

АННОТАЦИЯ

диссертационной работы Курманбекова Жулдыз Кайратовны на тему «Оптимизация лабораторных тест-систем для диагностики катаральной лихорадки овец», представленной на соискание степени доктора философии (PhD) по специальности 6D120200 - Ветеринарная медицина

1. Общая характеристика работы

Катаральная лихорадка овец (КЛЮ) является сезонным заболеванием, которое в настоящее время зарегистрировано во многих населённых пунктах. Учитывая эпизоотическую ситуацию, а также торгово-экономические связи с другими государствами и географическое положение, территорию Казахстана можно отнести к зоне потенциального риска. В связи с этим существует вероятность заноса и распространения катаральной лихорадки овец на территории Республики Казахстан.

Разработка и совершенствование средств и методов лабораторной диагностики КЛЮ являются актуальной и неотложной задачей. Одним из важнейших средств предупреждения данного инфекционного заболевания является своевременное применение тест-систем в качестве эффективного элемента профилактической системы.

2. Актуальность темы исследований

Катаральная лихорадка овец (КЛЮ) — трансмиссивное вирусное заболевание, передающееся кровососущими насекомыми (*Culicoides obsoletus*, *C. pulicaris*, *C. nubeculosus*, *C. impunctatus*). Болезнь характеризуется воспалением слизистой оболочки ротовой полости, особенно языка, обильным слюноотделением, некротическими поражениями, дегенеративными изменениями в копытах и скелетных мышцах, а также лихорадочным состоянием.

Согласно зоосанитарным правилам Международного эпизоотического бюро (МЭБ, OIE), КЛЮ включена в перечень заболеваний, общих для нескольких видов животных. В естественных условиях все породы овец восприимчивы к вирусу КЛЮ. По классификации Международного эпизоотического бюро данное заболевание относится к категории особо опасных инфекций. В настоящее время болезнь регистрируется в ряде стран Ближнего Востока и Азии, а также широко распространена в странах Европы.

Первые очаги данного заболевания были выявлены в Республике Таджикистан в конце 1990-х годов, что привело к значительным экономическим потерям в животноводстве. Диагноз заболевания был установлен сотрудниками “Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности” в рамках договорных исследований.

Кроме того, источником заноса возбудителей ранее не зарегистрированных особо опасных заболеваний могут являться импортируемые животные, их трупы, корма, семенной материал, а также продукция животного происхождения.

Риск заноса КЛЮ на территорию Республики Казахстан оценивается как высокий. Основным фактором риска являются животные, завозимые из-за рубежа. В частности, вероятным источником заноса заболевания на территорию Казахстана могут быть племенные животные, импортируемые из отдельных регионов Российской Федерации, а также из некоторых штатов США и Канады.

В связи с увеличением числа очагов экзотических и особо опасных заболеваний в мире в последние годы особую актуальность приобретает разработка новых надёжных средств и методов своевременной и точной диагностики данных инфекций на основе исследований образцов животных.

В настоящее время проблема опасных инфекционных заболеваний животных остаётся актуальной для многих стран мира, в том числе и для Республики Казахстан. Обеспечение устойчивого эпизоотического благополучия по опасным и особо опасным вирусным заболеваниям на территории Казахстана является важной задачей для улучшения социально-экономической ситуации в стране.

В Казахстане технология разработки диагностической тест-системы на основе иммуноферментного анализа (ИФА) для выявления КЛЮ у сельскохозяйственных животных в настоящее время не разработана. В связи с этим создание отечественной ИФА-диагностической тест-системы на основе местного штамма вируса КЛЮ является важной задачей для ветеринарной науки Республики Казахстан.

Ключевые слова: катаральная лихорадка овец, вирус, тест-система, штамм, серотип, диагностика, антиген, иммуноглобулин.

3. Цель и задачи исследования

Метод ИФА, разработанный для диагностики КЛЮ, широко применяется во многих странах. Однако в Республике Казахстан впервые ставится задача доказать, что разработанный метод ИФА нового поколения для выявления и индикации антигена вируса КЛЮ, созданный на основе нововыделенного актуального штамма и усовершенствованный в ходе исследований, не уступает зарубежным аналогам по своим характеристикам.

