

әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті

ӘОЖ 578.7 |(043)

Қолжазба құқығында

АБАЙ ЖАНДОС САЙЛАУБЕКҰЛЫ

Ірі қара малдың туберкулезіне қарсы векторлық вакцина жасау
технологиясын әзірлеу

8D05110 – Вирусология

Философия докторы (PhD)

Ғылыми дәрежесін алу үшін дайындалған диссертация

Ғылыми кеңесшілер:
б.ғ.д., профессор
Закарья К.

Корея, Сеул ұлттық
университеті.
в.м.д., профессор
Yoo H.S.

Қазақстан Республикасы
Алматы, 2024

МАЗМҰНЫ

БЕЛГІЛЕУЛЕР МЕН ҚЫСҚАРТУЛАР	5
КІРІСПЕ	6
1 ӘДЕБИЕТКЕ ШОЛУ	10
1.1 Ірі қара мал туберкулезі.....	10
1.2 Туберкулездің қысқаша шығу тарихы.....	12
1.3 Ірі қара мал туберкулезін балау.....	16
1.4 Ірі қара малдың туберкулезін дауалауда қолданып жүрген вакциналар.....	25
2 ЗЕРТТЕУ НЫСАНДАРЫ ЖӘНЕ ӘДІСТЕРІ	29
2.1 Зерттеуде қолданылған биологиялық нысандар.....	29
2.2 Зерттеу әдістері.....	30
2.2.1 <i>M. bovis</i> : ESAT-6 және TB10.4 ақуыздарын экспрессиялайтын рекомбинантты тұмау вирусы векторын құрастыру.....	30
2.2.2 <i>Vero</i> жасушаларына трансфекциялау.....	31
2.2.3 Тауық эмбриондарында вирусты өсіру (культивирлеу).....	31
2.2.4 Генетикалық ендіріменің тұрақтылығын КТ-ПТР арқылы бағалау....	32
2.2.5 Дайын вакцина сапасын тексеру әдістері.....	32
2.2.6 Вакцинаның қауіпсіздігі мен протективті қасиетін ақ тышқандарда зерттеу.....	34
2.2.7 Вакцинаның қауіпсіздігі мен протективті қасиетін теңіз шошқаларында зерттеу.....	35
2.2.8 Вакцинаның иммуногенділігін, иммунитеттің тұрақтылығын және протективтілігін ірі қара малда бағалау.....	36
2.2.9 Статистикалық өңдеу.....	37
3 ЗЕРТТЕУ НӘТИЖЕЛЕРІ ЖӘНЕ ОЛАРДЫ ТАЛДАУ	38
3.1 Кері генетика әдісімен <i>M. bovis</i> гендерін экспрессиялайтын рекомбинантты тұмау вирусының штаммдарын құру.....	38
3.1.1 Genbank-те <i>Mycobacterium bovis</i> -тің иммунодоминантты ақуыздарын таңдау.....	38
3.1.2 Химерлік (NS1+микобактериялық ендіріменің) генетикалық сегменттерді синтездеу.....	47
3.1.3 Тауық эмбрионында плазмидалармен трансфекция арқылы микобактериялық ақуыздарды экспрессиялайтын тұмау векторларын дайындау.....	53
3.1.4 Рекомбинантты тұмау вирусының NS генін КТ-ПТР арқылы талдау.....	56
3.1.5 Туберкулез ақуыздарының экспрессиясын растау. Рекомбинантты вирустардың РНҚ сегменттерін секвендеу.....	57
3.2 Перспективалық вакцина нұсқасын анықтау үшін зертханалық модель жануарларда тұмау векторларының қауіпсіздігін, иммуногенділігін және қорғаныштығын алдын ала бағалау.....	57
3.2.1 Тұмау векторларының қауіпсіздігін ақ тышқандарда бағалау.....	58

3.2.2.	Тұмау векторларының қауіпсіздігін теңіз шошқаларында бағалау.....	60
3.2.3	Тұмау векторларының теңіз шошқаларында қорғаныс тиімділігін бағалау арқылы иммуногенділігін зерттеу.....	69
3.3	Рекомбинантты тұмау векторы негізінде туберкулезге қарсы векторлық вакцина жасау технологиясын әзірлеу.....	69
3.3.1	Тауық эмбриондарында микобактериялық антигендерді экспрессиялайтын тұмау векторларын өсірудің оңтайлы параметрлерін (вирустың инфекциялық дозасы, температура және инкубация уақыты) әзірлеу.....	75
3.3.2	Тұмау векторларының бастапқы биомассасын және сапасын бақылау (стерилділік, инфекциялық және гемагглютининдік белсенділік, микобактериялық ендіріменің болуы).....	77
3.3.3	Вакцина өндірісі үшін тәжірибелік биомассаны алу.....	77
3.3.4	Тұрақтандырушы ортаны таңдау және вакцинаның оңтайлы құрамын жасау.....	78
3.3.5	<i>Mycobacterium bovis</i> -ке қарсы векторлық вакцинаның тәжірибелік сериясын дайындау және сапасын бақылау (стерильділік, инфекциялық белсенділік, микобактериялық ендіріменің болуы).....	79
3.3.5.1	Векторлық вакцинаны алу технологиясы.....	82
3.3.6	Зертханалық жануарларда және бұзауларда Т-жасушалық иммундық жауапты және вакцинаның қорғаныш қасиетін анықтау.....	84
3.4	Векторлық вакцинаның қауіпсіздігі мен иммуногенділігіне мекемешілік комиссиялық сынақ жүргізу.....	99
3.5	Туберкулезге қарсы векторлық вакцинаны ірі қара малға егудің оңтайлы әдісін таңдау.....	100
3.5.1	Ірі қара малды туберкулезге қарсы векторлық вакцинамен иммунизациялаудың оңтайлы режимі.....	100
3.5.2	Туберкулезге қарсы векторлық вакцинаның оңтайлы егу дозасын анықтау	101
3.5.3	Ірі қара малдың екпеден кейінгі иммундық қорғаныс жауабының мерзімі мен ұзақтығын анықтау.....	101
	ҚОРЫТЫНДЫ.....	104
	ПАЙДАЛАНЫЛҒАН ӘДЕБИЕТТЕР ТІЗІМІ.....	105
	ҚОСЫМША А – Микобактериялық ген кірістірулері бар NS химерлі генінің тізбектерін теңестіру.....	112
	ҚОСЫМША Ә – Ұйым стандартының мұқаба беті.....	115
	ҚОСЫМША Б – Вакцинаны қолдану нұсқаулығының мұқаба беті.....	116
	ҚОСЫМША В – Өндіру және бақылау нұсқаларының мұқаба беті.....	117
	ҚОСЫМША Г – Комиссиялық сынақ бағдарламасының мұқаба беті.....	118

БЕЛГІЛЕУЛЕР МЕН ҚЫСҚАРТУЛАР

bp – негіз жұптары

CD4+ - Т-лимфоциттер

CD8+ - цитотоксикалық жасушалар (Т-лимфоциттер)

КТБ – колония түзуші бірлік

EID₅₀–50% эмбрионды инфекциялау дозасы

TCID₅₀ - 50% жасуша культурасын инфекциялау дозасы

Esat-6 – early secreted antigenic target - туберкулездің *M. bovis* штаммының иммунодоминантты ақуызы

IFN γ – гамма интерферондар

RD1 – region of difference - айырмашылық аймағы 1 гені

TB10.4 – туберкулездің *M. bovis* штаммының иммунодоминантты ақуызы

БЦЖ –Кальмёт — Герён Бацилласы вакцинасы (коммерциялық вакцина)

ІҚМ – ірі қара мал

КТ-ПТР – кері транскрипциялық полимеразды тізбекті реакция

pH – сутегі иондарының концентрациясы

ЭДТА – этилендиаминтетрасірке қышқылы

АСТ – аспаратаминотрансфераза

АЛТ – аланинаминотрансфераза

ТМБ – туберкулез микобактериялары

мРНҚ – матрицалық (ақпараттық) рибонуклеин қышқылы

кДНҚ – комплементарлық дезоксирибонуклеин қышқылы

NS – тұмау вирусының құрылымдық емес ген сегменті

ХЭБ – Халықаралық эпизоотиялық бюро

WANIS – Дүниежүзілік жануарлар денсаулығы жөніндегі ақпараттық жүйесі

КІРІСПЕ

Жұмыстың жалпы сипаттамасы: Диссертациялық жұмыс микобактериялық гендерді тасымалдаушы векторды құру арқылы рекомбинантты құс тұмауы вирусының негізінде ірі қара мал туберкулезіне қарсы отандық векторлық вакцинаны жасауға, сонымен қатар зертханалық және мақсатты жануарларда вакцинаның қауіпсіздігін, қорғаныштығын және иммуногенділігін зерттеуге арналған.

Диссертациялық жұмыстың өзектілігі: Ірі қара мал туберкулезі – *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) микобактериясы тудыратын ірі қара малдың (ІҚМ) созылмалы жұқпалы ауруы. Ірі қара туберкулезін бақылаудың тағы бір маңызы – оның зооноздық қабілетіне байланысты, яғни белгілі бір жағдайда жануарлардан адамға табиғи жолмен берілуі қауіпін тудырады. Қазақстанның ауыл шаруашылығында ІҚМ басты орын алады. Сондықтан ірі қара денсаулығына елеулі әсерін, сондай-ақ экономикалық және әлеуметтік салдарын ескере отырып, Қазақстанда ірі қара мал туберкулезін зерттеу өзекті мәселе болып қала береді.

Қазіргі уақытта, *M. bovis* вакцинациясының тиімділігіндегі айтарлықтай айырмашылықтарға қарамастан, ірі қара малдағы және адамдардағы БЦЖ әлі күнге дейін ірі қара мал туберкулезінің таралуын төмендетуде әлеуетті пайдасы бар жалғыз коммерциялық қол жетімді вакцина үміткері болып табылады. Дегенмен, соңғы жылдары аллергиялық зерттеулер кезінде иммунизацияланған жануарларда вакцинациядан кейінгі реакциялардың пайда болуымен, төмен иммуногенділігімен және олардың дифференциациясының қиындығымен байланысты БЦЖ вакцинасын қолдануға қатысты көптеген шағымдар пайда болды. Жұқпалы ауруларға қарсы тиімді вакциналарды жасаудың перспективті бағыты вакцинацияның профилактикалық немесе емдік әсерін қалыптастырумен байланысты организмге қорғаныш антигендерін жеткізетін әлсіретілген рекомбинантты векторларды құру болып табылады.

Кері генетика әдісінің дамуы тұмауға қарсы түрлендірілген интраназальды векторлық вакцинаны қолданудың бірегей мүмкіндігі пайда болды. Тұмау векторларын құру кезінде генетикалық манипуляцияның перспективалы нысандарының бірі тұмау вирусының құрылымдық емес NS1 ақуызы болып табылады. Бұл ақуыз табиғи тұмау инфекциясы кезінде жұқтырған жасушаларда көп мөлшерде синтезделеді және айқын антидене мен Т-жасушалық иммундық жауап тудырады. Тұмау вирусының NS1 генінің NS1 протеинінің ашық оқу шеңберіне үлкен мөлшердегі бөгде нуклеотидтер тізбегін енгізуге жоғары төзімділігін көрсетті.

Қазіргі кезде жаңа вакцина кандидаттарын жасау кезінде туберкулез микобактериясының культуралық сүзгі ақуыздары үлкен қызығушылық

тудурып отыр. Солардың бірі ерте секреторлық антиген ESAT-6 (ерте секрeция антигені, 6 кДа) болып табылады. Бұл ақуыз микобактериялардың RD1 геномдық аймағының көмегімен кодталған, әрі аталмыш генмодық аймақ БЦЖ вакцина штаммын ұзақ мерзімді өсіру кезінде жоғалған және адамдар мен жануарлардың туберкулез инфекциясының бастапқы кезеңінде де, сондай-ақ зерттеулерде жасушалық иммундық жауаптың иммунды-доминантты нысанасы болып табылады.

Адьювантты қолданбай микобактериялық антигендердің иммуногенділігін арттыру жолдарының бірі генді жеткізу және олардың организмде экспрессиясы үшін вектор ретінде аттенуирленген вирустарды қолдану болып табылады. Аттенуирленген вирустар (аденовирус, тұмау вирусы) негізінде микобактерия гендерін тасымалдайтын вирустық векторлар жасалуда.

Инфекцияны тоқтату үшін вакциналарды қолдану маңызды құрал болып табылады. Вакцинаға үміткерлерді жасау, сондай-ақ вакцинациялау стратегияларын әзірлеу үшін *M. bovis* патогенезінің барлық ерекшеліктерін және вакцинаға үміткерлердің клиникаға дейінгі сынақтары жүргізілетін жануарлар үлгілерімен салыстырғанда адам ағзасының ерекшеліктерін ескеру қажет.

Зерттеу мақсаты: Микобактериялық ақуыздарды экспрессиялайтын рекомбинантты тұмау вирустары негізінде ірі қара мал туберкулезіне қарсы жаңа векторлық вакцинаны жасау технологиясын әзірлеу.

Зерттеу міндеттері:

1. *Mycobacterium bovis*-тің иммунодоминантты ақуыздарын экспрессиялайтын рекомбинантты тұмау векторларын құру;
2. Ірі қара мал туберкулезіне қарсы векторлық вакцина әзірлеу технологиясын жасау;
3. Ірі қара мал туберкулезіне қарсы вакцинаның тәжірибелік өнеркәсіптік үлгілеріне институтішілік комиссиялық сынақтар жүргізу.

Зерттеу нысаны: Микобактериялық антигендерді экспрессиялайтын рекомбинантты тұмау вирусы және ірі қара мал туберкулезіне қарсы векторлық вакцинаның тәжірибелік сериясы.

Зерттеу әдістері: Жұмыс барысында молекулалық биология, гендік инженерия, биотехнология, вирусология, серология әдістері қолданылып, жануарларда тәжірибелер жүргізілді.

Зерттеудің ғылыми жаңалығы: Қазақстан Республикасында алғаш рет молекулалық биология мен гендік инженерияның соңғы жетістіктерін пайдалана отырып, ірі қара туберкулезіне қарсы жаңа векторлық вакцина өндіріліп, сынақтан өткізілді.

Жұмыстың ғылыми-практикалық маңызы: Вакцинаның иммуногенділігін арттыру, жаңа вакциналық композициялар жасау, қазіргі

молекулалық биология мен иммунология жетістіктері негізінде туберкулезге қарсы вакциналарды жасау ветеринария үшін үлкен маңызға ие. Жүргізілген ғылыми зерттеулердің нәтижесінде ірі қара мал туберкулезінің алдын алатын жаңа буын препараты жасалды.

Қорғауға ұсынылатын тұжырымдар:

1. Құс тұмауы вирусын вектор ретінде пайдаланатын ірі қара малдың туберкулезіне қарсы векторлық вакцина аурудың алдын алудың тиімді әдісі болып табылады.

2. Ірі қара мал туберкулезіне қарсы векторлық вакцина алуға әзірленген технология оңтайлы болып табылады. Әзірленген технология бойынша вакцина сапасы бойынша ҰС 405-1919-04 ДП-146-2023 ұйым стандартына сәйкес келеді.

3. Құс тұмауы вирусы негізіндегі ірі қара малдың туберкулезіне қарсы векторлық вакцина зертханалық жануарларда қауіпсіз, протективті қасиетке ие және иммунитетті қамтамасыз етеді, бұл институтішілік сынақ нәтижелерімен расталады.

Автордың жеке үлесі. Зерттеу жұмысының тақырыбына байланысты әдеби деректерге талдау жасау, жұмыстың мақсаты мен міндеттерін анықтау, тәжірибелік зерттеулерді жүргізу, нәтижелерді статистикалық өңдеу және талдау, диссертацияны жазу мен қол жазбаны рәсімдеу, сонымен қатар шетелдік Web of Science и Scopus мәліметтер қорындағы және Білім саласындағы сапаны қамтамасыз ету комитеті ұсынған журналдарда ғылыми мақала жариялау автордың жеке қатысуымен орындалды.

Жұмыстың ғылыми жобамен байланысы. Диссертациялық жұмыс AP09259683 «Ірі қара мал туберкулезінің алдын алу үшін векторлық вакцинаны өндіру технологиясын әзірлеу» 2021-2023 жж. гранттық қаржыландыру жобасы аясында жүзеге асырылды.

Жұмыстың сыннан өтуі. Жұмыстың негізгі нәтижелері «Research for Rural Development 2023» (Елгава қ., Латвия, 2023) халықаралық ғылыми конференцияда баяндалып, тезистер жинағы AGRIS; CAB ABSTRACTS; CABI; EBSCO Academic Search Complete; Web of Science™ - Clarivate Analytics; Thomson Reuters, Elsevier, Scopus дерек қорларында жарияланды; «Жастар ғылымда 2023» (Алматы қ., Қазақстан, 2023) жас ғалымдар ғылыми-тәжірибелік конференциясында баяндалды.

Басылымдар. Диссертациялық жұмыс бойынша 10 ғылыми еңбек жарияланды. Диссертациялық жұмыстың негізгі нәтижелері Білім саласындағы сапаны қамтамасыз ету комитеті ұсынған «Eurasian Journal of Applied biotechnology» журналында жарияланды (Астана, 2023); Web of Science және Scopus деректер базасында рецензияланған импакт-факторы бар «Vaccines» журналында 1 мақала жарияланды; Web of Science және SCOPUS деректер базасында рецензияланған импакт-факторы бар «Journal of Genetic

Engineering and Biotechnology» журналында 1 мақала жарияланды. Пайдалы модельге 2 патент алынды.

Жұмыстың құрылымы мен көлемі. Диссертациялық жұмыс белгілеулер мен қысқартулар, кіріспе, әдебиеттерге шолу, зерттеу материалдары мен әдістері, зерттеу нәтижелері және оларды талдау, қорытынды, пайдаланылған әдебиеттер тізімі бөлімдерін қосқанда 118 беттен, 97 әдебиеттен, 40 суреттен және 30 кестеден тұрады.

1 ӘДЕБИЕТКЕ ШОЛУ

1.1 Ірі қара мал туберкулезі

Туберкулез ірі қара малдың жұқпалы ауруы. Аталмыш кеселдің қоздырғышы - *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) бактериясы [1-3]. Ірі қара мал туберкулезі борсықтарға, бұғыларға, ешкілерге, шошқаларға және түйелерге (ламалармен альпактарда) [4-10], сондай-ақ көптеген басқа сүтқоректілерге [11-14] жұғып, ауру тудыруы мүмкін, ол созылмалы респираторлық ауру ретінде өтеді, бірақ клиникалық белгілері өте сирек байқалады [15-18].

Ірі қара мал туберкулезі - бұл зоонозды ауру, жануарлардан адамға табиғи жолмен беріледі [19-21]. Ірі қара мал туберкулезін болдырмаудың жан-жақты стратегиялық жоспарының арқасында *M. bovis* ауыратын адамдар сирек кездеседі [22-23], алайда көптеген дамушы елдерде бұл ауру күрделі проблемалар тудырып отыр [24-25].

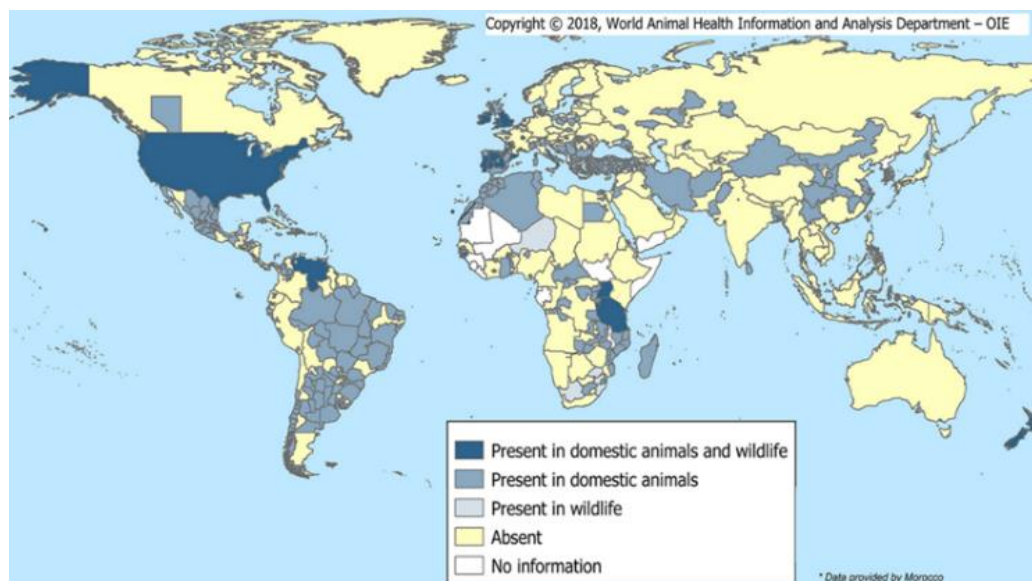
Аурудың қоздырғышы анаэробты бактерия болып табылады, ол қозғалмайды, спора түзбейді және қышқылдарға төзімді [26]. *M. bovis* майлы элементтерінің арқасында сыртқы ортаға және дезинфекциялық заттардың әсеріне төзімді болып келеді [27-28]. Сынама ретінде ауада кептірілген өкпе бөліктерінде микроорганизмдердің уыттылығы 200 күн сақталып, ал топырақ пен көңде 4-12 жылға дейін сақталуы мүмкін. Күн сәулесі қақырықтағы бактерияларды тек 72 сағаттан кейін зарарсыздандыра алады. Туберкулез қоздырғышы ауру жануарлардан алынған өнімдерде: сүтте 19 күнге дейін, майда 300 күнге дейін, ірімшікте 145 200 күн және мұздатылған етте бір жылға дейін, тұздалған етте 60 күнге дейін сақталады. Ірі қара мал мен құстардың өлекселерінде микобактериялар 3 айдан 12 айға дейін өмір сүре алады. Жоғары температура туберкулез бактерияларына теріс әсер етеді. Сүтті 55°C дейін қыздыру 4 сағат ішінде, 85°C дейін қыздыру 30 минут ішінде өлтіреді, ал сүт қайнатылған кезде микобактериялар 1-2 минуттан кейін өледі. Химиялық заттар бактерияларға салыстырмалы түрде ұзақ уақыт әсер етеді: бром қышқылының 5% ерітіндісінде 24 сағаттан кейін, 5% формалин ерітіндісінде 12 сағаттан кейін және 5% ағартқыш ерітіндісінде 3 сағаттан кейін жояды [29].

Туберкулезбен үй және жабайы жануарлардың 55-тен астам түрі және құстардың 25-ке жуық түрі ауырады [30-32]. Ауру жануарлар бактерияларды нәжіспен, несеппен, қақырықпен және сүт арқылы сыртқы ортаға таратады. Туберкулезбен ауыратын ірі қара малдың 1 грамм қақырығының құрамында 100 мыңға дейін туберкулез бактериялары болуы мүмкін [32-33]. Ауру жануар жөтелген кезде қақырықтың бір бөлігі ауаға шашырайды, ал бір бөлігін жануар қайта жұтып, нәжіспен шығарады. Сыртқы ортаға уытты жем-шөпті, суды, малдың қиын, қора-қопсыны залалдап, қасындағыға жұғады, малдың қиы арқылы егістікке жануарлар шоғырланған кезде топырақты, онда өсіп тұрған шөпті немесе астықты залалдап туберкулез кеселінің ошақтарының пайда болуына әсер етеді [34].

