

Министерство образования и науки Кыргызской Республики
Кыргызский национальный аграрный университет им. К.И.Скрябина

Диссертационный совет Д.06.16.538

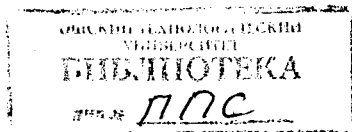
На правах рукописи
УДК 619:578.2

Боронбаева Аида Ильичевна

**«МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСА
ЯЩУРА ТИПОВ А, О»**

06.02.02- ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология
с микотоксикологией и иммунология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук



Бишкек-2018

Работа выполнена в лаборатории вирусологии и биотехнологии Кыргызского научно-исследовательского института ветеринарии имени А. Дуйшеева

Научный руководитель: доктор ветеринарных наук, член-корреспондент
НАН КР, профессор
Нургазиев Рысбек Зарылдыкович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Доолоткелдиева Тинатин Доолоткелдиевна

кандидат биологических наук,
Султанкулова Кулайсан Турлыбаевна

Ведущая организация: Институт проблем биологической безопасности
Таджикской Академии сельскохозяйственных наук

Защита диссертации состоится “16” февраля 2018г. в 14:00 часов на заседании диссертационного совета Д.06.16.538 при Кыргызском национальном аграрном университете имени К.И. Скрябина (соучредитель Кыргызско-Турецкий университет «Манас») по адресу: 720005, г. Бишкек, ул. Медерова, 68. E-mail: knau-info@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Кыргызского национального аграрного университета имени К.И. Скрябина по адресу: 720005, г. Бишкек, ул. Медерова, 68.

Автореферат разослан “12” января 2018г.

**Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат ветеринарных наук,
доцент**



Крутская Е.Д.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Ящур – опасное высококонтагиозное, остро протекающее вирусное заболевание домашних и парнокопытных животных.

Возбудитель ящура представлен целым рядом типов и подтипов, что значительно затрудняет их выявление и идентификацию.

Из большого числа типов вируса ящура на территории Кыргызской Республики в последние годы регистрируется два типа А и О. Благодаря ежегодным массовым вакцинациям восприимчивого поголовья уже в течение 5 лет сохраняется эпизоотическое благополучие по ящуру, однако локальные вспышки отмечаются ежегодно.

Основой успешной борьбы с ящуром являются ранняя диагностика и типизация возбудителя. Эти два взаимосвязанных фактора применяемые в ветеринарной практике ранее используемыми диагностическими методами не позволяют с высокой точностью дифференцировать вирусы на уровне генотипов и субгенотипов, что затрудняет постановку диагноза и подбор типа вакцин для специфической профилактики.

Для типизации вируса ящура требуется лабораторное диагностирование, которое должно выдать точный и быстрый результат. Ранее лабораторную диагностику ящура проводили серологическими методами, как ИФА, РСК, РН. Каждый из этих методов имеет свои преимущества и определенные недостатки. Основным их недостатком является трудоемкость и продолжительность постановки реакций. Для своевременной и точной постановки диагноза, идентификации типов вируса ящура необходимы более совершенные, высокоспецифичные методы.

Следовательно, идентификация типов вируса ящура с применением ПЦР технологии на основе молекулярно-биологических характеристик является актуальной задачей ветеринарной и биологической науки.

Исходя из этого, перед нами стояла задача разработать специфические праймеры для проведения мониторинга циркулирующего вируса ящура с целью выявления очагов ящура на территории Кыргызской Республики.

Связь темы диссертации с основными научными программами. Диссертационная работа выполнена на базе лаборатории вирусологии и биотехнологии, научные исследования, проведенные по теме диссертации, являлись составной частью тематического плана НИР лаборатории вирусологии и биотехнологии Кыргызского научно-исследовательского института ветеринарии имени Арстанбека Дуйшеева (Кырг.НИИВ) «Совершенствование мониторинга, диагностики и специфической профилактики ящура сельскохозяйственных животных» (2010-2014 гг.), регистрационный номер 0004028; «Разработка и совершенствование серологических и молекулярно-биологических методов диагностики особо опасных вирусных болезней сельскохозяйственных животных» (2015-2018гг.), регистрационный номер 0007146.

Цель и задачи исследования. Цель работы заключалась в разработке и оптимизации видоспецифических праймеров для выявления и типизации вируса ящура, изучить генетические свойства регистрируемых типов вируса ящура с применением молекулярно-генетических методов (секвенирования и ПЦР). Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- выделить из очагов эпизоотии изолят вируса ящура;
- изучить культуральные свойства выделенного изолята;
- разработать специфические праймеры для типизации вирусов ящура типов А, О;
- оптимизировать параметры ПЦР диагностики классического метода и Реал-Тайм для типизации вируса ящура;
- провести секвенирование ПЦР-продуктов с применением разработанных праймеров для филогенетического анализа.

Научная новизна работы:

- изучены культуральные свойства выделенного изолята вируса ящура;
- впервые в Кыргызской Республике разработаны специфические праймеры к вирусу ящура типов А, О;
- оптимизирована технология постановки ПЦР классического метода и Реал-Тайм для диагностики ящура;
- проведено секвенирование вируса и проанализирована нуклеотидная последовательность генов вируса ящура типов А и О;
- установлено происхождение филогенетической связи между изолятами типов А, О, циркулирующих на территориях Кыргызстана и дальнего зарубежья.

Практическая значимость полученных результатов. По результатам проведенных исследований разработаны «Методические рекомендации по типизации вируса ящура типов А, О с применением ПЦР анализа». Методические рекомендации обсуждены и одобрены ученым советом Кырг.НИИВ им. А. Дуйшеева, протокол № 2 от 17 марта 2017 года и утвержден Главным ветеринарным инспектором Государственной инспекции по ветеринарной и фитосанитарной безопасности при Правительстве Кыргызской Республики Жумакановым К.Т. (5 июня 2017 год). Разработаны и предложены центрам ветеринарной диагностики специфические праймеры для типизации вируса ящура типов А, О. Проведен анализ местного изолята в сравнении с базой данных NCBI, что дает возможность использования его при разработке и изготовлении диагностических препаратов и биопрепаратов для специфической профилактики.

Экономическая значимость полученных результатов.

Внедрение в лабораторную практику изготовленных праймеров и оптимизированной технологии постановки ПЦР, ОТ-ПЦР, ПЦР-РВ даст возможность с большой точностью и своевременно проводить диагностику ящура. Это даст возможность выявления очагов ящура на территории Кыргызской Республики и принимать целенаправленные меры по их купированию и оздоровлению.

Предлагаемые праймеры по эффективности не уступают зарубежным аналогам.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

- выделение и адаптация вируса ящура на перевиваемой культуре клеток ВНК-21 и ПК;
- культуральные свойства выделенного изолята вируса ящура;
- разработка и оптимизация видоспецифических праймеров для диагностики вируса ящура методом ПЦР анализа;
- применение видоспецифических праймеров для типизации вируса ящура типов А и О регистрируемых на территории Кыргызской Республики;
- молекулярно-генетический и филогенетический анализ полученного изолята.