Задачи работы:

Для достижения поставленной цели были запланированы следующие научные исследования:

1. Выделение штамма вируса КЛЮ из очага инфекции и изучение его биологических свойств;
2. Оптимизация условий культивирования вируса КЛЮ в клеточных культурах;
3. Разработка эффективных систем получения специфического антигена вируса КЛЮ, а также получение активной сыворотки против данного вируса;
4. Изучение способов выделения иммуноглобулина из противовирусной сыворотки;

5. Выбор эффективных методов получения конъюгата на основе вирусоспецифического иммуноглобулина;

6. Оптимизация условий постановки ИФА для выявления антигена вируса КЛЮ;

7. Проведение испытаний разработанного метода ИФА для обнаружения антигена вируса КЛЮ.

4. Объект и предмет исследований

Объектом и предметом исследования являлась разработка эффективных средств для выявления антигена вируса КЛЮ.

Кроме того, было проведено изучение биологических свойств штамма «RT/RIBSP-07/16» вируса КЛЮ. На основе данного штамма были получены специфические антигены, сыворотки крови, иммуноглобулины и конъюгаты против данного вируса. Завершающим этапом работы являлись разработка и оптимизация эффективных условий постановки ИФА.

5. Связь с научно-исследовательскими работами и государственными программами

Тема диссертации выполнена в рамках государственной программы «Разработка и применение генно-инженерных и клеточных технологий в медицине, сельском хозяйстве, охране окружающей среды, пищевой и перерабатывающей промышленности». Исследование проводилось на основе научно-исследовательских работ по проекту «Разработка высокоэффективных средств профилактики и диагностики катаральной лихорадки овец»

В рамках научно-технической программы BR249927852 «Организация и проведение комплексных исследований по обеспечению устойчивого развития агропромышленного комплекса Костанайской области с созданием научно-исследовательского технологического центра» на 2024–2026 годы.

6. Методология и методы исследования

Исследовательская работа по докторской диссертации выполнена в лаборатории «Диагностика инфекционных заболеваний» Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности, входящего в холдинг АО «QazBioPharm» Министерства здравоохранения Республики Казахстан.

В ходе исследования были использованы 5 коз и 5 овец, а также различные реагенты и методы исследования. В процессе работы применялись вирусологические, иммунологические и серологические методы.

В рамках исследования были проведены следующие научные работы:

- выделение штамма вируса КЛЮ из биологических проб, доставленных из Республики Таджикистан;
- освежение штамма «RT/RIBSP-07/16» вируса КЛЮ;
- выделение вируса КЛЮ из развивающихся куриных эмбрионов;
- выделение возбудителя вируса КЛЮ в клеточных культурах;

- изучение биологических свойств штамма «RT/RIBSP-07/16» вируса КЛЮ;
- приготовление антигена вируса КЛЮ;
- получение специфической сыворотки крови против вируса КЛЮ;
- выбор методов получения иммуноглобулинов;
- выбор методов приготовления конъюгатов;
- разработка метода ИФА для выявления антигена вируса КЛЮ;
- исследование специфичности и чувствительности разработанного метода ИФА;
- применение иммуноферментного анализа при проведении эпизоотологического мониторинга КЛЮ.

7. Научная новизна

Впервые из эпизоотических очагов Республики Таджикистан от мелкого рогатого скота был выделен штамм вируса КЛЮ. Новый штамм «RT/RIBSP-07/16», выделенный от больных животных, был изолирован на развивающихся куриных эмбрионах и в клеточных культурах.

Были изучены биологические свойства штамма «RT/RIBSP-07/16». На основе данного штамма были приготовлены диагностические препараты: специфический антиген, специфическая сыворотка крови, специфический иммуноглобулин и конъюгат.

С использованием этих диагностических препаратов были подобраны оптимальные условия постановки иммуноферментного анализа (ИФА) для выявления антигена возбудителя КЛЮ в клинических образцах на территории Республики Казахстан.

Были изучены специфичность и чувствительность разработанной тест-системы ИФА. Кроме того, разработанная тест-система ИФА была применена при проведении эпизоотического мониторинга КЛЮ на территории Республики Казахстан.

