

Базарбаев Рыскелди Кантореевичтің 6D120100 –«Ветеринарлық медицина» мамандығы бойынша философия докторы (PhD) ғылыми дәрежесін алу үшін «Құстың жұқпалы бронхиті және Ньюкасл ауруына қарсы поливалентті инактивтелген вакцина дайындауға қолданылатын вирустар штамдарының сипаттамасы» тақырыбына дайындаған диссертациялық жұмысына

АНДАТПА

1. Зерттеу тақырыбының өзектілігі

Құс шаруашылығы – тек Қазақстанда ғана емес, бүкіл әлемде халықты арзан және диеталық ақуызды азық-түлік өнімдерімен қамтамасыз етуге қабілетті ауыл шаруашылығының ең қарқынды дамып келе жатқан саласы. Бұл өндірісте құстар балапанының өсу қарқынның жоғары болуымен және бір мезгілде жоғары жемшөп конверсиясымен байланыстылығы құс шаруашылығын аграрлық мал шаруашылығының барлық салалары арасында ең табысты етеді. Етті бағыттағы құс өсірудің осындай ерекшеліктері елімізде құс фабрикаларының көбеюіне және олардың санының өсуіне ықпал етеді. Дегенмен, Қазақстанда құс шаруашылығының рентабельділік деңгейін төмендететін бірқатар факторлар әлі де бар. Мұндай тежеуші факторларға өсіп келе жатқан балапандарға арналған импорттық азық қоспаларының бағасының жоғары болуы, құстардың негізгі азығы болып табылатын дәнді дақылдардың қымбаттауы сияқты басқада азықтың және технологиялық себептер жатады. Бірақ бұлар саладан түсетін пайданы айтарлықтай төмендете алмайды, есесіне ал жаппай өлім-жітімге ұшырататын инфекциялық аурулар Қазақстандағы құс шаруашылығын толығымен жойып жіберуі мүмкін. Осылайша, құс шаруашылығы саласы үшін ең үлкен қауіп – ветеринарлық салада жатыр және бұл жоғары жұқпалы инфекциялық аурулардың таралуын үнемі бақылауды және олардың алдын алуды талап етеді.

Өндірістік құс шаруашылығындағы биоқауіпсіздіктің негізгі аспектілерінің бірі – серологиялық зерттеулер арқылы, құстың қан сарысуында телімді антиденелердің титрлерін анықтай отырып құстардан арасында вирустық аурулардың қоздырушысының таралуына мониторинг жүргізу болып табылады. Әдеби дереккөздерін талдау барысында Қазақстанда құстың Ньюкасл ауруы, жұқпалы бронхиті және тұмау сияқты вирустық ауруларының кең таралғаны анықталды. Ауылшаруашылық құстардың арасында инфекцияның енуі мен таралуының бірден бір жолы Қазақстанда бұл сала тұрақты дамуы үшін шетелден асыл тұқымды құстарды белсенді түрде импорттау, сондай-ақ вирус ауруларын табиғи қорламасы болып табылатын жабайы құстар.

Вирустардың дифференциацияға ұшырауы, үнемі жаңа түрлері мен генотиптердің пайда болуы вакцина даярлау мақсатында жергілікті штамдарда бөліп алу және ажыратып балау әдістерін жетілдірудің маңызын арттырады. Бұл арқылы жергілікті құстың жұқпалы ауруларының қоздырушысының генетикалық және фенотиптік өзгергіштігін бақылауға мүмкіндік береді. Жоғарыдағы факторлардың барлығы таңдалған тақырыптың өзектілігін және оның Қазақстандағы құс шаруашылығын дамыту үшін практикалық маңыздылығын көрсетеді.

2. Диссертациялық зерттеудің мақсаты: Қазақстандағы Ньюкасл ауруы мен тауықтың жұқпалы бронхитінің таралуына мониторинг жүргізу, вирусологиялық және серологиялық әдістер арқылы қоздырғыштарын бөліп алып, олардың антигендік қасиеттерін зерттеу нәтижесінде поливалентті инактивтендірілген вакцина дайындауға арналған тиімді штамдарды іріктеу, сондай-ақ молекулалық-генетикалық әдісті қолдану арқылы аталған ауруларды ажыратып балау.