Личный вклад соискателя. Все разделы диссертационной работы выполнены при личном участии автора. Выполнена серия сложных молекулярно-генетических исследований по разработке видоспецифических праймеров, типизации вируса ящура, оптимизации условий постановки ПЦР анализа, а также секвенирование генома вируса ящура. Работа выполнялась под научным руководством д.в.н., член-корр. НАН КР, профессора Нургазиева Р.З.

Апробация результатов исследований. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на межвузовской научно – практической конференции молодых ученых «Наука XXI века: новый подход», КНУ им. Ж. Баласагына (г. Бишкек, 2014 г.); на научно – практической конференции, посвященной 70-летию юбилею Аманбаева Ж.Б. – государственного и политического деятеля Кыргызской Республики, КНАУ им. К.И. Скрябина (г. Бишкек, 2016 г.); на заседаниях ученого совета Кыргызского научно-исследовательского института ветеринарии имени А. Дуйшеева (2008-2016 гг.).

Полнота отражения результатов диссертации в публикациях. По материалам диссертации опубликовано 10 научных работ в изданиях, рекомендованных ВАК Кыргызской Республики, в том числе 2 статьи в журналах, входящих в РИНЦ. Разработаны «Методические рекомендации по типизации вируса ящура типов А, О с применением ПЦР анализа».

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 133 страницах компьютерного текста и включает перечень условных обозначений, символов и терминов, оглавление, введение, обзор литературы, собственные исследования, обсуждение результатов исследований, выводы, практические предложения, список использованных источников литературы, приложения. Работа иллюстрирована 27 рисунками, 17 таблицами. Список использованных источников литературы включает 197 наименований, из которых 67 иностранных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении дается обзор состояния заболеваемости животных ящуrom в Кыргызстане и соседних приграничных республиках, о выделяемых типах вируса, причиняемый ущерб от ящура; применяемые методы диагностирования болезни, их специфичность и слабые стороны. Обосновывается необходимость глубокого изучения биологических свойств разных типов вируса ящура.

В главе 1 «Обзор литературы» по литературным источникам отечественных и зарубежных авторов приводятся общие сведения о регистрируемых на территории республики типах вируса ящура. Приведен литературный обзор по применяемым серологическим и молекулярно-биологическим методам выявления вирусов, их морфологическая характеристика с применением классических вирусологических методик.

В главе 2 «Материалы и методы исследований» дана характеристика объектов исследований – неблагополучных по ящуру фермерских, крестьянских хозяйств излагаются применяемые в исследовательской работе методы диагностики и изучения биологических свойств вирусов. В работе были применены классические серологические, вирусологические и молекулярно-генетические методики. Для выделения изолятов и при работе со штаммами были применены высокотехнологичные молекулярные методики и компьютерные программы MEGA6, BLAST, Clustal W.

Исследования сывороток крови КРС, МРС, яков проводили с помощью ИФА, набора СНЕКІТFMD ЗАВСbo-ov для выявления неструктурных белков в ИФА ЗАВС в сыворотках крови сельскохозяйственных животных (IDEXX Laboratories, Нидерланды).

Проведена адаптация вируса и накопление его в необходимых титрах методом пассирования на культурах клеток ВНК-21, ПК.

С помощью биоинформационной базы данных NCBI разработаны праймеры для типизации вируса ящура, регистрируемых на территории республики.

Выделение ДНК проводили набором «Ахуген». Для обратной транскрипции РНК использовали специальный набор фирмы Qiagen. Для оптимизации температурного режима амплификации использовали амплификатор Mini Opticon (Bio-Rad) с функцией температурного градиента. Учет реакции проводили методом электрофареза в агарозном геле. Постановку ПЦР в реальном времени (РВ) проводили специальным набором «СИНТОЛ» Учет результатов ПЦР РТ проводили с помощью аппарата Rotor-Gene Q (QIAGEN). Секвенирование полученного ПЦР продукта проводили на генетическом анализаторе ABIPRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

В главе 3 «Результаты собственных исследований» изложены материалы по мониторинговым исследованиям заболеваемости животных ящуром за период 2008-2014 гг. В форме диаграмм проанализировано количество очагов ящура в различных областях республики, описаны клинические признаки болезни, по которым ставился первичный диагноз на ящур. В очагах инфекции брался биологический материал и с применением серологических методов – ИФА, РСК уточнялся диагноз на ящур.

Мониторинг по заболеваемости животных ящуром на территории республики.

Эпизоотическая ситуация по ящуру в Кыргызстане на протяжении последних лет характеризовалась периодическими локальными вспышками. Так, в 2008 году имелось 11 неблагополучных пунктов по ящуру. В 2009 году в республике сохранялась благополучная ситуация по ящуру, не зарегистрировано фактов вспышки инфекции. В 2010 году было зарегистрировано 9 неблагополучных пунктов по ящуру среди крупного и мелкого рогатого скота. Падежа животных от ящура не зарегистрирован, однако переболевший скот терял продуктивность на 20-25%.

В 2011 году зарегистрировано 25 очагов по ящуру. По данным диагностических лабораторий циркулировали 2 типа вируса ящура А и О.

В 2012 году в 6 областях Кыргызской Республике всего зарегистрировано 37 неблагополучных пунктов по ящуру, заболело 889 голов крупного рогатого скота и 200 голов мелкого рогатого скота. По данным ветеринарных лабораторий циркулировал вирус ящура типов А и О (рис.1).

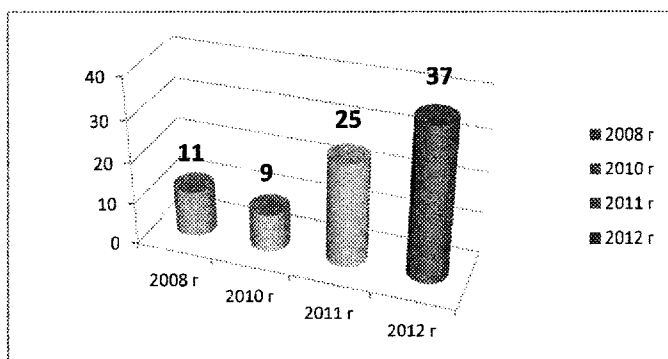


Рис. 1. Наличие очагов ящура среди с. х. животных на территории республики в период 2008-2012 г.г.

В 2013 году в Кыргызстане случаев заболевания ящуром среди восприимчивых животных не наблюдалось. С целью недопущения ящурной

эпизоотии государственной ветеринарной службой было провакцинировано трехвалентной вакциной 863,7 тыс. голов крупного рогатого скота.

В неблагополучных и угрожаемых регионах проводились профилактические, ветеринарно-санитарные мероприятия по недопущению заболевания. В настоящее время эпизоотическая ситуация по ящуру поддерживается достаточно стабильной, за исключением единичных локальных вспышек.

В 2014 году на территории республики зарегистрировано 5 неблагополучных очагов по ящуру, было вакцинировано против ящура 884,2 тыс. голов крупного рогатого скота и 4,0 тыс. овец.

Несмотря на принимаемые ветеринарной службой меры в 2014 году в Ак-Талинском районе Нарынской области возник 1 неблагополучный пункт, где заболело с клиническими признаками ящура 28 голов КРС, в Лейлекском районе Баткенской области 2 неблагополучных пункта, где заболело с клиническими признаками ящура 25 голов КРС, в Чуйском районе 1 неблагополучный пункт и одно заболевшее животное, в Таласском районе 1 неблагополучный пункт и одно заболевшее животное (рис.2).

