скрининга.

3. Выделение штаммов вируса на куриных эмбрионах и секвенирование их полного генома методом Сенгера.

4. Филогенетический анализ всех восьми генов изучаемых штаммов ВГП и выявление молекулярных маркеров с целью определения их патогенности.

5. Сравнительное изучение биологических свойств и антигенных взаимосвязей штаммов ВГП.

6. Разработка ПЦР тест-системы для диагностики ВГП.

Методы исследования. Работа выполнена с применением вирусологических, серологических (иммуноферментный анализ, ГГА, РТГА и др.), молекулярно-биологических методов (полимеразная цепная реакция, секвенирование) исследования и были использованы методы анализа биоинформатики (алгоритм Clustal W, метод «объединения соседей», Tamura-Nei модель, анализ BLASTn).

Научная новизна исследования

- В период 2020-2022 гг. проведен мониторинг ВГП шести областей, которые расположены на пути перелетных птиц и отобраны биологические образцы от домашних птиц в личных подсобных хозяйствах, расположенных вблизи пути миграции птиц;

- Изолированы четыре штамма ВГП - A/Chicken/North Kazakhstan/184/2020 (H5N8), A/Mute swan/Mangystau/9421/2022 (H5N1), A/Caspian tern/Atyrau/9184/2022 (H5N1) и A/Chicken/Almaty/220/2020 (H9N2) от диких и домашних птиц и проведено полное секвенирование их геномов;

- Проведен филогенетический анализ и молекулярно-генетическая характеристика изучаемых штаммов;

- Впервые в Казахстане выделен штамм H9N2 от домашней птицы;

- Выявлены новые уникальные точечные мутации, ранее не зарегистрировавшиеся в геноме ВГП;

- Разработана реал-тайм ПЦР тест-система для выявления и дифференциации вируса гриппа птиц на основе штамма A/Chicken/North Kazakhstan/184/2020 (H5N8) выделенной из Северо-Казахстанской области и получен патент.

Теоретическая и практическая значимость работы.

1. Проведены полное секвенирование генома A/Chicken/North Kazakhstan/184/2020 (H5N8), A/Mute swan/Mangystau/9421/2022 (H5N1), A/Caspian tern/Atyrau/9184/2022 (H5N1) и A/Chicken/Almaty/220/2020 (H9N2). Сравнительный анализ изучаемых штаммов со штаммами, зарегистрированными в Казахстане и странах ближнего зарубежья, показал их близкое родство с вирусами Китая, России и Ближнего Востока.

2. Впервые в Казахстане от домашней птицы выделен штамм гриппа H9N2 - A/Chicken/Almaty/220/2020 и определены молекулярные маркеры, связанные с адаптацией ВГП к млекопитающим.

3. В международной базе данных GenBank и GISAID в свободном доступе находятся нуклеотидные последовательности всех генов ВГП A/Chicken/North Kazakhstan/184/2020 и A/Caspian tern/Atyrau/9184/2022 под номерами OP740951.1 – OP740959.1 и OQ804408.1 – OQ804415.1, что дает возможность использовать их

для локального и глобального сравнительного филогенетического анализа со штаммами ВГП, циркулирующими в настоящий момент.

4. Получены 2 патента на полезную модель: №7497 «Способ разработки реал-тайм ПЦР тест-системы для выявления и дифференциации вируса птичьего гриппа» и №8586 «Штамм вируса гриппа птиц клада 2.3.4.4b A/Caspian tern/Atyrau/9184/2022 (H5N1), используемый для приготовления диагностических препаратов и вакцин».

5. Опубликовано методическое руководство «Зонирование и регионализация территории Республики Казахстан с учетом анализа рисков заноса и возможности распространения высокопатогенного вируса гриппа птиц».

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. В различных регионах Казахстана в 2020 - 2022 гг. от диких и домашних птиц собрано 3383 биологических образцов. При скрининге образцов в ИФА, ПЦР и РТГА установлена циркуляция ВГП. Из образцов, полученных из Северного и Западного и Южно-восточных регионов Казахстана, на куриных эмбрионах выделены четыре штаммов ВГП.

2. По данным филогенетического анализа на территории Республики Казахстан выявлены три генотипа вируса птичьего гриппа, относящиеся к подтипам H5N1, H5N8 и H9N2.

3. Молекулярно-биологический и филогенетический анализ гена НА исследуемых казахстанских изолятах показал, что три изолята H5 являются близкородственными штамма, а H9N2 штамм не имеет родственных связей ранее изолированными казахстанскими вирусами H9N2, выделенных от диких птиц.