M. bovis тыныс алу немесе ас қорыту жолдары арқылы жануардың денесіне еніп, өкпе немесе басқа мүшелерге лимфа және қан айналым жүйесімен таралады. Туберкулез бактерияларының жинақталған жерінде қабыну процесі дамып, содан кейін туберкулез түйіндерінің пайда болуымен жалғасады (туберкулез түйіндері - туберкулалар жасымық дәнінің мөлшерімен бірдей, сұрғылт түсті, дөңгелек пішінді болып келеді) [35]. Туберкулалар ортасында микобактериялар токсиндердің әсерінен өлі жасушалар сүзбе тәрізді массаға айналады. Ағзаның төзімділігіне және бактериялардың уыттылығына (вируленттілігіне) байланысты туберкулез процесі қатерсіз және қатерлі түрде өтуі мүмкін [36].

Туберкулездің жасырын кезеңінің ұзақтығы екі аптадан алты аптаға дейін созылады [37]. Ірі қара малдың туберкулезі созылмалы немесе жасырын болып келеді, сондықтан аурудың клиникалық белгілері ағзада кеселді жұқтырғаннан кейін бірнеше ай немесе тіпті жылдар өткен соң пайда болуы мүмкін. Шартты түрде белсенді туберкулез бронх шырышты, нәжісі немесе сүт арқылы туберкулез бактерияларын ағзадан сыртқы ортаға бөлінуін қамтамасыз етеді, кей жағдайда - жасырын туберкулез кезінде, бактериялар туберкулез ошағында соншалықты оқшауланған кезде, олар сыртқа шығарылмайды. Ірі қара малда туберкулезі көбінесе созылмалы немесе жасырын түрде, ал жас төлдерде ол өткір және латентті түрде жүреді. Аурудың клиникалық белгілері-дене температурасының жоғарылауымен (39,5°C), дымқыл жөтелдің пайда болуымен сипатталады. Жөтел кезінде ағзадан шырышпен бірге кейде өлі тіндердің қалдықтары бөлінеді [29].

Халықаралық эпизоотиялық бюроға қарасты (ХЭБ) Дүниежүзілік жануарлар денсаулығы жөніндегі ақпараттық жүйесі (WANIS) арқылы 2017 жылғы қаңтар мен 2018 жылғы маусым аралығында қара мал туберкулезінің дүниежүзі елдерінің 44 пайызында тіркелгені жөнінде хабарланды (сурет 1) [38,39].



Сурет 1 – WANIS мәліметтері бойынша қазіргі таңда *M. bovis* тудырыратын туберкулездің жаһандық таралу картасы [38]

Аталмыш зардап шеккен елдердің төрттен бір бөлігі ғана барлық тиісті бақылау шараларын қолданған. Аурудың таралу себептерін болдырмай, қадағалау және елдің ветеринариялық қызметтерінің нақты есептілігі жануарлардағы туберкулездің алдын алуға және бақылауға ықпалын тигізеді.

WANIS сайтында ірі қара туберкулезі бойынша 2018 жыл соңғы ақпарат тіркелгендігін ескере отырып, сайттын статистикалық ақпараттарын пайдаланып, Ресей, Қырғызстан және Қазақстан елдерін салыстырылды.

Қазақстан, Қырғызстан және Ресей үшін WANIS ресми есептері мен жылдық есептерінің деректері негізінде жасалған картаға сәйкес, Қазақстан 2005-2007 жж. үй және жабайы жануарлар арасында туберкулездің болуы статусына ие болды. 2007 жылдың барлық тоқсандары инфекцияға күдікті жағдайды көрсетті. 2008 жылдан бастап еліміз мал туберкулезінен таза ел деген ресми халықаралық мәртебеге ие болды. Ал Ресейде үй жануарлары арасында инфекция 2018 жылға дейін жалғасты.

Әдебиет көздеріне сүйенер болсақ, қара мал туберкулезі мал шарушылығында мал өнімдерін өндіру өндірісінің өнімділігін төмендетіп, ірі қараның репродуктивті қабілеттілігін нашарлатады және халықаралық сауда үшін шектеу қойылады, бүкіл әлемде мал шаруашылығына айтарлықтай экономикалық зиян келтіріп қана қоймай адам өліміне әкеліп соқтыратын зоонозды ауру болып табылады [40]. Дүниежүзілік денсаулық сақтау ұйымының (ДДСҰ) 2020 жылғы жаһандық туберкулез туралы баяндамасында мәлімделгендей әлемде туберкулез жағдайларының жалпы санының үштен екісі сегіз елге тиесілі: Үндістан (26%), Индонезия (8,5%), Қытай (8,4%), Филиппин (6,0%), Пәкістан (5,7%), Нигерия (4,4%), Бангладеш (3,6%) және Оңтүстік Африка (3,6%). Жоғарыда аталған елдердің Оңтүстік-Шығыс Азия аймағына кіретін төрт ел (Үндістан, Индонезия, Филиппин және Бангладеш) ірі қара туберкулезінен адам өлімі бойынша бірінші орында болса, ал екінші орын Африка аймағы иемденді (Global Tuberculosis Report 2020, 2020). Бұл елдерде мал сою пункттеріне бақылаудың жоқтығы (немесе нашарлығы) кеселдің алдын-алудың жүйелі жүйесінің жоқтығы әсер етіп отырған сияқты [41].

Туберкулин сынамасын жүйелі жүргізіп, кеселге шалдыққан малды оқшаулап, сау малға індеттік жағдайға байланысты вакцина егіп, кеселдің алдын алу көптеген дамыған елдерде жүйелі түрде жүргізіледі [42]. Қара мал туберкулезінің алдын алу әлемнің көптеген елдерінде қол жетімді емес, кей жағдайларда қолайсыз, сондықтанда бұл жағдай кейбір елдерде ірі қара мал туберкулезі адам денсаулығына қауіп төндіреді [43, 44].

1.2 Туберкулездің қысқаша шығу тарихы

Туберкулез ерте заманнан белгілі. Жұқпалы аурулардың табиғаты ашылғанға дейін көп уақыт бұрын туберкулез жұқпалы ауру деп есептелді. Вавилондық Хаммурапи кодексінде өкпе туберкулезінің белгілері бар науқас әйелімен ажырасу құқығы бекітілген. Үндістанда, Португалияда және Венецияда осындай жағдайлардың барлығын хабарлауды талап ететін заңдар

болды. Ежелгі Солтүстік Америка тарихи аспектілеріне жүгінер болсақ, туберкулез мұз дәуіріндегі ірі қара малмен мастодондар арасында таралғаны туралы деректер бар [1-3]. Natural Trap үңгіріндегі (Солтүстік Американың штаты Вайоминг) жиналған тас дәуіріне жататын қаңқалардың сүйек патологиясы ежелгі жануарлар туберкулезінің резервуарының болғандығын көрсетеді [4-6].

Туберкулез және оның жұқпалылығы туралы мәліметтер Гиппократтың (б.з.б. 460-377), Галеннің (б.з.б. 131-201), Аристотельдің (б.з.д. 384-322 ж.) еңбектерінде кездеседі. Өкпе туберкулезінің ағзада өршіп дамуымен оның ағымына сыртқы ортаның әсерін атап өткен Авиценнаның (Ибн Сина) (980-1037) еңбектері үлкен маңызға ие болды [7].

XVI ғасырдың өзінде туберкулез ауруы жұқпалы деп саналған [7]. «Туберкулез» терминін алғаш рет француз дәрігері Теофиль Лаэннак (1819) қолданған [8], аурудың жұқпалылығын Ж.А. Виллемин (1865) дәлелдеген. Ол 1890 жылы туберкулинді де жасады [9].

Рим империясының құлдырауынан кейін туберкулез Еуропада VIII және XIX ғасырларда кең таралды, бұған бірнеше археологиялық қазбалар дәлел бола алады [10].

Византия дәрігерлері Аетий Амидский, Александр Тралльский және Павел Эгинский туберкулездің өкпе және безді түрлерін сипаттады, Ал Араб империясында Авиценна туберкулездің жұқпалы сипаты туралы ақпараттар ұсынды [11].

17 ғасырда Фрэнсис Сильвиус алғаш рет адам өлексесінен алынған әртүрлі тіндердегі гранулемаларды туберкулез белгілерімен байланыстырды.

1700 жылы итальяндық дәрігер Бернардино Рамазинидің көптеген зиянды кәсіптер және олармен байланысты респираторлық жұмысшылар аурулары туралы баяндалған «Шеберлердің аурулары туралы» кітабы жарық көрді, онда, олардың қазіргі уақытта дамыған өкпе туберкулезінің көріністері немесе туберкулездің жеке нозологиялық түрлері жайлы ақпараттар кездеседі. Сонымен қатар, 1720 жылы Абердин университетінің медицина факультетінің британдық дәрігері Бенджамин Мартен туберкулезді науқастардың қақырығында байқаған микробтар тудыратын ауру ретінде сипаттайтын жаңа теориясы туралы кітабын шығарды. Алайда микробтарды ашқан Левенгук олардың қандай да бір ауру тудыруы мүмкін екеніне сенбеді, яғни бұл теорияны жоққа шығарды және оның беделі мен сол кездегі ғылымның жалпы даму деңгейі басқа мәдениет дәрігерлеріне (нақтылап айтар болсақ - Саксон әлемі) әсер етіп, тек арада 160 жыл өткенде Кох теорияларынан кейін ғана туберкулез қоздырғышы туралы ақпарат кеңінен таралды [12].

Алғашқы серпіліс 1865 жылы Валь-де Грейстегі әскери медициналық мектептің хирургі Жан Антуан Вильмен болды. Ол туберкулез ауруының кемеде ауру теңізшіден тарағанын байқады. Жұқпалы табиғаттың дәлелі ретінде дәрігер науқастардың қақырығын жинап, онымен теңіз шошқаларының бағу-күту құралдарын залалдап, нәтижесінде жануарлар туберкулезбен ауырып өлді – зерттеуші туберкулездің жұқпалы

(«вирулентті») ауру екенін дәлелдеді. Сонымен қатар Виллемин ұзақ уақыт казармада тұрған сарбаздар даладағы сарбаздарға қарағанда туберкулезбен ауыратынын, ал елден келген дені сау әскерге шақырылғандар қызметке кіріскеннен кейін бір-екі жыл ішінде жиі осы ауруға шалдығатынын байқаған. Ол көп жылдар бойы жиналған тәжірибелер арқылы туберкулез және бұл аурудың жұқпалы екені туралы мағлұматтарды: *son inoculation de l'homme au lapin* деген еңбегінде толықтай ашып жазды. [13-17].

1868 жылы неміс патологы Теодор Ланганс туберкулезді эпителиоидты жасушалар (макрофагтардың) бірігуі нәтижесінде түзілетіндігі және жасуша шетінде жылқы тәрізді тәртіпте орналасқан ядролардан тұратындығы жайлы айтып, кейінірек аталмыш жасушалар оның атымен аталған [18].

Бертін келе 1882 жылы Германияда Роберт Кох 17 жыл зертханада жұмыс істегеннен кейін туберкулездің қоздырғышын ашты, оны Кох таяқшасы деп атады. Туберкулезбен ауыратын науқастың қақырығынан дайындалған препаратты везувин және метилен көгімен бояғаннан кейін микроскопиялық зерттеу кезінде қоздырғышты анықтады. Кейіннен ол қоздырғыштың таза шоғырын бөліп алып, онымен тәжірибелік жануарларға жұқтырып, зертханалық жануарларда жасанды туберкулез кеселін тудырды [12].

1882 жылы Кохтың ағзада туберкулез ауруын тудыратын таяқшаны ашуы аурудың жұқпалы екендігіне дәлел болды. 1905 жылы Нобель сыйлығын алған кезде ол өзінің бактериолог әріптесі Карл Флюгге жөтелден шыққан тамшылардағы таяқшалар инфекцияны қоршаған ортаға таратуы мүмкін деген жұмысына тоқталды. Алайда, 20 ғасырдың ортасында ғана туберкулездің ластанған ауа тамшылары арқылы жұғатыны дәлелденді. Сонымен қатар 1882–1884 жылдары Франц Циль және Фридрих Нельсен (Германия) қышқылға төзімді туберкулез микобактерияларын бояудың тиімді әдісін ұсынды [19].

1890 жылы Роберт Кох алғаш рет туберкулез микобактериясының қоздырғышын анықтаудың тазартылған ақуыз туындысы (PPD) арқылы иммундық реакцияны бақылауды қамтитын туберкулинді алды, ол оны «туберкулез дақылдарының су-глицерин сығындысы» деп сипаттады. Кох туберкулезді анықтау үшін туберкулинді тері астына егуді ұсынды. Берлиндегі медициналық конгрессте Кох туберкулиннің профилактикалық және тіпті емдік әсері туралы баяндады. Кейіннен 1907 жылы австриялық педиатр Клеменс Пирке туберкулезбен ауырған адамдарды анықтау үшін туберкулинмен тері сынамасын жүргізіп, аллергия ұғымын енгізді [20].

1919 жылы микробиолог Альберт Кальмет пен ветеринар Камилл Герин адамдарды туберкулезден қорғау мақсатында туберкулез микобактериясының вакциналық штаммын жасады. Штамм "Bacilli Calmette-Guerin (БЦЖ)" деп аталды. БЦЖ вакцинасы алғаш рет жаңа туған нәрестеге 1921 жылы егілді [21-23].

1991-2019 жылдар аралығында Қазақстанда қара малдың туберкулезге індеттік жағдайы күрделі болды. Туберкулезді балау және алдын алу бойынша нұсқаулықтарды қатаң сақтау, әзірленген ветеринариялық-санитариялық

ұйымдастыру және экономикалық шараларды жүзеге асыру туберкулездің эпизоотиялық көрінісін жақсартуға, мамандардың республикамызда ауыл шаруашылық малдарының арасында туберкулездің алдын алу шаралары, уақтылы балау, реакция берген қара малдың тән реакциясын жалған реакциядан ажырату, қора-қопсыларды, жаздық және қыстық орындарды таза ұстау, нұсқауға байланысты залалсыздандыру шараларын тиянақты жүргізу туберкулезді нақты індеттік жағдайын бақылауға мүмкіндік берді, әрі адамдарды кеселден сақтауға септігін тигізді [24 - 26].

Туберкулез жұқпалы аурулар арасында ерекше орын алады, онымен адам, жануарлармен құстардың барлық түрлері ауырады. Екіншіден, туберкулездің қоздырғышын Роберт Кох (1882) ашқаннан бері 100 жылдан астам уақыт өтседе, бұл ауру қазіргі уақытта өте кең таралған инфекциялар қатарына жатады. Жануарларда туберкулездің таралуының ең ауыр салдары аталмыш аурудың адамдарға жұғып кеңінен таралуы болып табылады. Әдетте туберкулез адамға мал өнімдерін тұтынғанда немесе ауру жануарларға күтім жасағанда жұғады. Сондықтан жануарлардың туберкулезімен күрес-әлемнің барлық елдерінде үлкен назарға ие. Сонымен қатар, жануарлардың туберкулезін жою тек экономикалық ғана емес, сондай-ақ әлеуметтік - гигиеналық және эпидемиологиялық маңызға ие [24 - 27].

Туберкулез үй және жабайы жануарлардың, құстардың, сондай-ақ адамдардың созылмалы өтетін жұқпалы ауруы болып табылады [24 - 27].

Микобактериялар тұқымдасына уытты және уытты емес микроорганизмдердің 30-дан астам түрлері бар [68 -27].

Морфологиялық, өсу және биологиялық қасиеттері бойынша туберкулездің қоздырғышын классификациялайтын болсақ, микобактериялар тұқымдасы, актиномицеттер тұқымдастығына жатады. Мұның себебі қоректік орталарда баяу өсу және сәулелі саңырауқұлақтарға ұқсас тармақталған пішіндерді қалыптастыру мүмкіндігі болды. Осының негізінде Кох таяқшалары туберкулез микобактериясы деп өзгертілді [27].

Қазіргі уақытта шығу тегі бойынша туберкулездің жылы қанды жануарлар үшін уытты болып табылатын келесі түрлері ажыратылады: адам микобактериялары (*M. tuberculosis*), ірі қара мал (*M. bovis*), құс (*M. avium*), тышқан (*M. muris*), ірі қара мал паратуберкулезі (*M. paratuberculosis*) және адамның алапес ауруы (*M. lepre*). Сондай-ақ, *M. africanum* адам мен сиыр арасындағы аралық бактерияның орынын алады [26].

Mycobacterium bovis (*M. bovis*) қара мал туберкулезінің этиологиялық агенті болып табылады сонымен қатар ол басқа үй және жабайы күйіс қайыратын жануарларға, адамдармен приматтарға, жыртқыштарға, сондай-ақ тотықұстарға, кейбір басқа жыртқыш құстарға да уытты болып табылады, ол ағзада әртүрлі органдармен тіндерде туберкулездің пайда болуымен және олардың некротикалық ыдырауымен сипатталады [28].

Морфологиялық қасиеттері. Морфологиясы мен өсінділік қасиеттері бойынша жоғарыда аталған түрлердің микобактериялары негізінен бір-біріне ұқсас. Олардың пішіні 1–10 мкм × 0,2–0,6 мкм таяқшалар. ірі қара мал

туберкулезінің микобактерияларының орташа мөлшері 2,5–3 және ені шамамен 0,6 мкм, ал құстар туберкулезінің микобактерияларының ұзындығы 5–6 мкм және ені 0,3 мкм. Таяқшаның қысқа түрлері негізінен жас шоғырларға тән. Жалпы микобактериялар қатаң аэробтар, қозғалмайды, споралар немесе капсула түзбейді, қышқыл-алкогольге төзімді; Циль-Нилсен әдісімен ашық қызыл түске боялады, ал басқа микрофлора түрі көк түске боялады [29].

1.3 Ірі қара мал туберкулезін балау әдістері

Туберкулез – адамдар мен жануарлардың арасында кең тараған жұқпалы аурулардың бірі. Адамдар туберкулезге шалдыққан жануарлардан жұқтыруы мүмкін, сонымен қатар адамдар үшін *Mycobacterium bovis* (*Mycobacterium bovine tuberculosis*) ең қауіпті. *Mycobacterium tuberculosis*-ке шалдыққан адамдардан малға жұғуы мүмкін. Қара малдың туберкулезін анықтау кешенді зерттеулердің қорытындыларына байланысты. Оларға індеттік жағдай мен клиникалық белгілері, аллергиялық, сойғанда ішкі тәндердің өзгерістері, гистологиялық және бактериологиялық әдістер жатады (сурет 2) [1-3].



Сурет 2 – Қара малдың туберкулезінің кешенді балау жолдары

M. bovis микобактериясына шалдыққан қара малда созылмалы түрде өтеді және сыртқы белгілері ұзақ уақыт бойы байқалмауы мүмкін. Сондықтан шаруашылықта қара малды етке сойғанда ішкі органдарын, бездерін қадағалаған жөн, және арнаулы нұсқауда көрсетілген мерзімде аллергиялық балау (терінің ішіне және көзге) жүргізе отырып, қажет болғанда сезімтал иммунодиагностикалық сынамаларды қолданады [1,2].

M. bovis - макрофагтардың және моноциттік типтегі жасушалардың жасушаішілік қоздырғышы. Жануарлардың көптеген жұқпалы ауруларының диагностикасы патогенге гуморальды реакцияны (антиденелерді) анықтауға негізделген болса, *M. bovis* жұқтырған ірі қара малдың иммунологиялық

реакциясы Т-лимфоциттерге (немесе "Т жасушаларына") байланысты. Бұл жасушалық иммундық жауап қорғаныс механизмі және *M. bovis* инфекцияларына тән созылмалы қабынудың (гранулема) себебі болып табылады. Тек инфекцияның кейінгі кезеңдерінде, туберкулез патологиясы дамыған кезде немесе олар жоғары жұқпалы дозаларға ұшыраған кезде, ірі қара мал бойында антиденелердің жоғары деңгейін шығарады [3].

Осылайша, жасушалық иммунитеттің тірі ірі қарадағы сынақтары *M. bovis* жұқтырған жануарларды ертерек анықтауға мүмкіндік береді және бүгінгі күнге дейін бағаланған антидене негізіндегі сынақтарға қарағанда сезімталдығы жоғары. Еуропалық Одақта (ЕО) қара малдың туберкулезін балау үшін *in vivo* тері ішілік туберкулин сынамасы және *in vitro* (қан негізіндегі) гамма-интерферонды (IFN γ) әдістерін қолданады. Туберкулинді тері ішіне енгізу кезінде оң реакция берген жануарларды анықтаса, ал екіншісі иммуноферменттік талдау арқылы қан сарысуындағы IFN γ бөлінуін анықтайды [4].

Кейбір кемшіліктеріне қарамастан, Роберт Кох ұсынған туберкулинді қара малға 1890 жылдары диагностикалық реагент ретінде тәжірибие жүргізілді [5-9]. Қара мал өсіретін фермаларда жүйелі және тұрақты түрде тері сынамаларын жүргізу, кесел расталған жағдайда, оң реакция берген жануарларды малды сою, фермаға шектеу қою және қасапханалардағы жұмысты қадағалау көптеген дамыған елдерде ірі қара туберкулезін жоюға мүмкіндік берді. Мысалы, осындай бағдарламаны ұстанған елдер қатарына Австралия, ЕО-ға мүше мемлекеттер, Канада және АҚШ Штаттарын жатқызса болады [10-13].

Басқа елдерде тері сынамаларын қолдану қара мал туберкулезінің төмендеуіне ықпал еткенімен, дәстүрлі "тестілеу және сою" тәсілдері қолданылса да табиғатта *M. Bovis* қоздырғышының сақталуына байланысты [12], шаралардың толық орындалмауы, қаржыландырудың жеткіліксіздігі де тежеу болуда [10,11].

M. bovis-тың таралу динамикасына, ағзадағы микроскопиялық өзгерістерді анықтауда иммундық реакцияның қалыптасуына ұзақ уақыт кететіндіктен тері сынамасын жасау аз. Осы аралықта кеселдің таралуы залалданған жануарлардан анықтау қиындап, кейбір малда сынамаға жалған әсерлену де байқалады. Осыған байланысты тері ішілік сынамасын толықтыратын және екі негізгі стратегиялық мақсатты көздейтін с-IFN сияқты бірқатар көмекші балау әдістері әзірленді:

1) туберкулез анықталған аймақтарда табындардың кеселге шалдыққандарын кез-келген сынама бойынша анықтап, оң нәтиже бергендерін табыннан жекелеп ұстайды [14].

2) кеселден тазарту кезінде бұқа туберкулиніне жалған реакция көрсеткен қара малды қосымша сынама жүргізу арқылы балайды [15].

Туберкулезге арналған басқа (*in vitro*) сынамалар, мысалы, ИФТ (иммунды ферментті талдау) [16], лимфоциттердің пролиферациясын анықтау, флуоресцентті поляризацияны талдау (FPA) [17] және "электронды

мұрын" [18] әзірше тәжірибие ретінде қолдануда. Алайда теріішілік сынамаңы өндірісте алмастыруға әлі де ертерек [10].

Теріішілік туберкулин сынамасы. Ірі қара туберкулезімен күрес ХІХ ғасырдың аяғында көптеген индустриалды дамыған елдерде басталды. Келесі онжылдықтарда аурулармен күресу шаралары табындарды сыртқы белгілерге ветеринариялық тексеруден, сүтті бактериологиялық зерттеуден және ауру малды ерікті союдан тұрды. Туберкулинді тері ішіне, тері астына немесе жүйелі енгізуге негізделген сынақтар тек анда-санда қолданылды. Алғаш рет 1950 жылы Ұлыбритания үкіметі табындардың ішіндегі, көк жөтелге шалдыққандарды ерікті түрде анықтау сұлбасын бекітіп, онда ауру малды окшаулау, малдың қозғалысын шектеу және ветеринариялық санитариялық шараларды қатаң жүргізу жөнінде кеселді жоюдың ұлттық бағдарламасын бекітті. Бұл бағдарлама Ұлыбританияда ерікті түрде сертификатталған табындардың арасында басталды және 1960 жылдың қазан айында бүкіл ел сертификатталғанға дейін біртіндеп кеңейе түсті [12]. Үкімет 1960-1970 жылдары үлкен қарқын алып, 1970-ші жылдың аяғында қара мал туберкулезі ел тарихында ең төменгі деңгейге түсіп, туберкулезге шалдыққан қара мал 1961 жылы 16 984 болса 1979 жылы 633-ті құрады, немесе кесел 3,5% - дан 0,49% - ға дейін төмендеді. Алайда, Англияның оңтүстік-батысында туберкулездің мал арасында таралуы қалған бөлігінен шамамен үш есе жоғары болды. Бұған себеп елдегі Еуразиялық борсықтың (*Meles meles*) табиғаттағы ошағы болып табылады, соған байланысты бағдарлама өз нәтижесін көрсете алмады [19,20].