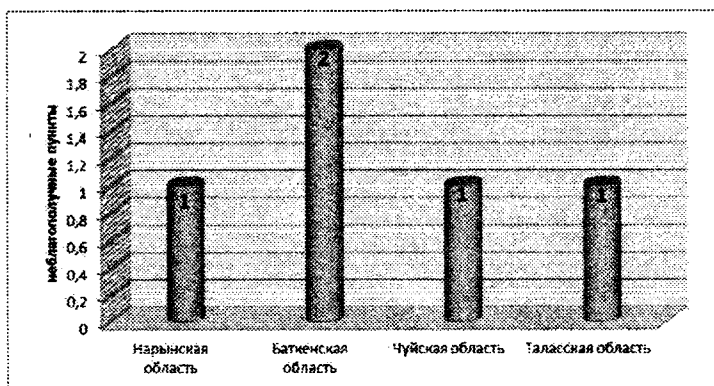


Рис. 2. Неблагополучные пункты по ящуру в республике в 2014 году

В очагах инфекции от больных животных отбирали патологический материал, а именно слюна, афты, проводились диагностические исследования по установлению причин заболевания.

Продолжительность поствакцинального иммунитета против ящура типов А, О. Лабораторная исследовательская работа начиналась с изучения продолжительности поствакцинального иммунитета у животных. В Чуйской области Московского района в частной ферме «Александр» провели отбор сыворотки крови у 20 голов вакцинированного крупного рогатого скота из разных половозрастных групп. Максимальное значение титра антител к вирусам типов А, О составило в РСК – 1:4 и 1:8 в ИФА. Полученные серологические исследования указывали на недостаточный иммунный фон.

При этом установили, что лабораторные исследования методом ИФА в сравнение с РСК легко воспроизводимы и наиболее удобны для повседневного анализа массовых образцов сыворотки на наличие специфических антител. ИФА является перспективным методом исследования сывороток крови животных при проведении массовых эпизоотологических обследований на вирусные болезни КРС.

Как показали лабораторные исследования, в крови вакцинированных КРС частной фермы «Александр» не обнаружен достаточный уровень антител, способный защитить животных от заражения ящуром.

Массовые исследования на напряженность поствакцинального иммунитета проведены среди КРС, МРС и яков из ОАО «МИС» МТФ 1, МТФ 2 Ысык-Атинского района и из Кара-Кужурских частных подворий. Были проведены исследования проб на наличие противоящурных антител в сыворотках крови КРС в иммуноферментном анализе, а также на наличие неструктурных белков, характеризующих уровень накопления антител к конкретным типам вируса.

Для дифференциации антител, выработанных при вакцинации, от антител к вирусу ящура (ВЯ) было проведено исследование сывороток крови животных на наличие ЗАВС НБ ВЯ. Для экспериментов на Кара-Кужурских летних пастбищах Нарынской области взяты образцы крови у яков, КРС и МРС (табл.1).

Таблица 1 - Наличие ЗАВС неструктурных белков вируса ящура в сыворотках крови животных

| Вид животных и сведения о вакцинации | Через 4 месяца после переболевания | | Через 8 месяцев после переболевания | | Через 12 месяцев после переболевания | |
|--------------------------------------|------------------------------------|----------------------|-------------------------------------|----------------------|--------------------------------------|----------------------|
| | кол-во исслед. проб | кол-во положит. проб | кол-во исслед. проб | кол-во положит. проб | кол-во исслед. проб | кол-во положит. проб |
| Яки (не вакц.) | 15 | 11 | 15 | 10 | 15 | 8 |
| КРС (вакц.) | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| МРС (не вакц.) | 13 | 4 | 13 | 5 | 13 | 6 |

Как показали лабораторные исследования, в крови всех исследованных животных были обнаружены неструктурные белки ВЯ, что свидетельствовало о циркуляции патогенного вируса в организме животных. Следовательно, все исследованные животные являлись вирусоносителями. НБ ВЯ были выявлены и у вакцинированных животных.

Биологические аспекты вирусоносительства требуют продолжения исследования на молекулярно-генетическом уровне.

Выделение вируса ящура. В 2010 и 2014 годах в Чуйской области от больных ящуром животных был взят патологический материал, а именно слюна, носовые смывы, афты, для диагностических исследований (табл. 2).

Таблица 2 - Исследование патологического материала по типированию ВЯ за 2010-2014 гг.

| Наименование материала | ИФА | | | ПЦР | | |
|------------------------|-------|-------|------------|-------|-------|------------|
| | Тип А | Тип О | Тип Азия-1 | Тип А | Тип О | Тип Азия-1 |
| Слюна | + | + | - | + | + | - |
| Афты | + | + | - | + | + | - |
| Носовые смывы | - | - | - | - | - | - |

Как видно в таблице 2, при исследовании патологического материала от больных животных был выявлен вирус ящура типа О и А, что говорит о циркуляции вируса ящура на территории республики в эти годы.

Полученные пробы замораживали при температуре от минус 20 до минус 40°C и возвращали в первоначальное состояние, вносили антибиотики. Отобранный суспензированный материал использовали при заражении культуры клеток и изучении молекулярно-биологических свойств выделенных изолятов.

Культивирование вируса ящура проводили на культурах клеток ВНК-21 и ПК. Цель данного эксперимента выявить наиболее чувствительную культуру клеток к данному изоляту. Для этого проводили по пять пассажей на каждой культуре клеток и определяли биологическую активность вируса. На 2-й день заражения в матрасе ВНК-21 ЦПД - составило 20% поверхности по сравнению с матрасом ПК, где ЦПД - 10%. Активность ЦПД проявлялась наиболее интенсивно. На четвертый день ЦПД в матрасе ВНК-21 составило 40% всего матраса, в ПК составило всего 20%. На шестой день ЦПД в матрасах ВНК-21 составило 70%, в ПК составило около 50% поверхности (рис.3).

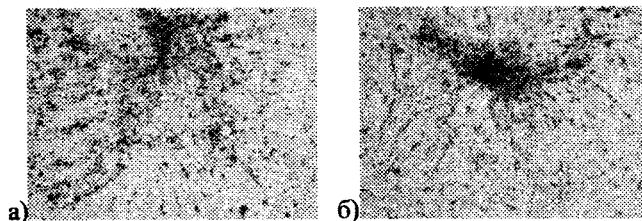


Рис. 3. Матрасы ВНК-21 и ПК на 6-й день после заражения вирусом ящура

Примечание: а) - ВНК-21

б) - ПК

По нашим наблюдениям вирус ящура в матрасе ВНК-21 заражал клетки значительно активнее, чем в матрасе ПК (табл. 3).

