

АННОТАЦИЯ

**диссертационной работы Базарбаева Рыскелди Кантореевича
на тему «Характеристика штаммов вирусов, применяемых для изготовления
поливалентной инактивированной вакцины против инфекционного бронхита птицы и
Ньюкаслской болезни» представленной на соискание степени доктора философии (PhD)
по специальности 6D120100 - «Ветеринарная медицина»**

1. Актуальность темы исследования

Птицеводство — наиболее интенсивно развивающаяся отрасль животноводства не только в Казахстане, но и во всём мире. Оно способно обеспечить население недорогими и диетическими белковыми продуктами питания. Это связано с высокой скоростью роста молодняка сельскохозяйственных видов птиц, что сопровождается высокой конверсией корма. Именно это делает птицеводство наиболее рентабельной отраслью аграрного животноводства.

Такие особенности разведения мясной птицы способствуют увеличению числа птицеводческих предприятий по стране и росту поголовья на них. Однако существуют факторы, снижающие уровень рентабельности птицеводства в Казахстане. К сдерживающим факторам относятся высокие цены на импортные кормовые добавки для выращивания цыплят, высокая стоимость зерновых — как основных кормов для птиц, а также другие кормовые и технологические проблемы. Все эти факторы могут лишь частично снизить уровень прибыли, тогда как инфекционные заболевания, сопровождающиеся высокой смертностью, способны полностью уничтожить птицеводство как отрасль в стране. Таким образом, наибольшая угроза для птицеводства носит ветеринарный характер и требует постоянного контроля за распространением высококонтагиозных инфекционных заболеваний и своевременного их предотвращения. Одним из первостепенных аспектов биобезопасности в промышленном птицеводстве являются постоянные мониторинговые исследования, направленные на выявление возбудителей вирусных заболеваний среди поголовья птицы путём определения титров специфических антител в крови с использованием серологических методов. Анализ литературных источников показывает, что в Казахстане широко распространены такие вирусные болезни птиц, как болезнь Ньюкасла, инфекционный бронхит и птичий грипп. Наиболее вероятными путями заноса и распространения инфекции среди популяции сельскохозяйственной птицы являются активный импорт племенного материала из-за рубежа, необходимый для стабильного развития отрасли, а также влияние диких птиц, которые служат естественными резервуарами вирусной инфекции.

Высокая изменчивость вирусов, постоянное появление новых вариантов и генотипов требуют разработки быстрых и в то же время чувствительных методов диагностики и дифференциации вирусных вирионов. Это позволит эффективно контролировать генетическую и фенотипическую изменчивость возбудителей инфекционных болезней птиц в локальной популяции.

Все перечисленные факторы подчёркивают актуальность выбранной темы и её практическое значение для развития отрасли птицеводства в Казахстане.

2. Цель диссертационного исследования: Проведение мониторинга распространения болезни Ньюкасла и инфекционного бронхита кур в Казахстане, выделение возбудителей с применением вирусологических и серологических методов, определение их антигенных свойств с целью отбора эффективных штаммов для разработки поливалентной инактивированной вакцины, а также дифференциация указанных заболеваний с использованием молекулярно-генетических методов.

3. Задачи исследования:

Для достижения целей были поставлены следующие задачи:

- Изучение эпизоотической ситуации по заболеванию птиц болезнью Ньюкасла и инфекционным бронхитом кур в птицеводческих хозяйствах Северо-Казахстанской, Восточно-Казахстанской, Акмолинской, Жамбылской и Алматинской областей нашей страны;

- Определение особенностей клинических проявлений болезни Ньюкасла и инфекционного бронхита кур в птицеводческих предприятиях Казахстана;
- Выделение и идентификация полевых штаммов болезни Ньюкасла и инфекционного бронхита кур, полученных из очагов инфекции в различных регионах Республики Казахстан;
- Определение иммуногенных свойств новых выделенных штаммов с целью подготовки поливалентной инактивированной вакцины;
- Одновременная диагностика болезни Ньюкасла и инфекционного бронхита кур с использованием молекулярно-генетического метода.

4. Методы исследования:

Основные исследовательские работы проводились на базе кафедры «Биологическая безопасность» Казахского национального аграрного университета, в лаборатории «Экспертная группа животных» ТОО «ЮНИВЕТ-Научно-производственный центр»..

Научно-исследовательские работы проводились в период с 2018 по 2024 годы.

