

Абишева Айгерим Кенжебаевна 6D120100 –«Ветеринариялық медицина» мамандығы бойынша философия докторы (PhD) дәрежесін алу үшін «Жылқы ринопневмониясына қарсы өсіндік вакцина дайындау технологиясы» тақырыбына дайындаған диссертациялық жұмысына

АҢДАТПА

1. Зерттеу тақырыбының өзектілігі

Біздің елімізде жылқы өсіру мал шаруашылығының ішіндегі ежелден ұлттық салаға жатады және ол қазір дамудың жаңа сапалы кезеңінде тұр: асыл тұқымды қымбат жылқылар өсіріледі, қолданылатын және тұқымы асылдандырылған жылқылардың саны артып келеді.

Жылқы басын көбейтуге және оның өнімін өндіруді арттыру үшін осы саланың дамуын тежейтін факторларға қарсы шараларды бірінші кезекке қояды әсіресе негізгі орында инфекциялық індеттер атап айтқанда жылқының ринопневмониясы.

Жылқы ринопневмониясы - биенің буаздығының екінші жартысында іш тастаумен, жас құлынның тыныс жолдарының жіті қабынуымен ерекшеленетін аса жұқпалы індет. Індетке жылқы тұқымына, жынысына, жасына қарамай шалдығады. Әйтсе де төл сезімтал келеді. Таза қанды асыл тұқымды жылқылар жиі ауырады, ал жергілікті жылқылар төзімдірек келеді. Басқа жануарлардан есек, қашар және пони ауырады.

Індет қоздырушысының бастауы ауырған, жасырын кезеңдегі және вирус алып жүретін жылқылар. Ринопневмонияның вирусы індет жылқының қанында, танаудан аққан сорада болады да, жануар пысқырған кезде аэрозоль ретінде ауаға тарайды. Буаз биенің шаранасында вирус мол шоғырланады да, іш тастаған кезде сыртқы ортаға бөлінеді. Іштастаған төл, шу және шарана негізгі індет көзі болып табылады. Вирустың айғыр шәуітімен берілетіндігі толық дәлелденген жоқ.

Індет Америкада, Еуропада, ТМД елдерінде, соның ішінде Қазақстан Республикасында кең таралған.

Бұл індет кезінде шаруашылық жүргізуші субъектілерне айтарлықтай экономикалық шығын келтіріледі, ол құлындардың және асыл тұқымды жылқылардың арасында өлім-жітім артады, шаруашылықта ветеринариялық-санитариялық іс-шараларды жүргізуге кететін шығындардан тұрады.

Егер шаруашылықта буаз биелер бар болса, ринопневмонияның әсерінен іш тастауы мүмкін, ал індеттің респираторлық түрі болса құлындар мен жас жылқыларда індет респираторлық түрде байқалып, күтімі жақсы болғанда, зілсіз өтеді. Негізінен жоғарғы тыныс жолдары зақымдап, дененің ыстығы шамалы көтеріледі. Кәрі жылқыларда табиғи қалыптасқан иммунитетің әсерінен індеттің бұл түрі сирек байқалады. Індет жануарлардың 90% - на дейін түсік түсіріп, бұл 8-10 айға дейін созылады.

Ринопневмонияның жұғымтал болуына байланысты бұл індеттің алдын-алу індетке қарсы жалпы және арнайы шараларды қатаң сақтауға негізделген. Жылқы ринопневмония вирусының шаруашылыққа кіргізбеу үшін қолайсыз

шаруашылықтардан, сондай-ақ соңғы 2 ай ішінде іш тастаған пункттерден жылқыларды әкелуге тыйым салынады. Барлық келіп түскен жылқылар профилактикалық карантинде 30 күн ұсталады.

Жоғарыда айтылғандарға сүйене отырып біздің зерттеулеріміздің мақсаты, жылқы ринопневмониясына қарсы вирусвакцинаны жасау технологиясын әзірлеу болды.

Жүргізілген зерттеулер нәтижесінде жасуша өсіндісінде өсірілген жылқы ринопневмониясына қарсы құрғақ вирусвакцина-ның эксперименттік үлгілері жасалады және оның иммунобиологиялық қасиеттері сыналды.

2. Диссертациялық зерттеудің мақсаты: Ғылыми зерттеулердің мақсаты жылқы ринопневмониясының қоздырушысының өсіндік және иммуногендік қасиеттерін зерттеу және осы індетке қарсы вакцина дайындау технологиясын әзірлеу.