Теріішілік сынама ірі қара мен басқа жануарлардың туберкулезге балаудың халықаралық стандарты болып табылады. Олар микобактерия супернатанттарынан алынған шикі ақуыз сығындысы — туберкулинді тері ішіне енгізуге баяу типтегі жоғары сезімталдық реакциясын анықтауға негізделген. Кауфман мен Шайбл 2005 жылы алдымен адам туберкулезіне қарсы терапевтік вакцина, содан кейін медицина мен ветеринариядағы диагностикалық құрал ретінде туберкулиннің дамуына әкелген оқиғалар туралы егжей-тегжейлі тарихи есептер жазды. Қысқаша айтқанда, 1890 жылы Роберт Кох ашқан таза сұйық туберкулез бациллаларының глицерин сығындысы жылдар бойы тазартылды және қазіргі уақытта әлемде тазартылған ақуыз туындысы (PPD) деп аталатын туберкулин ретінде қолданылады. Бұл *M. bovis*-тың термиялық өңделген өсу және лизис өнімдерінің суда еріген күрделі фракциясы. Қазіргі уақытта көптеген елдерде қолданылатын бұқа туберкулині 1948 жылы Англияда окшауланған және *in vitro* жағдайында өсіру үшін таңдалған далалық штамм *M. bovis* AN5 дәрмегі болып табылады [21]. Оны сұйық синтетикалық ортада өсіреді және бумен термиялық өңдеуден өткізіп, сүзіп, тұндыру арқылы концентрлейді, жуылады, содан кейін басқа микобактериялардан таза стерильді дәрмегіне қайта ерітіледі [22,23]. Сол сияқты құстар мен адамдардың туберкулиндері ("сүтқоректілер") сәйкесінше құстардың белгілі бір штамдарының (*M. avium* subsp. *avium*) және адам (*M. tuberculosis*) туберкулез таяқшаларынан алынады.

Туберкулин антигендеріне сезімтал емес жануардың терісіне бұқа туберкулинін енгізгенде жергілікті қабыну реакциясы болмайды [24,25]. Алайда, егер туберкулин иммундық жүйесі *M. bovis* инфекциясымен немесе өзара әрекеттесетін антигендердің әсерінен сезімтал жануарға берілсе, бұл егілген жерде қабыну реакциясы мен ісінуді тудырады, ол 48-72 сағаттан кейін ең жоғары қарқындылыққа жетеді. Одан кейін тез реакция қайта бастайды [26]. PPD туберкулинін тері ішіне енгізуге арналған бұл баяу типті жоғары сезімталдық реакциясы сенсублизацияланған Т жасушаларының популяциясы арқылы жүзеге асырылады және инфекциядан бірнеше апта өткен соң дамиды [27,28].

Терішілік сынама (SIT) қарапайым түрде теріге аз мөлшерде бұқа туберкулинін енгізу арқылы жүзеге асырылады. Егілгеннен шамамен 72 сағаттан кейін екпе орны тексеріліп, қабыну белгілері анықталады. Бірреттік терішілік сынаманы (SIT) ортаңғы мойын аймағының терісіне (мойын аймағы SIT) немесе құйрық түбіне (каудальды SIT) қолдануға болады [22]. Мойын аймағына туберкулин енгізер алдында тері саусақпен ұстап тексеріледі, ал тері қатпарының қалыңдығы арнайы құрылғы (кутиметр) арқылы туберкулин енгізгенге дейін және 72 сағаттан соң өлшенеді.

1908 жылы француз дәрігері Шарль Манту бұл әдісті алғаш рет адамдарда *M. tuberculosis* инфекциясын анықтау үшін қолданды [12].

Мойынға бір рет салыстырмалы терішілік туберкулин сынамасы (SICCT) ұзақ уақытты талап етеді, себебі бұл сынақ кезінде бұқа мен құс туберкулинін мойын терісіне бір мезгілде енгізіледі. SICCT сынағының интерпретациясы *M. bovis* жұқтырған ірі қара малдың құс туберкулиніне қарағанда бұқа туберкулиніне көбірек реакция көрсететінін байқауға негізделген. Басқа микобактериялармен болған инфекциялар керісінше нәтиже беруі мүмкін [26].

Бұл сынақ SIT әдісіне қарағанда микобактерияларға оң нәтиже көрсеткен жануарларды ажыратуға мүмкіндік береді [29]. Қай сынақ түрін тандау аймақтағы туберкулездің таралуы мен қоршаған ортадан сенсублизациялаушы микобактериялардың әсеріне байланысты [29].

Құйрық түбі SIT сынамасы АҚШ, Канада, Жаңа Зеландия және Австралияда жеке ірі қара мал мен табындарды туберкулезге күнделікті скринингтен өткізу үшін негізгі сынақ ретінде пайдаланылады [12, 13, 30]. Ал мойын аймағын тестілеу Еуропадағы жеке мал мен табындар үшін туберкулездің негізгі скринингтік сынағы болып табылады [29].

SICCT сынағы Ұлыбритания мен Ирландияда 1947 жылы енгізілген. Бұл әдіс бұрынғы қос терішілік салыстырмалы сынақтың (екі бөлек инъекция қажет болған) орнына қабылданды, себебі SICCT әдісінде тек бір рет инъекция жасау жеткілікті болды. Ирландия Республикасы мен Солтүстік Ирландия бұл әдісті сәйкесінше 1954 және 1958 жылдары ресми түрде қабылдады [29].

1975 жылы Ұлыбританияда SICCT сынағының хаттамасы жетілдірілді: сүтқоректілерге арналған ескі туберкулиннің орнына *M. tuberculosis*-тің үш штаммынан алынған жаңа вейбридж PPD туберкулинін енгізілді [29-30].

Еуропа елдерінде SICCT сынағы жоспарлы скрининг пен тәуекел аймағындағы табындарды арнайы сынау үшін кеңінен қолданылады. Мысалы, Ирландия Республикасы мен Солтүстік Ирландияда ірі қара малдың барлық табындары үнемі 12 ай аралықпен сыналады. Ал Ұлыбританияда SICCT сынағы туберкулездің расталған жағдайлары тіркелген аймақтарда табындардың үлесіне байланысты әр 12–48 ай сайын өткізіледі [31].

Туберкулин сынақтарының нәтижелері мен интерпретациясы көбінесе Lesslie және әріптестерінің ұсыныстарына сәйкес орындалады. Мысалы, 1975 жылы Англия, Уэльс және Шотландияда 179 табыннан 10 305 ірі қара малына вейбридждің бұқа PPD (1,0 мг/мл) және құс PPD (0,5 мг/мл) сынақтары жүргізілді. Бұл сынақтардан кейін, *M. bovis* инфекциясы анықталған жануарларға патологиялық зерттеу жүргізілді. SICCT сынақтарының нәтижелері «қатаң» интерпретация қағидасы бойынша бағаланды [31].

Қатаң интерпретация сезімталдықты арттырғанымен, ол әдетте стандартты скринингтік сынақтарда қолданылмайды. Себебі бұл интерпретацияның нәтижесінде тесттің ерекшелігі төмендеп, туберкулезге күдік тудыратын жануарлар немесе табындар саны шамадан тыс артуы мүмкін.

Диагностикалық сынақтың дәлдігі негізінен сезімталдық (жұқтырған жануарларды дұрыс анықтау қабілеті) және спецификалық (жұқпаған жануарларды дұрыс анықтау қабілеті) көрсеткіштеріне тәуелді. Бұл параметрлер әртүрлі популяцияларда тұрақты болуы мүмкін, егер:

- Тестілеу процедурасы стандартталған болса,
- Оң нәтиже беру нүктесі жануарлардың барлық топтары үшін бірдей белгіленсе.

Алайда, бұл жағдай туберкулез диагностикасында сирек кездеседі. Себебі тест нәтижелеріне келесі факторлар әсер етеді:

- Аурудың сатысы мен ауырлығы,
- Инфекцияның қоздырғыш микроорганизмдері,
- Тест орындалатын ортаның ерекшелігі және басқа да көптеген аспектілер.

Тесттің болжамды мәні зерттелетін популяциядағы *M. bovis* инфекциясының таралу деңгейіне тікелей тәуелді. Бұл таралу көрсеткіші белгілі бір сынақтың оң немесе теріс нәтижелерін түсіндіруде маңызды рөл атқарады. Мысалы:

- Жоғары таралу аймақтарында тесттің сезімталдығы маңыздырақ, өйткені ол ауруды анықтау қабілетін арттырады.
- Төмен таралу аймақтарында спецификалықтың маңызы артады, себебі жалған оң нәтижелердің ықтималдығы жоғары болуы мүмкін [32,14].

Бұл факторларды ескеру SICCT сынағын тиімді қолдануға және оның нәтижелерін дұрыс интерпретациялауға мүмкіндік береді.

Тесттің сезімталдығы (Se) диагностикалық талдауда оң нәтиже берген, яғни жұқтырған жануарларды дұрыс анықтаған үлесті білдіреді. Сезімталдықтың кері көрсеткіші — жалған теріс нәтижелердің пропорциясы

(1-Se). Туберкулин сынамасынан өткен ірі қара малда жалған теріс реакциялар келесі себептерге байланысты болуы мүмкін:

- Инфекцияның бастапқы кезеңінде ірі қара мал туберкулинге жауап бермеуі мүмкін.

- *M. bovis* инфекциясынан кейін туберкулинге жоғары сезімталдық 1-9 апта ішінде дамиды, бұл жануардың ерекшеліктері мен сынақ факторларына байланысты өзгереді.

- Толық иммундық жауап көп жағдайда инфекциядан кейін 3-6 апта аралығында дамиды.

Аллергияға дейінгі кезең:

- Моррисон және әріптестері (2000) аллергияға дейінгі фазаның ұзақтығы 1900 жылдары бациллалардың жоғары дозасымен жұқтырылған жануарларды зерттеуде анықталғанын хабарлады. Кейінірек жүргізілген тәжірибелер 104 *M. bovis* колониясын құрайтын бірліктермен мұрын ішіне жұқтырған бұзауларда инфекциядан 3 апта өткенде SICCT сынағына оң нәтиже бергенін көрсетті.

Десенсибилизация:

- Туберкулин енгізілгеннен кейін тері реактивтілігі уақытша төмендеуі мүмкін. Бұл құбылыс десенсибилизация деп аталады және кесел жұқтырған ірі қара малды ауру ретінде дұрыс анықтауға кедергі келтіруі мүмкін.

- Десенсибилизация ең қарқынды түрде туберкулин енгізілгеннен кейін алғашқы 7 күн ішінде байқалады. Әдетте, сезімталдық туберкулиннен кейінгі 60-шы күні қалпына келеді.

Бұл құбылыстың алдын алу үшін халықаралық хаттамалар бойынша екі сынақ арасындағы аралық кемінде 42 күн болуы қажет [31].

SICCT сынақтары кезінде алынған тері реакциясының мөлшері сою кезінде туберкулез патологиясының ықтималдығы мен ауырлығымен оң корреляция көрсетеді. Бұл сынақтар *M. bovis* инфекциясының ерте және дамыған сатыларын анықтауға мүмкіндік береді.

Кез келген диагностикалық сынақ секілді, тері ішілік сынамалар кезінде де оператордың қателіктері мен тест процедураларының дұрыс орындалмауы жалған теріс немесе жалған оң нәтижелерге әкелуі мүмкін. Бұл қателіктер келесідей жағдайларда орын алады:

- Туберкулиннің дұрыс енгізілмеуі: теріге енгізілмей, тері астына енуі.
- Мөлшердің жеткіліксіздігі: енгізілетін туберкулин мөлшері аз болуы.
- Нәтижелерді оқу уақытын бұзу: туберкулин инъекциясынан кейін нәтижелердің тым ерте немесе кеш оқылуы [29].

SICCT стандартты интерпретациясы кезінде кейбір жұқтырған жануарларда туберкулезді анықтау қиындауы мүмкін. Бұл *M. bovis* инфекциясының нәтижелері *M. avium-intracellulare* кешенінің микобактерияларының алдыңғы әсерінен уақытша жасырылуы мүмкін. Мұндай жағдайлар *M. avium* инфекциясы жиі кездесетін аймақтарда туберкулезді бақылауға кедергі келтіруі мүмкін. Шешімдер:

- Құс туберкулиніне реакцияларды елемеу.

– Бірреттік терішілік сынақты (SIT) қолдану. Бірақ SIT сынағының ерекшелігі төмен, бұл жалған оң нәтижелерді арттыруы мүмкін.

– Өзгертілген С-IFN сынағын қолдану: Бұл тест *M. bovis* инфекциясын *M. avium* әсерінен ажырату үшін антигендерге негізделген нақты сынақтарды пайдалануға мүмкіндік береді.

Сезімталдықтың нақты бағаларын алу үшін барлық сыналған жануарлар сойылып, олардың инфекцияға нақты сынақтан өткен-өтпегені тексерілуі қажет [34].

Әртүрлі елдерде SIT және SICCT сынамаларына қатысты зерттеулер нәтижелері келесідей:

– Құйрық асты SIT: Сезімталдық 63,2%-дан 100%-ға дейін өзгерген, орташа көрсеткіші — 83,9%.

– Мойын аймағы SIT: Құйрық асты SIT-ке қарағанда жоғары сезімталдық көрсеткен [29].

Терішілік сынаққа оң әсерленген қара малдың 50-80%-ын сойып, патологоанатомиялық зерттеу жүргізгенде, жиі жағдайда туберкулез ошақтары байқалмайды. Зертханалық талдаулар кезінде де *M. bovis* бөлінбеуі немесе аурудың клиникалық белгілері анықталмауы мүмкін [12,13]. Мұндай жағдайлар терішілік сынақтың және IFN γ сынағының туберкулезді анықтаудағы сенімділігіне күмән туғызады. Алайда, бұл пікір екі негізгі түсініспеушіліктен туындайды:

1. Иммунодиагностикалық сынақтардың «алтын стандарт» деп саналмауы

Көптеген ветеринарлар туберкулезді анықтауда патологиялық және бактериологиялық зерттеулерді ең дәл әдіс деп қате санайды. Бірақ бұл зерттеулер:

– Иммунологиялық сынақтарға қарағанда сезімтал емес, әсіресе субклиникалық инфекцияларды анықтауда.

– Патологиялық зерттеулер мен стандартты бактериологиялық әдістер туберкулезді анықтауда шектеулі мүмкіндіктерге ие, себебі олар бактерияға қарсы жасушалық реакцияларды ескермейді [29].

2. Жалған оң және болжамдық мән арасындағы айырмашылықты түсінбеу

Жалған оң көрсеткіштер мен болжамдық мәндер арасындағы айырмашылық жиі бағаланбайды:

– Жалған оң мән: «Жануар жұқтырмаған болса, тест оң нәтиже беруі мүмкін бе?».

– Болжамдық оң мән: «Егер тест оң болса, жануардың нақты жұқтырылған болу ықтималдығы қандай?».

Бұл көрсеткіштер:

– Жалған оң нәтижелер тесттің спецификалығына әсер етеді.

– Ал болжамдық мән зерттеліп отырған популяциядағы инфекцияның таралу деңгейіне тәуелді [32].

Қосымша сынамалар туберкулездің таралуы төмен популяцияларда тест нәтижелерін нақтылау үшін қажет.

Гамма-интерферон сынағы (IFN γ) – бұл *in vitro* форматында қан анализі арқылы ірі қара малдағы туберкулезді диагностикалау әдісі. Ол алғаш рет 1980 жылдардың соңында Австралияда жасалды [35-37]. Бұл сынақ 1991 жылы Австралияда, ал 1990 жылдардың соңында Жаңа Зеландияда ірі қара туберкулезін анықтаудың ресми әдісі ретінде бекітілді.

Австралия 1997 жылы тері сынақтарының кеңінен қолданылуы, ірі қара малдың қозғалысын бақылау және жабайы мал табындарындағы инфекция ошақтарын жою арқылы ресми түрде туберкулезден таза ел мәртебесін алды. Алайда, қалған бірнеше ошақтардың зертханалардан алыс орналасуы IFN γ сынағын ел көлемінде толық енгізуге мүмкіндік бермеді. Бұл әдіс өндірісте кеңінен қолданылмаса да, жеке шаруашылықтарда қолдануға рұқсат етілді [38].

IFN γ – негізінен Т-лимфоциттер шығаратын цитокин. Ол:

- Макрофагтарды белсендіреді, бұл микобактерияларға қарсы иммундық жауапты күшейтеді.

- *M. bovis* инфекциясының жасушалық жауап реакциясын анықтайды.

IFN γ сынағының негізгі принципі: *M. bovis* инфекциясынан кейін жануардың перифериялық қанындағы Т-жасушалары бұқа туберкулинмен ынталандырылғанда, өлшенетін мөлшерде IFN γ шығарады. Керісінше, егер жануар *M. avium* сияқты микобактериялармен жұқтырылған болса, IFN γ реакциясы құс туберкулинмен ынталандырылған кезде максималды болады.

IFN γ сынағы ешкі, қой, африкалық буйвол және басқа да Bovidae тұқымдасының жануарларында қолдануға арналған. Алайда бұл сынақ борсықтар, бұғылар және адамнан басқа приматтарда қолданылғанымен, кейбір жануарлар түрлері үшін қосымша тексеру мен бағалауды қажет етеді [39].

IFN γ сынағы (Bovigam) диагностикалық тиімділігі Австралия, Бразилия, Эфиопия, Ұлыбритания, Ирландия, Италия, Жаңа Зеландия, Солтүстік Ирландия, Испания және АҚШ-та бағаланды. Зерттеулер бойынша, IFN γ тестінің сезімталдығы 73%-дан 100%-ға дейін ауытқыды, орташа мәні — 87,6%. Тесттің спецификалылығы 85%-дан 99,6%-ға дейін өзгерді [39].

IFN γ сынағының ерекшелігіне жоғары сезімталдығы жатады, яғни тері сынақтарымен анықталмаған жұқтырған ірі қара малды ерте кезеңде анықтай алады. Бұл оны инфекцияның бастапқы сатыларында тиімді етеді және туберкулездің әртүрлі субпопуляцияларын анықтайды: Тері сынақтарына теріс нәтиже берген, бірақ IFN γ сынағы оң нәтиже көрсеткен мал кейінгі сынақтарда реакторға айналу ықтималдығы жоғары [34].

IFN γ сынағының артықшылықтарына иез нәтиже алу, жиі қолдану мүмкіндігі және нәтижелердің дәлдігін айтса болады.

Құйрық асты SIT IFN γ реакциясын күшейтуі мүмкін, ал IFN γ сынағына SICCT тесті айтарлықтай әсер етпейді. Бовигам сынағын SIT-тен 3 күн өткен соң қолдануға болады, бұл нәтижелерге әсер етпейді [40,41].

IFN γ сынағы тері сынақтарына қарағанда ерте кезеңде инфекцияны анықтауға қабілетті және оның сезімталдығы SICCT сынағына қарағанда жоғары. Қазіргі уақытта IFN γ сынағы бірнеше елдерде қолданылады, бірақ оның экономикалық тиімділігін толық түсіну үшін қосымша зерттеулер қажет [40,42].

Антиденелерге негізделген диагностикалық сынақтар

Ірі қара туберкулезі – ауру дамыған сайын иесінің иммундық реакциясының тепе-теңдігі жасушалық жауаптан антиденелерге негізделген жауапқа ауысатын спектрлік ауру. Аурудың дамыған және жалпыланған сатыларында терішілік туберкулин сынағына жауап бермейтін («анергиялық») жануарлар кездеседі. Бұл «анергиялық» жануарлар табынының бұзылуына және инфекцияның таралуына себеп болуы мүмкін [43,44].

Серологиялық сынақтар арқылы мұндай жануарлардың белгілі бір бөлігін анықтауға болады. Бұл сынақтар тері және IFN γ сынақтарымен салыстырғанда сезімталдығы төмен, әсіресе инфекцияның ерте сатыларында [46]. MPB70 және MPB83 сияқты нақты «серодоминантты» антигендерді қосу ерекшелікті жақсартады, бірақ сезімталдықты арттырмайды [47].

Артықшылықтары:

- Серологиялық сынақтар арзан әрі оңай орындалады.
- Созылмалы инфекциясы бар немесе тері және IFN γ сынақтарында теріс нәтиже берген жануарларды анықтауда қосымша әдіс ретінде қолданылады.

Шектеулері:

- Жалпы қабылданған жасушалық жауап сынақтарына балама бола алмайды.
- Негізінен туберкулездің дамыған түрін анықтауға жарамды.

Қосалқы диагностикалық сынақтар

Культуралық әдістер. *M. bovis* анықтауда алтын стандарт болып саналатын культуралық әдістер мал тіндері, мұрын шырышы, сүт, қан және қоршаған орта үлгілерінде қолданылады. Алайда, бұл әдістер баяу, күрделі және артықшылығы аз.

Полимеразды тізбекті реакция (ПТР). ПТР әдістері жоғары сезімталдық пен жылдамдыққа ие. Бұл әдістер:

- *M. bovis*-ке тән ДНҚ тізбегін анықтауға мүмкіндік береді.
- Клиникалық үлгілерде қолданылуы шектеулі, себебі жоғары бактериялық жүктемені қажет етеді.
- Культуралық әдістерден асып түспейді, өйткені бациллалардың төмен саны, ДНҚ алу қиындықтары және ингибиторлар ПТР нәтижелеріне әсер етеді.

Қорытындылай келе, ПТР әдістері микобактерия түрлерін ерте анықтау үшін пайдалы, бірақ күнделікті диагностикалық құрал ретінде иммунологиялық сынақтарға балама бола алмайды.

«Электронды мұрын» технологиясы инфекцияланған бұзаулардың сарысу үлгілеріндегі ұшпа органикалық қосылыстарды талдау үшін жасалған бұл әдіс перспективалы болып көрінеді. Бірақ:

Антиденелерге негізделген және қосалқы диагностикалық әдістер тиімділігі жоғары болғанымен, олар инфекцияның ерте сатыларында шектеулі және жасушалық иммундық жауап әдістерімен толықтырылуы керек. Бұл сынақтар туберкулездің дамыған түрлерін анықтауда және эндемиялық аймақтарда қолдануға тиімді балама бола алады.

1.4 Ірі қара малдың туберкулезінің алдын алуда қолданып жүрген вакциналар

Ірі қара мал туберкулезіне қарсы күресте диагностикалық тесттерді арнайы егу құралдарымен біріктіру тиімді стратегия ретінде қарастырылады [51]. Қазіргі уақытта адам мен ірі қара туберкулезіне қарсы жалғыз қол жетімді вакцина – тірі аттенуацияланған Кальметт-Герен бацилласы (БЦЖ вакцинасы) [52, 53].

БЦЖ вакцинасы инфекцияның алдын алу қабілеті бойынша тұрақты қорғаныштық әсер көрсетпейді. Оның жетістіктері мен сәтсіздіктерінің себептері әлі толық анықталмаған [54, 55]. Ірі қара малда БЦЖ вакцинасы туберкулездің таралуын төмендетуде әлеуеті жоғары жалғыз коммерциялық қол жетімді вакцина болып қала береді [56, 57]. Алайда, вакцинацияланған жануарларда туберкулиндік сынамаларға жауап беру туберкулезді диагностикалау барысында қиындықтар туғызады [58].