3. Зерттеудің міндеттері:

- Еліміздің Солтүстік және Шығыс Қазақстан, Ақмола, Жамбыл, Алматы облыстарының құс шаруашылықтарында Ньюкасл ауруы мен тауықтың жұқпалы бронхитіне шалдығуы бойынша індеттанулық жағдайды зерттеу;

- Қазақстанның құс кәсіпорындарында Ньюкасл ауруы мен тауықтың жұқпалы бронхиттің клиникалық көріністерінің ерекшеліктерін анықтау;

- Қазақстан Республикасының әртүрлі өңірлеріндегі індет ошақтарынан алынған Ньюкасл ауруы мен тауықтың жұқпалы бронхитінің далалық штаммдарын бөліп алу және сәйкестендіру.

- Поливалентті инактивтендірілген вакцина дайындау мақсатында бөлінген жаңа штаммдардың иммуногендік қасиеттерін анықтау;

- Молекулалық-генетикалық әдістің көмегімен Ньюкасл ауруы мен тауықтың жұқпалы бронхитінің бір мезгілде балау.

4. Зерттеу әдістері:

Негізгі ғылыми-зерттеу жұмыстары 2018-2024 жылдар аралығында Қазақ ұлттық аграрлық университетінің «Биологиялық қауіпсіздік» кафедрасында, ЖШС «UNIVET-Ғылыми-өндірістік орталығы» «Animal Expert Group» зертханасында жүргізілді.

Мониторингтік зерттеулер 2019-2021 жылдар аралығында Солтүстік Қазақстан және Алматы облыстарындағы әр түрлі меншіктегі және өнім алудың әр түрлі бағытындағы құс фабрикаларында жүргізілді. Атап айтқанда, Солтүстік Қазақстан және Алматы облысы аумағындағы, құстың жұқпалы бронхиті және Ньюкасл ауруы вирустарына қарсы тауықтардың организміндегі антидене титрлеріне серологиялық скрининг жүргізілді. Шаруашылықтар олардың инфекциялық ауруларды сауықтыру және алдын алуға қатысты ветеринариялық-санитариялық шараларының деңгейіне байланысты таңдалынып алынды Жұқпалы бронхиттің қоздырушысына тән аурудың клиникалық белгілері және патологоанатомиялық өзгерістерінің ерекшеліктері Солтүстік Қазақстан облысындағы құс фабрикаларының біріндегі індет ошағында зерттелсе, Ньюкасла ауруына қатысты барлық зертеулер Алматы облысының шаруашылықтарында жүргізілді.

Мониторингтік зерттеулер кезіндегі өнім беретін құстардың арасында вирустық аурулардың таралуына имунделген және вакцина егілмеген құстарды серологиялық зертеу арқылы қанынан телімді антиденелердің титрін анықтау арқылы көз жеткізілді. Осы мақсатта бірнеше шаруашылықтан кездейсоқ таңдау әдісімен әр-түрлі жастағы саны 10 нан 25 дейінгі құстардан қан сынамсы алынды. Қан сынамаларын алу топтары жас құстарды өсірудің технологиялық картасын немесе ересек құстардың өнімділік фазасын ескере отырып қалыптастырылды. Қан қанат асты венасынан AVATUBE стерильді вакуумдық пробиркаға (қоспаларсыз) 2-3 мл көлемінде алынды және қан ұйып және қан сарысуы бөлінуі үшін бөлме температурасында қалдырылды, одан әрі сынамаларды сақтау және тасымалдау +4 °C температурада жүзеге асырылды.

