

АННОТАЦИЯ

диссертации на соискание степени доктор философии (Ph.D.)

по специальности «6D060700 - Биология»

Онгарбаевой Нурай Сырлыбаевны

на тему: «Молекулярно-биологические характеристики вирусов гриппа свиней, циркулирующих в Казахстане»

Общая характеристика диссертационного исследования. Работа посвящена идентификации и изоляции циркулирующих на территории Республики Казахстан штаммов вируса гриппа свиней, изучению их молекулярно-биологических свойств и определению филогенетической принадлежности для выявления закономерностей их распространения и эволюции.

Актуальность исследования. Грипп свиней - высококонтагиозная вирусная инфекция, вызываемая вирусом гриппа (ВГ) семейства *Orthomyxoviridae*. ВГ по поверхностным белкам делится на 18 подтипов по гемагглютиниру и на 11 подтипов по нейраминидазе. ВГ заражает как людей, так и птиц и различные виды млекопитающих, включая свиней. В свиной популяции циркулируют три основных подтипа ВГА: H1N1, H3N2 и H1N2. Эпителий респираторного тракта свиней имеет клеточные рецепторы остатков сиаловой кислоты с концевыми структурами NAcNeu α 2-3Gal, восприимчивые для птичьих, и NAcNeu α 2-6Gal – для человеческих штаммов ВГ, что способствует одновременной репликации и реассортации в организме свиней ВГ разных подтипов. Основными путями передачи вирусов гриппа свиней (ВГС) являются воздушно-капельный и прямой контакт: через выделения инфицированных животных. В полевых условиях ВГ передается через воду в водоемах, загрязненных птичьими фекалиями. Свиньи могут служить природным резервуаром и сосудом для смешивания и возникновения новых потенциально опасных штаммов, что подтвердила пандемия 2009 г., вызванная реассортантным вирусом H1N1 свиней, который содержал гены нейраминидазы и М белка евразийского вируса свиней и шести генов североамериканского тройного реассортантного вируса.

Систематический молекулярно-биологический скрининг биологических образцов и изоляция штаммов ВГС из носоглоточных смывов, собранных от свиней в различных регионах Казахстана, значительно расширяют знания в области выявления закономерностей распространения в продолжающейся эволюции ВГ, а также может способствовать подбору актуальных вакцинных штаммов и минимизировать роль свиней, как источника возникновения новых, потенциально опасных вариантов ВГ.

Объекты исследования: вирусы гриппа свиней, носоглоточные смывы, сыворотки крови.

Цель исследования. Изучение молекулярно-биологических характеристик и выявление изменчивости вирусов гриппа, циркулирующих в популяции свиней в Республике Казахстан.

Задачи исследования:

1. Молекулярно-биологический скрининг и изоляция штаммов ВГ из носоглоточных смывов, собранных от свиней в различных регионах Казахстана.

2. Филогенетический анализ вариабельных генов (гемагглютинин, нейраминидаза, NS и М) штаммов ВГС.

3. Сравнительное изучение биологических свойств и антигенных взаимосвязей штаммов ВГС.

4. Получение лиофильновысушенных препаратов штаммов ВГС и иммунных кроличьих сывороток к ним.

Методы исследования. Работа выполнена с применением современных сертифицированных вирусологических и молекулярно-биологических методов. Молекулярно-генетические исследования (NGS секвенирование на платформе Illumina MiSeq и секвенирование по технологии Сэнгера) проводились с использованием соответствующих методологий и материально-технической базы лабораторий биохимии вирусов и молекулярной вирусологии ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии».

Научная новизна исследования

Впервые в животноводческих хозяйствах различных регионов Казахстана в эпидемические периоды с 2018 г. по 2021 г. проведено мониторинговое исследование и выявлена социркуляция двух подтипов ВГА: H1N1 и H3N2, с преобладанием ВГА H1N1.

Впервые из носоглоточных смывов, собранных от свиней в свинокомплексах северного и алматинского регионов Казахстана, изолировано шесть штаммов.

Впервые определена и опубликована нуклеотидная последовательность полного генома ВГС А/свинья/Караганда/3/2020 (MZ396822.1 - MZ396828.1) и А/свинья/Караганда/4/2020 (MZ363969.1 - MZ363976.1) в международной базе данных GenBank.

Впервые установлена филогенетическая принадлежность штаммов ВГС А/свинья/Караганда/03/2020, А/свинья/Караганда/04/2020 к европейской ветви и изолятов ВГС А/свинья/Петропавловск/01/2018, А/свинья/Петропавловск/02/2018, А/свинья/Петропавловск/03/2018, А/свинья/Павлодар/43/2019 к азиатской ветви.

Впервые в структуре гена белка М2 карагандинских ВГС (03/20; 04/20) и алматинского штамма (45/19) обнаружена мутация S31N, отвечающая за формирование устойчивости к Ремантадину.

