

АННОТАЦИЯ

**диссертационной работы Садуакасовой Меруерт Акберовны
на тему «Разработка геномных тест-систем для идентификации и
индикации топотипов вируса ящура, циркулирующих в странах
Центральной Азии, представляющих угрозу Республике Казахстан»
представленной на соискание степени доктора философии (PhD)
по специальности 6D120100 – «Ветеринарная медицина»**

Актуальность темы исследования. Животноводство является ключевым сектором агропромышленного комплекса Республики Казахстан, играющим стратегическую роль в обеспечении продовольственной безопасности, развитии экспортного потенциала и устойчивости сельских территорий. В 2024 году производство мяса в убойном весе достигло 1,2 млн тонн, что на 4,3 % превышает показатели предыдущего года. Объёмы переработки мяса крупного и мелкого рогатого скота увеличились на 17 %, составив 270 тыс. тонн. В первом квартале 2025 года экспорт говядины и баранины из Казахстана удвоился по сравнению с аналогичным периодом 2024 года. Основными направлениями поставок стали Узбекистан, Объединённые Арабские Эмираты и Иран, что свидетельствует о росте конкурентоспособности отечественной мясной продукции на внешних рынках.

Однако дальнейшее устойчивое развитие отрасли невозможно без обеспечения эпизоотического благополучия, особенно в отношении особо опасных трансграничных инфекций, к числу которых относится ящур. Даже единичная вспышка данного заболевания может привести к значительным экономическим потерям, ограничению экспорта и подрыву доверия к ветеринарному контролю со стороны международных партнёров. Актуальность данной проблемы особенно высока для Казахстана, расположенного на перекрёстке интенсивных торгово-логистических и миграционных маршрутов, соединяющих страны Центральной Азии, где продолжают циркулировать различные генетические линии вируса ящура (FMDV).

Генетическая изменчивость циркулирующих штаммов FMDV существенно затрудняет эпизоотологический мониторинг, молекулярную диагностику и выбор эффективных вакцинных штаммов. В этих условиях крайне важным становится наличие высокоспецифичных и чувствительных методов быстрой индикации и точной идентификации генетических вариантов вируса, особенно тех, которые могут быть занесены на территорию Казахстана из сопредельных государств.

Обеспечение эпизоотического благополучия и поддержание статуса территории, свободной от ящура, требует внедрения современных подходов к раннему выявлению инфекции и молниеносной диагностике. Применение молекулярно-генетических методов, в частности, разработка и использование геномных тест-систем в режиме ОТ-ПЦР (real-time RT-PCR), становится

одним из ключевых направлений в реализации стратегии профилактики, контроля и ликвидации ящура в регионе.

В странах Центральной Азии, включая Казахстан, циркулируют серотипы вируса ящура О, А и Asia1. Подтипы этих серотипов демонстрируют значительное внутрисеротипическое генетическое разнообразие, что требует применения методов молекулярной дифференциации. Наиболее надёжным методом остаётся секвенирование участка VP1 и последующий филогенетический анализ, однако большинство ветеринарных лабораторий региона не располагает необходимыми ресурсами специализированным оборудованием, биоинформационной инфраструктурой и квалифицированным персоналом для систематического проведения таких исследований.

В ответ на данный вызов была разработана серия высокоспецифичных геномных тест-систем формата ОТ-ПЦР для выявления и идентификации топотипов/генетических линий FMDV, циркулирующих на территории Азии. В рамках работы были созданы и валидированы 8 тестов, нацеленных на генетические линии O/ME-SA/PanAsia–PanAsia-2, O/ME-SA/Ind-2001, O/SEA/Mya-98, O/CATHAY, A/ASIA/Iran-05, A/ASIA/G-VII, Asia1/Sindh-08/06 и A/ASIA/Sea-97 вируса ящура.

Тест-системы валидированы на обширной коллекции положительных образцов различных типов (эпителий, орофарингеальная жидкость, культуральные супернатанты). Полученные результаты продемонстрировали высокую аналитическую чувствительность (точность свыше 96,5 %) и специфичность (100 %), при полном отсутствии перекрёстной амплификации между различными линиями.

Таким образом, созданные геномные тест-системы существенно расширяют инструментарий эпизоотического мониторинга и позволяют оперативно принимать управленческие решения при выявлении и распространении очагов ящура. Кроме того, их использование позволяет обоснованно подбирать штаммы для вакцинации с учётом актуальной молекулярной эпизоотической картины, что имеет важнейшее значение для повышения эффективности профилактических мероприятий в условиях Центральной Азии.