Мониторинговые исследования 2019–2021 годов проводились на птицеводческих предприятиях Северо-Казахстанской и Алматинской областей. Серологический скрининг титров антител к вирусам инфекционного бронхита и болезни Ньюкасла проводили на предприятиях Северного Казахстана и среди птицы в частных хозяйствах Алматинской области. Выбор хозяйств обусловлен разной интенсивностью ветеринарно-профилактических мероприятий. Клинические и патологоанатомические исследования инфекционного бронхита проводились в очаге заболевания в Северном Казахстане, а изучение вируса болезни Ньюкасла – в хозяйствах Алматинской области.

При мониторинговых исследованиях распространения вирусных заболеваний продуктивной птицы основным методом был серологический анализ титров специфических антител у иммунизированных и не вакцинированных кур. Для этого в ряде хозяйств методом случайной выборки были отобраны образцы крови от птицы разных возрастных периодов в количестве от 10 до 25 голов. Группы для отбора образцов крови формировались с учетом технологической карты выращивания ремонтного молодняка или фазы продуктивности взрослой птицы. Кровь отбирали с подкрыльцовой вены в стерильные вакуумные пробирки AVATUBE (без добавок) в объеме 1-2 мл. и оставляли при комнатной температуре для образования сгустка и отделения сыворотки, дальнейшее хранение и транспортировка образцов производилась при температуре +4 °С.

Определение титра антител проводили с помощью иммуноферментного метода (ИФА, ELISA) с применением коммерческих диагностических наборов «Avian Infectious Bronchitis Virus Antibody Test Kit» и «Newcastle disease Virus Antibody Test Kit» от голландского производителя – компании BioChek. При этом для проведения анализа использовался полный комплект оборудования для ИФА-лабораторий от этого же производителя, который включал промыватель и инкубатор для микропланшет, а также иммуноферментный ридер. Исследования проводились в соответствии с рекомендациями производителя до диагностических наборов. Определение оптической плотности раствора проводили на ридер ELISA ELX 800 (BioChek, Winooski, VT, USA). Учет и анализ полученных результатов проводили в программном обеспечении BioChek Monitoring Software

Патологический материал от больных птиц был взят в период проявления клинических признаков заболевания. Отбор и подготовка патологического материала проводились по установленным методикам. У цыплят брали срезы лёгких и трахеи, а у взрослых птиц — почки и яичники. Образцы до завершения исследовательских работ хранились в замороженном состоянии при температуре -20 °С. Для выделения вируса использовали 9–12-дневные куриные эмбрионы, выращенные АО «Алель-Агро». Методы культивирования вирусов болезни Ньюкасла и инфекционного бронхита кур, а также постановка реакции гемагглютинации (РГА), реакции торможения гемагглютинации (РТГА), А) и реакции нейтрализации (РН) проводились согласно утверждённым инструкциям. В ходе выполнения диссертационной работы были применены молекулярно-генетические методы исследования с использованием информации о нуклеотидной последовательности штаммов вирусов инфекционного бронхита кур и болезни Ньюкасла из базы

данных GenBank, а также путем тестирования методов на выделенных штаммах этих вирусов популяции сельскохозяйственных птиц Северо-Казахстанской и Алматинской области. Для совместной идентификации вирусных геномов инфекционного бронхита и болезни Ньюкасла реакционной смеси были разработаны специфические праймеры. При разработке праймерных систем для детекции вируса болезни Ньюкасла использовались последовательности F гена, тогда как для вируса инфекционного бронхита кур применялись последовательности гена S1. При разработке специфических олигонуклеотидов была создана локальная база данных нуклеотидных последовательностей генов возбудителей, полученных из GenBank. Анализ их консервативности проводился с использованием программы BioEdit.

5. Основные положения выносимые на защиту диссертации:

- Результаты мониторинговых исследований по распространению респираторных заболеваний птиц на производственных предприятиях Северо-Казахстанской и Алматинской областей;
- Динамика формирования антител после вакцинации против болезни Ньюкасла и инфекционного бронхита кур, а также особенности клинико-патологических проявлений этих заболеваний у птиц;
- Постановка диагноза методом серологических исследований и выделение возбудителя болезни Ньюкасла и инфекционного бронхита кур на производственных предприятиях сельскохозяйственной птицы;
- Характеристика антигенных свойств местных штаммов-кандидатов для подготовки поливалентной инактивированной вакцины против инфекционного бронхита кур и болезни Ньюкасла;
- Молекулярно-генетическая характеристика вирусов болезни Ньюкасла и инфекционного бронхита кур, циркулирующих в Казахстане, и их дифференцировка методом обратной транскрипционной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР).