4. В структуре белка NA вируса A/Chicken/Almaty/220/2020 (H9N2) в положении 63-65 обнаружена делеция аминокислот TEI (кодирующий треонин (T), глутаминовую кислоту (E) и изолейцин (I)), который является высокопатогенным маркером штамма A/Duck/HongKong/Y280/97, выделенным во время эпидемии домашних птиц Китая.

5. В геноме изученных изолятов выявлены молекулярные маркеры, связанные с адаптацией ВГП к млекопитающим и ранее не зарегистрированные точечные мутации.

Основные результаты исследований и выводы:

1. В результате серологического скрининга 3286 проб сыворотки крови, собранных от домашних птиц, в частных подсобных хозяйствах Алматинской, Восточно-Казахстанской, Акмолинской, Западно-Казахстанской, Костанайской и Северо-Казахстанской областей, в 100 пробах выявлен положительный результат на антиген H5 вируса. А молекулярно-биологический скрининга этих образцов методом ПЦР с обратной транскрипцией выявлен слабоположительный результат на М-ген только 5 образцов, собранных в Акмолинской области.

2. В результате скрининга 109 проб, собранных на территории Алматинской, Северо-Казахстанской, Мангистауской и Атырауской областей в 2020 и 2022 годах, в время вспышки ВГП, выявлена циркуляция подтипов H5N8, H9N2 и H5N1.

3. Из 10 ПЦР-положительных проб на куриных эмбрионах выделены четыре штамма: A/Chicken/Almaty/220/2020, A/Chicken/North Kazakhstan/184/2020, A/Mute swan/Mangystau/9421/2022 и A/Caspian tern/Atyrau/9184/2022.

4. В результате филогенетического анализа сайт расщепления гена НА

изолята H5N8 - A/184/2020 и H5N1 – A/9421/2022 и A/9184/2022 - состоит из последовательности PLREKRKR↓GLF, что возможно идентичное мотиву высокопатогенных вариантов ВГП, обнаруженных в европейских странах, включая Великобританию в 2016–2017 гг. А мотив сайта расщепления A/220/2020 (H9N2) - PSRSSR↓GLF был одинаковым с низкопатогенными изолятами H9N2 линии Y280, зарегистрированных в Китае в 2018 году.

5. Несмотря на низкую патогенность изолята A/Chicken/Almaty/220/2020, в геноме H9N2 обнаружены несколько молекулярных маркеров, повышающих его адаптивность к млекопитающим. Опубликована нуклеотидная последовательность полного генома ВГП A/Chicken/North Kazakhstan/184/2020 (OP740951.1 – OP740959.1) и A/Caspian tern/Atyrau/9184/2022 (OQ804408.1 – OQ804415.1) в международных базах данных GenBank и GISAID.

6. Изолят A/Chicken/North Kazakhstan/184/2020(H5N8), выделенный из Северо-Казахстанской области, послужил основой для разработки реал-тайм ПЦР тест-системы для выявления и дифференциации вируса гриппа птиц.

Связь с планом основных научных работ. Диссертационная работа выполнена в лаборатории вирусологии Казахского научно-исследовательского ветеринарного института в рамках ПЦФ МСХ РК BR10764899-ОТ-22 «Изучить эпизоотическую характеристику территории страны по особо опасным болезням и разработать ветеринарно-санитарные мероприятия по повышению их эффективности» и BR10764975-ОТ-22 «Разработать и предложить для производства средства и методы диагностики, профилактики болезней, терапии инфицированных животных», а также в лаборатории экологии вирусов Научно-производственного центра «Микробиологии и вирусологии» в рамках проекта МОН РК AP19678255 «Изучение эпидемического потенциала природных вариантов вирусов гриппа А, циркулирующих среди птиц и млекопитающих в Казахстане».

Апробация работы. По результатам диссертационной работы опубликованы и доложены на международной конференции студентов и молодых ученых «Фараби әлемі» (Алматы, 2021 г.) и научной конференции Достижения молодых ученых и специалистов Казахстана в области ветеринарии, биотехнологии и пищевой безопасности (Алматы, 2020). Также частично включен в отчет о НИР по проектам BR10764899-ОТ-22, BR10764975-ОТ-22 и AP19678255.

Публикации. Согласно требованиям Положения о диссертационном совете КазНУ им. аль-Фараби материалы диссертации отражены в 12 публикациях, в том числе 2 статьи в журналах, входящих в базу данных Web of Science, 5 статей из списка Комитета контроля в сфере образования и науки и 1 тезис на международной конференции. Также получены 2 патента на полезную модель - №7497 (2022 г.) и №8586 (2024 г.).

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 114 страницах и состоит из разделов: обозначения и сокращения, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, заключение и выводы, список использованных источников, который включает 186 наименований. Диссертационная работа содержит 18 таблиц, 31 рисунка и пять приложений.