Таблица 3 - Оценка интенсивности цитопатического действия вируса ящура

| Культура клеток | Дни наблюдения | | | | | |
|-----------------|----------------|----------------------------|----------|----------------------------|----------|----------------------------|
| | 2-й день | в % к поверхности монослоя | 4-й день | в % к поверхности монослоя | 6-й день | в % к поверхности монослоя |
| ВНК-21 | + | 20 | ++ | 40 | +++ | 70 |
| Почки козлёнка | - | 10 | + | 20 | ++ | 50 |

Эксперименты показали, что вирус ящура активнее адаптировался на культуре клеток ВНК-21. И как показали наши наблюдения, цитопатическое действие вируса ящура на ВНК-21 более активное. Данная культура клеток более всего подходит для культивирования вируса ящура.

Таблица 4 - Биологическая активность изолята вируса ящура типа А на культурах клеток

| № | Культура клеток | Пассажный уровень и биологическая активность изолята вируса ящура типа А | | | | |
|---|-----------------|--|---------|---------|-------|----------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | ВНК-21 | 4,5 log | 5 log | 5,5 log | 6 log | 7,25 log |
| 2 | ПК | 1,5log | 2,5 log | 3 log | 4 log | 5,5 log |

Как видно из таблицы, титры вируса с первого по пятый пассаж на культуре ВНК-21 были высокими что еще раз подтверждает что вирус ящура активнее адаптируется на культуре клеток ВНК-21, цитопатическое действие вируса ящура на ВНК-21 более активное и достигает 70%, биологическая активность культурального вируса составляет в пределах 7,25 lg ТЦД_{50/см³}.

Для контроля и обеспечения стабильной эпизоотической ситуации по инфекционным заболеваниям, в том числе по ящуру важно своевременное и точное диагностирование болезней, определение циркулирующего возбудителя и его типизация. Поэтому в задачу исследований входила разработка специфических праймеров для типизации вируса ящура типов А и О, циркулирующих на территории республики.

Были изучены и проанализированы источники литературы по применяемым методам ПЦР диагностики ящура. Особое внимание было обращено на последовательность нуклеотидов идентификации вируса ящура при ПЦР анализе. Близкое родство и высокая гомологичность по нуклеотидным последовательностям затрудняют разработку метода, позволяющего идентифицировать возбудитель и дифференцировать данное заболевание от других инфекционных болезней.

Для подбора видоспецифических праймеров использовали биоинформационную базу данных NCBI (National Center Biotechnological

Information, USA). Анализ олигонуклеотидных последовательностей проводили в GenBank с помощью программы BLAST. Синтез праймеров выполняли с применением программы коммерческой компании «BioBasic» (Канада). При выборе праймеров из установленных консервативных участков руководствовались следующими критериями: содержание G+C должно составлять 30-60%, праймеры не должны включать самокомплементарные участки как внутри себя, так и между собой; желательно, чтобы праймеры одной пары имели достаточно высокую и одинаковую или близкую температуру плавления.

После получения консервативных участков гена праймеры сконструировали вручную, без применения дополнительных программ, но строго учитывали все требования конструкции праймеров. Причиной ручного способа выбора праймеров была высокая вариабельность генома вируса ящура. Таким образом, были сконструированы 2 праймера, специфичные к определенным типам вируса ящура (табл.5).

Таблица 5–Характеристика разработанных праймеров

| Название праймеров | Их последовательность | Размер ПЦР продукта |
|--------------------|------------------------------------|---------------------|
| FMD-OF | 5'-CCACTGTTGAGA ACT ACG GTG G -3' | 539 bp. |
| FMD-O R | 5'-CCA AAG AGG CCG GGG GCA GTA-3' | |
| FMD-A F | 5'-TCA GCA GAC CCT GTC ACC ACC -3' | 519bp. |
| FMD-A R | 5'-GCG CAC GAG AAG CTC GTG GA -3' | |

Следующим этапом исследований была проверка достоверности разработанных нами праймеров, наработка вирусного материала и выделение РНК вируса ящура. Из наработанного вирусного материала коммерческим набором американского производства Axugen (AxuPrep TMBody Fluid, Viral DNA/RNA miniprepkit, cat. № AP-MN-BF-VNA-250) в соответствии с наставлением по его применению была выделена РНК вируса ящура.

Для оптимизации условий постановки ПЦР проведена серия предварительных экспериментов, в ходе которых учитывались следующие факторы: температура отжига праймеров, время денатурации, синтеза, концентрация праймеров, ионов магния и количество матрицы. В ходе экспериментов был подобран оптимальный температурный режим ПЦР при проведении амплификаций фрагментов генома вируса ящура.

Далее с применением ПЦР с обратной транскрипцией и с помощью ревертазы (обратной транскриптазы) проведен синтез одноцепочечной молекулы ДНК (кДНК). В итоге к РНК вируса ящура с помощью обратной транскрипции была достроена комплементарная ДНК (кДНК) вируса ящура.

Для последующей работы с выделенным ДНК рассчитали состав и соотношение реакционной смеси к ПЦР микс с использованием разработанных праймеров. Экспериментами было установлено, приготовленная реакционная смесь по всем компонентам и их совместимости отвечали требованиям для

постановки ПЦР микс. Реакционная смесь была использована в последующей стадии ПЦР – амплификации.

Для специфичности амплификации важным условием является выбор температуры отжига праймеров, продолжительность и количество циклов. Были отработаны экспериментально названные признаки и их параметры. С использованием оптимальных параметров времени и температур для всех стадий амплификации был разработан режим постановки ПЦР (табл.6).

Таблица 6 - Температурный режим амплификации фрагментов генома вируса ящура

| Стадии амплификации | Температура | Время | Количество циклов |
|-----------------------|-------------|--------|-------------------|
| Начальная денатурация | 94°C | 1 мин | 1 |
| Денатурация | 94°C | 30 сек | 36 |
| Отжиг | 55°C | 45 сек | |
| Элонгация | 72°C | 45 сек | |
| Финальная элонгация | 72°C | 5 мин | 1 |

С целью усиления чувствительности и для сокращения побочных продуктов реакции ПЦР нами дополнительно применен метод "nested" (гнездной) амплификации. В результате получен более четкий рисунок продукта амплификации в агарозном геле.

Детекцию (читку) результатов ПЦР продукта проводили с помощью электрофореза в агарозном геле. Наиболее распространенным для детекции является метод электрофореза, основанный на разделении молекул ДНК по размеру. Учет результатов проводили в геледокументирующей системе BIO-RAD GelDoc XRTM + imagingsystem.

Для детекции полученного ПЦР продукта использовали 2,5% агарозный гель на 1x TAE буфере с бромистым этидием.

По окончании электрофореза гель помещали на фильтр трансиллюминатора, который излучает свет в ультрафиолетовом диапазоне. Энергия ультрафиолета, поглощаемая ДНК в области типа А - 519 и типа О - 539 нм, передается на краситель, заставляя его флуоресцировать в области видимого спектра. Результаты электрофореза учитывали с помощью видеосистемы.

Наличие фрагментов ПЦР продукта в геле длиной 519 п.н. и 539 п.н. свидетельствовало о присутствии РНК вируса ящура типов А (519 п.н.) и О (539 п.н.) в исследуемых пробах (рис.4).