8. Практическая значимость

В лабораторных условиях был разработан комплект препаратов для диагностики КЛЮ и выявления антигена возбудителя методом ИФА. Разработанный набор ИФА может применяться в животноводческих хозяйствах для постановки диагноза на КЛЮ.

Для оперативного выявления антигена вируса КЛЮ был разработан метод ИФА. С целью внедрения и практического применения данного метода ИФА в ветеринарной практике были разработаны следующие нормативно-технические документы:

- Тест-система [набор] для выявления антител к вирусу катаральной лихорадки овец методом иммуноферментного анализа, СТ 405-1919-04 ГП-086–2015;
- «Временная инструкция по изготовлению и контролю тест-системы [набор] для выявления антител к вирусу катаральной лихорадки овец

методом иммуноферментного анализа»;

- «Временное наставление по применению тест-системы [набор] для выявления антител к вирусу катаральной лихорадки овец методом иммуноферментного анализа».

Акты внедрения в производство: №1 от 12.08.2025 г. — КХ «Адил»; №2 от 08.10.2025 г. — КХ «Илияс».

9. Основные положения, выносимые на защиту

На защиту выносятся следующие положения:

1. Впервые выделен штамм вируса КЛЮ из очага эпизоотии и изучены его биологические и патогенные свойства.

2. Научно обоснованы основные факторы, влияющие на эффективность культивирования вируса КЛЮ в клеточных культурах (тип клеток, инфекционная доза, режим инкубации), и предложены оптимальные технологические параметры.

3. Разработана усовершенствованная методика получения и очистки антигена вируса КЛЮ, обладающего высокой диагностической значимостью.

4. Предложена технология получения и очистки высокоспецифичных иммуноглобулинов против вируса КЛЮ.

5. На основе специфических иммуноглобулинов к вирусу КЛЮ впервые получен ферментный конъюгат с высокой стабильностью, а также проведена оценка его диагностических свойств.

6. Разработан модифицированный метод ИФА для выявления антигена вируса КЛЮ, экспериментально подтверждены его аналитические и диагностические характеристики.

10. Основные результаты исследований в форме выводов

- Из биологических проб, доставленных из Республики Таджикистан, был выделен штамм «RT/RIBSP-07/16» вируса КЛЮ.

- Оптимизированы эффективные условия культивирования штамма «RT/RIBSP-07/16» на развивающихся куриных эмбрионах и в клеточных культурах.

- Изучены биологические свойства штамма «RT/RIBSP-07/16» вируса КЛЮ.

- Для выявления антигена вируса КЛЮ методом ИФА подготовлены специфический антиген, специфическая сыворотка крови, специфический иммуноглобулин и конъюгаты.

- Разработаны оптимальные условия постановки ИФА для выявления антигена вируса КЛЮ, изучены её специфичность и чувствительность.

- Разработанная тест-система ИФА показала высокую эффективность при проведении эпизоотологического мониторинга КЛЮ в южных регионах Республики Казахстан.

11. Достоверность и обоснованность полученных результатов

Достоверность и надежность полученных научных результатов обеспечены использованием современных научных подходов и методов, широко применяемых в области ветеринарной вирусологии, серологической диагностики и биотехнологии. Исследовательская работа была спланирована в соответствии с общепринятыми научными принципами и методологическими требованиями, а экспериментальные исследования проводились систематически и последовательно.

Все лабораторные исследования выполнялись в лаборатории диагностики инфекционных заболеваний “Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности”. В работе применялись методические протоколы, предназначенные для проведения вирусологических и иммунологических анализов.

Экспериментальные исследования проводились с использованием достаточного объёма биологического материала, а для повышения точности результаты экспериментов неоднократно проверялись. Собранные данные анализировались с применением современных методов статистической обработки, что обеспечило их научную обоснованность и репрезентативность.

Полученные выводы сопоставлялись с научными данными, опубликованными в трудах отечественных и зарубежных исследователей в области ветеринарной вирусологии, что позволило подтвердить их корректность и научную обоснованность.

12. Сведения о публикациях по основным результатам.

Материалы диссертации: По теме диссертации опубликовано 10 статей, из которых 4 статьи — в изданиях, рекомендованных Комитетом по контролю в сфере образования и науки Министерства образования и науки Республики Казахстан (МОН РК).