3. Зерттеудің міндеттері:

- Жылқы ринопневмониясы бойынша індеттанулық зерттеу жүргізу;
- Жылқы ринопневмониясы вирусына әртүрлі алғашқы және тұрақты торша өсінділерінде пассаж жүргізу арқылы сезімталдығын зерттеу;
- Жылқы ринопневмония вирусын үздіксіз пассаж жүргізу арқылы таңдалған торша өсіндісінде белсенді көбеюге бейімдеу және өсірудің ең оңтайлы режимін таңдау;
- Жылқы ринопневмониясына қарсы құрғақ вирусвакцинаның эксперименттік үлгілерін жасау және иммунобиологиялық қасиеттерін сынау;
- Қазақстан Республикасының ветеринариялық практикасында жылқы ринопневмониясын алдын алу үшін вирусвакцинаны қолдану бойынша ұсыныс әзірлеу

4. Зерттеу әдістері:

Жұмыс 2018-2025 жылдар аралығында Қазақ ұлттық аграрлық зерттеу университетінің «Биологиялық қауіпсіздік» кафедрасында және зерттеулердің эксперименттік бөлігі Ғылыми-өндірістік орталық «ДиаВак-АБН» ЖШС зертханасында жүргізілді.

Зерттеу нысандарына ринопневмониямен ауырған жылқының іштастаған төлінен алынған сынамадан бөлініп алынған "АК-2011" штаммы қолданылды.

Жылқы ринопневмония вирусының биологиялық белсенділігі $6,0 \text{ Ig TЦД}_{50/\text{см}^3}$ «АК-2011» штаммының өміршеңдігі бұзау трахеясы, тұрақты өсетін бұзау бүйрегі жасушалары, қой бүйрегі, тұрақты өсетін ірі қара мал бүйрек жасушалары, тұрақты өсетін жасыл маймыл бүйрек жасушалары, тұрақты өсетін сириялық хомяқтың бүйрек жасушалары, пробиркаларда және матрастарда өсірілген жылқы бүйректерінің алғашқы трипсинделген өсіндісінде анықталды.

Вирусты жасуша өсінділерінде дамылсыз жұқтырулар арқылы жүзеге асырылды. Ол үшін жасуша өсіндісі бар матрастардан өсу қоректік ортасы алынып тасталды, тиісті дозада вирустық суспензия енгізілді және моноқабаттың бетін жеңіл тербеліспен өсіндіні сіндіру 37°C -та 1 сағат бойы жүргізілді, содан кейін қалғаны төгіліп тасталды, жұқтырған жасуша

өсіндісінің моноқабатына қолданыстағы қоректік орта құйылды және 37°C-та өсіру жалғастырылды.

Вирустық массаны жинау моноқабат бойынша цитопатогендік әсер анық байқалу кезінде немесе тәжірибенің мақсатына байланысты жұқтырудан кейін тиісті уақытта жүргізілді. Ол үшін ыдыстардағы жасушалардың өсіндісі минус 20°C-та мұздатылып, бөлме температурасында ерітіліп, қатты шайқалып 200-300 мл-ден 0,5 л бөтелкелерге құйылды және минус 20°C-та жұмыста қолданғанға дейін мұздатылған күйде сақталды.

Вирусы бар жасушалық сұйықтықтағы вирустың титрі бастапқы трипсинделген жылқы бүйрегі немесе бұзау трахеясы пробиркалық өсінділерінде титрлеу арқылы анықталды. Ол үшін зерттелетін суспензиядан он есе сұйылтылту (10^{-1} - 10^{-7}) қолданыстағы қоректік ортасында дайындалды және әрбір сұйылту 1 см³ дозада 4-6 пробиркалық жасуша өсіндісіне жұқтырылды.

Вирустың цитопатогендік белсенділігі, цитопатогендік әсерлердің даму қарқындылығы басталу уақыты және жинақталған вирустың титрі бойынша бағаланды. Барлық пробиркалар (матрастар) жасуша жұқтырылғаннан кейін цитопатогендік әсерлер микроскопты шамалы ұлғаютумен күн сайын зерттеліп, вирус жұқтырған жасуша өсінділерін бақылаумен салыстырылды. Вирустың титрі Ридамен Менча әдісімен есептелді.