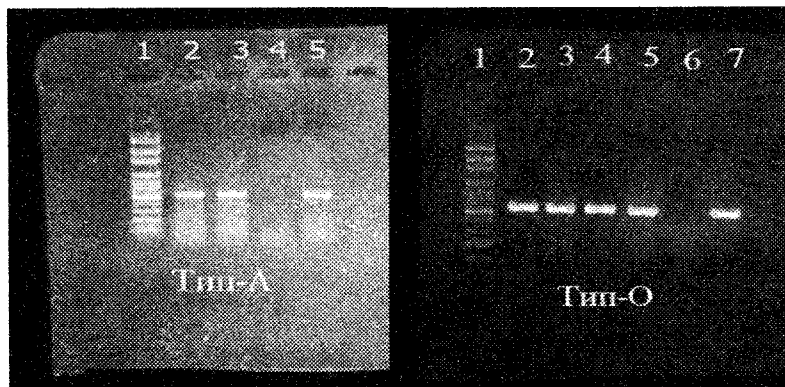


Рис. 4. ПЦР продукт в агарозном геле

Тип-А: 1- маркер.

2, 3- образцы.

4- отрицательный контроль (К⁻).

5-положительный контроль (К⁺).

Тип-О: 1- маркер.

2 по 5- образцы.

6- отрицательный контроль (К⁻).

7- положительный контроль (К⁺).

Для проверки специфичности реакции с подобранными праймерами нами наряду с типами А и О возбудителя ящура были проведены исследования на другие типы вируса ящура.

Однако с помощью разработанных праймеров нами выявлены только типы А и О возбудителя ящура, на другие типы получены отрицательные результаты.

Результаты опытов подтвердили специфичность разработанных нами праймеров, что позволяет использовать их для определения циркулирующих типов возбудителя ящура типов А и О.

Оптимизация параметров постановки полимеразной цепной реакции в Реал тайме (РТ ПЦР). Дальнейшим этапом исследований было изучение достоверности разработанных праймеров в реакции ПЦР РТ. Для этого применительно к ПЦР РТ были оптимизированы состав реакционной смеси и температурно-временные параметры технологических циклов (табл. 7).

Таблица 7 - Температурный режим амплификации фрагментов генома вируса ящура типа А в ПЦР РТ

| Стадии амплификации | Температура | Время | Количество циклов |
|---------------------|-------------|--------|-------------------|
| Удержание | 95°C | 1 мин. | 35 |
| Денатурация | 94°C | 15 сек | |
| Отжиг | 60°C | 20 сек | |
| Элонгация | 72°C | 15 сек | |

Экспериментально установлено, что оба варианта молекулярно-биологических методов ПЦР и ПЦР в реальном времени подтвердили пригодность разработанных праймеров (рис. 5).

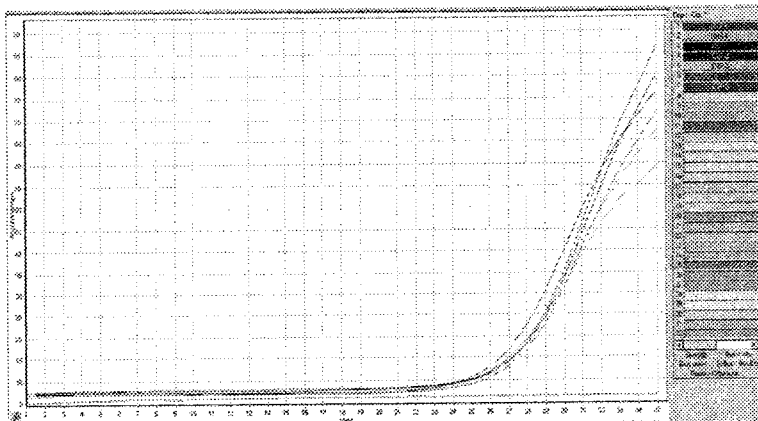


Рис. 5. Характеристика полученного ПЦР продукта в реальном времени

- 1 – отрицательный контроль
 2 – положительный контроль
 3-7 – исследуемые образцы

Следующим этапом исследований являлось изучение молекулярно-генетической характеристики вируса ящура типов А и О. Исследования выполняли методом секвенирования. Для этого определили нуклеотидную последовательность генома вируса типов А, О поэтапно:

- гибридизация изучаемого фрагмента ДНК с праймером;
- ферментативный синтез ДНК;
- денатурация полученных продуктов формамидом;
- электрофорез в геле на четырех дорожках (по числу типов нуклеотидов)

или автоматический анализ результатов.

Реакцию секвенирования выполняли по методу Сенжера с помощью набора BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) согласно рекомендациям производителя.

По результатам секвенирования полученного фрагмента ДНК вируса определили типовую и штаммовую принадлежность вируса.

После обработки результатов секвенирования получили последовательность нуклеотидов вируса ящура типа А и О.

Полученная последовательность нуклеотидов вируса ящура типа «А»:
 GATGGTCGTGGCCTTAATTGCACCAAAGTTGAAAGAGCTGGGTAGCTGTG
 CGGCGACCCGCGCCGCAAGTGACCCAGGTCGCCCCCTTCTACCACCACTA
 GTTGTGGAGTACTTGCTCACTCCGTTGTACACTGTTGCCAACACTCGGTGC
 CGTGCGGTGTAAGGGAGTGCAAGTCTCGTAAATGGCTGTTTGTGGTAGGC
 GGTGGGGTTGCTTGTGTTGGCCAAGGCTTCCACAGGTGCTCCATTGGGCA
 CCCACGTCAAATTGCCATCGTGACGCACCACGATCTCCAGGTGAGAGAAG
 TAGTACGTGGCTGCACGCAAAAAGGGCACCCACCAACGCCTGTTGGTGTGT

TTGCATGAGGTTCGATGACATGCGTGGGGCTCACAGGGTTGATTTTTACAA
ACCTGTCCATGATGAAGCCGACGTCAGTGTGGTGACGCCGCTGAGCCTGT
GTCTCACCACCGTAGTTCTCGACAGTGGTGGTAA.

Полученная последовательность нуклеотидов вируса ящура типа «О»:
TACGGTGGCGAGACGCAGGTCCAGAGACGCCAGCACACGGACGTCTCGT
TCATATTGGACAGATTTGTGAAAGTGACACCAAAAGACCAAATTAATGTG
TTGGACCTGATGCAAACCCCGCCCATACTTTGGTAGGAGCGCTCCTCCG
CACCGCCACCTACTACTTCGCAGATCTAGAGGTGGCAGTGAAACACGAGG
GGAACCTCACCTGGGTCCCGAATGGGGCGCCCGAGACAGCGTTGGATAA
CACCACCAATCCAACGGCTTACCATAAGGCACCCGCTACCCGACTTGCAC
TGCCTTACACGGCACACACCGTGTCTTTGGTACCCTATACAACGGGAAC
TGCAAGTATGGCGAGAGCCACACAACCCAGTGTGAGAGGTGACCTGCAAG
TGTTGGCCCAAAGGCGGCGAGGACGCTGCCTACCTCCTTCAACTACGGT
GCTATCAAAGCTACCCGGGTGACTGAAATGCTTTACCGCATGAAGAGGGC
TGAACATACTG.

Заключительным этапом исследований являлся анализ полученных нуклеотидных последовательностей геномов вируса ящура для построения филогенетического дерева.