БЦЖ вакцинасы енгізілген елдерде туберкулинге негізделген стандартты балау құралдарының ерекшелігі төмендеуі мүмкін. Дифференциалды диагностикалық тестілер әсіресе «тестілеу және жаппай сою» стратегияларын қолданатын аймақтарда маңызды [57, 58].

1921 жылы Calmette пен Guerin БЦЖ вакцинасын *M. bovis* штамдарын глицеринге малынған картоп кесектерінде өткізу арқылы әзірледі. Адамдар мен ірі қара малдағы сынақтар вакцинацияның тиімділігі кеңінен өзгеретінін көрсетті. Қорғаудың негізгі көрсеткіші – патология деңгейінің төмендеуі, ал инфекциядан толық қорғаныс сирек байқалды [59, 60].

2018 жылға қарай бүкіл әлемде 10-нан астам БЦЖ вакциналары өндірілді, олардың технологиясы бастапқы 1913 жылы алынған *M. bovis* штамдарына негізделген [61].

БЦЖ-ның тиімділігі әртүрлі штамдар арасында айтарлықтай айырмашылық көрсетпейді, сондықтан қай штамның қолайлы екендігі туралы консенсус жоқ [66].

1956 жылдан бастап ДДҰ лиофилизацияланған матрицалық штамдарды сақтайды, бұл бастапқы БЦЖ штаммынан ауытқуды азайтуға мүмкіндік берді. Қазіргі қолданыстағы БЦЖ вакциналарының 90%-ы микобактериялардың кең таралған 6 штаммынан жасалған (1-кесте).

Кесте 1 – Ірі қара мал туберкулезіне қарсы вакцина жасау мақсатта қолданылатын және кең таралған *M. bovis* штаммдардың түрлері

Штамм атауы	Өндіруші
Pasteur 1173 P2	Франция
Danish 1331	Дания
Glaxo 1077	Дат тілінен алынған, Glaxo өндіреді
Tokyo 172-1	Япония
БЦЖ-1	Россия
Moreau RDJ.	Бразилия

Соңғы екі онжылдықта БЦЖ вакцинасы бойынша жинақталған білім туберкулез қоздырғышының штаммдарымен организмді зарарлау тәсілдерін, БЦЖ штаммдары мен дозаларын үйлестірудің тиімділігін зерттеуге негізделген. Зарарлау тәсілі ретінде бронх ішілік инокуляция немесе туберкулез қоздырғышын аэрозольді түрде енгізу қолданылады. Бұл әдіс арқылы *M. bovis* дозасы 10^3 -тен 10^4 КТБ-ға дейін колония түзуші бірліктер (КТБ) мөлшерінде қолданылды [67].

Buddle В.М. және әріптестері БЦЖ вакцинасының 10^4 – 10^6 КТБ дозасын тері астына енгізу тиімдірек екенін анықтады [27]. Wedlock D.N. және әріптестері ұқсас нәтижелерге қол жеткізіп, вакцинаны ауыз қуысы арқылы енгізудің тиімділігін атап өтті [27]. БЦЖ вакцинасы үшін Пастер және Дания штаммдары қолданылды, бұл вакцинаның қорғаныс тиімділігін арттыруға бағытталған [68].

Зерттеулер көрсеткендей:

– Жасы 1 айдан аз бұзауларды вакцинациялау 6 айлық бұзауларға қарағанда тиімдірек қорғаныс деңгейін қамтамасыз етеді.

– Қоршаған орта микобактерияларымен сенсбилизацияланған бұзауларда БЦЖ вакцинасы тиімділігі төмен болуы мүмкін [69].

– *M. avium* қоздырғышына әсер еткенде, ағза *M. bovis* инфекциясына белгілі бір деңгейде төтеп бере алатыны анықталды. Бұл БЦЖ егілгеннен кейінгі иммундық жауапты бүркемелеуі мүмкін [70].

Ревакцинацияның уақыты вакцинаның тиімділігін анықтауда маңызды рөл атқарады. 6 аптадан кейін ревакцинацияланған бұзауларда иммунитет бір рет егілген жануарларға қарағанда әлсіз болды [71].

Мексика, Эфиопия және Жаңа Зеландияда жүргізілген далалық сынақтар БЦЖ вакцинасының *M. bovis* табиғи әсерінен қорғауда тиімді екенін дәлелдеді [72]. Теріс нәтижесі бар 1300 ірі қара малдың жартысы липидті матрицамен араласқан БЦЖ вакцинасын ауыз арқылы қабылдады. Вакцинацияланған топ пен вакцинацияланбаған топ бірдей жағдайда ұсталынды. Жануарлар сойылған кезде, *M. bovis* жұқтырған жануарлардың пайызы вакцинацияланған топта шамамен 4% болып, вакцинацияланбаған топпен салыстырғанда едәуір төмен болды [73].

Қазіргі уақытта БЦЖ вакцинасы барлық басқа вакциналарды бағалау критерийі болып табылады. БЦЖ-ден тиімдірек вакциналарды жасау үшін екі негізгі әдіс қолданылады:

– БЦЖ-ны бустер-вакциналармен толықтыру: Қосымша немесе ревакцинальды вакциналар көмегімен БЦЖ-нің қорғаныс деңгейін арттыру.

– БЦЖ-ны алмастыратын вакциналар жасау: БЦЖ-ны толық ауыстыратын жаңа вакцина әзірлеу.

Ең тиімді тәсілдердің бірі – гетерологиялық бустерлік вакцинациялау стратегиясы, яғни БЦЖ вакцинасын енгізу арқылы иммундық жүйені ынталандырып, кейіннен суббірлікті вакциналарды қолдану [74-76].

Суббірлікті вакциналар ДНҚ немесе вирустық вектор негізінде жасалып, БЦЖ вакцинасымен бір мезгілде енгізіледі. Кейбір зерттеулер бойынша антиген 85А экспрессиялатын рекомбинантты аденовирустық вакцина БЦЖ вакцинасынан кейін бустер ретінде қолданғанда тиімділігін бірнеше есе арттырған [77-78].

БЦЖ технологиясын жетілдіру үшін гендік модификация қолданылады. Бұл иммундық жауапты күшейту және қауіпсіздікті арттыру мақсатында гендердің инактивтелуі немесе өзгерту арқылы жүзеге асады:

– Ауксотрофты мутанттар: Лейцин мен метионин метаболизмін кодтайтын гендер мутацияланған БЦЖ ауксотрофты мутанты жасалды.

– Бұл мутанттар адамның ағзасында өсу қабілетін төмендетіп, қауіпсіздікті арттырды.

Алайда, ірі қара малда туберкулезден қорғаныс тиімділігі әлі толық зерттелмеген [70].

RD1 делециясы:

– *M. bovis* RD1 делециясына негізделген мутант вакцина қорғаныс әсерін көрсеткенімен, тиімділігі БЦЖ-мен ұқсас болды [80].

– Кейбір зерттеулер *mce2A* және *mce2B* гендері алынып тасталған *M. bovis* штамдарының БЦЖ-ға қарағанда жоғары тиімділігін көрсетті. Алайда, бұл вакциналар DIVA диагнозын қоюды қиындатты.

БЦЖ тиімділігін арттыру әдістері

– Антигендердің экспрессиясын күшейту: Ag85В сияқты антигендердің шамадан тыс экспрессиясы туберкулезден қорғауды жақсартты [81].

– *zmp1* генінің делециясы. Мырыш металлопротеиназасын кодтайтын *zmp1* гені жойылған БЦЖ нұсқасы дәстүрлі БЦЖ-мен салыстырғанда иммундық реакцияны күшейтті. Бұл вакцина қазір сынақтан өтуде [82-83].

M. bovis вирулентті штамдарын аттенуациялау әдісі вакциналық қасиеттері бар штамдарды жасау үшін бірнеше бактериялық патогендерге табысты қолданылған. Бұл мақсатта нитрозогуанидинді пайдалана отырып, сұйық культураларда химиялық мутагенез жүргізу арқылы бірнеше аттенуацияланған *M. bovis* штамдары әзірленді [83].

БЦЖ вакцинасына қойылған шектеулерге қарамастан, ол өкпе туберкулезіне қарсы қорғаныс қамтамасыз ететін жалғыз лицензияланған вакцина болып қала береді. Вирулентті *M. bovis*-тен алынған БЦЖ

штаммының шамадан тыс әлсіреуі, оның шектеулі қорғаныс тиімділігін түсіндіруі мүмкін. Жаңа зерттеулер БЦЖ-Zmp1 мутанттарының микобактериялық антигендердің иммуногенділігін арттыратынын көрсетті [84-86].

Ірі қара малға арналған туберкулезге қарсы вакциналарды әзірлеу саласында айтарлықтай прогреске қол жеткізілді. БЦЖ вакцинасын ауыстыру қазіргі уақытта басты мақсат емес, керісінше, оны туберкулездің алдын алу үшін қосымша ретінде қолдану ұсынылады.

Ықтимал әдістер:

- Рекомбинантты БЦЖ вакциналар. Иммуногенді ақуыздарды, мысалы, ESAT6 және Ag85 кешенін қосу.

- Генетикалық аттенуацияланған вакциналар. *M. tuberculosis* немесе *M. bovis* гендерін инактивациялау.

- Атипті микобактериялық вакциналар. Ауксотрофты немесе транспозонды мутагенез арқылы жасалған штаммдар негізінде.

- ДНҚ-вакциналар. Қолдаушы антигендерді экспрессиялайтын плазмидаларды бұлшықетке немесе тері астына енгізу.

- Суббірлікті вакциналар. Иммуногенді ақуыздарға негізделген инактивтелген вакциналар.

Туберкулезге қарсы вакцинация саласында айтарлықтай прогреске қарамастан, тиімді вакцина жасау әлі де үлкен ғылыми міндет болып табылады. БЦЖ вакцинасын жетілдіру және қосымша стратегияларды қолдану арқылы туберкулезді бақылауда нақты нәтижелерге жету мүмкіндігі артып келеді.

2. ЗЕРТТЕУ НЫСАНДАРЫ ЖӘНЕ ӘДІСТЕРІ

2.1 Зерттеуде қолданылған биологиялық нысандар

Диссертациялық жұмысты орындауда *A/PuertoRico/8/34 NS-124 (H1N1)* және *A/chicken/Astana/6/05* құс тұмауы вирусының штаммдары қолданылды.

Mycobacterium bovis бактериясының 0078-*M. bovis*-8/RIBSP штаммы қолданылды. Штаммды Қазақстан Республикасы Денсаулық сақтау министрлігі «Биологиялық қауіпсіздік проблемаларын ғылыми-зерттеу институтының» микробиология зертханасынан алынды.

E. coli TOP10 бактериалды штаммы, плазмидаларды субклондау үшін қолданылады.

Тәжірибеде келесі жануарлар қолданылды:

- 8-10 апталық, орташа дене салмағы 20-30 г болатын ақ тышқандар;
- 1,5-2 айлық, орташа дене салмағы 250-300 г болатын теңіз шошқалары;

- 6 айлық, дене салмағы 150-200 кг болатын бұзаулар;

- 9-11 күндік, жіті жұқпалы аурулардан таза құс фабрикаларынан алынған тауық эмбриондары [87].

Тәжірибеде келесі сынамалар зерттелінді:

- *M. bovis* штаммының Esat-6 иммунодоминантты ақуызын экспрессиялайтын тұмау векторы;

- *M. bovis* штаммының TB10.4 иммунодоминантты ақуызын экспрессиялайтын тұмау векторы;

- *M. bovis* штаммының Esat-6 және TB10.4 иммунодоминантты ақуыздарын экспрессиялайтын тұмау векторы;

- Montanide Gel адьюванты қосылған *M. bovis* штаммының Esat-6 иммунодоминантты ақуызын экспрессиялайтын тұмау векторы;

- Montanide Gel адьюванты қосылған *M. bovis* штаммының TB10.4 иммунодоминантты ақуызын экспрессиялайтын тұмау векторы;

- Montanide Gel адьюванты қосылған *M. bovis* штаммының Esat-6 және TB10.4 иммунодоминантты ақуыздарын экспрессиялайтын тұмау векторы;

- Montanide Gel адьюванты қосылған *M. bovis* штаммының Esat-6 және TB10.4 иммунодоминантты ақуыздарын экспрессиялайтын тұмау векторынан жасалған туберкулезге қарсы векторлы вакцинасы;

- *M. bovis* штаммының Esat-6 және TB10.4 иммунодоминантты ақуыздарын экспрессиялайтын тұмау векторынан жасалған туберкулезге қарсы векторлы вакцинасы;

- Коммерциялық БЦЖ вакцинасы.

Зерттеуде қолданылған материалдар тізімі:

- NheI и SalI рестриктазалары;

- Бактериалды ДНК бөлу жинағы, PrepMan Ultra, Applied Biosystems;

- ДНК гельден бөліп алу жинағы, "QIAquick Gel ExtractionKit", Qiagen;

- pL2-Т векторын клондауға арналған жинақ (Evrogen);

- pHW2000 векторын клондауға арналған жинақ (Evrogen);

- Секвенирлеуге арналған жинақ "BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v.3.1", Applied Biosystems;
- Секвенирлеуге арналған үлгілерді тазалауға арналған жинақ, "CleanSeqKit", Agentcourt;
- Секвенирлеуге арналған 5x буфер, AppliedBiosystems;
- 80 % этанол;
- Амплификация және секвенирлеуге арналған 96 шұңқырлы планшеттер;
- Автоматты дозаторларға арналған 0,5 – 200 мкл ұштар;
- Агароза;
- 70 и 96 % этанол;
- 6 шұңқырлы планшеттер;
- 1,5 мл пробиркалар;
- 50 мл конустық пробиркалар;
- Деионизирленген су;
- Арнайы қоректік орталар (ет пептонды агарымен сорпасы, вазелин майы қосылған ет пептонды сорпасы, Сабуро қоректік ортасы, Эдвард қоректік ортасы);
- 96 шұңқырлы U формалы серологиялық планшеттер;
- Vero жасуша культурасы;
- Физиологиялық ерітінді (0,85% NaCl);
- Стерильді пробиркалар.

2.2 Зерттеу әдістері

2.2.1 *M. bovis*: Esat-6 және TB10.4 ақуыздарын экспрессиялайтын рекомбинантты тұмау вирусы векторын құрастыру

Рекомбинантты вирус сегіз екі бағытты рНW2000 плазмидасын пайдаланып стандартты кері генетика әдісі арқылы жасалды [87]. Гендерді клондау жұмыстары «Евроген» ЖШС, Мәскеу қ. жүргізілді. Vero жасушалары электропорация әдісі арқылы A/PuertoRico/8/34(H1N1) вирусының PB1, PB2, PA, NP және химерикалық NS генін және A/chicken/Astana/6/05(H5N1) штаммының HA, NA және M гендерін кодтайтын плазмидалармен 0,5 мкг/мкл мөлшерде трансфекцияланды. NS гендері *M. bovis*: Esat-6 (GenBank: OP610627) және TB10.4 (GenBank: OP610628) алынған ақуыз тізбегімен біріктірілген NS1 ақуызынан алынған N-терминалды 124 амин қышқылы тізбегін қамтитын NS1 синтез ақуыздарын экспрессиялау үшін модификацияланды. Вирустар 10 күндік тауық эмбриондарында 48 сағат бойы 37°C температурада инкубацияланды. Вакцина кандидаттары тауық эмбриондарының бесінші пассажынан алынған аллантаоистық сұйықтықтан жасалды. *M. bovis*-тің Esat-6 және TB10.4 ақуыздарын экспрессиялайтын барлығы 2 кандидаттық вакцина формуласы жасалды [87].

2.2.2 Vero жасушаларын трансфекциялау

Сарыусыз ортада өсуге бейімделген Vero жасушалары 10% фетальды ірі қара сарыусымен және 2 мМ L-глутаминмен толықтырылған DMEM/F12 ортада бір рет өсірілді. Рекомбинантты вирустарды өндіру үшін Vero жасушалары Nucleofector II жабдығын (Амаха) пайдаланып электропарацция арқылы сәйкес плазмидалармен трансфекцияланды. Трансфекцияланған жасушалардың бір бөлігі 10% фетальды ірі қара сарыусымен толықтырылған 4 мл қоректік ортасы бар 6 шұңқырлы дақылдық планшеттің ұңғымасына егілді; басқа бөлігі 10 күндік тауық эмбриондарына егілді. Трансфекциядан кейін 6 сағаттан соң, қоректік орта 2% GlutaMax культуральды қоспасы (Гибко, АҚШ) және трипсин (1 мкг/мл) (Сигма) қосылған 4 мл Opti-Pro SFM ортасымен (Гибко, АҚШ) ауыстырылды. Цитопатиялық әсер дамығаннан кейін 2 күннен кейін супернатант жиналып, тауық эмбриондарын жұқтыру үшін пайдаланылды [87].

2.2.3 Тауық эмбриондарында вирусты өсіру (культивирлеу)

Вирусты өсіру жұмыстары республикадағы құс тұмауынан таза құс фабрикаларынан жеткізілген тауық эмбриондарында жүргізілді. Бұл мақсатта тұмау вирусының векторы тауық эмбриондарының аллантоис қуысына 0,2 мл көлемінде жұқтырылды. Тауық эмбриондары күнделікті арнайы овоскоппен тексеріліп отырды. Алғашқы 24 сағат ішінде эмбриондардың өлуі спецификалық емес деп саналып, өлген эмбриондар есепке алынбай, жойылды. Инкубациялық кезең аяқталғаннан кейін инфекцияланған тауық эмбриондары 2-8 °С температурада 16-18 сағат бойы салқындатылды [88].

Тұмау вирусының инфекциялық белсенділігінің титрі 10 күндік тауық эмбриондарында вирусты титрлеу арқылы анықталды. Ол үшін вирустық суспензия физиологиялық ерітіндіде 10^{-1} -ден 10^{-10} -ға дейін он есе сұйылтылды. Әрбір сұйылтудағы вирустық материал, ең жоғары концентрациясынан бастап (10^{-10}), 4 тауық эмбрионының аллантоис қуысына 0,2 мл көлемінде жұқтырылды. Эмбриондар салқындатылғаннан кейін вирустың бар-жоғы гемагглютининдік белсенділікке негізделген гемагглютинация реакциясының (ГАР) микроәдісімен анықталды. Вирустың титрі Л. Рид және Х. Мюнч әдісі бойынша есептеліп, $lg EID_{50}/мл$ бірлігімен көрсетілді [89].

Вирустардың гемагглютинациялық белсенділігі жалпы қабылданған әдіс бойынша этеш эритроциттерінің 0,5% суспензиясын қолдану арқылы анықталды.

2.2.4 Генетикалық ендірмелердің тұрақтылығын КТ-ПТР арқылы бағалау

Тұмау векторына енгізілген микобактериялық ендірменің болуын растау үшін КТ-ПТР арқылы химералық NS генінің өлшемін жабайы штамм өлшемімен салыстырылды. РНҚ сынамалары RNeasy жинағы (Qiagen, АҚШ) арқылы 100 мкл вирустық сұйықтықтан бөлініп алынды. КТ-ПТР One-Step RT-PCR (Qiagen, АҚШ) жинағы арқылы жүргізілді. ПТР құрамында 5 мкл One-

құйылады, содан кейін олардың біріншісіне 0,5 мл бастапқы зат қосылады, вакцинаның 1:10 (10^{-1}) сұйылтуын алады. Пипетканы стерильдісіне ауыстырады және бірінші пробиркадан екінші пробиркаға 0,5 мл ауыстырып, 1:100 (10^{-2}) вакцина сұйылтуын алады және т.с.с. тоғызыншы пробиркада 1:1000000000 (10^{-9}) сұйылтуға дейін апарды.

Вакцинаның белсенділігі тауық эмбриондарында титрлеу арқылы анықталады. Ең жоғарыдан бастап әрбір вакцинаның сұйылтуынан 0,2 мл шприцпен 4 эмбрионның аллантостық қуысына енгізіледі. Жұмыртқалардың беті жалынмен алдын ала зарарсыздандырылады.

Эмбрионды жұқтырғаннан кейін тесік балқытылған парафинмен жабылады. Эмбриондар $34,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ температурада 48 сағат бойы инкубацияланады. Эмбриондардың инфекция жұқтырылуы есепке алу негізінде эмбриондар үшін вакцинаның ең төменгі инфекциялық дозасы (титр) есептеледі ($\lg \text{EID}_{50}/0,2$ мл). Эмбриондарды жұқтыру үшін алынған вакцинаның осы дозасында, содан кейін вакцина вирусының 1,0 мл мөлшерінде доза саны анықталады. $\text{EID}_{50}/0,2$ мл мөлшеріндегі вакцина титрі (1) формула бойынша есептеледі:

$$\lg \text{EID}_{50}/0,2 \text{ мл} = \lg \text{DN} - \sigma (\sum \text{Li} - 0,5) \quad (1)$$

мұндағы, \lg - санның логарифмі;

$\text{EID}_{50}/0,2$ мл - вакцина титрі, яғни тауық эмбриондарының 50% инфекция жұқтырылуы мүмкін ең аз мөлшері;

DN - вакцинаның тексерілген дозаларының максимумы (мысалы DN = 10-10-1, $\lg \text{DN} = -1$);

σ (сигма) - әрбір келесі дозаның алдыңғыға логарифмдердегі қатынасы, яғни сыналған сұйылтулардың көптігінің логарифмі (мысалы 10 есе сұйылтымдар алынды, ал $\lg = 1$, демек, $\sigma = 1$);

Li - берілген дозаны енгізуден оң реакция берген эмбриондар санының осы дозаны алған эмбриондардың жалпы санына қатынасы;

$\sum \text{Li}$ - барлық тексерілген дозалар үшін Li мәндерінің қосындысы.

Осы шамаларды (2) формулаға қойып, мынаны аламыз:

$$\lg \text{EID}_{50}/0,2 \text{ мл} = \lg 10^{-1} - \lg 10 \cdot (6,25 - 0,5) = -1 - 1 \cdot (5,75) = -1 - 5,75 = -6,75$$

Осылайша, $\lg \text{EID}_{50}/0,2 \text{ мл} = 6,75$;

$\lg \text{EID}_{50}/0,2 \text{ мл} = 6,75 + 0,70 = 7,45$, яғни 1,0 см³ вакцинада $10^{7,45} \text{EID}_{50}$ вакцина вирусы немесе 28 млн EID_{50} бар.

Вакцинаның биологиялық белсенділігі үш параллель титрлеудің орташа арифметикалық мәнін есептеу арқылы жүзеге асырылады. Вакцинаның биологиялық белсенділігі кем дегенде $10^{6,0} \text{EID}_{50}/\text{мл}$ болуы керек.