«АК-2011» вирустық штаммының молекулалық-генетикалық қасиеттерін растау мақсатында ПТР – талдау жүргізілді. Зерттелетін штаммның вирустық ДНҚ-сын оқшаулау QIAGEN коммерциялық жиынтығының көмегімен жүргізілді. Бөлініп алынған ДНҚ күшейту үшін Gene Amp PCR 9700 амплификацисы қолданылды.

Амплификация реакциясы 50 мкл-да жүргізілді, оның ішінде буфердің 5 мкл 10 x ПТР (Qiagen, USA), 1 μ L 10 mM dNTP (NEB, USA), 0.5 μ L ДНҚ (100 ng/ μ L), 1 μ L праймермен seeH-F 5'-AGC ATG ATT CTA ACT TAA TTG AAG CCG -3' (20 pmol/ μ L) seeH-R 5'-TAG CAT GCT ATT AAA GTC TCC ATT GCC-3', и 0.25 μ L (1.25 Units) Taq DNA полимерасы (Qiagen, USA). Амплификации шарттары 95°C - 5 мин; 20 циклов: 95°C - 20 с, touchdown 60°C (-0,5) – 20 с, 72°C - 30 с; 20 циклдар: 95°C - 20 с, 50°C – 20 с, 72°C - 30 с; 72°C - 7 мин.

Тізбектеу MiSeq Reagent v. 3 (Illumina, АҚШ) жиынтығының көмегімен "MiSeq" (illumina, АҚШ) жаңа буындағы секвенаторында жүргізілді.

Тізбектеу нәтижесінде алынған биоақпараттық талдауы Geneious 11.0 (Biomatters, Жаңа Зеландия) компьютерлік бағдарламасын пайдалана отырып жүргізілді.

GenBank-тен нуклеотидтер тізбегі бар реттелген гендерді туралау және филогенетикалық талдау MEGA 6.0 компьютерлік бағдарламасы арқылы 500 үлгіге негізделген максималды ықтималдылық әдісімен жүргізілді, GTR үлгісі.

Әзірленген вакцинаның апробациялау: сыртқы түрін, түсін, бөгде қоспаның, зеннің, құтылардың жарылмауы, тығынның беріктігін және таңбалаудың дұрыстығын, препараттың вакуумының болуын, сутегі иондарының, қайта суспензиялану уақыты мен концентрациясын, ылғалдың массалық үлесін, стерильділікті, биологиялық белсенділікті, қояндар мен ақ

тышқандардағы зиянсыздығын, қоян және жылқыда вирусвакцинасының иммуногендігін анықтау арқылы жүргізілді.

Жылқы ринопневмониясының қоздырғышына қарсы телімді антиденелердің деңгейі комплементті байланыстыру реакциясы және иммуноферменттік талдау әдістерінде бекітілген нұсқау бойынша анықталды.

5. Диссертация қорғауға ұсынылатын негізгі ережелер.

–Қазақстан бойынша жылқы ринопневмониясының індеттік жағдайы.

–жүргізілген тәжірибелік жұмыстардың нәтижесінде негізгі биологиялық және молекуло-генетикалық қасиеттері зерттеліп, жылқы ринопневмониясына қарсы вакцина жасауға үміткер «АК-2011» жылқы ринопневмониясы вирусының авирулентті штаммы алынды.

–жылқы ринопневмониясы вирусына әртүрлі алғашқы және тұрақты көбейетін торша өсінділерінде үздіксіз пассаж жүргізу арқылы сезімталдығы зерттеліп, таңдалған жасуша өсіндісінде белсенді көбеюге бейімделді және тұрақты жоғары белсенді вирустық массаны алуға мүмкіндік беретін вирусты өсірудің ең оңтайлы режимі таңдалды;

–жылқы ринопневмониясына қарсы құрғақ вирусвакцинаның эксперименттік үлгілері жасалып және иммунобиологиялық қасиеттері сыналды;

–Қазақстан Республикасының ветеринариялық практикасында алдын алу үшін жылқы ринопневмониясына қарсы вирусвакцинаны қолдану бойынша ұсыныс әзірленіп, өндіріске ұсынылды.