Филогенетический анализ полученных ПЦР продуктов был необходим для определения точности проводимых амплификаций и обнаружения РНК возбудителя ящура типов А и О. С применением пакета программ MEGA 6 проведена сборка и множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей продуктов амплификации и построение филогенетического дерева, анализ соответствия нуклеотидных последовательностей.

Результаты секвенирования проверяли через BLAST в информационной базе данных NCBI. Филогенетический анализ вируса ящура типа А выделенного на территории Кыргызстана в 2012 и 2014 годы, показал, что циркулирующие полевые штаммы вируса относятся к линии Iran-05 (рис. 5).

Впервые данная сублиния вируса ящура идентифицирована на территории Ирана в 2003 году. В течение 2005 и 2006 гг. достиг Саудовской Аравии, Иордании, Турции, позже достиг европейской части Фракии. В 2004-2007 гг. он был зарегистрирован в Афганистане и Пакистане (2006-2007 гг.). В 2008 году эта сублиния вызвала вспышки в Турции. В Кыргызстане в 2012 и 2014 гг. был зарегистрирован в единичных случаях. Данные филогенетических исследований показали, что выделенные штаммы относились к этой сублинии. Одним из интересных факторов этой сублинии было то, что Iran-05 по антигенным свойствам отличался от ранее выявленной сублинии Iran-96 на территории Ирана. Это свидетельствует о том, что выявленные штаммы субтипа Iran-05 требуют особого внимания и исследования при разработке вакцинных штаммов, где циркулирует данный субтип.

Исследуя вспышки ящура на территории Кыргызской Республики в разные года, нужно отметить, что все они генетически и серотипически были разными, следовательно, принадлежали к различным серотипам и топотипам. Это

усложняет способы борьбы с данной инфекцией, делает объективно необходимыми филогенетические исследования происхождения и путей заноса вируса ящура.

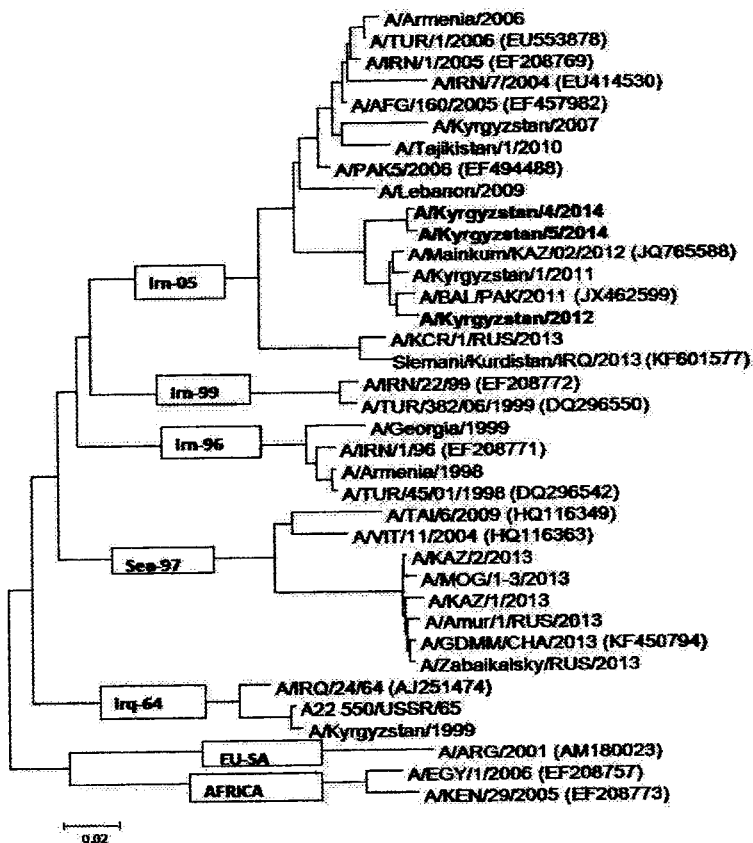


Рис. 5. Филогенетическая характеристика вируса ящура типа А, выявленного на территории Кыргызской Республики.

На представленном рисунке видно, что выделенный на территории республики штамм вируса ящура типа О принадлежит топотипу ME-SA (Средний Восток - Южная Азия). Данный топотип был обнаружен в 1995 году в Малайзии. Позже он был обнаружен на территории Индии, далее на ближнем востоке. Распространение вируса на ближний восток, возможно было связано с вывозом животных из Индии. В 1999-2000 годы этот топотип вновь был обнаружен в юго-восточной части Азии. Занос вируса топотипа ME-SA возможно состоялся через Китай, так как в Китае в эти годы интенсивно развивались внешние и внутренние торговые связи. В результате активных

торговых связей Китая с внешним миром ящура из неблагополучных стран Юго-Восточной Азии распространился до северных территорий Китая, а оттуда был занесен в Кыргызстан (рис.6).

Таким образом, Китай из препятствующего барьера превратился в мост, по которому вирус ящура легко мог распространяться из южных стран в северные и наоборот, достигнув ранее благополучные по этой болезни Корею, Японию, Монголию и Россию. Филогенетический анализ в таких случаях является самым эффективным методом изучения происхождения вирусов. Он может ответить на вопросы, касающиеся источника появления трансграничных инфекций, в том числе ящура. Топотип ME-SA внутри себя имеет множество сублиний: PanAsia, PanAsia-2, Ind2001, Iran2001, PAK98, Branch A и Branch B, который был эндемичен в разные годы в странах Азии.

Разделение на генетические линии вируса ящура показал, что регистрируемый штамм вируса ящура принадлежит сублинии PanAsia-2 внутри топотипа ME-SA. Результаты филогенетических исследований показаны на рисунке 7.

Выделенный изолят по филогенетическим данным попадает в группу PanAsia, в одну из линий ME-SA. Линия PanAsia вытеснила все другие линии, ранее циркулирующие во многих странах мира. Она распространилась по всему миру, за исключением Южной Америки. Впервые линия PanAsia была обнаружена в Индии в 1982 году, до 90-х годов данная линия ящура ограничивалась только территорией Индии. Позже она постепенно продвигалась на север, уже в 1990 году вирус был обнаружен в Непале. В 1997 году линия PanAsia, была идентифицирована во многих странах Азии, в Бутане в 1998 и 1999 годах, Бахрейне, Кувейте, Саудовской Аравии, Сирии, Йемене, Иране и в Ливане в 1998 году, далее в 1999 году в ОАЭ, Израиле и Турции. В 1999 году эта линия распространилась на Китай и страны Юго-Восточной Азии, вызвала вспышки ящура в Таиланде (1999 г.), Малайзии и Лаосе (2000 г.), Вьетнаме (2002 г.). Вирус также вызвал вспышку болезни в Южной Корее и Японии в 2000 году, которые были ранее свободными от ящура. Оттуда и названия PanAsia сокращенно из двух слов Pan от английского слова "pandemic", в переводе означает пандемию и Asia соответственно Азия. Был назван за создания с начала пандемичную ситуацию в странах Азии.