В связи с вышеуказанной актуальностью, **целью диссертационного исследования явилась:** разработка геномных тест-систем для индикации и идентификации топотипов вируса ящура, циркулирующих в странах Центральной Азии и угрожающих эпизоотическому благополучию Республики Казахстан. В соответствии с поставленной целью в рамках диссертационной работы были определены следующие задачи:

- Изучить молекулярно-генетические особенности вирусов ящура, циркулирующих на территории стран Азии, на основе анализа последовательностей гена VP1;
- Отобрать прототипные изоляты и репрезентативные нуклеотидные последовательности, характерные для отдельных топотипов и генетических линий вируса ящура;

- Разработать топотип-специфичные олигонуклеотиды (праймеры и флуоресцентные зонды) для проведения амплификации в формате ОТ-ПЦР-РВ, направленной на дифференциацию FMDV по топотипам и генетическим линиям;
- Провести оптимизацию и валидацию диагностических тест-систем ОТ-ПЦР в режиме реального времени для индикации и идентификации вируса ящура по ключевым топотипам;
- Оценить чувствительность и специфичность разработанных геномных тест-систем, включая перекрестную реактивности между генетическими линиями;
- Сравнить диагностическую эффективность разработанных геномных тест-систем с универсальной 3D rRT-PCR тест-системой, используемой для индикации вируса ящура.

Методы исследования. Применялись методы молекулярной биологии (ОТ-ПЦР-РВ, дизайн праймеров и зондов), вирусологии (выделение и анализ эпителиальных проб, орофарингеальной жидкости, культуральных супернатантов), биоинформатики (множественное выравнивание, филогенетический анализ), а также сравнительный статистический анализ чувствительности и специфичности тест-систем.

Обоснование новизны и важности полученных результатов

Научная новизна диссертационной работы заключается в разработке комплекса диагностических тест-систем на основе обратной транскрипции с полимеразной цепной реакцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ, real-time RT-PCR), предназначенных для одновременной индикации и идентификации топотипов вируса ящура, циркулирующих в странах Центральной Азии.

В отличие от широко применяемого пан-серотипного 3D-теста, который используется в международной практике в качестве «золотого стандарта» для индикации РНК вируса ящура независимо от серотипа, разработанные в данной работе геномные тест-системы обеспечивают не только подтверждение присутствия вируса, но и типоспецифическую идентификацию наиболее эпизоотически значимых топотипов и генетических линий (O/ME-SA/PanAsia–PanAsia-2, O/ME-SA/Ind-2001, O/SEA/Mya-98, O/CATNAY, A/ASIA/Iran-05, A/ASIA/G-VII, A/ASIA/Sea-97, Asia-1/Sindh-08).

При конструировании тест-систем в качестве мишени использован участок гена VP1, характеризующийся высокой степенью вариабельности и определяющий серотипоспецифичность вируса. Такой подход позволил обеспечить высокую чувствительность и специфичность реакции, исключив перекрёстную амплификацию между линиями. Применение технологии TaqMan-проб позволило повысить точность детекции и исключить ложноположительные результаты, что делает разработанные тесты пригодными для использования в условиях рутинной диагностики и эпизоотического мониторинга.

Разработанные тест-системы прошли сравнительную оценку с универсальным 3D-тестом, что подтвердило их эквивалентную

чувствительность при более высокой разрешающей способности в части типоспецифической дифференциации вируса.

Полученные результаты имеют существенную практическую значимость, так как обеспечивают ускоренную идентификацию источников заражения, контроль циркулирующих топотипов и генетических линий вируса, подбор вакцинных штаммов и, как следствие, повышение эффективности профилактических мер при угрозе заноса ящура на территорию Республики Казахстан.

Практическая значимость подтверждается следующими положениями:

Проведён молекулярно-генетический и филогенетический анализ штаммов вируса ящура, циркулирующих в странах Центральной и Юго-Восточной Азии, что позволило обосновать необходимость создания регионально адаптированных средств диагностики.

Разработан комплекс геномных тест-систем на основе обратной транскрипции с полимеразной цепной реакцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ), обеспечивающих быструю и точную идентификацию и индикацию наиболее актуальных топотипов и генетических линий вируса ящура (O/ME-SA/PanAsia, Ind-2001, SEA/Mya-98, CATHAY, A/ASIA/G-VII, A/ASIA/Iran-05, Asia-1 и др.).

Сконструированные праймеры и зонды направлены на участок VP1, обладающий высокой вариабельностью и определяющий антигенные и филогенетические различия между линиями вируса, что обеспечивает высокую специфичность диагностики.

Проведена сравнительная валидация разработанных тест-систем с универсальной 3D rRT-PCR тест-системой, применяемой в качестве «золотого стандарта» для индикации вируса ящура, что подтвердило высокую диагностическую эффективность и достоверность полученных результатов.

Показана возможность лиофилизации реагентов, что обеспечивает сохранность активности и стабильность тест-систем при хранении и транспортировке без холодовой цепи, а также их применение в полевых условиях и лабораториях с ограниченными ресурсами.

Полученные результаты могут быть использованы для обновления состава вакцинных штаммов с учётом изменяющейся эпизоотической ситуации в регионе и для обоснованного выбора профилактических мер при угрозе заноса возбудителя.