6. Описание основных результатов исследования.

В результате проведенного мониторинга эпизоотической ситуации в птицеводческих хозяйствах северных, восточных и юго-восточных регионов Республики Казахстан установлено стабильное повышение титров специфических антител к вирусам болезни Ньюкасла и инфекционного бронхита кур, превышающее ожидаемые поствакцинальные показатели. Выявленная тенденция свидетельствует о циркуляции в популяции сельскохозяйственной птицы полевых штаммов вирусов, обладающих способностью вызывать эпизоотические вспышки. Комплексные диагностические и лабораторные исследования подтвердили наличие заболеваемости инфекционным бронхитом и болезнью Ньюкасла среди бройлерных и яичных кур, несмотря на проведение профилактических мероприятий. Установлено, что эти инфекционные процессы обусловлены воздействием вируса инфекционного бронхита кур и низкопатогенных штаммов вируса болезни Ньюкасла. Результаты исследования указывают на развитие комплексной вирусной инфекции. Проведенные вирусологические исследования позволили выделить штамм вируса инфекционного бронхита кур Як-Сев-ИБК2024. По результатам ПЦР-диагностики и секвенирования генома установлено, что выделенный штамм обладает генетическим родством с такими известными вариантами вируса инфекционного бронхита, как Israel 02, Israel 1494 и QX-вариант. Анализ серотипа подтвердил высокую степень геномной близости выделенного штамма к указанным зарубежным аналогам. Выделенный штамм Як-Сев-ИБК2024 характеризуется широким спектром антигенных свойств, способствуя выработке антител различных типов и обладая высокой иммуногенностью. Это подтверждено результатами экспериментального заражения, в ходе которого у цыплят на 21-е сутки зафиксированы высокие титры специфических антител. Полученные данные указывают на необходимость использования штамма Як-Сев-ИБК2024 при разработке профилактических биопрепаратов для вакцинации птицы в северных регионах Казахстана, так как данный вариант вируса обладает широкой

распространенностью и представляет собой актуальную угрозу для птицеводческих хозяйств данного региона.

Кроме вируса инфекционного бронхита, у крови подконтрольных птиц были обнаружены высокие титры антител против вируса Ньюкасла, которые превышали их поствакцинальный уровень и указывали на циркуляцию вирусов «дикого» типа в птицеводческих предприятиях. С целью определения со штаммами возбудителя болезни Ньюкасла было проведено ряд мониторинговых, диагностических, вирусологических и других исследований для выявления наиболее распространенных штаммов вируса болезни Ньюкасла. В результате был отобран штамм ПМВ-1/курица/Алматы 66/2020 который наиболее часто выявляли у птицы и который владел довольно высокими иммунными свойствами. Указанный штамм возбудителя имеет умеренное влияние на показатели экономического ущерба на отрасль птицеводства в Казахстане, что делает его хорошим кандидатом в качестве генетической основы для приготовления регионального вакцинного препарата для Казахстана в дальнейших биотехнологических исследованиях.

Выделенные штаммы Як-Сев-ИВК-2024 вируса инфекционного бронхита кур (регистрационный номер М-03-24/D) и ПМВ-1/курица/Алматы/2020 вируса болезни Ньюкасла (рег. номер М-02-24/D) были депонированы в коллекции микроорганизмов «Научно-

Результаты проведенных исследований показали возможность использования реакции непрямой агглютинации для выявления титра парамиксовирусных антител не только в сыворотках крови вакцинированных и больных птиц, но и в содержимом куриных яиц, при этом уровень антител был практически на одном уровне. Кроме того, при проведении этих серологических исследований был усовершенствован метод приготовления антигенной ЭД для изучения интенсивности популяционного иммунитета к вирусу болезни Ньюкасла у домашних птиц с помощью химического медиатора. Наибольшая чувствительность при определении титров антител до штамма ПМВ-1/курица/Алматы/2020, на уровне 1:4096-1:8192, были получены при использовании реактивов, полученных ментольным методом и выявляющих антитела, которые превышали показатели в реакции задержки гемагглютинации в 4-8 раз.