Антидене титрі BioChek голландтық өндірушісінің «Avian Infectious Bronchitis Virus Antibody Test Kit» және «Newcastle disease Virus Antibody Test Kit» коммерциялық диагностикалық жинақтарын пайдалана отырып иммуноферментті талдау (ИФТ) арқылы анықталды. Сынамаларды зерттеуде осы өндіруші ұсынған микропланшетті шайғыш, инкубатор және иммуноферменттік анализатордан тұратын ИФТ ға арналған қондырғылардың толық құрамы қолданылды. Зерттеулер өндірушінің диагностикалық жинақтарға арналған нұсқаулығына сәйкес жүргізілді. Ерітіндінің оптикалық тығыздығы 650 нм толқын ұзындығында ELISA ELX 800 оқу құралының (BioChek, Winooski, VT, USA) көмегімен анықталды. Алынған нәтижелер BioChek мониторинг бағдарламалық құралының көмегімен жазылды және талданды.

Ауру құстардан зардапты материалдар аурудың клиникалық белгілері байқалған кезеңде алынды. Зардапты материалдарды алу және дайындау белгілі әдістер бойынша жүргізілді. Балапандардан өкпе және кеңірдек кесінділері, ал ересек құстардан бүйрек және аналық безі алынды. Сынамалар зерттеу жұмыстары біткенше - 20°C температурада тоңазытылған күйде сақталды.

Вирусты бөліп алу үшін Алель – Агро АҚ өсірген 9-12 күндік тауық эмбриондары қолданылды. Ньюкасл ауруы мен тауықтың жұқпалы бронхитінің вирустарын өсіру жолдары және зерттеу барысында қойылған гемагглютинация реакциясы (ГАР),

гемагглютинацияны тежеу реакциясы (ГАТР), жанама гемагглютинация реакциясы (ҚГАР) және бейтараптау реакциясы (БР) бекітілген нұсқау бойынша қойылды.

Молекулярлық-генетикалық зерттеулер кезінде Ньюкасл ауруы мен тауықтың жұқпалы бронхитінің GenBank базасындағы вирус штамдарының нуклеотидтік реттілігіне байланысты мәліметтерге сүйендік, сонымен қатар Солтүстік Қазақстан және Алматы облыстарындағы құстардан бөлініп алынған вирус штамдарының көмегімен әдістерді тестілеу арқылы жүргізілді.

Ньюкасл ауруы вирусын анықтауға арналған праймерлік жүйелерді әзірлеу кезінде геннің F жалғасы пайдаланылды, ал тауықтың жұқпалы бронхитінің вирусы үшін S1 генінің жалғасы пайдаланылды. Арнайы олигонуклеотидтерді әзірлеу кезінде GenBank-тен алынған қоздырушылардың гендерінің нуклеотидтер тізбегінің жергілікті базасы жасалды. Олардың консервативтілігін талдау BioEdit бағдарламасы арқылы жүзеге асырылады.

5. Диссертация қорғауға ұсынылатын негізгі ережелер:

- Солтүстік Қазақстан және Алматы облыстарының өндірістік кәсіпорындарындағы құстардың респираторлық ауруларының таралуына жүргізілген мониторингтік зерттеулердің нәтижелері;

- Ньюкасл ауруы және тауықтың жұқпалы бронхитіне қарсы вакцинадан кейінгі қалыптасқан антидененің динамикасы және құстардың арасында осы аурулардың клиникалық-патологиялық көріністерінің ерекшеліктері;

- Ауыл шаруашылығы құстарының өндірістік кәсіпорындарында тауықтың жұқпалы бронхиті мен Ньюкасл ауруына шалдыққан құстарға серологиялық әдістермен балау қойып, ауру қоздырушысын бөліп алу;

- Тауықтың жұқпалы бронхиті мен Ньюкасл ауруына қарсы поливалентті инактивтендірілген вакцина даярлауға кандидат жергілікті штамдардың антигендік қасиеттеріне сипаттама;

- Қазақстанда айналымда жүрген Ньюкасл ауруы және тауықтың жұқпалы бронхиті вирустарының молекулалық-генетикалық сипаттамасы, кері транскрипциялық полимеразды тізбекті реакциясы арқылы оларды ажыратып балау.