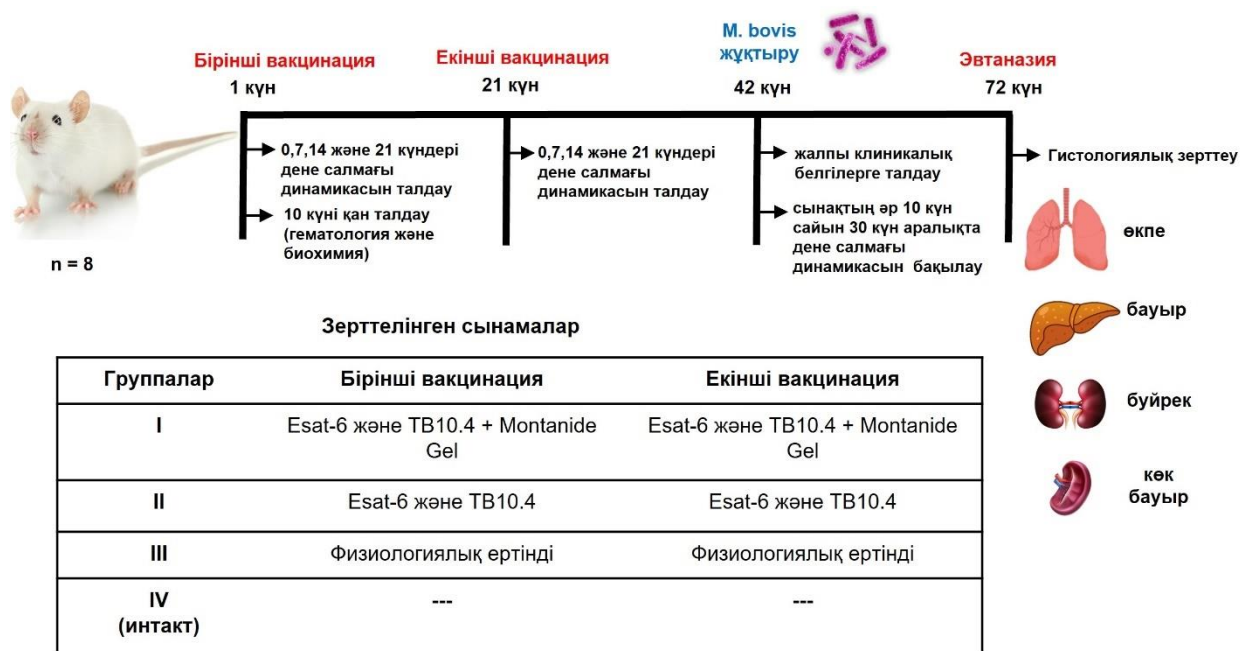
2.2.6 Вакцинаның қауіпсіздігі мен протективтік қасиетін ақ тышқандарда зерттеу

ІҚМ туберкулезіне қарсы векторлық вакцинаның қауіпсіздігін зерттеу үшін 1мл/ $\lg 6,25 \text{EID}_{50}$ көлемінде вакцинаны тері астына енгізу арқылы ақ тышқаннан тұратын топтар (n=8 бас) екі рет иммунизацияланды.

Зерттеу барысында тышқандардың клиникалық жағдайлары 72 күн бойы бақылауға алынды. Клиникалық бақылау барысында жануарлардың жалпы жағдайымен қатар, жем мен суды тұтынуы, терісі, шырышты қабықтардың күйі, мінез-құлықтары мен қозғалыс белсенділігі зерттелді (сурет 4). Сонымен қатар жануарлардың дене салмағының өзгері динамикасы біріншілік және екіншілік вакцинациядан кейін әрбір 0-, 7-, 14- және 21-тәулікте есепке алынды.

Ақ тышқандардан біріншілік вакцинациядан кейін зерттеудің 10-тәулігінде қандағы гематологиялық және биохимиялық өзгерістерді бақылау мақсатта пункция арқылы құйрық қан тамырынан қан сынамалары алынды (сурет 4). Гематологиялық талдау Sysmex XN-1000 (Sysmex, Швеция) автоматты анализаторында жүргізілді. Биохимиялық талдау A25 BioSystems анализаторында зерттелді.

Сондай-ақ вакцинацияланған ақ тышқандарға зерттелініп отырған вакцинаның протективтілігін анықтау үшін 0,2 мл физиологиялық ерітіндіде ерітілген туберкулездің *M. bovis*-8 вирулентті штаммымен $\times 10^6$ КТБ/тышқан дозада тері астына шаптың оң жағына жұқтырылып, сынақтың әрбір 10 күн сайын 30 күн аралықта дене салмағы динамикасы зерттелінді (сурет 3).



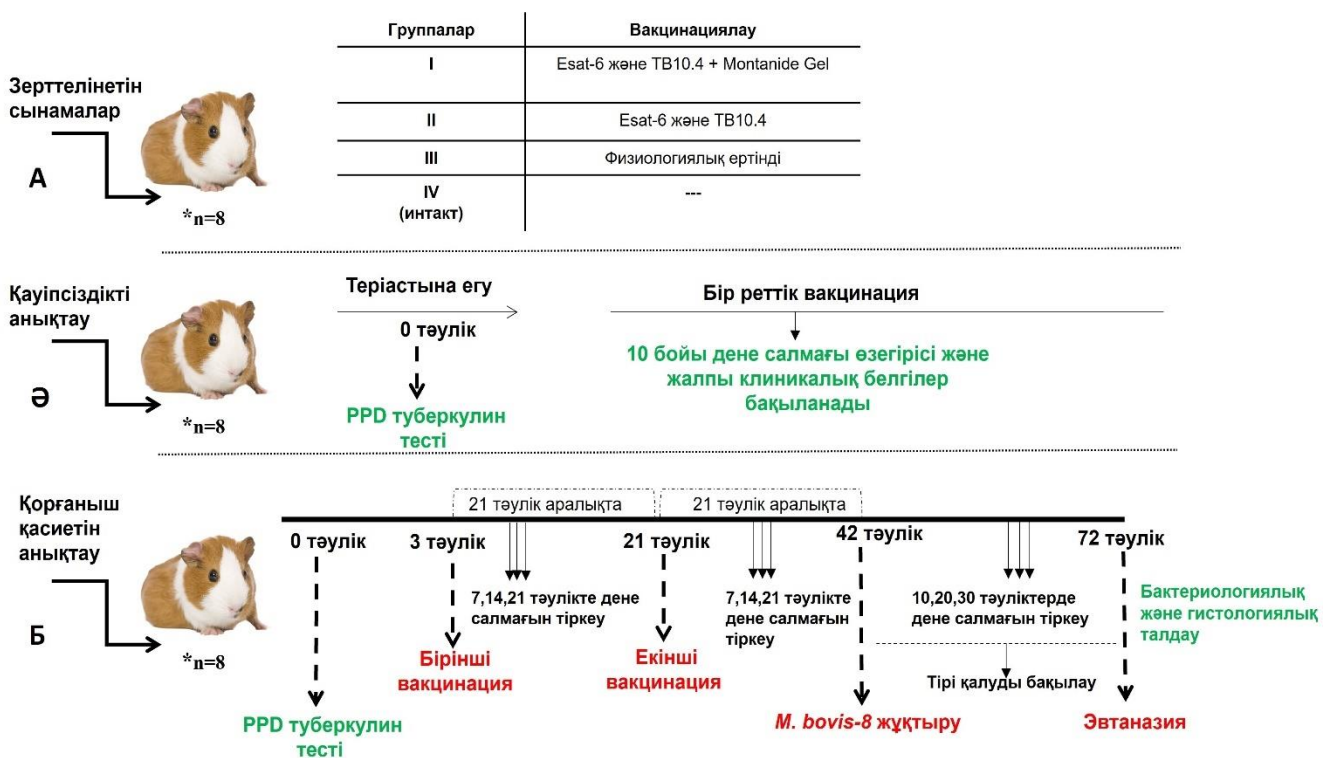
Сурет 3 – Қара мал туберкулезіне қарсы жаңа вакцинаның қауіпсіздігі мен қорғаныштық қасиетін ақ тышқандарда зерттеу схемасы

Ірі қара мал туберкулезіне қарсы вакцина кандидаттарының протективті тиімділігін 0078-*M. bovis*-8/*RIBSP* вирулентті штаммымен бақылау жұқтыруынан кейін 30 күн өткенде өкпедегі ТМБ өсуін анықтау, қорғаныс индексін есептеу және өкпедегі, бауырдағы, бүйректегі және көкбауырдағы қабыну процесін гистологиялық бағалау арқылы жүргізілді.

2.2.7 Вакцинаның қауіпсіздігі мен протективтік қасиетін теңіз шошқаларында зерттеу

Ірі қара мал туберкулезіне қарсы вакцинаның қауіпсіздігін теңіз шошқаларында зерттеу мақсатында 1,5 – 2 айлық теңіз шошқалары (n=8) вакцина нұсақаларымен 1 мл/1g 6,25 EID₅₀ көлемінде тері астына бір рет егу арқылы иммунизацияланды. Зерттеу барысында жануарлардың жалпы жағдайы: азық-түлік пен суды тұтыну, тері, жүн және шырышты қабаттардың жағдайы, мінез-құлық реакциялары, теңіз шошқаларының қозғалыс белсенділігі және дене салмағының динамикасы талданды (сурет 4, а,ә).

Вакцинаның қорғаныштық қасиетін анықтау иммунизациядан кейінгі бақылау жұқтыруы (challenge) арқылы жүргізілді. Ол үшін теңіз шошқалары (n=8) вакцина нұсақаларымен 1 мл/1g 6,25 EID₅₀ көлемінде тері астына екі рет егу арқылы иммунизацияланды. Екі реттік екпе 21 күн аралығымен жүргізілді. Тәжірибе барысында жануарларға сырттай бақылау (дене салмағы, жануардың жалпы жағдайын тіркеу) жүргізілді. Бұдан әрі зерттеудің 42 тәулігінде теңіз шошқаларының шап аймағы тері астына 1 мл (1×10⁶ КТБ/жануар) көлемде вирулентті 0078-*M.bovis*-8/*RIBSP* штаммымен жұқтырылды. Бақылау жұқтыруынан кейін 30 күн бойы жануарлар бақыланып, дене салмағының динамикасы, туберкулез кеселінің клиникалық белгілерінің дамуы (летаргия, жүнінің үрпиуі), белсенділік деңгейі, тәбетінің төмендеуі талданды. Эвтаназиядан кейін өкпе гомогенатын дозалап егу арқылы өкпенің бактериологиялық көрсеткіштері зерттелді. Қорғаныс индексі есептеліп, өкпе, бауырдағы, бүйректегі және көкбауырдағы қабыну процесі гистологиялық бағалау арқылы бағаланды (сурет 4, б).



Сурет 4 – Қара мал туберкулезіне қарсы жаңа вакцинаның қауіпсіздігі мен қорғаныштық қасиетін теңіз шошқаларында зерттеу схемасы.

Салыстырмалы бақылау ретінде теңіз шошқаларының үшінші тобына физиологиялық ертінді егіліп, сонымен қатар тәжірибеде төртінші салыстырмалы сараптама ретінде интактты (манипуляциясыз) жануарлар тобы қолданылды.

2.2.8 Вакцинаның иммуногенділігін, иммунитеттің тұрақтылығын және протективтілігін ірі қара малда бағалау

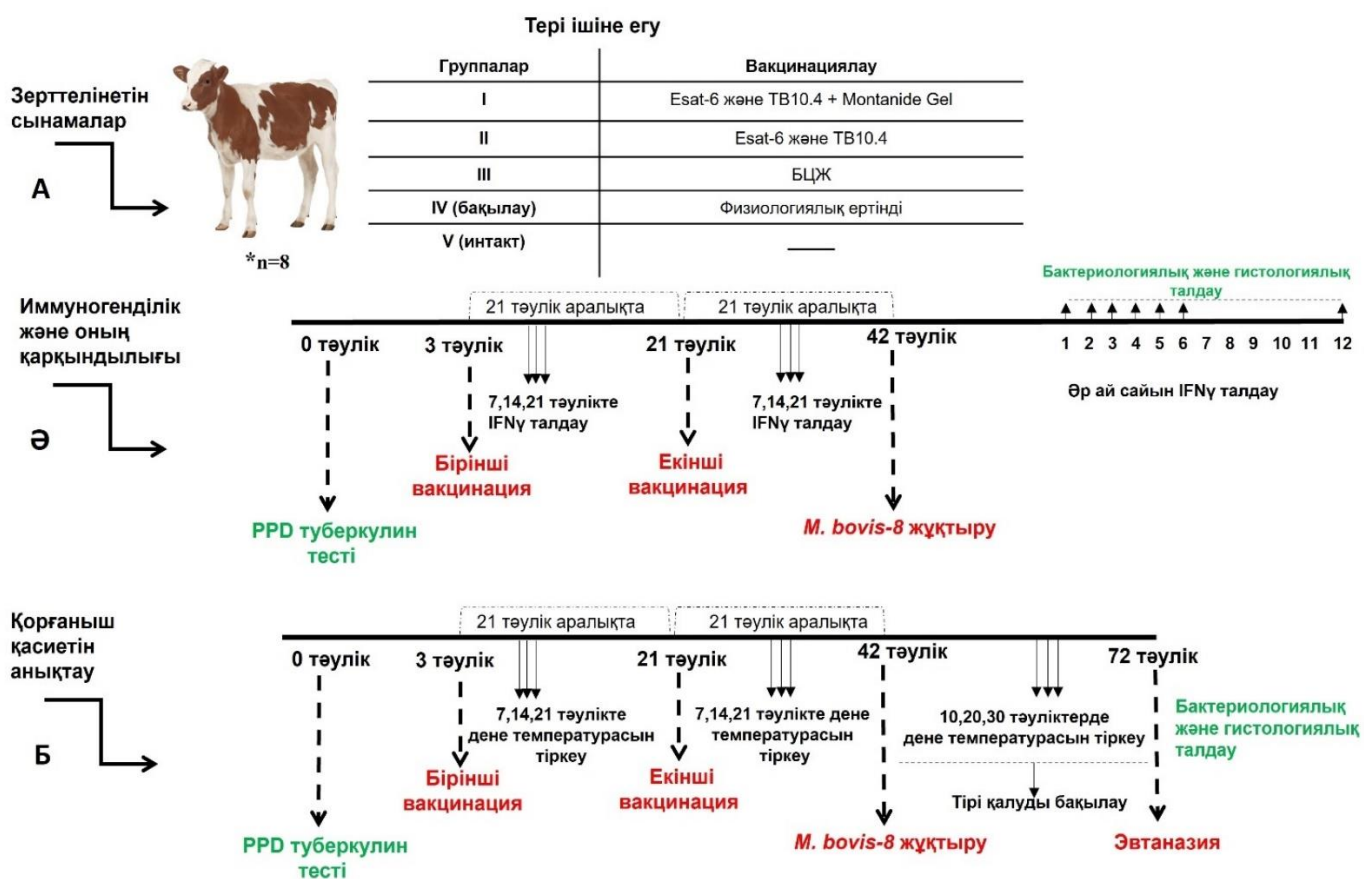
Бұзаулар рандомизация әдісімен 5 топқа бөлінді және әр топта 8 бас бұзау болды. №1 топтың бұзауларына физиологиялық ертіндідегі Montanide Gel адьювантының 15% ертіндісінде ерітілген векторлық вакцинамен тері ішіне егілді. №2 топтың бұзауларына адьювантсыз векторлық вакцина тері ішіне егілді. №3 топ бұзауларына БЦЖ вакцинасы тері ішіне егілді. №4 топтағы бұзаулар физиологиялық ертінді инъекцияны алды, ал №5 топтағы бұзаулар ешқандай манипуляциясыз таза күйінде қалды. №4 және №5 топтардың бұзаулары вакцинаны бағалауға арналған бақылау топтары болып табылады (сурет 5, а).

Жаңа вакцинаның иммуногендігі мен иммунитеттің ағзада тұрақтылығын немесе ұзақтығын ірі қара малда зерттеу мақсатында бұзаулар даярланған вакциналармен 2 мл/лг 6,25 EID₅₀ көлемінде екі рет тері ішіне егу алды. Әр вакцинация аралығы 21 тәулікті құрады. Содан кейін зерттеудің 7, 14 және 21-ші тәуліктерінде әрбір вакцинациядан кейін стандартты ИФА әдістерін қолдана отырып, Т-жасушалық иммунитетті (IFN γ жасушалары) бағалау үшін бұзаулардың мойын көк тамырынан қан алынды (сурет 6, ә).

Зерттеудің 42-ші тәулігінде зерттелініп отырған вакцинаның протективтілігін анықтау үшін 0078-*M. bovis*-8/*RIBSP* вирулентті штаммымен малдың оң жақ шап тері астына 1,0 мл көлемінде (1,1 млрд) суспензия түрінде енгізілді (сурет 6, ә).

Сонымен қатар 1 - 6 және 12 айдан кейін әр топтан бір бұзау эвтанизацияланып, жасушалық иммунитеттің қалыптасуы мен қоздырғыштан қорғану арасындағы корреляцияның салыстырмалы талдауы үшін бактериялогиялық және гистологиялық зерттеу жүргізіледі (сурет 6, ә).

Ірі қара мал туберкулезіне қарсы жаңа вакцинаның протективтілік қасиетін зерттеу үшін вакциналарды (2 мл/л 6,25 EID₅₀ көлемінде) тері ішіне екі рет егу 21 күн аралығымен жүргізілді. Зерттеудің 0, 7, 14 және 21-ші күндерінде әрбір вакцинациядан кейін қара малдың дене температурасының динамикасы зерттелінді (сурет 5, б).



Сурет 5 – Ірі қара мал туберкулезіне қарсы вакцина кандидатының иммуногенділігін, иммунитеттің тұрақтылығын және қорғаныштық қасиетін ірі қара малда зерттеу схемасы

Зерттеудің 42-ші күні вакцинаның протективтілігін анықтау үшін туберкулездің *M. bovis-8* патогенді штаммының суспензия оң жақ шап тері астына 1,0 мл көлемінде (1,1 млрд) енгізілді.

Малға 0078-*M. bovis-8/RIBSP* вирулентті штаммымен жұқтырылғаннан кейін жануарларды 30 күн бойы бақылап, келесі көрсеткіштер бағаланды: дене салмағы, дене температурасы, клиникалық белгілері, физиологиялық белсенділік деңгейі, тәбетінің төмендеуі. Эвтаназиядан кейін жануарлардың ішкі органдарына бактериялогиялық және гистологиялық зерттеулер жүргізіледі (5-сурет, б).

Бактериологиялық зерттеулер. Вирустық жүктемені анықтау үшін өкпе тінінің гомогенатының тығыз Левенштейна-Йенсен жұмыртқалы қоректік ортасына сериялық сұйылту әдісін қолдана отырып дозаланған себу арқылы жасалды. Әдістің сезімталдығының төменгі шегі - 2×10^3 КТБ. ТМБ жаппай өсуі өкпенің салмағына шаққанда КТБ санының ондық (lg) көрсетілген. Органдарды қорғау индексі инфекцияны бақылау тобындағы жануарлардың lg КТБ иммунизацияланған жануарлардың lg КТБ шегеру арқылы есептелді. Нәтижелерді талдау кезінде $\geq 0,5$ lg қорғаныс индексі МБТ өсуінің тежелуіне оң әсер етеді деп есептелді.

Гистологиялық зерттеулер. Ішкі ағзалардың зақымдалуына визуалды макрокопиялық зерттеу жүргізілді. Бүйрек, бауыр, көкбауыр және өкпе

гистологиялық зерттеу үшін 10% бейтарап формальдегидте бекітілді. Гистологиялық кесінділер гематоксилин және эозин ерітіндісімен бояу арқылы алынды.

2.2.9 Статистикалық талдау

Зерттелетін параметрлердің орташа арифметикалық мәндері, сондай-ақ олардың стандартты қателігі анықталды. Көрсеткіштер арасындағы айырмашылықтардың маңыздылығы GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, АҚШ) статистикалық бағдарламасының көмегімен анықталды. $P < 0,05$ мәні маңызды деп саналды.

3 ЗЕРТТЕУ НӘТИЖЕЛЕРІ ЖӘНЕ ОЛАРДЫ ТАЛДАУ

3.1 Кері генетика әдісі негізінде *M. bovis* гендері бар генетикалық тұрақты рекомбинантты тұмау вирусының штамдарын құру

Рекомбинантты вирустарды алу бөгде тізбектері бар NS модификацияланған геномдық фрагменті бар әлсіретілген тұмау векторларын құруды көздейтін бұрын әзірленген технология негізінде жүзеге асырылды. Бұл технология интраназальды иммундау арқылы респираторлық эпителий жасушаларында инфекциялық агенттердің проактивті антигендерін экспрессиясы үшін әлсіреген тұмау векторын пайдалануға мүмкіндік береді. Мұндай схема тұмау векторы негізінде туберкулезге қарсы вакцинаны әзірлеу кезінде сыналды [87].

Рекомбинантты вирустық штамдар 8 плазида жиынтығымен Vero жасушаларының электропорациясы арқылы алынды [87]. Бұл жүйеде плазмидалардың әрқайсысында тұмау вирусының сегіз геномдық сегменттерінің бірінің кДНК көшірмесі бар, олардан вирустық РНҚ транскрипциясы және вирустық ақуыздардың экспрессиясы бір уақытта жүреді. Жасушаға енгеннен кейін әр плазмидадан САР (*азғышын термині*) вирустық РНҚ (минус-тізбек) және вирустық ақуыздарды кодтайтын САР мРНҚ синтезі басталады. Полимеразды кешен ақуыздарының (РВ1, РВ2, РА) және NP ақуызының САР мРНҚ-ларынан трансляцияланғаннан кейін вирустық РНҚ-ның сегіз минус тізбегінің транскрипциясы мен репликациясы басталады. Әрі қарай вирустық рибонуклеопротеидтер мен құрылымдық ақуыздардан жаңа вирустық бөлшектер жиналады. Бұл жағдайда берілген генетикалық сипаттамалары бар А тұмауы вирусының көптеген толыққанды бөлшектерін өндіруге жағдай жасалады. Нәтижесінде *de novo* инфекциялық вирустық бөлшектер пайда болады, олар жасушадан шыққаннан кейін көрші Vero жасушаларын жұқтыруға қабілетті, ал одан әрі процесс табиғи инфекцияның барысын қайталайды.

Кері генетикалық технология негізінде тұмау вирусының NS1 ақуызының ашық оқу шеңберінен микобактериялық ақуыздарды экспрессиялайтын рекомбинантты тұмау векторы құрастырылды. Жобаны іске асыру нәтижесінде векторлық туберкулезге қарсы вакцина жасау үшін микобактериялық ақуыздарды экспрессиялайтын рекомбинантты тұмауға қарсы вакцина штаммы таңдалды.

3.1.1 Genbank гендік банкінде *Mycobacterium bovis*-тің иммунодоминантты ақуыздарды таңдау

M. bovis протективті ақуыздарын кодтайтын гендерді өңдеуге арналған праймерлерді таңдау және синтездеу

Молекулярлық вирусология жетістіктерімен вирустық иммунология жетістіктері қазіргі таңда жоғары иммундық жауаптарды тудыратын антигендерді яғни ақуыздарды ағзаға тасымалдау ерекшелігіне ие векторларды жасауға мүмкіндік береді [91]. Туберкулез инфекциясының алдын

алу мақсатта hsp60, Ag 85, TB10.4, ESAT-6 және басқалары сияқты бірнеше негізгі антигендер аталмыш ауруға қарсы жаңа үміткер вакцина жасауда перспективалы ақуыздар болып саналады. Әлемдік әдебиет көздеріне жүгінер болсақ осы аты аталған антигендердің негізінде бірқатар диагностикалық жүйелермен вакциналар жасалынған (2-кестеде келтірілген) [90].

Кесте 2 – *M. bovis* негізіндегі антигендерінің (ақуыздардың) биологиялық қасиеттері

Антиген түрі (локализация)	Атауы	Биологиялық функция
Секреторлық антиген	Ag85	Ag85A, Ag85B, Ag85C – микобактериялардың жасуша қабырғасының биосинтезі үшін қажетті миколитрансфераза ферменттері. Туберкулез инфекциясын диагностикалауға арналған негізгі маркерлер.
	ESAT-6	RD1 аймағында кодталған төмен молекулалы бөлінетін ақуыз. ESX 1 жүйесі арқылы шығарылады. Олар қорғаныс механизмдерін басу үшін қабылдаушы ағзаға тікелей әсер етеді. Фаголизосомалардың мембраналық лизисіне және макрофагтардың сыртқы мембранасына қатысады және осылайша микобактериялардың бір жасушадан екіншісіне таралуына ықпал етеді.
	TB10.4	EsxH регулонымен кодталған молекулалық салмағы 10,4 кДа rv0288 генінің өнімі. Ақуыз туберкулез инфекциясының ерте сатысында танылады және протективті иммунитеттің негізгі факторы (IFN γ) өндіруге жауапты лимфоциттердің көбеюіне ықпал етеді. Ол ақуыздармен бірге микобактерияларды енгізгенде адьювантты әсерге ие. Туберкулезге қарсы жаңа вакциналарды әзірлеу үшін перспективалы ақуыз болып табылады.