Разработаны праймеры для проведения одновременного определения присутствия возбудителей болезни Ньюкасла и инфекционного бронхита кур методом обратной транскрипционной полимеразной цепной реакции в реальном времени, что позволяет ускорить диагностику заболеваний.

7. Обоснование новизны и важность полученных данных

В результате проведенных мониторинговых исследований в очаге заболевания продуктивной птицы на территории Северо-Казахстанской и Алматинской областей были выделены «дикие» штаммы вирусов болезни Ньюкасла и инфекционного бронхита, которые стали причиной вспышки болезни.

По результатам серологических исследований во всех птичниках птицефабрики было установлено, что средний титр специфических антител находился в ожидаемом диапазоне — от 12904 до 17097. При этом коэффициент вариации не превышал 5%, хотя согласно нормативной документации, предшествующей использованию коммерческого набора, ожидаемый диапазон изменчивости должен был составлять от 20% до 60%. Такая низкая вариативность, как показал анализ индексной вакцинации, подтверждает гипотезу о воздействии на иммунную систему птицы антигена, более сильного, чем вакцинные штаммы.

Иммунологические, вирусологические и клинические исследования, проведенные посредством искусственного заражения выделенными штаммами, показали, что данные штаммы обладают низкой вирулентностью и одновременно высокой иммуногенностью, что делает их перспективными кандидатами для создания вакцинных препаратов.

Проведенные исследования показали, что использование реакции непрямой гемагглютинации, поставленной с применением усовершенствованного метода приготовления

антигенного эритроцитарного диагностикума, дало хорошие результаты при определении уровня специфических антител не только в сыворотке крови вакцинированных и больных птиц, но и в составе куриных яиц.

В ходе проведённой обратной транскрипционной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) в результате электрофореза в полиакриламидном геле были получены два продукта амплификации длиной 100 и 230 нуклеотидов, что соответствует целевым ампликонам генов вакцинных штаммов вируса инфекционного бронхита кур и вируса болезни Ньюкасла. Эти результаты позволяют определить тип вирусного таргетного гена при дуплексной ОТ-ПЦР. Это свидетельствует о том, что предложенные праймеры могут быть использованы для дифференцированной диагностики при одновременном заражении птиц двумя респираторными вирусами — вирусом болезни Ньюкасла и вирусом инфекционного бронхита кур.

Построенные филогенетические древа вирусов инфекционного бронхита кур за спайковым геном S1 и вируса болезни Ньюкасла за геном F позволят ускорить типизацию выделенных нуклеотидных последовательностей и соотнести их к известным штаммам этих вирусов. А также поможет упорядочить внутривидовую классификацию и избежать в будущем дальнейшей путаницы в номенклатуре генетических групп.

8. Соответствие направлениям развития науки или государственным программам:

Проведенные исследования были составной частью исследовательской программы «Характеристика штаммов вируса, используемых для приготовления поливалентной инактивированной вакцины против инфекционного бронхита птиц и болезни Ньюкасла» за 2019-2021 гг., государственная регистрация № 0119РКИ0320, выполняемых кафедрой «Биологической безопасности» Казахского национального аграрного исследовательского университета, а также частью программ исследований ряда диагностических учреждений (лаборатория «Экспертная группа животных» ТОО «ЮНИВЕТ-Научно-производственный центр»).

9. Описание вклада докторанта в подготовку каждой публикации

Основные результаты научных и экспериментальных исследований были представлены на международных научных конференциях, симпозиумах и конгрессах.

6 научных работ по материалам диссертационных работ, в том числе 1 статья в Международном открытом ветеринарном журнале, входящем в базу Scopus; 5 научных статьях (2019-2025 гг.) в казахских периодических изданиях и одних материалах научной конференции.

В материалах Международной научно-практической конференции «Современные вызовы биотехнологии, ветеринарии и медицины». - Гвардейский, 2020.

Патент на полезную модель № 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

Патент на полезную модель № 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. Способ серологической диагностики инфекционного бронхита кур

Авторское свидетельство № 8228, 14.02.2020. Нурходжаев, Н. О., Базарбаев Р. К. Результаты исследования птиц на инфекционный бронхит кур в отдельных регионах Республики Казахстан.

10. Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 123 страницах компьютерного текста, содержит 22 таблиц и 24 рисунков. Включает такие разделы: введение, обзор научной литературы, материалы и методы исследования, экспериментальная часть, выводы и списка используемой литературы, включающего 222 источников, из них 207 иностранных авторов.