6. Зерттеудің негізгі нәтижелерінің сипаттамасы

Эпизоотологиялық деректерді талдау нәтижесінде 2011-2025 жылдары жылқы ринопневмониясының таралу көрсеткішінің өскенін көрсетеді. Осы уақытта Республиканың 10 облысының аумағы жылқы ринопневмониясы бойынша қолайсыз болып табылды: Ақтөбе, Жамбыл, Алматы, Шығыс Қазақстан, Солтүстік Қазақстан, Атырау, Қарағанды, Қостанай, Ақмола және Павлодар облыстары. Жылқы ринопневмониясынан Батыс Қазақстан, Маңғыстау, Қызылорда, Ұлытау, Жетісу, Абай және Түркістан облыстары індеттен сау өңірлер болып саналады, олардың аумағында 2011-2022 жылдары індет тіркелмеген.

«АК-2011» вирустық штаммының геномдық сипаттамалары бойынша вирус 1963 жылы Германияда сипатталған RasL11 штаммымен 99,9% - ға ұқсас болды.

RasL11 референстік штаммының геномы 147 469 нуклеотидтен тұрды, ал ринопневмония вирусының геномында ORF67 ақуызды кодтайтын аймақта бірқатар делециялар анықталды. Аталған делециялардың вакциналық мақсатта жабайы штаммды аттенуациялау үшін жасанды жолмен енгізілуі мүмкін екені болжанады.

Қазақстан аумағында бөлініп алынған вирус эволюциялық өзара байланыстарды анықтауда кеңінен қолданылатын ORF68 гені бойынша АҚШ-та және Австралияда сәйкесінше бөлінген T-953 және 2222-03 штаммдарымен филогенетикалық тұрғыдан ең жақын екені анықталды. Бұл деректер зерттелген штаммның халықаралық циркуляциядағы вирустық изоляттармен

тығыз генетикалық байланыста екенін көрсетеді. Ринопневмония вирусының көбеюін үздіксіз қамтамасыз ететін ең сезімтал бастапқы және үздіксіз өсетін жасуша өсінділеріне: ТТ, ПТ-80, ПО, ДБК, VERO және ВНК-21 скрининг жүргізілді. Жылқы ринопневмониясы вирусын оңтайлы өсіру жағдайларын пысықтау барысында, 2–3 тәулік ішінде 37 °С температурада инкубациялау және жұқпалы дозаны 0,01-ден 1,0 ТЦД₅₀/см³ дейін өзгерту арқылы ТТ жасуша өсіндісінде вирустың жоғары деңгейде жинақталуы қамтамасыз етілді. ТТ жасуша өсіндісінде вирус титрі 1-пассаждан бастап біртіндеп артып, 6,00 lg ТЦД₅₀/см³ деңгейіне дейін жетіп, тұрақты түрде жоғары көрсеткіштер сақталды. Жүргізілген зерттеулер нәтижесінде ең белсенді вирустық материалдардың дәл осы ТТ жасуша өсіндісінде алынғаны анықталды. Осыған байланысты, бұл өсінді вирусқа ең сезімтал және оңтайлы репликациялық орта ретінде сипатталды.

7. Алынған мәліметтердің жаңалығы мен маңыздылығын негіздеу

Жылқы ринопневмониясы елімізде жеке және жылқы шаруашылықтарында тіркелді. Қазіргі уақытта Ресей аймақтарынан ТМД мемлекеттерінен және бірқатар Еуропа елдерінен әкелінетін жылқылардың біртіндеп өсу тенденциясы байқалады. Бұл ретте қолайсыз елдерден жылқылардың ринопневмониясын әкелу қаупі бар. Жылқы санының көбеюі және көрші елдерден импортты дамыту ринопневмония індеті бойынша жағдайды бақылауды күшейту қажет етеді.

Жүргізілген тәжірибелердің нәтижелері жылқылардың ринопневмония вирусының «АК-2011» штаммына сыналған жасуша өсінділерінің ішінен ТТ жасуша өсіндісіне ең сезімтал, әрі жоғары титр көрсеткен жалғыз жүйе болып анықталды. Осы жасуша өсінділеріндегі вирустың көбеюі қатарынан жалғасымды он пассаж жүргізілгенде тұрақты болып қалды.