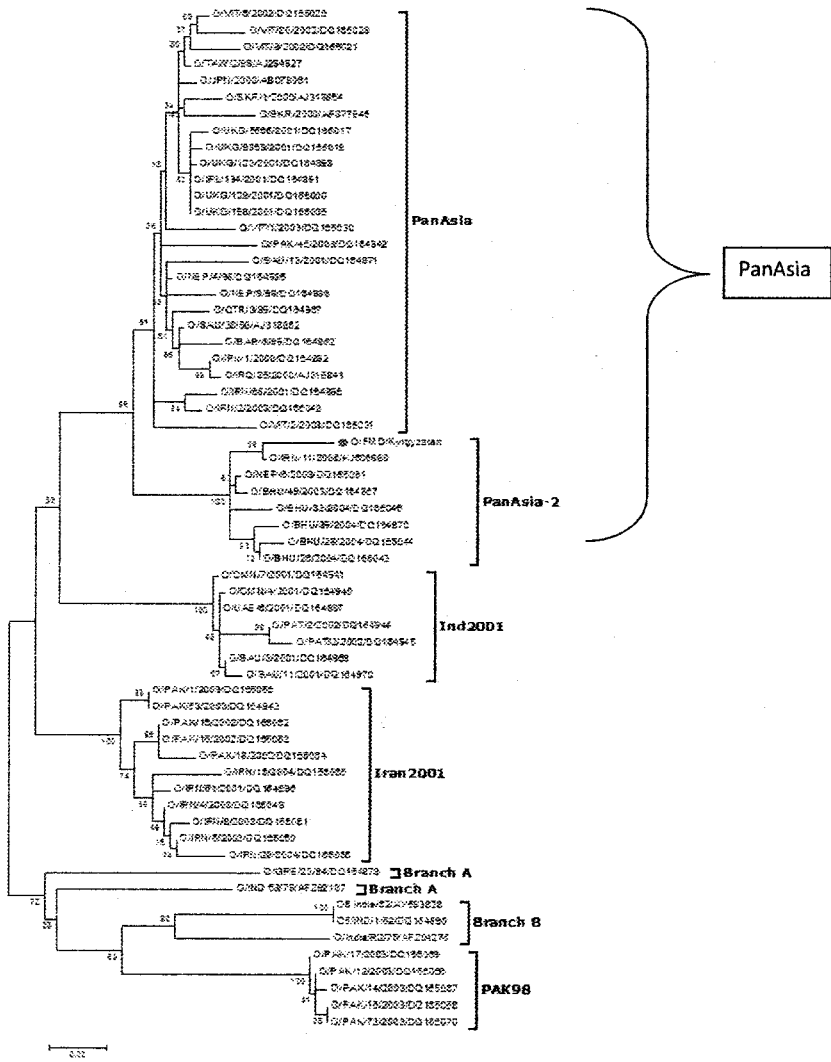


Рис. 7. Филогенетическая характеристика топотипа ME-SA

Примечание: изолят, выделенный на территории Кыргызской Республики, помечен красной точкой в группе сублинии PanAsia-2.

В 2000 году вирус PanAsia был обнаружен в Узбекистане, Монголии, Армении, Грузии и России, а в 2001 году в Кыргызстане, в 2001-2003 гг в Таджикистане. В эти же годы линия PanAsia была обнаружена в африканских и в европейских государствах: Ирландия, Франция, Нидерланды, Великобритания. Как видно на рисунке линия PanAsia имеет две сублинии: PanAsia и PanAsia-2.

Сублиния PanAsia-2 появилась относительно недавно. Данный штамм возбудителя ящура в 2009 году обнаружен в Пакистане, позже в Турции, Израиле, Ливии и Болгарии. В 2010 году впервые был обнаружен в дикой природе (кабан) на территории Болгарии. И штамм, выделенный на территории Кыргызской Республики, филогенетически относится к группе PanAsia-2 (рис. 7). Это подтверждает, что от заноса вируса ящура на свою территорию никакое государство полностью не защищено. Поэтому для борьбы с ящуром необходимы объединенные усилия между соседними странами.

Результаты секвенирования ПЦР продуктов, полученных с помощью разработанных праймеров, также подтверждают достоверность полученных данных. Секвенированные ПЦР продукты действительно относятся к геному вируса ящура. Амплифицированные участки генома вируса относятся к типам А и О вируса ящура. Это доказывает специфичность подобранных праймеров и реакции в целом.

ВЫВОДЫ

1. В результате молекулярно-генетических исследований установлено, что выделенные вирусы ящура принадлежат к типам А и О.
2. Изучены культуральные свойства изолятов в первичных культурах клеток ПК и перевиваемой линии клеток ВНК-21, вирус ящура активнее адаптируется на культуре клеток ВНК-21, ЦПД вируса ящура на ВНК-21 более активное и достигает 70%, биологическая активность культурального вируса - $7,25 \lg \text{ТЦД}_{50/\text{см}^3}$.
3. Впервые в Кыргызской Республике были сконструированы и разработаны 2 праймера, специфичные к циркулирующим КР типам А и О вируса ящура.
4. К разработанным праймерам оптимизирован состав реакционных смесей, отработан температурно-временной режим для ОТ-ПЦР, ПЦР анализа в классическом и ПЦР в реальном времени для выявления геномной ДНК вируса ящура типов А, О.
5. Секвенированием ампликонов и филогенетическим анализом нуклеотидных последовательностей установлено, что вирусы типа А принадлежат к разным серотипам и топотипам и относятся к генетической линии Iran-05. Выделенный штамм типа О принадлежит к топотипу ME-SA.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Диагностическими лабораторными исследованиями установлено, что периодические вспышки ящура на территории республики вызываются вирусами ящура типов А и О. Знание циркулирующих типов вируса облегчит выбор вакцинных препаратов и повысит эффективность профилактических мероприятий.

2. Для диагностики и типизации циркулирующих на территории республики вирусов ящура разработаны высокоспецифичные праймеры. Их применение позволит проводить типизацию вирусов ящура с высокой достоверностью.
3. Внедрение ускоренного и специфичного метода выявления циркулирующих типов вируса ящура с помощью классического метода и в режиме реального времени ПЦР обеспечит более успешную борьбу с данной инфекцией на территории республики
4. Разработаны «Методические рекомендации по типизации вируса ящура типов А, О с применением ПЦР анализа» (утверждены ГИВФБ при Правительстве КР 5 июня 2017 года.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Боронбаева, А.И. Продолжительность поствакцинального иммунитета у овец, привитых вакциной Вр. Rakshaovac Trivalent (Индия). [Текст] / А.И. Боронбаева, Е.Д. Крутская // Вестник Сельскохозяйственной науки // №8, 2013г. Бишкек, С. 92-95.
2. Боронбаева, А.И. Приготовление гипериммунных ящурных сывороток, используемых в диагностических целях. [Текст] / А.И. Боронбаева, Р.З. Нургазиев, Н.К. Султаналиев, Е.Д. Крутская // Вестник Сельскохозяйственной науки // №3, 2008г. Бишкек, С. 177-180.
3. Боронбаева, А.И. Контроль иммунного фона у вакцинированных животных к вирусу ящура. [Текст] / А.И. Боронбаева // Вестник КНУ им. Ж. Баласагына, 2014г., Бишкек, С. 86-88.
4. Боронбаева, А.И. Анализ вспышек ящура в Кыргызской Республике. [Текст] / А.И. Боронбаева, Р.З. Нургазиев, Н.Т. Джапаралиев // Вестник КНУ им. Ж. Баласагына, 2014г., Бишкек, С. 98-107.
5. Боронбаева, А.И. Исследование вирусносительства среди различных видов животных вакцинированных и переболевших ящуром. [Текст] / А.И. Боронбаева, Е.Д. Крутская // Вестник КНАУ им. К.И. Скрябина - Бишкек.- 2015.- № 1 (33) Март 2015. – стр. 34-38.
6. Боронбаева, А.И. Адаптация вируса ящура, выделенного в Чуйской области, на различных культурах клеток. [Текст] / А.И. Боронбаева // Научный журнал «Изденистер, нэтижелер – Исследования и результаты», КазНАУ, №02 (062) 2014 г., г. Алматы, С. 14-18.
7. Боронбаева, А.И. Выявление изолята вируса ящура типа Ос помощью полимеразной цепной реакции. [Текст] / А.И. Боронбаева, Р.З. Нургазиев, Е.Д. Крутская, М. Узакбаева // Вестник КНАУ им. К.И. Скрябина - Бишкек.- 2016.
8. Боронбаева, А.И. Подбор и оптимизация праймеров для типизации вируса ящура типов А, О. [Текст] / А.И. Боронбаева, М.К. Исакеев, А.Т. Мамытова,

