

АННОТАЦИЯ

диссертационной работы Боранбаевой Карлыгаш Ерболатовны на тему «Разработка мультиплексной полимеразно-цепной реакции в режиме реального времени для выявления возбудителей инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота», представленной на соискание степени доктора философии (Ph.D) по образовательной программе 8D09101 – «Ветеринарная медицина»

Актуальность темы исследования. К настоящему времени во многие хозяйствующие субъекты Республики Казахстан осуществляется импорт крупного рогатого скота из стран Дальнего и Ближнего зарубежья. При этом среди животных нередко обнаруживаются болезни, ранее не регистрируемые в нашей стране, в числе которых находится инфекционный кератоконъюнктивит, вызываемые вида моракселл.

Инфекционный кератоконъюнктивит (лат. - *Keratoconjunctivitis*; англ. - Pink-eye (розовый глаз); моракселлез, глазная эпизоотия, инфекционный кератит, пастбищная слепота крупного рогатого скота) - инфекционное заболевание, характеризующееся поражением глаз, проявляющимся слезотечением, гиперемией сосудов конъюнктивы, светобоязнью, помутнением и изъязвлением роговицы, деформацией глазного яблока в виде кератоглобула или кератоконуса, частичной или полной потерей зрения.

Заразные болезни глаз животных наносят животноводческим хозяйствам значительный экономический ущерб за счет преждевременной выбраковки животных, потери их племенной ценности, снижения удоев, прироста живой массы тела, затрат на проведение ветеринарно-санитарных и специальных ветеринарных мероприятий. Наиболее высокий процент заболеваемости наблюдается у телят в возрасте от 1 до 6 мес. (50–70%). В группах доращивания и откорма, особенно когда скот находится на площадках с большой плотностью поголовья, заболевание регистрируется до 30%. ИКК среди дойного стада колеблется в пределах 10-12%. В крупных животноводческих комплексах зарубежных стран по выращиванию скота мясного направления продуктивности ежегодный ущерб достигает от 150 до 230 млн долларов.

На животноводческих комплексах болезнь регистрируется круглогодично, но наиболее массово – в летние месяцы, когда крупный рогатый скот находится на пастбище и подвержен нападению насекомых - переносчиков возбудителя.

Борьба с моракселлезом КРС, в связи с расширяющимся нозоареалом этой болезни на территории Республики Казахстан, в современных рыночных условиях является весьма актуальной проблемой. По данным мониторинга, проведенного в РК в 2018-2020 годы, моракселлез выявлен во многих эпизоотологических единицах среди пород Абердино-агнус, Герефорд, а также Казахской белоголовой.

В нашей стране, несмотря на широкое распространение инфекционного кератоконъюнктивита вопросы диагностики, терапии и превентизации не изучены. Причиной тому являются то, что моракселлёз крупного рогатого скота в нашей стране является новым, слабо изученным заболеванием, а диагностика проводится трудоемким рутинным методом - бактериологическим исследованием.

Ведущая роль при возникновении инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота принадлежит гемолитическим бактериям *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi* и *Moraxella ovis*. Из иммунологических тестов в странах Дальнего и Ближнего зарубежья применяются РДП, ИФА, генотипирование. Разработка ПЦР-РВ для диагностики ИКК КРС имеет большое научно-практическое значение, так как своевременное выявление возбудителя является неоспоримым доказательством наличия инфекции как нозоформы, что повлечет эффективную разработку соответствующих противоэпизоотических мероприятий. Производство диагностического препарата может быть налажено на предприятиях биологической промышленности.

Исходя из изложенного, весьма актуальным является разработка быстрой, специфичной и точной диагностики – полимеразно-цепной реакции в реальном времени. Кроме того, наряду с детализацией заболевания и мерами по его профилактике, при проведении лечения важное место занимает использование терапевтических препаратов, оказывающих эффективное действие. В настоящее время в связи с ухудшением экологической обстановки актуальной становится проблема совершенствования новых фитопрепаратов, оказывающих не только симптоматическое, но и эффективное патогенетическое действие по сравнению с синтетическими препаратами.

Цель диссертационного исследования. Совершенствование мероприятий по борьбе с инфекционным кератоконъюнктивитом крупного рогатого скота.

Задачи исследования.