6. Зерттеудің негізгі нәтижелерінің сипаттамасы

Қазақстан Республикасының солтүстік, шығыс және оңтүстік-шығыс өңірлеріндегі құс өсіру шаруашылықтарында жүргізілген эпизоотиялық жағдай мониторингі нәтижесінде Ньюкасл ауруы мен тауықтың жұқпалы бронхиті вирусына қарсы арнайы антиденелер титрлерінің тұрақты түрде жоғарылағаны анықталды, бұл күтілетін поствакциналық көрсеткіштерден асып түсті. Анықталған үрдіс ауыл шаруашылығы құстары арасында эпизоотиялық өршулерді тудыру қабілетіне ие жабайы вирустық штамдардың айналымда екенін көрсетеді.

Бройлер және жұмыртқа бағытындағы тауықтар арасында профилактикалық шаралардың жүргізілгеніне қарамастан, кешенді диагностикалық және зертханалық зерттеулер инфекциялық бронхит пен Ньюкасл ауруының бар екенін растады. Бұл жұқпалы процестердің тауықтардың инфекциялық бронхит вирусы мен Ньюкасл ауруы вирусының төмен патогенді штамдарының әсерінен туындайтыны анықталды. Зерттеу нәтижелері кешенді вирустық инфекцияның дамып жатқанын көрсетеді.

Вирустық зерттеулер нәтижесінде тауықтың жұқпалы бронхиті вирусының Як-Сев-IBK2024 штаммы бөлініп алынды. ПТР-диагностика мен геномды секвенирлеу нәтижелері бұл штаммның тауықтың жұқпалы бронхиті вирусының Israel 02, Israel 1494 және QX-варианттары сияқты белгілі нұсқаларымен генетикалық жақындығын көрсетті. Серотипті анықтау нәтижелері бөлінген штаммның аталған шетелдік аналогтармен жоғары геномдық ұқсастығын растады.

Бөлінген Як-Сев-IBK2024 штаммының антигендік қасиеттері жоғарылығымен ерекшеленеді, ол әртүрлі типтегі антиденелердің түзілуін қамтамасыз етеді және жоғары иммуногенділікке ие. Бұл деректер эксперименттік жұқтыру барысында 21-ші тәулікте

балапандардың организмінде жоғары титрлі антиденелердің қалыптасуымен дәлелденді. Алынған нәтижелер Як-Сев-ИВК2024 штаммын Қазақстанның солтүстік өңірлерінде құстарды вакцинациялау үшін профилактикалық биопрепараттарды әзірлеуде қолдану қажеттілігін көрсетеді, себебі дәл осы вирус нұсқасы аталған аймақта кең таралған және айтарлықтай қауіп төндіреді.

Тауықтың жұқпалы бронхиті вирусымен қатар, бақыланатын құстардың қан сарысуынан Ньюкасл ауруы вирусына қарсы антиденелердің поствакциналық деңгейден жоғары титрлері анықталды, бұл құс фабрикаларында «жабайы» типті вирустардың айналымда екенін көрсетті. Ньюкасл ауруы вирусының штамдарын анықтау мақсатында бірқатар мониторингтік, диагностикалық және вирустық зерттеулер жүргізілді. Нәтижесінде құстардан жиі табылған және жоғары иммундық қасиеттерге ие ПМВ-1/тауық/Алматы 66/2020 штаммы іріктеліп алынды. Бұл қоздырғыш штаммы құс өсіру саласына экономикалық зияны орташа деңгейде, сондықтан оны Қазақстанда аймақтық вакциналық препарат әзірлеу үшін генетикалық негіз ретінде пайдалануға болады.