Жоғарыда атап өткен ғылыми зерттеулерді жүргізу барысында алынған нәтижелер

ПТР қою барысында *M. bovis* TB10.4, Ag85A, Ad85v және Esat-6 протективті ақуыздарын кодтайтын гендерге ПТР өнімдерін өңдеуге арналған 4 (төрт) жұп праймерлер таңдалып синтезделді. Таңдалынған олигонуклеотидті праймерлердің сипаттамасы 3-кестеде көрсетілген.

Кесте 3 - Праймерлердің сипаттамасы

Ақуыз дар	Гендер	Функциясы	Праймер атауы	Праймердің реттілігі (5'-3')	Өнімнің өлшемі (п. о.)
TB10.4	esxH	Ерте секреция ақуызы	Tb10.4_F P	CAGATGTCGCAAATCACAACCTACC CCG	280

3-кесте жалғасы

			Tb10.4_R P	CAGTTGGCGGCTTCGGCGTGTCTG	
Ag85A	FbpsA	Антигендік кешеннің ақуызы	Ag85A_F P	CCGATGCAGCTTGTGACAGGGT	1014
			Ag85A_R P	TTGGAATTTCGGCGCCCTGGGGCGC	
Ag85B	FbpsB	Антигендік кешеннің ақуызы	Ag85B_F P	GAGATGACAGACGTGAGCCGA	975
			Ag85B_R P	TTGGAATTCTCAGCCGGCGCCTAA CGA	
Esat-6	esxA	Ерте секреция ақуызы	Esat-6_FP	TAGATGACAGAGCAGCAGTGGAAT TTCGCGGGTA	285
			Esat-6_RP	AAGGAATTCTGCGAACATCCCAGT GACGT	
<i>Ескертпе:</i> т. о. - негіздер жұбы					

6-9 суреттерде амплификация кезінде праймерлердің орналастырылған участоктары көрсетілген. Суретте көрсетілгендей, құрастырылған праймерлер телімді гендердің (Tb10.4, Ag85A, Ag85B, Esat-6) нуклеотидтік тізбегін толық танып тұр, сәйкесінше, 280, ~1014, ~975 және ~285 молекулярлық массаны көрсетіп тұр. Сонымен қорыта келгенде геннің дұрыс реттілігін алудың маңызды кезеңдерінің бірі-оны амплификациялау. Осылайша, біз синтездеген праймерлер, праймерлерді құрау кезіндегі қолданылатын барлық жалпы міндеттемелі нұсқаулықтарға сәйкес келеді.

1	ATGTCGCAAA TCATGTACAA CTACCCCGCG ATGTTGGGTC ACGCCGGGGA TATGGCCGGA TATGCCGGCA CGCTGCAGAG CTGGGTGCC GAGATCGCCG TACAGCGTIT AGTACATGTT GATGGGGCGC TACAACCCAG TCGGGCCCT ATACCGGCCT ATACGGCCGT GCGACGCTC GAACCCACGG CTCTAGCGGC	PstI ~~~~~
101	TGGAGCAGGC CGCGTTGCAG AGTGCCTGGC AGGCGGATAC CGGGATCAG TATCAGGCGT GGCAGGCACA GTGGAACCAG GCCATGGAAG ATTTGGTGGC ACCTCGTCCG GCGCAACGTC TCACGCACCG TCCCGCTATG GCCCTAGTGC ATAGTCCGCA CCGTCCGTGT CACCTTGGTC CGGTACCTTC TAAACCACGC	NcoI ~~~~~
201	GGCCTATCAT GCGATGTCCA GCACCCATGA AGCCAACACC ATGGCGATGA TGGCCCGGA CACGGCCGAA GCCGCCAAT GGGGGGGCTA G CCGGATAGTA CGCTACAGGT CGTGGTACT TCGTTGTGG TACCGTACT ACCGGGCGCT GTGCGGCTT CGGGGGTTTA CCCCCTCGAT C	NcoI ~~~~~

Сурет 6 - Tb10.4 генін амплификациялау кезінде праймерлерді отырғызу учаскелері

1	ATGCAGCTTG TTGACAGGGT TACGTGCGAA AACTGTCCCA	TCGTGGCGCC GTCACGGGTA TGTCGCGTGG ACTCGTGGTC GGGGCCGTGG GCGCGGCCCT AGTGTCCGGT CTGGTCGGCG AGCACCGCGG CAGTGCCCAT ACAGCGCAGC TGAGCACCAG CCCCAGCAGC GCGCGCCGGA TCACAGCCCA GACCAGCCGC
101	CCGTCCGTGG CACGGCGACC GCGGGGGCAT TTTCCCGGCC GGGCTTGGCG GTGGAGTACC TGCAGGTGCC GTCGCCGTGG ATGGGCCGTG ACATCAAGGT GCGACCCACC GTGCCGTGG CGCCCCCGTA AAAGGGCCGG CCGGAACGGC CACCTCATGG ACGTCCACGG CAGCGGCAGC TACCCGGCAC TGTAGTCCCA	PstI CCGTCCGTGG CACGGCGACC GCGGGGGCAT TTTCCCGGCC GGGCTTGGCG GTGGAGTACC TGCAGGTGCC GTCGCCGTGG ATGGGCCGTG ACATCAAGGT GCGACCCACC GTGCCGTGG CGCCCCCGTA AAAGGGCCGG CCGGAACGGC CACCTCATGG ACGTCCACGG CAGCGGCAGC TACCCGGCAC TGTAGTCCCA
201	CCAAATTCAA AGTGGTGGTG CCAACTCGCC CGCCCTGTAC CTGCTCGACG GCGTGGCGCG GCAGGACGAC TTCAGCGGCT GGGGATCAA CACCCCGCG GGTTAAGGTT TCACCACCAC GGTGAGCGG GCGGGACATG GACGAGCTGC CCGAGCGCGC GTCCTGTGCT AAGTGCAGCA CCCTGTAGTT GTGGGGCCGC	HindIII CCAAATTCAA AGTGGTGGTG CCAACTCGCC CGCCCTGTAC CTGCTCGACG GCGTGGCGCG GCAGGACGAC TTCAGCGGCT GGGGATCAA CACCCCGCG GGTTAAGGTT TCACCACCAC GGTGAGCGG GCGGGACATG GACGAGCTGC CCGAGCGCGC GTCCTGTGCT AAGTGCAGCA CCCTGTAGTT GTGGGGCCGC
301	TTGAGTGGT ACGACCAGTC GGGCCTGTGG GTGGTCAATG CGGTGGGTGG CCAAGTCAAGC TTCTACTCCG ACTGGTACCA GCCCGCCTGC GGCAGGGCCG AAGCTCACCA TGCTGGTCAG CCCGGACAGC CACCAGTACG GCCACCCACC GGTCTAGTTC AAGATGAGGC TGACCATGTT CCGGCGGACG CCGTTCGGGC	HindIII TTGAGTGGT ACGACCAGTC GGGCCTGTGG GTGGTCAATG CGGTGGGTGG CCAAGTCAAGC TTCTACTCCG ACTGGTACCA GCCCGCCTGC GGCAGGGCCG AAGCTCACCA TGCTGGTCAG CCCGGACAGC CACCAGTACG GCCACCCACC GGTCTAGTTC AAGATGAGGC TGACCATGTT CCGGCGGACG CCGTTCGGGC
401	GTGCCAGAC TTACAAGTGG GAGACCTTCC TGACCACGGA GTCGCCGGGG TGGCTGCAGG CCAACAGGCA CGTCAAGCCC ACCGGAAGCG CCGTCTCGG CAACGGTCTG AATGTTACCC CTCTGGAAGG ACTGGTCTGT CGACGGCCCC ACCGACGTCC GGTGTCCGT GCAGTTCGGG TGGCCTTCGC GGCAGCAGCC	PstI GTGCCAGAC TTACAAGTGG GAGACCTTCC TGACCACGGA GTCGCCGGGG TGGCTGCAGG CCAACAGGCA CGTCAAGCCC ACCGGAAGCG CCGTCTCGG CAACGGTCTG AATGTTACCC CTCTGGAAGG ACTGGTCTGT CGACGGCCCC ACCGACGTCC GGTGTCCGT GCAGTTCGGG TGGCCTTCGC GGCAGCAGCC
501	TCCTTCGATG GCTGTTCTTT CGGCGCTGAC GCTGGCGATC TATCACCCCC AGCAGTTCGT CTACGCGGGA GCGATGTCGG GCTGTGTGGA CCCTCCAG AGAAAGCTAC CGACGAAGAA GCCCGGACTG CGACCGTAG ATAGTGGGGG TCGTCAAGCA GATGCGCCCT CCGTACAGCC CCGACAACCT GGGGAGGGTC	HindIII TCCTTCGATG GCTGTTCTTT CGGCGCTGAC GCTGGCGATC TATCACCCCC AGCAGTTCGT CTACGCGGGA GCGATGTCGG GCTGTGTGGA CCCTCCAG AGAAAGCTAC CGACGAAGAA GCCCGGACTG CGACCGTAG ATAGTGGGGG TCGTCAAGCA GATGCGCCCT CCGTACAGCC CCGACAACCT GGGGAGGGTC
601	GCGATGGGTC CCACCTGAT CGGCCTGGCG ATGGGTGACG CTGGCGGCTA CRAGGCCCTC GACATGTGGG GCCCGAAGGA GGACCCGGCG TGGCAGCGCA CGCTACCCAG GGTGGGACTA GCGGACCGC TACCCACTGC GACCGCCGAT GTTCGGGAGG CTGTACACCC CCGGCTTCTT CCGGGCCGC ACCGTCGGT	HindIII GCGATGGGTC CCACCTGAT CGGCCTGGCG ATGGGTGACG CTGGCGGCTA CRAGGCCCTC GACATGTGGG GCCCGAAGGA GGACCCGGCG TGGCAGCGCA CGCTACCCAG GGTGGGACTA GCGGACCGC TACCCACTGC GACCGCCGAT GTTCGGGAGG CTGTACACCC CCGGCTTCTT CCGGGCCGC ACCGTCGGT
701	ACGACCCGCT GTTGAAGTC GGAAGCTGA TCGCAACAA CACCCGCGTC TGGGTGACT GCGGCAACGG CAAGCCGTGG GATCTGGGTG GCAACAACCT TGCTGGCGA CAACTTGCAG CCCTTCGACT AGCGTTGTT GTGGGCGCAG ACCCACATGA CCGGTTGCC GTTCGGCAGC CTAGACCCAC CGTGTGTGGA	HindIII ACGACCCGCT GTTGAAGTC GGAAGCTGA TCGCAACAA CACCCGCGTC TGGGTGACT GCGGCAACGG CAAGCCGTGG GATCTGGGTG GCAACAACCT TGCTGGCGA CAACTTGCAG CCCTTCGACT AGCGTTGTT GTGGGCGCAG ACCCACATGA CCGGTTGCC GTTCGGCAGC CTAGACCCAC CGTGTGTGGA
801	GCCGCCAAG TTCCTCGAGG GCTTCGTGGC GACCAGCAAC ATCAAGTTC AAGACGCTA CAACGCCGT GCGGCCCAAC ACGGCGTGT CGACTTCCC CGCCCGTTC AAGGAGCTCC CGAAGCACGC CTGGTCTGTT TAGTTCAGG TTCTCGGATG GTTGGGCCA CCGCCGGTGT TGCCGACAA GCTGAAGGGC	AvaI GCCGCCAAG TTCCTCGAGG GCTTCGTGGC GACCAGCAAC ATCAAGTTC AAGACGCTA CAACGCCGT GCGGCCCAAC ACGGCGTGT CGACTTCCC CGCCCGTTC AAGGAGCTCC CGAAGCACGC CTGGTCTGTT TAGTTCAGG TTCTCGGATG GTTGGGCCA CCGCCGGTGT TGCCGACAA GCTGAAGGGC
901	GACAGCGGTA CGCACAGTCC GGAGTACTGG GGGGCGCAGC TCAACGCTAT GAAGCCGAC CTGCGAGGG CACTGGGTGC CACGCCAAC ACCGGCCGC CTGTGCCAT GCGTGTGAC CCTCATGACC CCCCAGCTGC AGTTGCGATA CTTGCGGCTG GACGTTGCC GTGACCCAG GTGGGGTTG TGCCCGGGC	HindIII GACAGCGGTA CGCACAGTCC GGAGTACTGG GGGGCGCAGC TCAACGCTAT GAAGCCGAC CTGCGAGGG CACTGGGTGC CACGCCAAC ACCGGCCGC CTGTGCCAT GCGTGTGAC CCTCATGACC CCCCAGCTGC AGTTGCGATA CTTGCGGCTG GACGTTGCC GTGACCCAG GTGGGGTTG TGCCCGGGC
1001	CGCCCAAGG CGCTTAG GGGGGTCC GGGATC	

Сурет 7 - Ag85A генін амплификациялау кезінде праймерлерді отырғызу учаскелері

1	ATGACAGAGC TGAGCCGAAA TACTGTCTGC ACTCGGCTTT	GATTGAGCT TGGGACGCC GATTGATGAT CGGCACGGCA GCGGCTGTAG TCCTTCGGG CCTGGTGGG CTTCGGCGG CTAAGCTCGA ACCCTTGGCG CTAACACTA GCGCTGCCGT CCGCGACATC AGGAAGGCC GGACACCCC GAACGGCCGC
101	GAGCGCAAC CGCGGGCGG TTCTCCCGGC CGGGGCTGCC GTCAGATAC CTGCAGGTGC CGTCCGCTG GATGGGCCG GACATCAAG TTCAGTCCA CTCGCCCTT GCGCCCGCG AAGAGGGCCG GCCCGACGCG CCAGCTCATG GACGTCCACG GACGCGGCG CTACCCGGCG CTGTAGTTC AAGTCAAGGT	PstI GAGCGCAAC CGCGGGCGG TTCTCCCGGC CGGGGCTGCC GTCAGATAC CTGCAGGTGC CGTCCGCTG GATGGGCCG GACATCAAG TTCAGTCCA CTCGCCCTT GCGCCCGCG AAGAGGGCCG GCCCGACGCG CCAGCTCATG GACGTCCACG GACGCGGCG CTACCCGGCG CTGTAGTTC AAGTCAAGGT
201	GAGCGGTGGG ACAAACCTAC CTGCGGTTTA TCTGCTGAC GGCCTGCGCG CCCAAGACGA CTACAACGGC TGGGATATCA ACACCCCGCG GTTCGAGTG CTCGCCACC TTGTTGAGTG GACGCCAAT AGACGAGCTG CCGGACGCG CCGTCTGCT GATGTTGCCG ACCCTATAGT TGTGGGGCCG CAAAGTCAAC	HindIII GAGCGGTGGG ACAAACCTAC CTGCGGTTTA TCTGCTGAC GGCCTGCGCG CCCAAGACGA CTACAACGGC TGGGATATCA ACACCCCGCG GTTCGAGTG CTCGCCACC TTGTTGAGTG GACGCCAAT AGACGAGCTG CCGGACGCG CCGTCTGCT GATGTTGCCG ACCCTATAGT TGTGGGGCCG CAAAGTCAAC
301	TACTACCAGT CCGGACTGTC GATAGTCATG CCGGTCCGCG GGCAGTCCAG CTTCTACAGC GACTGGTACA GCCCGGCTG CGGTAAGGCT GGCTGCCAGA ATGATGGTCA GCCCTGACAG CTATCAGTAC GGCCAGCCCG CCGTCAAGTC GAAGATGTG CTGACCATGT CCGGCGGAC GCCATTCCGA CCGACGGTCT	HindIII TACTACCAGT CCGGACTGTC GATAGTCATG CCGGTCCGCG GGCAGTCCAG CTTCTACAGC GACTGGTACA GCCCGGCTG CGGTAAGGCT GGCTGCCAGA ATGATGGTCA GCCCTGACAG CTATCAGTAC GGCCAGCCCG CCGTCAAGTC GAAGATGTG CTGACCATGT CCGGCGGAC GCCATTCCGA CCGACGGTCT
401	CTTACAAGTG GGAACCTTC CTGACCAGCG AGCTGCCGA ATGGTGTCC GCCAACAGGG CCGTGAAGCC CACCGGCGC GCTGCAATCG GCTTGTGAT GAATGTTAC CCTTTGGAAG GACTGCTGCG TCGACGGCGT TACCACAGG CCGTGTGCTC GGCACCTCGG GTGGCGTGC CGACGTTAGC CGAACAGCTA	HindIII CTTACAAGTG GGAACCTTC CTGACCAGCG AGCTGCCGA ATGGTGTCC GCCAACAGGG CCGTGAAGCC CACCGGCGC GCTGCAATCG GCTTGTGAT GAATGTTAC CCTTTGGAAG GACTGCTGCG TCGACGGCGT TACCACAGG CCGTGTGCTC GGCACCTCGG GTGGCGTGC CGACGTTAGC CGAACAGCTA
501	GGCCGGCTCG TCGCAATGA TCTTGGCGCG CTACCACCC CAGCAGTTCA TCTACGCGG CTGCTGTGCG GCCCTGCTG ACCCTCTCA GGGATGGGG CCGGCCGAGC AGCCGTTACT AGAACCGGCG GATGGTGGG GTCGTCAAGT AGATGCGGCC GAGCGACAGC CCGGACGACC TGGGGAGAGT CCCCTACCC	HindIII GGCCGGCTCG TCGCAATGA TCTTGGCGCG CTACCACCC CAGCAGTTCA TCTACGCGG CTGCTGTGCG GCCCTGCTG ACCCTCTCA GGGATGGGG CCGGCCGAGC AGCCGTTACT AGAACCGGCG GATGGTGGG GTCGTCAAGT AGATGCGGCC GAGCGACAGC CCGGACGACC TGGGGAGAGT CCCCTACCC
601	CCTAGCCTGA TCGGCTCGG GATGGTGCAG GCCGGCGGTT ACAAGGCGCG AGACATGTGG GGTCCCTCGA GTGACCCGCG ATGGGAGCG AACGACCTA GGATCGGACT AGCCGGAGCG CTACCCACTG CCGCCGCCAA TGTTCCGGCG TCTGTACACC CCAGGGAGCT CACTGGGCG TACCCTCGG TTGCTGGGAT	AvaI CCTAGCCTGA TCGGCTCGG GATGGTGCAG GCCGGCGGTT ACAAGGCGCG AGACATGTGG GGTCCCTCGA GTGACCCGCG ATGGGAGCG AACGACCTA GGATCGGACT AGCCGGAGCG CTACCCACTG CCGCCGCCAA TGTTCCGGCG TCTGTACACC CCAGGGAGCT CACTGGGCG TACCCTCGG TTGCTGGGAT
701	CGCAGCAGT CCCCAGCTG GTCGCAACA ACACCCGGCT ATGGGTTTAT TCGGGGAAC GCACCCCGAA CGAGTTGGG GGTGCCAACA TACCCGCGCA GCGTCTGCTA GGGGTTGAC CAGCGTTTGT TGTGGGCGGA TACCACAAATA ACGCCCTTGC CGTGGGGCTT GCTCAACCCG CCACGTTGT ATGGGCGGCT	HindIII CGCAGCAGT CCCCAGCTG GTCGCAACA ACACCCGGCT ATGGGTTTAT TCGGGGAAC GCACCCCGAA CGAGTTGGG GGTGCCAACA TACCCGCGCA GCGTCTGCTA GGGGTTGAC CAGCGTTTGT TGTGGGCGGA TACCACAAATA ACGCCCTTGC CGTGGGGCTT GCTCAACCCG CCACGTTGT ATGGGCGGCT
801	GTTCTGGAG AACTTCGTC GTAGCAGCAA CCTGAAGTTC CAGGATCGGT ACAACGCGCG GGGCGGGCAC AACCCGTGT TCAACTTCCC GCCAACGGC CAAGAACCTC TTGAAGCAAG CATCGTCTGT GGACTTCAAG GTCCTACGCA TGTTCGGCG CCGCCCTGT TTGCGGCACA AGTTGAAGGG CCGGTTGCCG	HindIII GTTCTGGAG AACTTCGTC GTAGCAGCAA CCTGAAGTTC CAGGATCGGT ACAACGCGCG GGGCGGGCAC AACCCGTGT TCAACTTCCC GCCAACGGC CAAGAACCTC TTGAAGCAAG CATCGTCTGT GGACTTCAAG GTCCTACGCA TGTTCGGCG CCGCCCTGT TTGCGGCACA AGTTGAAGGG CCGGTTGCCG
901	ACGCACAGCT GGGAGTACTG GGGCGCTCAG CTCAACGCCA TGAAGGGTGA CCTGCAGAGT TCGTTAGGCG CCGGCTGA TGGTGTGCA CCCTCATGAC CCGCGGAGTC GAGTTGCGGT ACTTCCCACT GGACGTCTCA AGCAATCCGC GGCCGACT	PstI ACGCACAGCT GGGAGTACTG GGGCGCTCAG CTCAACGCCA TGAAGGGTGA CCTGCAGAGT TCGTTAGGCG CCGGCTGA TGGTGTGCA CCCTCATGAC CCGCGGAGTC GAGTTGCGGT ACTTCCCACT GGACGTCTCA AGCAATCCGC GGCCGACT

Сурет 8 - Ag85B генін амплификациялау кезінде праймерлерді отырғызу учаскелері

1	ATGACAGAGC AGCAGTGGAA TTTCCGGGT TACTGTCTGC TGTCACTT AAAGCGCCCA	TTCGAGGCC CGGCAAGCGC AATCCAGGGA AATGTCACGT CCATTCACT CCTCCTGAC GAGGGGAAGC TAGTCTCCGC GCGCTTCCG TTAGTCCCT TTACAGTGA GGTAAAGTAA GGAGGAAGT CTCCCCTTCG
101	AGTCCCTGAC CAAGCTCGCA GCGGCCTGGG GCGGTAGCGG TTCGAGGGCG TACCAGGGTG TCCAGCAAAA ATGGGACGCC ACGGCTACCG AGCTGAACAA TCAGGGACTG GTTCGAGCGT CCGCGACCC CCGCATCGCC AAGCCTCCGC ATGGTCCCAG AGGTCTGTTT TACCCTGCGG TGCCGATGCG TCGACTGTGTT	PstI AGTCCCTGAC CAAGCTCGCA GCGGCCTGGG GCGGTAGCGG TTCGAGGGCG TACCAGGGTG TCCAGCAAAA ATGGGACGCC ACGGCTACCG AGCTGAACAA TCAGGGACTG GTTCGAGCGT CCGCGACCC CCGCATCGCC AAGCCTCCGC ATGGTCCCAG AGGTCTGTTT TACCCTGCGG TGCCGATGCG TCGACTGTGTT
201	CGCGCTGCA AACCTGGCGG GGACGATCAG CGAAGCCGGT CAGGCAATGG CTTGACCGA AGGCAACGTC ACTGGGATGT TCGCATAG GCGCGACGTC TTGGACCGCG CTTGCTAGTC GCTTCGGCCA GTCGGTACC GAAGCTGGT TCCGTTGAG TGACCTACA AGCGTATC	HindIII CGCGCTGCA AACCTGGCGG GGACGATCAG CGAAGCCGGT CAGGCAATGG CTTGACCGA AGGCAACGTC ACTGGGATGT TCGCATAG GCGCGACGTC TTGGACCGCG CTTGCTAGTC GCTTCGGCCA GTCGGTACC GAAGCTGGT TCCGTTGAG TGACCTACA AGCGTATC

Сурет 9 - Esat-6 генін амплификациялау кезінде праймерлерді отырғызу учаскелері

ПТР қою барысында 3-кестеде келтірілген праймерлердің жұмыс сезімталдығын анықтау үшін амплификация режимінің температуралық-уақыттық типтік бағдарламасын қолдана отырып жұмыстар жүргізілді (кесте 4,5).