Теоретическая значимость работы заключается в следующем:

На основе анализа нуклеотидных последовательностей обоснованы принципы выбора уникальных генетических мишеней в области гена VP1 для дифференциации топотипов вируса ящура, что дополняет современные представления о молекулярной структуре и филогенетическом разнообразии FMDV.

Полученные данные расширяют научные знания в области молекулярной эпизоотологии и эволюции вируса ящура, способствуя развитию подходов к его молекулярной типизации и контролю.

На основе полученных научных результатов получен патент Республики Казахстан на полезную модель № 2025/0884.2 «Способ диагностики вируса ящура», подтверждающий оригинальность и практическую ценность предложенных решений.

Соответствие направлениям развития науки или государственным программам. Диссертационная работа выполнена в рамках государственной научной программы Министерства сельского хозяйства Республики Казахстан (№ государственной регистрации 0115RK01952), а также при поддержке и финансировании международных партнёров Министерства окружающей среды, продовольствия и сельского хозяйства Великобритании (DEFRA, проекты SE2943 и SE1129) и Совета по биотехнологическим и биологическим наукам Великобритании (BBSRC, проект BB/E/I/00007017).

Тематика диссертационного исследования полностью соответствует национальным приоритетам Республики Казахстан в сфере ветеринарной безопасности, а также международным стратегическим направлениям в области борьбы с трансграничными болезнями животных (Transboundary Animal Diseases, TADs), в том числе:

Целям и задачам Всемирной организации здравоохранения животных (ВОЗЖ) и Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН (ФАО);

Глобальной стратегии контроля ящура - PCP-FMD (Progressive Control Pathway for Foot-and-Mouth Disease);

Концепции укрепления эпизоотического мониторинга и быстрого реагирования на вспышки особо опасных инфекций животных.

Таким образом, исследование носит не только научно-прикладной, но и стратегически важный характер, способствуя реализации международных инициатив в области обеспечения биобезопасности и профилактики трансграничных инфекций.

Апробация работы. Основные положения и результаты диссертационного исследования были представлены на международных и республиканских научных мероприятиях:

на международной научно-практической конференции Европейской комиссии по борьбе с ящуром (**EuFMD**) — «Повышение глобальной безопасности в поставках эффективных вакцин против ящура» (открытое заседание EuFMD, Италия, 2018 г.);

на V Международной конференции молодых учёных: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов (АНО «Кольцово инновационный центр», Новосибирск, 2018 г.);

на Международной конференции-симпозиуме «Астана Биотех 2018» г. Астана, 2018 г.;

доклад результатов диссертационной работы в Институте Пирбрайт (The Pirbright Institute, Великобритания).

По результатам выполненного диссертационного исследования опубликовано 18 научных работ, в том числе:

- в научных периодических изданиях, рекомендованных ККСОН МОН РК:
- «Ізденістер, нәтижелер. Исследования, результаты» (Алматы, 2017);
- «Ғылым және білім», научно-практический журнал Западно-Казахстанского аграрно-технического университета им. Жангир хана (Уральск, 2019);
- «Қазақстан жоғары мектебі», научно-педагогический журнал (Алматы, 2018);
- в международных рецензируемых научных журналах:
- Journal of Virological Methods (Нидерланды, 2018; статья: Development and evaluation of a novel real-time RT-PCR to detect foot-and-mouth disease viruses from the emerging A/ASIA/G-VII lineage) - индексируется в **Web of Science**;
- Frontiers in Veterinary Science (Швейцария; статья: Establishing a molecular toolbox of lineage-specific real-time RT-PCR assays for the detection and characterisation of foot-and-mouth disease viruses circulating in Asia) - международный, рецензируемый журнал с открытым доступом, индексируемый в **Web of Science**.

Личный вклад соискателя и благодарности. Диссертационная работа выполнена автором самостоятельно, с использованием полученных им научных результатов и экспериментальных данных. Автор выражает искреннюю благодарность команде Всемирной референтной лаборатории по ящуру (WRLFMD) за оказанную научную и методическую помощь, а также за предоставленную возможность проведения исследований на базе данной лаборатории. Особая признательность выражается Султанову Ахметжану Акиевичу, руководителю программы целевого финансирования Министерства сельского хозяйства Республики Казахстан, за поддержку и содействие в реализации исследований. Искренне благодарю научного консультанта, доктора ветеринарных наук, профессора Кутумбетова Леспека Бекболатовича за ценные научные советы и поддержку. Особая благодарность зарубежному научному консультанту Ph.D доктору Дональду Кингу, а также Катажине Бачанек-Банковска за профессиональное руководство, помощь в проведении лабораторных исследований и плодотворное сотрудничество.

Объём и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 131 страницах компьютерного текста и содержит 27 таблиц, 21 рисунок и состоит из следующих разделов: введение, выбора направления исследований, материалы и методы исследования, результаты собственных исследований, заключение, список использованных источников, включающий 157 наименования.