Бөлінген Як-Сев-ИВК2024 тауықтың жұқпалы бронхиті вирусы штаммы (тіркеу нөмірі М-03-24/D) және ПМВ-1/тауық/Алматы 66/2020 Ньюкасл ауруы вирусы штаммы (тіркеу нөмірі М-02-24/D) ЖШС «Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-

Өткізілген зерттеулердің нәтижелері серологиялық диагностика үшін қолданылатын жанама агглютинация реакциясының көмегімен антиденелер титрлерін тек вакцинацияланған және ауырып жазылған құстардың қан сарысуында ғана емес, сондай-ақ жұмыртқа құрамынан да анықтауға болатынын көрсетті, бұл кезде антиденелер деңгейі шамамен бірдей болды. Сонымен қатар, серологиялық зерттеулер барысында Ньюкасл ауруы вирусына қарсы популяциялық иммунитеттің қарқындылығын зерттеу үшін химиялық медиаторды пайдаланып антигендік эритроцитарлық диагностикум дайындау әдісі жетілдірілді. ПМВ-1/тауық/Алматы 66/2020 штаммына қарсы антиденелердің титрлерін анықтауда ең жоғары сезімталдық 1:4096–1:8192 деңгейінде ментол әдісімен алынған реактивтерді қолданғанда байқалды, бұл көрсеткіштер гемагглютинация тежелу реакциясымен анықталған деңгейден 4–8 есе жоғары болды.

Ньюкасл ауруы мен тауықтың жұқпалы бронхитінің қоздырғыштарын бір мезгілде анықтау үшін нақты уақыттағы кері транскрипциялы полимеразалық тізбекті реакция (RT-PCR) әдісіне арналған праймерлер әзірленді, бұл ауруларды диагностикалау процесін айтарлықтай жылдамдатуға мүмкіндік береді.

7. Алынған мәліметтердің жаңалығы мен маңыздылығын негіздеу

Солтүстік Қазақстан және Алматы облыстарында өнімді құстардың індет ошағында жүргізілген мониторингтік зерттеулер нәтижесінде Ньюкасл ауруының және тауықтың жұқпалы бронхитінің таралуына себепші болған «далалық» вирустардың штамы бөлініп алынды.

Құс фабрикасының барлық құс қораларындағы серологиялық зерттеулердің нәтижелері бойынша телімді антиденелердің орташа титрі күтілетін ауқымда (диапазон) болғанын және 12904-тен 17097-ге дейінгі титрді құрағанын атап өтуге болады. Бұл ретте өзгеру коэффициенті 5%-дан аспады, дегенмен бұл көрсеткіштің күтілетін өзгергіштігі коммерциялық жиынтықты қолданғанға дейінгі нормативтік құжаттарға сәйкес 20-дан 60%-ға дейінгі аралықта болуы тиіс еді. Мұндай төмен өзгергіштік құстың иммундық жүйесіне вакцина штамдарынан да күшті антигеннің әсерінен деген болжам индекстік вакцинация талдауында расталды.

Бөліп алынған штаммдарды қолдан жұқтыру арқылы жүргізілген иммунологиялық, вирусологиялық және клиникалық зерттеулер бұл штаммдардың зардаптылығы төмен және жеткілікті дәрежеде иммуногенділігі жоғары екендігін көрсетті бұл оларды вакцина препаратын жасауға жақсы үміткер етеді.

Жүргізілген зерттеулердің нәтижелері вакцинацияланған және ауру құстардың қан сарысуларында ғана емес, сонымен қатар тауық жұмыртқасының құрамындағы телімді

(арнамалы) антиденелердің деңгейін анықтауда антигендік эритроцитарлық диагностикум дайындау әдісін жетілдіру арқылы қойылған жанама гемагглютинация реакциясын қолдану жақсы нәтиже көрсетті.