Проведено сравнительное изучение биологических свойств североказахстанских и алматинского штаммов ВГС 2018-2019 гг. с изолятами ВГС, циркулировавшими в свинофермах Костанайской и Актюбинской областях в 2012-2014 гг. и эталонными штаммами ВГ. Показана гетерогенность популяций ВГС 2018-2019 гг. по ряду биологических свойств.

Впервые изучена чувствительность североказахстанских и алматинского штаммов ВГС 2018-2019 гг. к современным противогриппозным препаратам, входящим в государственный реестр лекарственных средств и медицинских изделий, и в клинический протокол диагностики и лечения гриппа и ОРВИ МЗ РК.

На штамм А/свинья/Петропавловск/03/18 (H1N1), предназначенный для производства диагностических препаратов, получен патент №34782 от 09.04.2021.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Накоплен огромный арсенал знаний об особенностях циркуляции ВГ и роли свиней в эволюции и трансмиссии этого патогена. Исследование молекулярно-биологических характеристик изолятов ВГ, изолированных от свиней, является фундаментальным вкладом в экологию гриппа. Кроме теоретической значимости диссертационная работа представляет и практическую ценность, связанную с возможностью использования штамма А/свинья/Петропавловск/03/18 (H1N1) для производства современных диагностических препаратов.

Оригинальный штамм ВГС А/свинья/Петропавловск/03/18 (H1N1) депонирован (регистрационный номер М-3-19/D от 27.03.2019) в национальной коллекции микроорганизмов РГП на ПХВ "Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности" МОН РК. На оригинальный штамм ВГС А/свинья/Петропавловск/03/18 (H1N1), предназначенный для производства диагностических препаратов, получен Патент (№34782 от 09.04.2021).

Лиофильновысушенные препараты казахстанских штаммов ВГА, циркулировавших в популяциях свиней в 2018-2019 гг., и иммунные сыворотки к ним, рекомендованы для применения в вирусологических лабораториях здравоохранения и ветеринарных служб республики для оценки напряженности коллективного иммунитета к гриппу и расшифровки возникающих вспышек ОРВИ и идентификации вновь выделенных изолятов ВГ.

В международной базе данных GenBank в свободном доступе находятся нуклеотидные последовательности всех генов ВГС А/свинья/Караганда/03/2020 и А/свинья/Караганда/04/2020 под номерами MZ396822.1 - MZ396828.1 и MZ363969.1 - MZ363976.1, что дает возможность использовать их для локального и глобального сравнительного филогенетического анализа со штаммами ВГ, циркулирующими в настоящий момент.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. В свинофермах различных регионов Казахстана в 2018 - 2021 гг. от свиней собрано 2144 биологических образцов. При скрининге образцов в ПЦР и РТГА установлена социркуляция ВГА H1N1 и H3N2. Из образцов, полученных из Северного и Южного регионов Казахстана, на КЭ и КК MDCK выделены пять штаммов вируса гриппа А/H1N1 и один А/H3N2.

2. Филогенетический анализ вариабельных генов (НА, NA и NS) штаммов ВГ, циркулировавших в популяциях свиней в РК в 2018 – 2020 гг., выявил принадлежность карагандинских ВГС (03/20; 04/20) к европейской ветви, а североказахстанских штаммов (43/19; 03/18; 02/18; 01/18) – к азиатской.

3. По основным биологическим свойствам изоляты представляют в основном однородную группу, проявляя гетерогенность по некоторым свойствам. Установлено близкое антигенное родство североказахстанских штаммов (44/19; 43/19; 03/2018; 02/2018 и 01/2018) с эталонными ВГА H1N1

(A/New Jersey/8/76; A/swine/USA/1976/31 и A/swine/Iowa/15/30), алматинского штамма (45/19) – с вирусом A/Wisconsin/67/05(H3N2).

4. Лиофильно высушенные антигены ВГС 2018 – 2019 гг. и иммунные кроличьи сыворотки к ним сохраняли активность после шести-девяти месяцев хранения, что позволяет рекомендовать данные препараты для использования в качестве диагностических.

Основные результаты исследований и выводы:

1. В результате молекулярно-биологического скрининга в РТ-ПЦР 2055 свиных носоглоточных смывов и серологического анализа в реакции торможения гемагглютинации 89 сывороток крови свиней, собранных в животноводческих хозяйствах Алматинской, Карагандинской, Костанайской, Северо-Казахстанской и Павлодарской областей Казахстана в эпидемические периоды с 2018 по 2021 гг., выявлена социркуляция двух подтипов ВГА: H1N1 и H3N2, с преобладанием ВГА H1N1.