- А.Р. Нургазиева // Вестник Алтайского государственного аграрного университета №7 (141), С. 139-143. Алтай. – 2016.
9. Боронбаева, А.И. Оптимизация ПЦР в режиме реального времени для выявления вируса ящура типа О. [Текст] / А.И. Боронбаева, Р.З. Нургазиев, Е.Д. Крутская // Вестник Алтайского государственного аграрного университета №3 (149), 2017. С. 132-136. Алтай. – 2017.
10. «Методические рекомендации по типизации вируса ящура типов А, О с применением ПЦР анализа». – Бишкек. 2017. – 10 с.

Боронбаева Анда Ильичевнанын «Шарп вирусунун А, О типтеринин молекулярдык-генетикалык мүнөздөмөсү» темасында 06.02.02 – ветеринардык микробиология, вирусология, эпизоотология, микология менен бирге микотоксикология жана иммунология адистиги боюнча биология илимдеринин кандидаты даражасын коргоочу диссертациясынын КОРУТУНДУСУ

Негизги сөздөр: шарп вирусу, А, О типтери, изолят, клетка өстүрмөсү, ИФА, ПЧР (полимераздык чынжырлуу реакциясы), ПЧР реалдуу убагындагы режим, секвенатордон өткөзүү.

Изилдөөнүн объектиси: ийримүйүздүү мал, патологиялык материал (мурдунан алынган материал, афтылар).

Изилдөөнүн максаты: шарп вирусун бөлүп алуу жана типизациялоо үчүн спецификалык праймерлерди иштеп чыгуу жана оптимизациялоо, молекулярдык-генетикалык ыкма жана секвенаторду колдонуу менен шарп вирусунун катталган типтеринин генетикалык касиеттерин изилдөө.

Изилдөөнүн ыкмалары: серологиялык, вирусологиялык, молекулярдык-биологиялык.

Алынган натыйжалар жана алардын жаңычылыгы: шарп вирусунун изолятынын А тиби эпизоотия очогуна бөлүнүп алынган. Шарп вирусунун изолятынын А тибинин культуралдык касиеттери КБ жана ВНК-21 өстүрмө клеткаларында изилденген. Кыргыз Республикасында биринчи жолу шарп вирусунун А, О типтерин типизациялоо үчүн праймерлер иштелип чыккан жана конструкцияланган. Шарп вирусунун А, О типтеринин ДНК геномдорун бөлүп алуу үчүн АКТ-ПЧР, ПЧР классикалык анализинде жана ПЧР реалдуу убагындагы реакциялык эритмелердин кошулмасы жана температурдук убакыттын параметрлери оптималдаштырылган.

Колдонуу чөйрөсү: вирусология, биотехнология, ветеринардык тажрыйба.

РЕЗЮМЕ

диссертации Боронбаевой Аиды Ильичевны на тему: «Молекулярно-генетическая характеристика вируса ящура типов А, О»

на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 06.02.02. – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

Ключевые слова: вирус ящура, типы А, О, изолят, культура клеток, ИФА, полимеразная цепная реакция (ПЦР), ПЦР в режиме реального времени, секвенирование.

Объект исследования: крупный рогатый скот, патологический материал (носовые смывы, афты)

Цель работы: разработка и оптимизация видоспецифических праймеров для выявления и типизации вируса ящура, изучить генетические свойства регистрируемых типов вирусов ящура с применением молекулярно-генетических методик и секвенирования.

Методы исследования: серологические, вирусологические, молекулярно-биологические.

Полученные результаты и их новизна. Из очагов эпизоотии выделен изолят вируса ящура типа А. Изучены культуральные свойства изолята вируса ящура типа А в культурах клеток ПК и ВНК-21. Впервые в Кыргызской Республики разработаны и сконструированы праймеры для типизации вируса ящура типов А, О. Оптимизированы состав реакционных смесей и температурно-временные параметры ОТ-ПЦР, ПЦР анализа в классическом и ПЦР в реальном времени, для выявления геномной ДНК вируса ящура типов А, О.

Область применения: вирусология, биотехнология, ветеринарная практика.

SUMMARY

Boronbaeva Aida Ilyichevna dissertation on the theme: "Molecular genetic characteristic of foot and mouth disease virus of types A, O" for the degree of candidate of biological sciences in specialty 06.02.02. - Veterinary microbiology, virology, epizootology, mycology with mycotoxicology and immunology

Key words: foot and mouth disease virus, types A, O, isolate, cell culture, ELISA, polymerase chain reaction (PCR), real-time PCR, sequencing.

Object of research: cattle, pathological material (nasal washings, aphthae).

Objective: development and optimization of species-specific primers for detection and typification of foot-and-mouth disease virus, to study the genetic properties of registered types of foot and mouth disease viruses using molecular genetic techniques and sequencing.

Methods of investigation: serological, virological, molecular-biological.

The results obtained and their novelty. From the outbreaks of the epizootic, the isolate of foot and mouth disease virus type A was isolated. The cultural properties of the virus isolate of foot and mouth disease type A in cultures of cells of PC and BHK-21 were studied. For the first time in the Kyrgyz Republic, primers have been designed and constructed to typify the foot and mouth disease virus types A, O. The composition of reaction mixtures and the temperature-time parameters of RT-PCR, PCR analysis in classical and PCR in real time, for genomic DNA detection of foot and mouth disease virus types A, O were optimized.

Field of application: virology, biotechnology, veterinary practice.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'B. K. K.', is centered on the page.

Боронбаева Аида Ильичевна

**«МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
ВИРУСА ЯЩУРА ТИПОВ А, О»**

Объем 1,5625 уч.изд.л.
Тираж 100 экз. Заказ № 140

Типография ОсОО «Алтын Тамга»
720000, г. Бишкек, ул. Орозбекова, 44
Тел.: (+996 312) 62-13-10
e-mail: altyntamga@mail.ru