1. Выделить эпизоотологическую культуру и определить типовую принадлежность возбудителя инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота на территории Республики Казахстан;
2. Разработать мультиплексную полимеразно-цепную реакцию (ПТР) в режиме реального времени для выявления возбудителей инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота;
3. Провести апробацию разработанной тест-системы мультиплексной ПЦР в реальном времени в лабораторных и производственных условиях;
4. Определить сравнительную эффективность лечебных мероприятий, применяемых при инфекционном кератоконъюнктивите КРС.

Методы исследования. Научно-исследовательские работы 2021-2023 гг. проводились в лаборатории бактериологии ТОО «КазНИВИ», лаборатории «Зеленая биотехнология и клеточная инженерия» Казахстанско-Японского инновационного центра и научной лаборатории кафедры «Клиническая ветеринарная медицина» КазНАИУ, лаборатории факультета

ветеринарной медицины Сельчукского университета (Турецкая Республика), производственные испытания в эпизоотологических единицах Алматинской, Жетысуской, Акмолинской, ЗКО, Туркестанской и Костанайской областей.

Выделение эпизоотологической культуры и определение типовой принадлежности возбудителя ИКК КРС на территории РК проводили путем бактериологического исследования биоматериала, полученного от клинически больных животных. Культуральные, морфологические, тинкториальные и другие биологические свойства выделенных культур моракселл изучали согласно «Методическим указаниям по диагностике, лечению и специфической профилактике инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота, вызванного бактериями *Moraxella bovis* и *Moraxella bovoculi*», утвержденным 19.10.2017г. МСХ России, по методам описанным М.А. Сидоровым «Определитель зоопатогенных микроорганизмов» (1995) и «Кратким определителем бактерий Bergeys» (1997).

Биологический материал получен от племенного КРС (Абердино-ангус, Геррефорд), местного (Казахской белоголовой, беспородные) поголовья в хозяйствующих субъектах Алматинской, Жетысуской, Акмолинской, Западно-Казахстанской, Туркестанской, Костанайской областей. Для бактериологических исследований был отобран биологический материал из конъюнктивы и слизистой оболочки носовой полости, а для серологических (РСК, РДСК) исследований – сыворотка крови. Бактериологические исследования выделенных культур моракселл были проведены в сравнении с референтными штаммами АТСС *Moraxella bovis* АТСС 17948ТМ и *Moraxella bovoculi* ВАА 1259ТМ.

Терапевтический препарат – фитомазь «КерКон» состоит из сбора лекарственных растений: трава очанки прямостоячей (*Euphrasia officinalis* L.), листья подорожника (*Plantago stepposa*), трава чабреца обыкновенной (тимьян ползучий - *Thymus serpyllum* L.), цветки ромашки (*Matricaria chamomilla* L.), листья подорожника (*Plantago stepposa*) на основе ланолина.

Для анализа геномов и поиска специфичных праймеров был использован алгоритм SpeciesPrimer, который в качестве исходных данных использует нуклеотидные последовательности полных геномов бактериальных штаммов. Все праймеры и зонды, полученные в ходе анализа, были проверены на специфичность и на отсутствие димеров с использованием программ BLAST+, MFEprimer, MPprimer, Mfold. Испытания экспериментальной серии набора реагентов «ПЦР-Моракселла-РВ» для выявления ДНК *Moraxella bovoculi*, *Moraxella ovis* и *Moraxella bovis* методом мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени проводились в соответствии с СТ ТОО 071240018450-002-2023.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Выделены эпизоотические культуры *M. bovis*, *M. bovoculi*. Культуральные, морфологические, тинкториальные и биохимические свойства выделенных культур соответствовали референтным штаммам АТСС

Moraxella bovis ATCC 17948TM и *Moraxella bovoculi* ВАА 1259TM. Типовая принадлежность подтверждена постановкой полимеразно-цепной реакции.

2. Разработана мультиплексная полимеразно-цепная реакция в режиме реального времени для выявления трех возбудителей (*M. bovis*, *M. bovoculi* и *M. ovis*) инфекционного кератоконъюнктивита КРС в одной пробе. Аналитическая чувствительность с использованием набора олигонуклеотидов в реакции ПЦР в РВ для выявления ДНК *M. bovis*, *M. bovoculi* и *M. ovis* составила 21 копия, что соответствовало 50 фг в реакции. Специфичность набора олигонуклеотидов *Moraxella* доказана тестированием близкородственных микроорганизмов и возбудителей некоторых зоонозов (*Salmonella enterica*, *Streptococcus equi*, *Helicobacter pylori*, *Pasteurella equi*). Использование набора олигонуклеотидов в реакции ПЦР в режиме реального времени показало 100% специфичность для определения культур *Moraxell*.