Жүргізілген зерттеулер нәтижесінде жылқы ринопневмония вирусының «АК-2011» өндірістік штаммының инфекциялық белсенділігі (5,75±6,00) lg ТЦӨ₅₀/см³ құрайтын өсінділік вирустық сұйықтықты алу үшін мынадай шарттардың маңызды екенін көрсетті:

- Инфекцияның мөлшері 0,1–0,5 ТЦӨ₅₀/мл шегінде болуы тиіс;
- ТТ жасуша өсінділерінің концентрациясы 150–200 мың кл/мл болуы қажет;
- Мұндай жағдайда моноқабат 40–72 сағат ішінде қалыптасады, және дәл осы кезеңде ең жоғары вирус титрі – 5,25–6,0 lg ТЦӨ₅₀/мл деңгейінде анықталады.

Бұл жұмыс шеңберінде вирусвакцинаның тәжірибелік үлгілерін дайындау, оларды өндірістік деңгейде өндірудің негізгі технологиялық сатыларын пысықтау және дайын өнімнің иммуногенділігі мен қауіпсіздігін кешенді түрде бағалау жоспарланған.

Вакцинаны дайындаудың технологиялық үрдісі екі кезеңнен тұрды:

I - Вирустың матрикстік сериясын алу, II-Вакцинаның өндірістік сериясын алу.

Иммуногенділік – вакцинаның ағзада иммундық жауап тудыру қабілеті. Иммунитеттің басталу уақыты – вакцинациядан кейін белгілі бір уақыт өткен

соң иммундық жауаптың пайда болуы; бұл көрсеткіш вакциналық әсердің жеделдігін сипаттайды.

Вирусвакцинанан дайындаудың технологиялық үрдісі биологиялық қасиеттерін зерделегеннен кейін жылқы ринопневмониясына қарсы вакцина әзірлеуге кірісіп және «RinoVac» деген атаумен ары қарай апробациялық сынақтар жүргізілді.

Жылқы ринопневмониясына қарсы әзірленген вакцинасының эксперименттік серияларының сапасы келесі көрсеткіштер: бактериялық (вакцина құрамында бактериялық ластанудың бар-жоғын анықтау), зең және микоплазмалық ластану, стерильділік, зиянсыздық және ареактогенділік бойынша бағаланды.

Вирусвакцинанан бұлшық етке 2 см³ көлемінде қолдану иммундық жауаптың күшеюіне мүмкіндік береді. Сынақтағы жануарларға 90 күннен кейін ревакцинация (қайта егу) жүргізілді, ол бастапқы иммундық жауапты күшейту және ұзақ мерзімді қорғанышты қамтамасыз ету мақсатында жүзеге асырылады, бұл вакцинаның иммуногенділігін арттыруға ықпал етеді.

8. Ғылыми даму бағыттарына немесе мемлекеттік бағдарламаларға сәйкестігі:

Диссертациялық жұмыс мал ауруларының алдын алу шараларын күшейту, вакцинациялау және диагностикалау жүйесін жетілдіру, мал шаруашылығы өнімдерінің қауіпсіздігін қамтамасыз ету және ветеринариялық биотехнологияның дамуының басым бағыттарына сәйкес келеді.

«Мемлекеттік сатып алу туралы» 2015 жылғы 4 желтоқсандағы Қазақстан Республикасы Заңының (бұдан әрі – Заң) және «2024-04-24» жыл № 11983185-1 «Аукцион (с 2022)» мемлекеттік сатып алудың қорытындылары негізінде осы тауарларды мемлекеттік сатып алу туралы шартты.

9. Докторанттың әрбір басылымды дайындауға қосқан үлесін сипаттау

Диссертациялық жұмыс материалдары бойынша 7 ғылыми жұмыс, оның ішінде 1 мақала Scopus Q1, процентиль 99), базасына кіретін «Transbound Emerg Dis.» журналында жарияланған, 3 мақала - Қазақстан Республикасы Ғылым және жоғары білім министрлігінің Ғылым және жоғары білім саласындағы сапаны қамтамасыз ету комитеті ұсынған журналдарда, 4 мақала - халықаралық конференциялар, конгрестер мен симпозиумдар материалдарында.

10. Диссертацияның көлемі және құрылымы

Диссертация компьютерлік мәтіннің 104 бетінде ұсынылған, 17 кесте мен 23 суреттен тұрады. Келесі бөлімдерді қамтиды: кіріспе, ғылыми әдебиеттерге шолу, зерттеу материалдары мен әдістері, эксперименттік бөлім, қорытындылар және пайдаланылған әдебиеттер тізімі, оның ішінде 228 дереккөз.