2. Из 116 ПЦР-положительных проб на КК МДСК и КЭ выделено шесть штаммов: А/свинья/Алматы/45/19(H3N2), А/свинья/Павлодар/44/19(H1N1), А/свинья/Павлодар/43/19(H1N1), А/свинья/Петропавловск/03/18(H1N1), А/свинья/Петропавловск/02/18(H1N1), А/свинья/Петропавловск/01/18(H1N1).

3. В результате филогенетического анализа трех наиболее вариабельных генов ВГА: НА, NA и NS белка, карагандинские ВГС (03/20; 04/20) отнесены к европейской ветви, а североказахстанские штаммы (43/19; 03/18; 02/18; 01/18) - к азиатской.

4. В структуре гена белка М2 карагандинских ВГС (03/20; 04/20) и алматинского штамма (45/19) обнаружена мутация S31N, отвечающая за формирование устойчивости к Ремантадину.

5. У штамма А/свинья/Павлодар/43/19 в нуклеотидной последовательности гена М определена рекомбинация. Вероятная вставка находится в положении 331-684. Основной родительской последовательностью данной области является штамм A/mallard/Illinois/10OS3243/2010.

6. Опубликована нуклеотидная последовательность полного генома ВГС А/свинья/Караганда/3/2020 (MZ396822.1 - MZ396828.1) и А/свинья/Караганда/4/2020 (MZ363969.1 - MZ363976.1) в международной базе данных GenBank.

7. Казахстанские штаммы ВГС 2018 - 2019 гг. по адсорбирующей и элюирующей способностям и ингибиторочувствительности проявили сходство между собой и с референсными штаммами, различаясь по гемагглютинирующей и инфекционной активностям; степени чувствительности к противовирусным препаратам (Тамифлю, Ремантадин) и устойчивости гемагглютинина к температурному фактору.

8. Антигенный анализ определил близкое родство штамма А/Алматы/45/19 к вирусу А/Wisconsin/67/05 (H3N2) и североказахстанских штаммов (44/19; 43/19; 03/2018; 02/2018; 01/2018) - к эталонным вирусам ВГ: А/New Jersey/8/76; А/swine/USA/1976/31 и А/swine/Iowa/15/30.

9. Установлено, что лиофильновысушенные препараты ВГС 2018 – 2019 гг. и иммунных кроличьих сывороток сохраняют активность на протяжении девяти месяцев хранения, что позволяет рекомендовать их для использования в

качестве стандартных диагностических препаратов при расшифровке возникающих вспышек ОРВИ.

Связь с планом основных научных работ. Диссертационная работа выполнена в рамках двух проектов: грантового финансирования МОН (МНВО) РК AP05130989 «Молекулярно-генетическая изменчивость вирусов гриппа свиней в Казахстане» (2018 - 2020 гг.) и международного ISTC K-2231 «Molecular characterization of swine influenza viruses circulating in different regions in Kazakhstan and comparison with contemporary human influenza viruses» (2018 - 2021 гг.) в ТОО «НПЦ микробиологии и вирусологии». Научный руководитель проектов – к.б.н. Н.Г. Кливлеева.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы опубликованы и доложены на трех международных научных конференциях: «Influenza 2018: Centenary of the 1918 Pandemic» (Лондон, 2018 г.); Конгресс «10th Edition of Options for the Control of Influenza» (Сингапур, 2019 г.); 22nd Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology (Копенгаген, 2019 г.), в материалах международных научно-практических конференций ближнего зарубежья: «Вирусные инфекции и общество: проблемные вопросы диагностики, лечения и профилактики» (Екатеринбург, 2018 г.); «Молекулярные основы эпидемиологии, диагностики, профилактики и лечения актуальных инфекций» (Санкт-Петербург, 2018 г.) и Республики Казахстан: «Современные вызовы для биотехнологии, ветеринарии и медицины» (Гвардейский, 2020 г.), на ежегодных научных семинарах кафедры «Молекулярная биология и генетика» факультета «Биология и биотехнология» КазНУ им. аль-Фараби и частично включены в Отчеты о научно-исследовательской работе по проектам AP05130989, ISTC K-2231 и OR11465435-OT-22.

Публикации. Согласно требованиям Положения о диссертационном совете КазНУ им. аль-Фараби материалы диссертации отражены в 17 публикациях, в том числе 2 статьях в журналах, входящих в Q3 по базе Web of Science, 3 статьях в журналах, включенных в перечень Комитета по обеспечению качества в сфере образования Министерства науки и высшего образования РК (КОКСНВО МНВО РК), 3 тезисах в материалах международных конференций, 2 тезисах в материалах международных конференций в ближнем зарубежье и 1 тезисе в материалах международной конференции в Республике Казахстан. А также 1 патент на изобретение.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 127 страницах и состоит из разделов: обозначения и сокращения, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, заключение и выводы, список использованных источников, который включает 250 наименований, из них 200 на английском языке. Диссертационная работа содержит 30 таблиц, 32 рисунка и два приложения.