Жүргізілген кері транскрипциялы полимеразды тізбекті реакцияда электрофорез нәтижесінде полиакриламидті геледе ұзындығы 100 және 230 нуклеотидтік тізбектерге сәйкес келетін екі амплификация өнімі алынды, бұл вакциналық штамдардың гендері бойынша мақсатты амплификондарға сәйкес (тауықтың жұқпалы бронхиті вирусы мен Ньюкасл ауруы вирусы). Бұл нәтижелер дуплексті кері транскрипциялы полимеразды тізбекті реакция кезінде вирус таргетті гендерінің түрін анықтау мүмкіндік береді. Бұл ұсынылған праймерлерді екі респираторлық вирустармен (Ньюкасл ауруы мен тауықтың жұқпалы бронхит вирусы) құстардың бір уақытта жұқтырылған жағдайда ажыратып балау үшін қолдануға болатындығын көрсетеді. Тауықтың жұқпалы бронхитінің вирусы үшін S1 қосылған гені және Ньюкасл ауруы вирусы үшін F гені арқылы құрастырылған филогенетикалық шежіре оқшауланған нуклеотидтер тізбегін және олардың осы вирустардың белгілі штамдарымен корреляциясын жылдамдатуға мүмкіндік береді. Сондай-ақ, бұл түрішілік жіктеуді оңтайландыруға және болашақта генетикалық топтардың номенклатурасында одан әрі шатасуды болдырмауға көмектеседі.

8. Ғылыми даму бағыттарына немесе мемлекеттік бағдарламаларға сәйкестігі: Жүргізілген зерттеулер 2019-2021 жылдарға арналған «Құстардың жұқпалы бронхитіне және Ньюкасл ауруына қарсы поливалентті инактивтендірілген вакцинаны дайындау үшін қолданылатын вирус штаммдарының сипаттамасы» ынталы тақырып бөлігі болды, мемлекеттік тіркеу № 0119RKI0320, ЖШС «UNIVET-Ғылыми-өндірістік орталығы» «Animal Expert Group» зертханасы.

9. Докторанттың әрбір басылымды дайындауға қосқан үлесін сипаттау

Ғылыми-эксперименттік зерттеулердің негізгі нәтижелері халықаралық ғылыми конференцияларда, симпозиумдар мен конгрестерде баяндалды.

Диссертациялық материалдарға негізделген 6 ғылыми жұмыс, оның ішінде Scopus деректер базасына енгізілген International Open Veterinary Journal-да 1 мақала; қазақша мерзімді басылымдарында 5 ғылыми мақала (2019-2025 жж.) және бір ғылыми конференция материалы. «Современные вызовы биотехнологии, ветеринарии и медицины» атты Халықаралық ғылыми-тәжірибелік конференция материалдарында. - Гвардейский, 2020 жыл.

Пайдалы модельге патент № 7256, 2022/0221.2. Асанов, Н., Базарбаев, Р. К., Мусоев, А. М., Асанова, С. Е., Отарбаев, Б. К., Хусаинов, Д. М., Исламов Е. И., Толымбекова А. Б., Курбанбаева Н. М., Кенжеев Ш. Т., Махашов Е. Способ диагностики болезни Ньюкасла

Пайдалы модельге патент № 7257, 2022/0222.2. Асанов, Н., Базарбаев, Р. К., Мусоев, А. М., Асанова, С. Е., Отарбаев, Б. К., Хусаинов, Д. М., Исламов, Е. И., Мусина, Г. Ш., Курбанбаева, Н. М., Кенжеев, Ш. Т., Махашов, Е., Ахаева, Д. Н. Тауықтардағы инфекциялық бронхиттің серологиялық диагностика әдісі

Авторлық куәлік № 8228, 14.02.2020. Нурходжаев, Н. О., Базарбаев Р. К. Қазақстан Республикасының жекелеген аймақтарындағы тауықтардың инфекциялық бронхитіне құстарды зерттеу нәтижелері.

10. Диссертацияның көлемі және құрылымы

Диссертация компьютерлік мәтіннің 123 бетінде ұсынылған, 22 кесте мен 24 суреттен тұрады. Келесі бөлімдерді қамтиды: кіріспе, ғылыми әдебиеттерге шолу, зерттеу материалдары мен әдістері, эксперименттік бөлім, қорытындылар және пайдаланылған әдебиеттер тізімі, оның ішінде 222 дереккөз, оның ішінде 207 шетелдік автор.