3. Проведены апробационные испытания разработанной тест-системы в лабораторных и производственных условиях. Специфичность, чувствительность и срок годности препарата подтверждены апробационными испытаниями на базе РГП на ПВХ «НРЦВ» КВКН МСХ РК (Регистрационное удостоверение №РК-ВП-2-5289-24). Производственные испытания проводились на 542 смывах с пораженных глаз крупного рогатого скота хозяйствующих субъектов Акмолинской, Жетысуской, Туркестанской, Костанайской областей. При этом выявлено 15 положительных проб с Акмолинской области. В этих 15 положительных пробах идентифицированных как *Moraxella bovoculli* (100%), *Moraxella ovis* составило 33,3%, а *Moraxella bovis* – 6,7%.

4. Разработан лечебный фитопрепарат «КерКон». Терапевтическая эффективность составила 86,7% при длительности лечения 10-16 суток. Фитомазь не обладает местно-раздражающим действием на конъюнктиву.

Описание основных результатов исследования. Впервые на территории РК разработана мультиплексная полимеразно-цепная реакция в режиме реального времени для выявления возбудителей инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота. Ценность данной тест-системы подтверждается специфичностью, аналитической активностью и отсутствием аналога коммерческого набора на территории РК, ближнего и дальнего зарубежья.

В связи с существующей потенциальной опасностью дальнейшего распространения моракселлёза среди местных пород животных, разработанный набор реагентов «ПЦР-Моракселла-РВ» для выявления ДНК *M. bovis*, *M. bovoculi* и *M. ovis* методом мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, представляет большой практический интерес для фермеров, ученых, специалистов ветеринарного профиля в области животноводства позволяя прогнозировать и предупреждать появление кератоконъюнктивита крупного рогатого скота, предотвращая огромный экономический ущерб сельскому хозяйству, своевременно и эффективно разработать противоэпизоотические мероприятия.

Впервые разработана мазь «КерКон» для лечения инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота, приготовленная на основе лекарственных трав.

Обоснование новизны и важности полученных результатов. Впервые в Республике Казахстан установлены оптимальные параметры постановки реакции, которые включали подбор оптимальной температуры отжига и компонентов реакционной смеси. Оптимизирован состав фитомазы на основе лекарственных растений и отработана схема лечения конъюнктивита терапевтическим препаратом «КерКон». Доказано, что испытанный метод лечения позволяет сократить время выздоровления животных в среднем на 5-6 дней раньше по сравнению с другими методами. Предлагаемые диагностический тест и терапевтический препарат позволят своевременно разработать эффективные противоэпизоотические мероприятия.

Новизна работы защищена 3 охранными документами (№7332 от 12.08.2023 г., №8214 от 30.06.2023 г., №8587 от 05.04.2024 г.), опубликовано 1 рекомендация (Правила осуществления ветеринарно-санитарных мероприятий по профилактике и ликвидации моракселлёза крупного рогатого скота).

Соответствие направлениям развития науки или государственным программам. Диссертационная работа выполнена в период с 2021 по 2023 гг. на основе научно-технической программы «Разработать и предложить для производства средства и методы диагностики, профилактики заболеваний, терапии больных животных и обезвреживания очагов сибирской язвы в почве», по проекту «Разработать и предложить для производства мультиплексную полимеразно-цепную реакцию (ПЦР) в режиме реального времени для выявления возбудителей инфекционного кератоконъюнктивита КРС» (BR10764975).

Описание вклада докторанта в подготовку каждой публикации Докторантом по результатам научных исследований были подготовлены и опубликованы под руководством научных консультантов 17 научных работ, в том числе 4 статьи в журналах Комитета по обеспечению качества в сфере науки и высшего образования, 3 статьи в журнале, входящий в базу данных Scopus (Research Journal of Pharmacy and Technology 2023; Vet World. 2023; International Journal of Veterinary Science, 2023), 1 статья в зарубежном (РФ) издании, приравненном к КОКНВО (ВАК), 5 статей опубликовано в материалах международных (РК, РФ, Грузия) конференций, 1 рекомендация, так же было получено 3 охранных документа.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 132 страницах компьютерного набора текста. Ее содержание состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования, обсуждения результатов, выводов, практических рекомендаций, списка использованной литературы и приложения. Диссертация иллюстрирована 19 таблицами, 36 рисунками. Список литературы включает 156 источника, в том числе на иностранном языке - 72.