В международных научных изданиях, включённых в информационные ресурсы Web of Science (Clarivate Analytics) и Scopus (Elsevier), опубликована 1 статья по общей ветеринарии с процентилем 65 и квартилем Q2: <https://doi.org/10.47278/journal.ijvs/2022.198>.

Опубликовано 4 статьи в материалах международных конференций. Также имеются 2 акта внедрения разработок в производство.

13. Апробация результатов исследования

Основные результаты исследования были представлены на четырёх международных научно-практических конференциях:

1. Серомониторинг животных на блутанг на территории Республики Таджикистан // VI Международная конференция молодых учёных: Биофизиков, Биотехнологов, Молекулярных Биологов и Вирусологов, 2019. Сборник тезисов / АНО «Инновационный центр Кольцово». — Новосибирск: ИНЦ НГУ, 2019. — С. 349–353.

2. Получение и сравнительная оценка специфических сывороток к серотипам вируса блутанг // VI Международная конференция молодых учёных: Биофизиков, Биотехнологов, Молекулярных Биологов и

Вирусологов, 2019. Сборник тезисов / АНО «Инновационный центр Кольцово». — Новосибирск: ИНЦ НГУ, 2019. — С. 353–357.

3. Блутанг вирусына тәнді антигенін дайындау // Международная научно-теоретическая конференция, посвящённая 125-летию С. Сейфуллина «Сейфуллин окулары-15: Жастар, ғылым, технологиялар: Жаңа идеялар мен перспективалар», Нұр-Сұлтан, 2019. — С. 38–40.

4. Эпизоотическая ситуация по блутангу в мире и приграничных регионах Республики Казахстан // Материалы международной научно-практической конференции «Применение инноваций в развитии ветеринарной науки», Баку, 2019. — С. 98–102.

14. Личный вклад докторанта

Кандидатская диссертация является завершённой научно-исследовательской работой, выполненной автором самостоятельно, и соответствует требованиям Комитета по контролю в сфере образования и науки Министерства образования и науки Республики Казахстан.

Достоверность полученных результатов и обоснованность практических разработок подтверждаются фотоматериалами, таблицами, научными статьями, а также нормативно-технической документацией (НТД) на испытательную систему (комплект) для диагностики КЛЮ методом иммуноферментного теста (ИФТ) у сельскохозяйственных животных.

15. Объем и структура диссертации

Диссертация выполнена в печатном виде на 123 страницах в компьютерном формате и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, результаты исследования, обсуждение результатов, заключение, практические рекомендации, список источников и приложения.

В работе представлены 39 таблиц, 10 рисунков и 140 ссылок на источники

16. Основные результаты исследований

В ходе научной работы были получены следующие результаты:

1. Впервые выделен штамм «RT/RIBSP-07/16» вируса КЛЮ от жвачных животных, распространённого на территории Республики Таджикистан. С помощью молекулярно-биологических и вирусологических методов данный штамм полностью идентифицирован, депонирован и передан в коллекцию микроорганизмов Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности для длительного хранения.

2. Комплексно изучены основные биологические свойства, репродуктивная активность и патогенные характеристики выделенного вирусного штамма. В результате исследований, проведённых на экспериментальных моделях, выявлены типичные клинические признаки КЛЮ у овец и коз.

3. Определены оптимальные параметры культивирования (доза заражения, режим инкубации и время выращивания), обеспечивающие

эффективную репродукцию вируса в интактных куриных эмбрионах и клеточных культурах. Эти условия позволили накопить вирусный материал в высоких титрах и использовать его для дальнейших лабораторных исследований.

4. Разработан научно обоснованный метод получения диагностических препаратов вируса КЛЮ (специфические антигены, сыворотки, иммуноглобулины, конъюгаты). На основе этих препаратов оптимизированы параметры ИФА для выявления антигена КЛЮ, исследованы их диагностическая специфичность, чувствительность и эффективность.

5. Высокая диагностическая специфичность, чувствительность и эффективность разработанной ИФА-тест-системы подтверждены в ходе эпизоотологического мониторинга в южных регионах Республики Казахстан.