Кесте 4 – Амплификацияның температуралық-уақыттық режимі

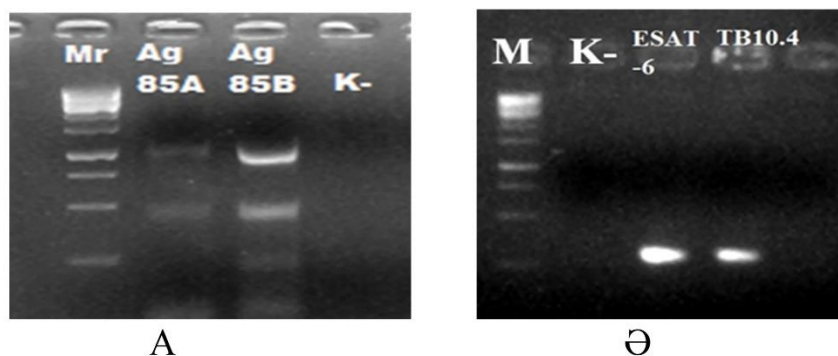
ПТР кезеңдері	Амплификацияның температуралық-уақыттық режимі	Цикл саны
Бастапқы денатурация	95 °С - 5 мин	-
Денатурация 1	94 °С - 40 с	35
Күйдіру 2	52 °С - 40 с	
Элонгация 2	72 °С - 60 с	
Соңғы элонгация	72 °С - 7 мин	-
Температураны сақтау	4 °С	-

Кесте 5 – Оңтайландырылған ПТР температуралық-уақыттық режимі

Ген	ПТР кезеңдері	Амплификацияның температуралық-уақыттық режимі	Цикл саны
Esat-6	Бастапқы денатурация	95 °С - 5 мин	-
	Денатурация 1	94 °С – 1 мин	30
	Праймер белсенділігі 2	62 °С – 1 мин	
	Элонгация 2	72 °С – 1,30 мин	
	Соңғы элонгация	72 °С - 7 мин	-
ТВ10.4	Бастапқы денатурация	94 °С - 5 мин	-
	Денатурация 1	94 °С - 40 с	35
	Праймер белсенділігі 2	50 °С - 40 с	
	Элонгация 2	72 °С - 60 с	
	Соңғы элонгация	72 °С - 5 мин	-

Алынған ампликондар электрофоретикалық әдіспен бром этидиясы бар 1,7% агароза гелінде талданды (10-сурет).

ПТР нәтижелерінің электрофоретикалық профилі көрсетілген 11-сурет бойынша ПТР өнімдерінің өлшемдері бұрын теориялық есептелген өлшемдерге сәйкес келеді.



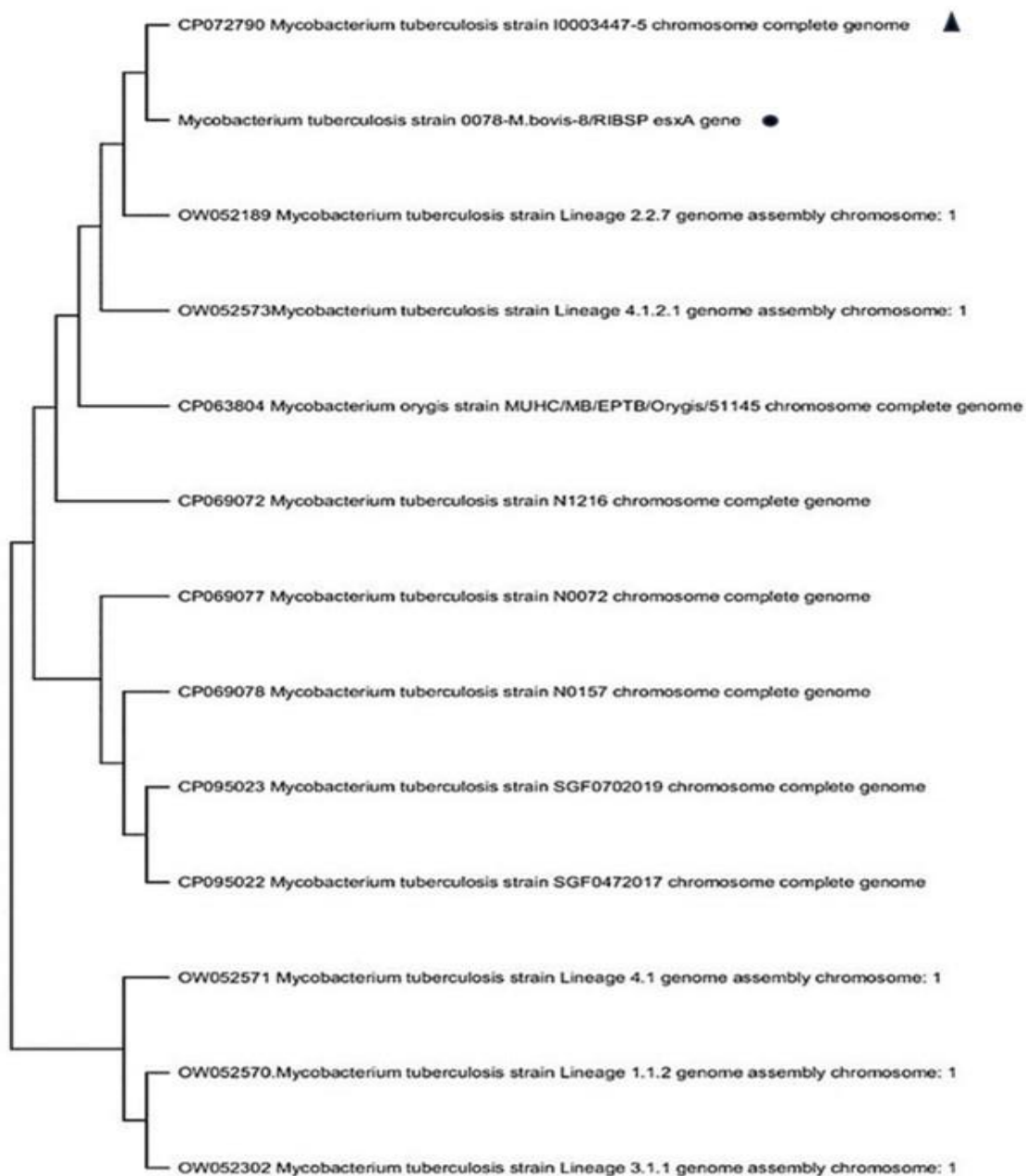
А) Ag85A және Ag85B гендері; Ә) Esat-6 және TB10.4 гендері

Сурет 10 - ПТР өнімдерінің электрофоретикалық профилі

Осы электрофорограммалардан әрбір зерттелген сынамада сәйкесінше қажетті өлшемдері 280, ~1014, ~975 және ~285 bp болатын гендерінің бөліктері жасалғанын көруге болады.

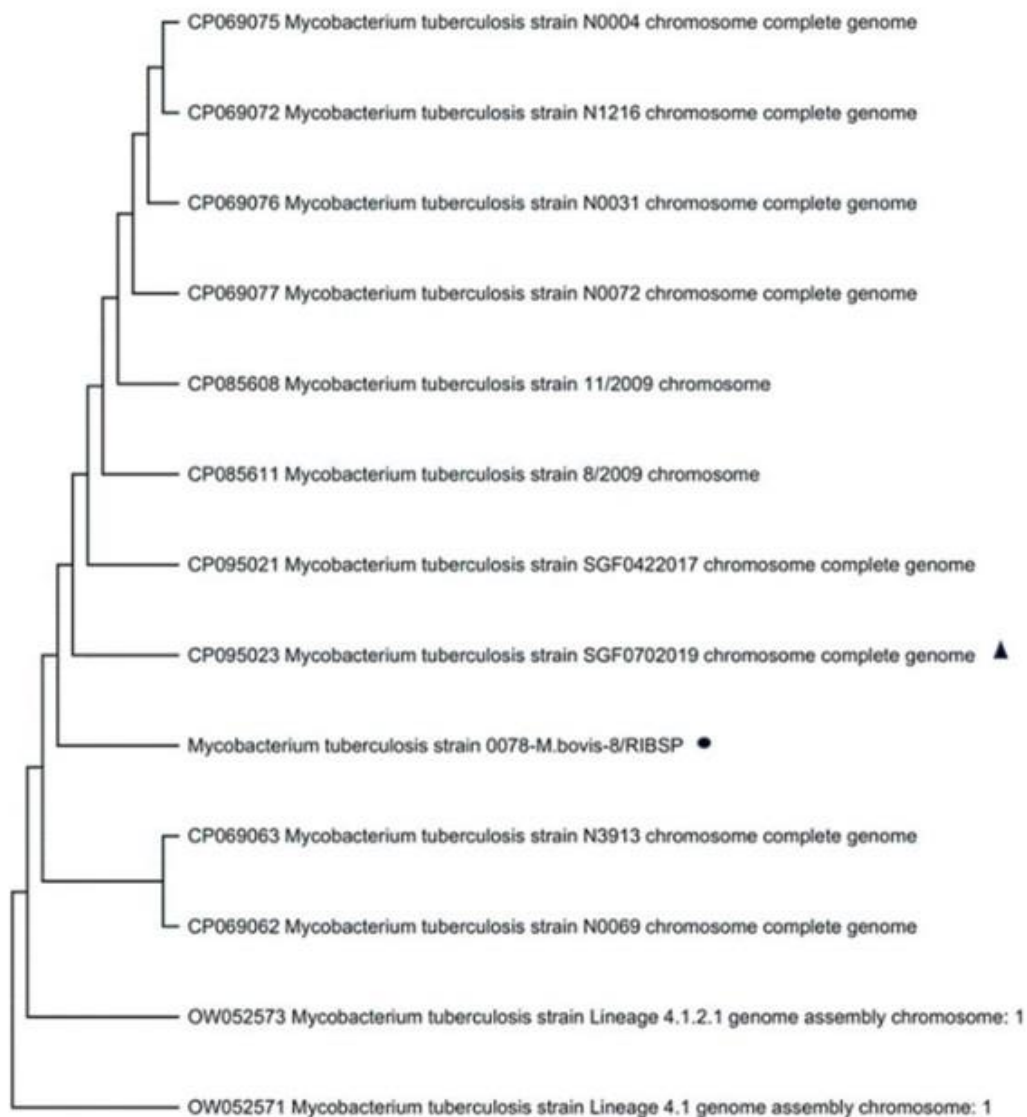
ПТР нәтижесінде алынған күшейтілген Esat-6 және TB10.4 ДНҚ өнімдері тазартылып, кейін секвенделіп және алынған тізбектер OP610627 және OP610628 ID нөмірлерімен GenBank дерекқорына жіберілді. *M. bovis* филогенетикалық байланысын анықтау үшін GenBank-тен ұқсас ген үлгілерімен 0078-*M.bovis*-8/*RIBSP* бөлініп алынған Esat-6 және TB10.4 гендерінің негізінде филогенетикалық талдау жүргізілді (сурет 11,12).

Зерттеу нәтижесінде 0078-*M.bovis*-8/*RIBSP* штаммының Esat-6 генінің нуклеотидтер тізбегі *Mycobacterium* тұқымдасына жататынын және GenBank-тен *M. tuberculosis* I0003447-5 (CP072790) штаммымен жеке генетикалық тармақты құрайтыны көрсетілген (сурет 12). GenBank дерекқорындағы ең жақын штаммен, атап айтқанда *M. tuberculosis* SGF0702019 (CP095023) штаммымен 0078-*M.bovis*-8/*RIBSP* штаммының TB10.4 генінің нуклеотидтер тізбегін салыстырмалы талдауымыз салыстырылған нуклеотидтер тізбегі 100% бірдей екенін көрсетті. Ол сонымен қатар 0078-*M. bovis*-8/*RIBSP* штаммы *Mycobacterium* тұқымдасына жатады және GenBank дерекқорынан *M. tuberculosis* SGF0702019 (CP095023) штаммымен жеке генетикалық тармақты құрайды (сурет 12) [91].



Esat-6 генінің филогенезі MEGA11 бағдарламасында ықтималдық әдісін қолдану арқылы жасалды. Қара нүктемен белгіленген зерттелген тізбек, қара үшбұрышпен белгіленген салыстырушы тізбек.

Сурет 11 – 0078-*M.bovis-8/RIBSP* штаммының Esat-6 генінің филогенетикалық талдауы



ТВ10.4 генінің филогенезі MEGA11 бағдарламасында ықтималдық әдісін қолдану арқылы жасалды. Қара нүктемен белгіленген зерттелген тізбек, қара үшбұрышпен белгіленген салыстырушы тізбек.

Сурет 12 – *0078-M/bovis-8/RIBSP* штаммының ТВ10.4 генінің филогенетикалық талдауы

Талдау барысында Esat-6 геніне ең жақын сәйкестік 2019 жылы адам терісінің биопсиясынан Қытайдың Цзянсу аймағында оқшауланған *M. tuberculosis* I0003447-5 (GenBank ID: CP072790) болып табылды. Екі геннің нуклеотидтер тізбегін теңестіру кезінде ешқандай айырмашылықтар немесе нуклеотидтердің алмасулары анықталмады. Екі тізбектің ұқсастығы 100% құрады. ТВ10.4 геніне ең жақын штамм N0004 *M. туберкулез* (ID: CP069075), ол 2010 жылы Үндістанда адам қақырығынан бөлінген. ТВ10.4 тізбектері мен N0004_ *M. tuberculosis* (ID: CP069075) анықтамалық гені арасында ген

аймақтарының 100% ұқсастығын көрсетіп, нуклеотидтердегі алмасулар немесе айырмашылықтар анықталмады [91].

Соңғы жылдар *M. bovis* қоздырғышының протективті ақуыздарын кодтайтын векторлық антигендерге негізделген вакциналарды жасау аса қатты маңыздылыққа ие болуда [92]. Бұл қатарға протективті антигендер ретінде туберкулез қоздырғышының Ag85, TB10.4 және ESAT-6 ақуыздарды кіреді [93]. Әдеби деректерге сүйенсек, *M. bovis* үлгісіндегі бұл ақуыздар туберкулездің алдын алуда жоғары деңгей көрсетті [94].

Келесі Ag85A, Ag85B және Ag85C мукозил-трансферазды белсенділікке ие және жасуша қабырғасы мен вирулентті корд-фактор гликолипидтерінің биосинтезін катализдейтін Ag85 құрамындағы үш компонентті ақуыздар - Ag85 антигендік кешенді құрайды [95].

Сонымен қатар *M. tuberculosis* геномымен кодталған мыңдаған ақуыздардың ішінде аурудың басталуымен және оның дамуымен тікелей байланысты шағын ғана ақуыздар тобы бар. Бұл топтың қатарына ESAT-6, TB10.4 ақуыздары кіріп, олар – ең күшті иммуногендер болып саналады, сонымен қатар аталмыш ақуыздар бүкіл әлемде сәтті қолданылатын гетерологиялық вакцина дайындауға ең қолайлы үміткерлер болып табылады [96].

Жоғарыда көрсетілген мәліметтерге сүйенсек, туберкулез инфекциясымен күресте жаңа вакциналық және диагностикалық дәрмектерді жасау үшін ESAT-6, Ag85A, Ag85B және TB10.4 ақуыздары жоғарыда аталған қасиеттері үшін ең перспективті ақуыздар болып саналады.

Қорыта келе айтарымыз, дұрыс ген тізбегін алудағы маңызды қадамдардың бірі оны амплификациялау болып табылады. Көзделген мақсатқа жету үшін ПТР дұрыс қою параметрлерін таңдау және ПТР қолайлы компоненттерді таңдау болып табылады.

Ірі қара мал туберкулезіне қарсы векторлы вакцинаны дайындау кезінде қолданылатын M. Bovis гендерін амплификациялау үшін ПТР параметрлерін оңтайландыру

Бұл жұмыстың мақсаты *M. bovis* гендерін амплификациялау үшін жобаланған праймердің қоймалжыңдылығын және құрастырылған праймерді күйдіру температурасын оңтайландыру, одан әрі профилактикалық агенттерді әзірлеуде пайдалану болып табылады.

Праймердің арнайы дизайндері және екіншілік құрылымдардың (мысалы, шанышқы/шпильки және димерлер) қалыптасу ықтималдығының бағалаулары Vector NTI Advance 11.5.2 бағдарламалық құралының көмегімен есептелді. ДНҚ экстракциясы өндіруші Qiagen компаниясының QIA amp DNA Mini Kit тест-жүйесінің қолдану бойынша нұсқаулығына сәйкес жүзеге асырылды. Амплификация Applied Biosystem GenAmp 9700 амплификаторы арқылы жүзеге асырылды.

Праймерлердің өнімділігін бастапқы сынау реакциялық қоспаның ең жиі сипатталған құрамын, 1x ПТР буферін, 2,5 мМ қоймалжыңдағы магний иондарын, сондай-ақ пайдаланылатын полимеразға арналған нұсқаулықта

келтірілген циклдік параметрлерді пайдалана отырып жүргізілді. Бастапқыда таңдап алынған праймерлердің өнімділігін сынау кезінде қажетті ПТР өнімдері амплификацияланды. Аталмыш праймерлердің өнімділігін анықтау барысында біз жоғары тиімділік байқалатын праймерді белсенді ету температурасын оңтайландырып, жоғары концентрациядағы теріс бақылауға күйдіру болмайтын спецификалық емес генетикалық ұқсас организмнің геномдық ДНҚ-сы болып табылатыны (1-млн астам реакцияға) анықталды. Ол үшін ПТР праймерлердің болжамды балқу температураларынан $\pm 4^{\circ}\text{C}$ градиентінде жүретіндігі анықталды. Праймерлердің қоймалжындығы реакция қоспаларына 5 пМ қадамдарымен 5-тен 20 рМ-ге дейінгі диапазондағы праймерлерді қосу арқылы оңтайландырылды.

Электрофореграмма талдауы бойынша $56,0-59,0^{\circ}\text{C}$ температурасында бейспецификалық фрагменттердің күшеюі байқалатынын көрсетті. Күйдіру температурасы $65,7^{\circ}\text{C}$ жоғары болған кезде праймерлер дұрыс жұмыс жасамайды. Ең анық жарқырау $62,0-63,0^{\circ}\text{C}$ температурасында байқалады, ПТР өнімінің мөлшері шамамен 280 бр, яғни праймерді белсенді ететін оңтайлы температурасы $62,0-63,0^{\circ}\text{C}$. Сондай-ақ, оптималды праймер концентрациясы реакциялық қоспаның соңғы көлемінде 20 рМ болатыны анықталды.

Жүргізілген жұмыстардың нәтижесінде *M. bovis* бактериясының межеленген гендерін амплификациялау үшін праймерді күйдіру шарттары мен оптималды праймер концентрациясы оңтайландырылды.

Осылайша, қорыта келгенде біз синтездеген праймерлер ірі қара мал туберкулезіне қарсы векторлы вакцинасын дайындау мақсатта қолданылатын рекомбинантты векторды конструкциялау яғни құрастыру барысында қолданылатын барлық жалпы қабылданған ұсыныстарға сәйкес келеді.

3.1.2 Химерлік (NS1+микобактериялық кірістірулер) генетикалық сегменттерді синтездеу

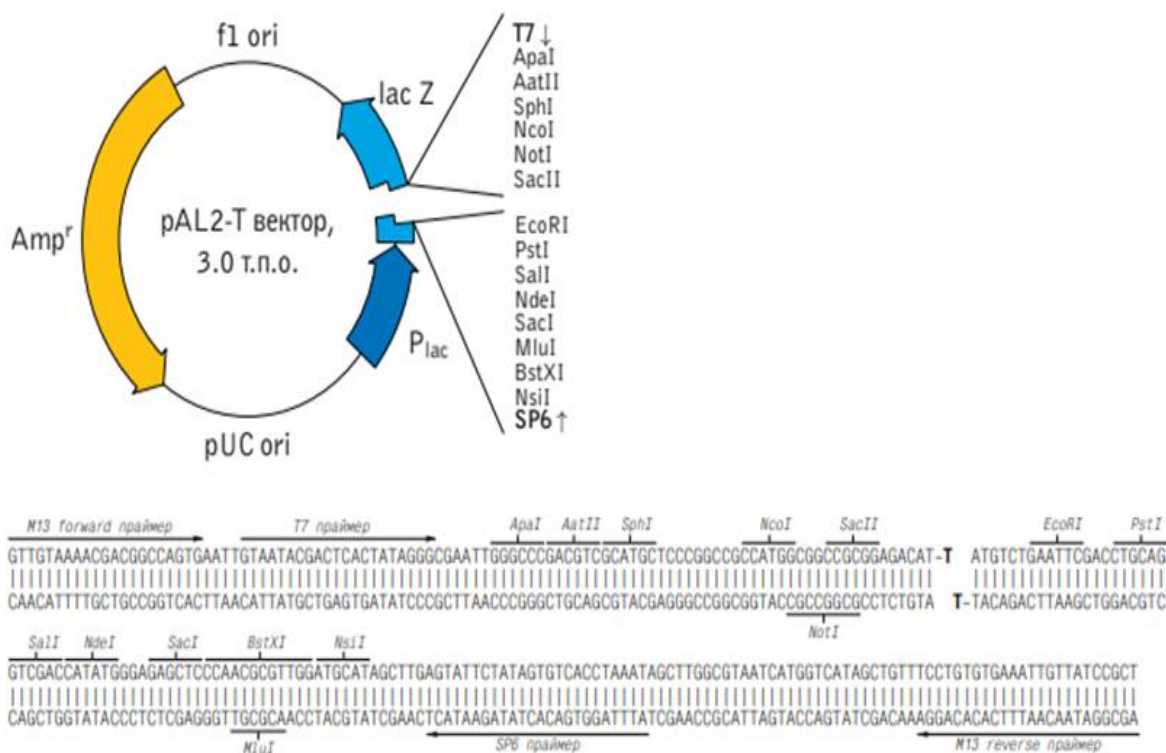
NS1 ақуызын оқу шеңберіндегі микобактериялық антигендерді экспрессиялайтын тұмау вирусының рекомбинантты штамдарын жасау үшін плазмидалардан вирустың жиналуын қамтитын кері генетика әдісі қолданылды. Бұл әдіс берілген геном құрамы бар штамдарды алуға және гендік-инженерлік модификацияларды енгізуге мүмкіндік береді.

Рекомбинантты вирустарды алу бөгде тізбектері бар NS модификацияланған геномдық фрагменті бар әлсіретілген тұмау векторларын құруды көздейтін бұрын әзірленген технология негізінде жүзеге асырылды. Бұл технология интраназальды иммундау арқылы респираторлық эпителий жасушаларында инфекциялық агенттердің проективті антигендерін экспрессиясы үшін әлсіреген тұмау векторын пайдалануға мүмкіндік береді. Мұндай схема тұмау векторы негізінде туберкулезге қарсы вакцинаны әзірлеу кезінде сыналды [97].

Рекомбинантты вирустық штамдар 8 плазида жиынтығымен Vero жасушаларының электропорациясы арқылы алынды [87]. Бұл жүйеде плазмидалардың әрқайсысында тұмау вирусының сегіз геномдық

сегменттерінің бірінің қДНК көшірмесі бар, олардан вирустық РНҚ транскрипциясы және вирустық ақуыздардың экспрессиясы бір уақытта жүреді. Жасушаға енгеннен кейін әр плазмидадан САР вирустық РНҚ (минустізбек) және вирустық ақуыздарды кодтайтын САР мРНҚ синтезі басталады. Полимеразды кешенді ақуыздардың (РВ1, РВ2, РА) және NР ақуызының САР мРНҚ-ларынан трансляцияланғаннан кейін вирустық РНҚ-ның сегіз минус тізбегінің транскрипциясы мен репликациясы басталады. Әрі қарай вирустық рибонуклеопротеидтер мен құрылымдық ақуыздардан жаңа вирустық бөлшектер жиналады. Бұл жағдайда берілген генетикалық сипаттамалары бар А тұмауы вирусының көптеген толыққанды бөлшектерін өндіруге жағдай жасалады. Нәтижесінде de novo инфекциялық вирустық бөлшектер пайда болады, олар жасушадан шыққаннан кейін көрші Vero жасушаларын жұқтыруға қабілетті, ал одан әрі процесс табиғи инфекцияның барысын қайталайды.

NS1 геніне негізделген векторлық дизайнды жасау үшін TB10.4, ESAT-6 және NS1 ақуыздары өндірілді. Ақуыздардың жеткілікті көлемін алу үшін олар рAL2-т векторына клондалған (Евроген, кат.# ТА002) (сурет 13). Бұл вектор рестриктазалармен немесе экзонуклеазалармен алдын ала өңдеусіз ПТР өнімдерін жылдам клондауға арналған және клондарды ақ-көк селекциялау мүмкіндігін қамтамасыз етеді.



Сурет 13 – рAL2-Т векторының картасы

Микобактериялық антигендерді экспрессиялайтын екі рекомбинантты штамм алынды. Рекомбинантты штаммдардың екеуінде де А/PR/8/34(H1N1)

тұмау вирусының Pb2, PB1, PA, NP гендік сегменттері мен модификацияланған NS гені, А/Астана/6/05 тұмау вирусының беткі антигендері (НА, NA) және М гені болды (кесте 6).

Кесте 6 - Микобактерия ақуыздарын экспрессиялайтын рекомбинантты вирустық штаммдардың геномдық құрамы

Рекомбинантты штаммдардың атауы	Ішкі ақуыздарды кодтайтын ген сегменттерінің шығу тегі	Беттік антигендерді кодтайтын ген сегменттерінің шығу тегі	Химерикалық NS ген сегментінің сипаттамасы
A/Ast/PR8-NS124-10.4	A/PR/8/34(H1N1) тұмау вирусының ішкі және құрылымдық емес ақуыздарының (PB2, PB1, PA, NP) гендері, М протеині – A/chicken/Astana/6/05	А/тауық/Astana/6/05 (H5N1) тұмау вирусының беткі антигендерінің (НА, NA) гендері. Модификацияланған бөлу орны НА	A/PR/8/34(H1N1) тұмау вирусының NS гені, 124 аминқышқылына дейін қысқартылған NS1 ақуызын кодтайды, микобактериялық антиген 10.4 кодтайтын реттілікпен бірдей оқу шеңберінде біріктірілген.
A/Ast/PR8-NS124-Esat6			A/PR/8/34(H1N1) тұмауы вирусының NS гені, 124 аминқышқылына дейін қысқартылған NS1 ақуызын кодтайды, Esat6 микобактериялық антигенін кодтайтын тізбегімен бірдей оқу шеңберінде біріктірілген.

NS1 гені одан әрі клондау қадамдары үшін NS1-124 және NS125-224 екі бөлік түрінде әзірленді.

Кесте 7 - NS1 генінің синтезі үшін пайдаланылған праймер жұптары

Атауы	Реттілік
NS1_fo r1	GGTAGCGTGAAGACGGTCTCGCTAGCAGTTAACCGGAGTACTGATGGAC CCCAATACTGT
NS1_re v1	CGGACATGCCAAAGGAAACAGTCCACCTGGAAGCTGGACACAGTATTG GGGTCCATCA
NS1_fo r2	TTCSTTTGGCATGTCCGTAACGCGTGGCAGATCAGGAGTTAGGGGATG CTCCGTT
NS1_re v2	CCTCGGCCACGCAGAGACTTCTGGTCCCTCCTCAATCTATCCAGGAACG GAGCATCCCCT
NS1_fo r3	GCGTGGCCGAGGCAGTACACTGGGGTTGGACATTGAGACGGCTACGCG GGCCGGGAA
NS1_re v3	AGTGCCTCATCAGATTCTTCTTTCAGGATTCGTTCCAATTTGCTTCCCG GCCCGCGTA

7-кесте жалғасы

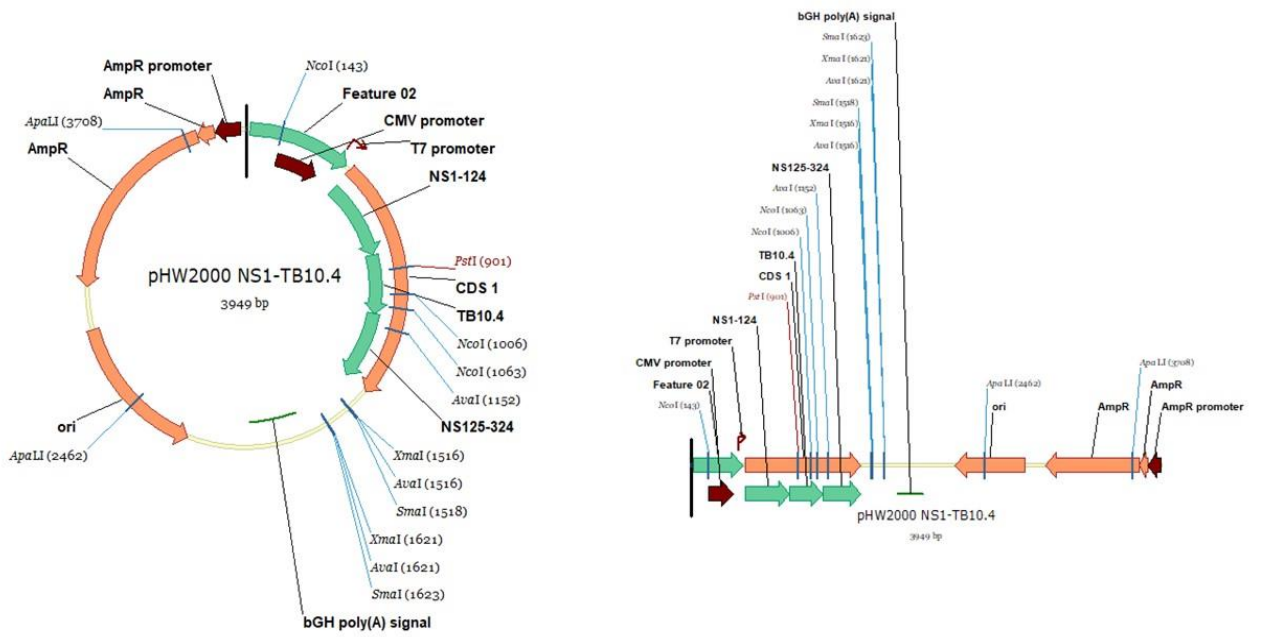
NS1_fo r4	AGAAGAATCTGATGAGGCACTGAAGATGACAATGGCTTCCGTACCTGCC TCTCGCTACCT
NS1_re v4	GCTCCAATCTCTAGACATCTCTTCAAGTGTCATGTCGGTTAGGTAGCGAG AGGCAGG
NS1_fo r5	AGAGATGTCTAGAGATTGGAGCATGCTCATACCCAAACAGAAGGTTCGC GGGCCCACTATG
NS1_re v5	GCAGCGAACTCAGTGGTCTCAGATGGCCTGGTCCATTCTGATGCATAGT GGGCCCGCGA
NS2_fo r1	GGTAGCGTGAAGACGGTCTCTGATAAGAATATTATCCTCAAAGCCAATT TTAGTGTC
NS2_re v1	TGTCTCGAGGCGATCAAATATGACACTAAAATTGGCTTTGAGGATAAT
NS2_fo r2	TGATCGCCTCGAGACACTATTCTGCTGCGGGCATTACCGAGGAGGGA GCCATTGTT
NS2_re v2	GGGCAGTGGGCTGATTTCTCCAACAATGGCTCCCTCCTCGGTAA
NS2_fo r3	TCAGCCCACTGCCCTCACTTCCAGGACACACCGCCG
NS2_re v3	AAGCCACCAATCAGCACTCCCACTGCGTTCCTCACGTCCTCGGCGGTGT GTCCTG
NS2_fo r4	GTGCTGATTGGTGGCTTGGAGTGGAACGACAATAACCGTTAGGGTTTCCG AAACTCTGCAA
NS2_re v4	AGGTCTGCCATTCTCGTTCGAGCTCCGCCAAGCGAATCTTTGCAGAGTTT CGGAAACC
NS2_fo r5	ACGAGAATGGCAGACCTCCGTAACTCCTAAGCAGAAAAGGGAGATGG CGGGTACCAT
NS2_re v5	GCAGCGAACTCAGTGGTCTCGTCGACTCATACTTCACTGCGGATGGTAC CCGCCATCT

Компетентті Top10 E.coli жасушалары ақуыздар алу үшін лигаза қоспасымен трансформацияланды. Ақуыздар рНW плазмидаларына клондау үшін оқшауланған және тазартылған. Клондау басталғанға дейін ген тізбегі Сэнгер әдісі бойынша секвенделіп, тексерілді.

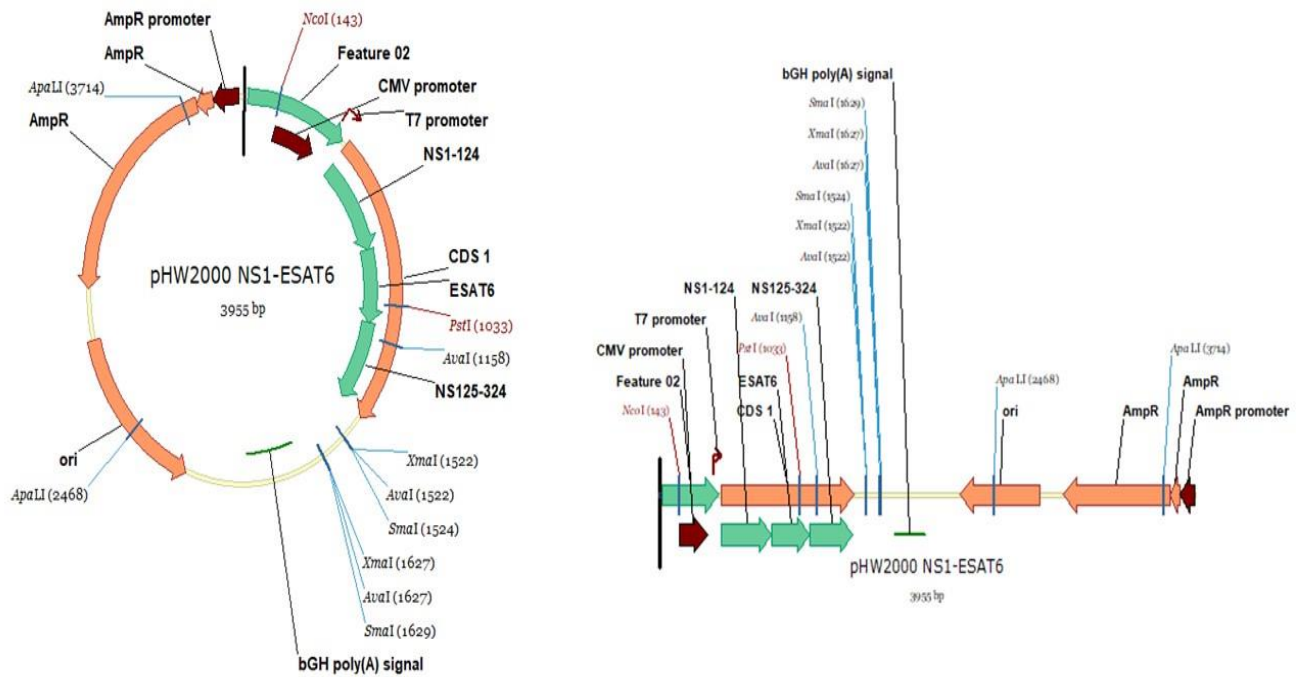
NS1-124	73	176
NS1-6_M13-dir_B09	gGTAGCGTGAAGACGgtctcGCTAGCAGTTAACCGGAGTACTGATGGACCCCAATACTGTGTCCAGCTTCCAGGTGGACTGTTTCCTTTGGCATGTCCGTA AAC	GGTAGCGTGAAGACGGTCTCGCTAGCAGTTAACCGGAGTACTGATGGACCCCAATACTGTGTCCAGCTTCCAGGTGGACTGTTTCCTTTGGCATGTCCGTA AAC
NS1-124	177	280
NS1-6_M13-dir_B09	GCGTGGCAGATCAGGAGTTAGGGGATGCTCCGTTCTGGATAGATTGAGGAGGGACCAGAAGTCTCTGCCTGGCCGAGGCAGTACACTGGGGTTGGACATTGAG	GCGTGGCAGATCAGGAGTTAGGGGATGCTCCGTTCTGGATAGATTGAGGAGGGACCAGAAGTCTCTGCCTGGCCGAGGCAGTACACTGGGGTTGGACATTGAG
NS1-124	281	384
NS1-6_M13-dir_B09	ACGGCTACGCGGGCCGGGAGCAAAATAGTGAACGAATCCTGAAAGAAGAATCTGATGAGGCACTGAAGATGACAATGGCTTCCGTACCTGCCTCTCGTACCT	ACGGCTACGCGGGCCGGGAGCAAAATAGTGAACGAATCCTGAAAGAAGAATCTGATGAGGCACTGAAGATGACAATGGCTTCCGTACCTGCCTCTCGTACCT
NS1-124	385	488
NS1-6_M13-dir_B09	AACCGACATGACACTTGAAGAGATGTCTAGAGATTGGAGCATGCTCATACCCAAACAGAAGGTCGCGGGCCCACTATGCATCAGAATGGACCAGGCCATCTGAG	AACCGACATGACACTTGAAGAGATGTCTAGAGATTGGAGCATGCTCATACCCAAACAGAAGGTCGCGGGCCCACTATGCATCAGAATGGACCAGGCCATCTGAG
NS1-124	489	505
NS1-6_M13-dir_B09	ACCACTGAGTTCGCTGC	ACCACTGAGTTCGCTGC
NS125-224	704	807
NS2-4_M13-dir_E09	gGTAGCGTGAAGACGgtctctGATAAGAAtAttACCTCAAAGCCAAATTTAGTGTCAATTTGATCGCCTCGAGACACTCATTCTGCTGCGGGCATTACC GA	GGTAGCGTGAAGACGGTCTCTGATAAGAATATTACCTCAAAGCCAAATTTAGTGTCAATTTGATCGCCTCGAGACACTCATTCTGCTGCGGGCATTACC GA
NS125-224	808	911
NS2-4_M13-dir_E09	GGAGGGAGCCATTGTTGGAGAAATCAGCCCAGTCCCTCACTCCAGGACACACCCCGAGGACGTGAAGAACGCAGTGGGAGTGTGATTGGTGGCTTGGAGT	GGAGGGAGCCATTGTTGGAGAAATCAGCCCAGTCCCTCACTCCAGGACACACCCCGAGGACGTGAAGAACGCAGTGGGAGTGTGATTGGTGGCTTGGAGT
NS125-224	912	1015
NS2-4_M13-dir_E09	GGAACGACAATACCGTTAGGGTTTCCGAAACTCTGCAAAGATTTCGCTTGGCGGAGCTCGAACGAGAATGGCAGACTCCGTTAACTCCTAAGCAGAAAAGGGAG	GGAACGACAATACCGTTAGGGTTTCCGAAACTCTGCAAAGATTTCGCTTGGCGGAGCTCGAACGAGAATGGCAGACTCCGTTAACTCCTAAGCAGAAAAGGGAG
NS125-224	1016	1071
NS2-4_M13-dir_E09	ATGGCGGGTACCATCCGCAGTGAAGTATGAGTCGACGAGACCACTGAGTTCGCTGC	ATGGCGGGTACCATCCGCAGTGAAGTATGAGTCGACGAGACCACTGAGTTCGCTGC

Сурет 14 - NS1 ген тізбегінің туралануы

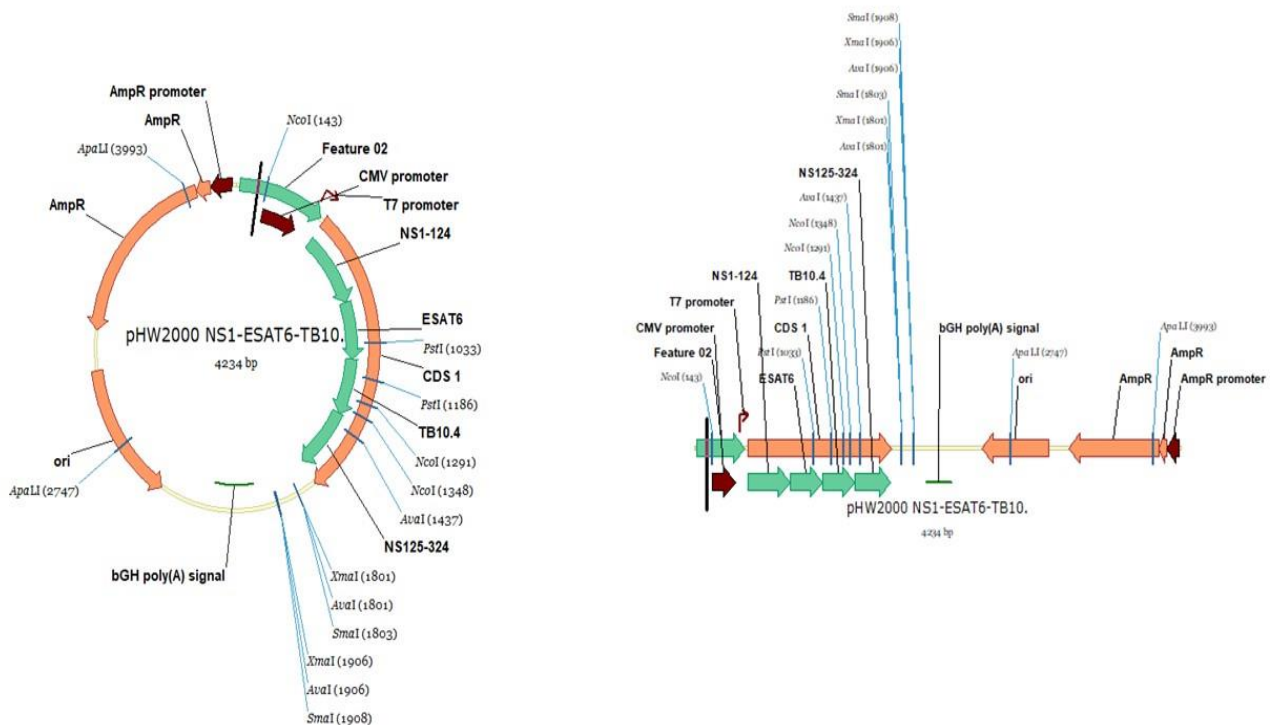
Алынған ақуыздар TB10.4 және ESAT-6 ақуыздарын тұрақты экспрессиялайтын NS1 тұмау вирусының векторын құру үшін рНW2000 екі бағытты экспрессиялық плазмидаға клондалды. Мақсатты ақуыздар рНW2000-да NheI және SalI шектеу сайттары бойынша клондалған (сурет 15,16,17).



Сурет 15 - NS1-TB10.4 кіріктіруі бар рНW2000 плазмидасының картасы



Сурет 16 - NS1-ESAT-6 кіріктіруі бар рНW2000 плазмидасының картасы



Сурет 17 - NS1-ESAT-6-TB10.4 кірiктіруі бар рНW2000 плазмидасының картасы

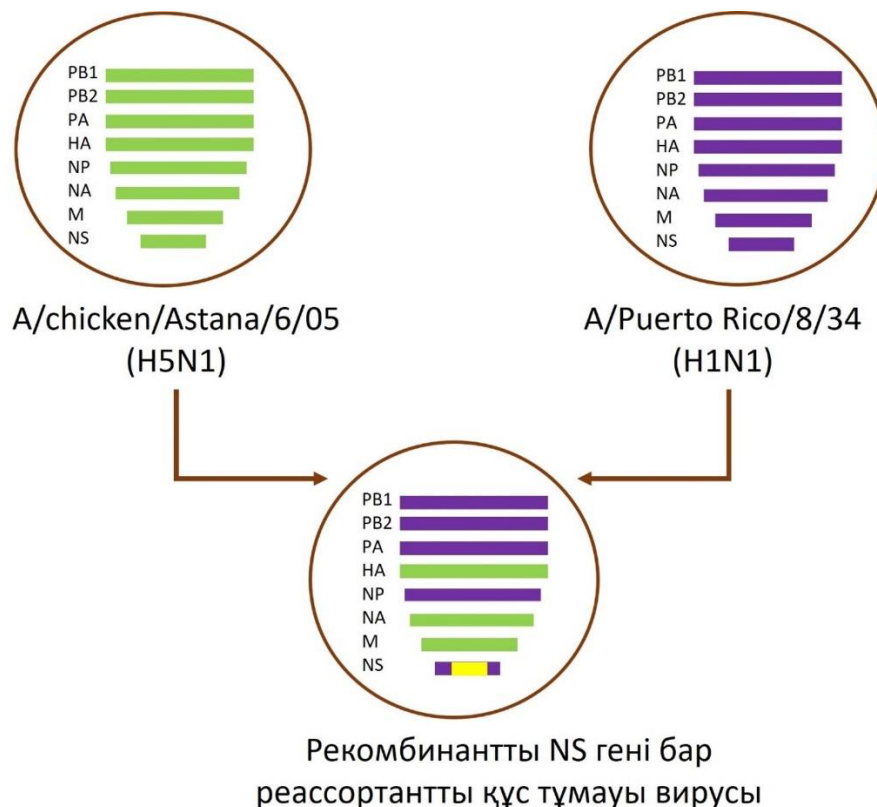
Плазмида өндірісі heat-shock әдісімен легирленген плазмидалардың қоспасымен компетентті жасушаларды трансформациялау арқылы жүргізілді.

Осылайша, А/PR/8/34 (H1N1) тұмау вирусының және А/Астана/6/05 тұмау вирусының гендері бар 8 плазмида алынды. Клондау процесінде НА кодтау тізбегі НА ыдырау орнында қайталанатын негізгі аминқышқылдарының RRRK мотивін кодтайтын аймақты жою арқылы өзгертілді. Сонымен қатар, полимеразаның сырғып кетуі арқылы қайталанатын негізгі аминқышқылдарының мотивін қалпына келтіру мүмкіндігін болдырмау үшін G→Т және К→Т алмасулары енгізілді. Нәтижесінде А/chicken/Astana/6/05 (H5N1) жоғары патогенді штаммының қайталанатын негізгі (NTPQGERRRKKRGLFGAI) аминқышқылдарының мотиві төмен патогенді штаммдарына тән NTPQTETRGLFGAI тізбегімен ауыстырылды (сурет 17).

3.1.3 Тауық эмбрионында плазмидалармен трансфекция арқылы микобактериялық ақуыздарды экспрессиялайтын тұмау векторларын дайындау

Рекомбинантты вирустық штамдар Vero жасушаларының электропорациясы арқылы 8 плазмида жиынтығымен алынды. Бұл жүйеде плазмидалардың әрқайсысында тұмау вирусының сегіз геномдық сегменттерінің бірінің кДНК көшірмесі бар, олардан вирустық РНҚ транскрипциясы және вирустық ақуыздардың экспрессиясы бір уақытта жүреді. Жасушаға енгеннен кейін әр плазмидадан вирустық ақуыздарды

кодтайтын САР вирустық РНҚ (минус-тізбек) және САР мРНҚ синтезі басталады. Полимеразды кешенді ақуыздардың (PB1, PB2, PA) және NP ақуызының САР мРНҚ-ларынан трансляцияланғаннан кейін вирустық РНҚ-ның сегіз минус тізбегінің транскрипциясы мен репликациясы басталады (сурет 18).



Сурет 18 - Рекомбинантты NS гені бар құс тұмауының реассортантты вирионының геномының жалпы құрылымы

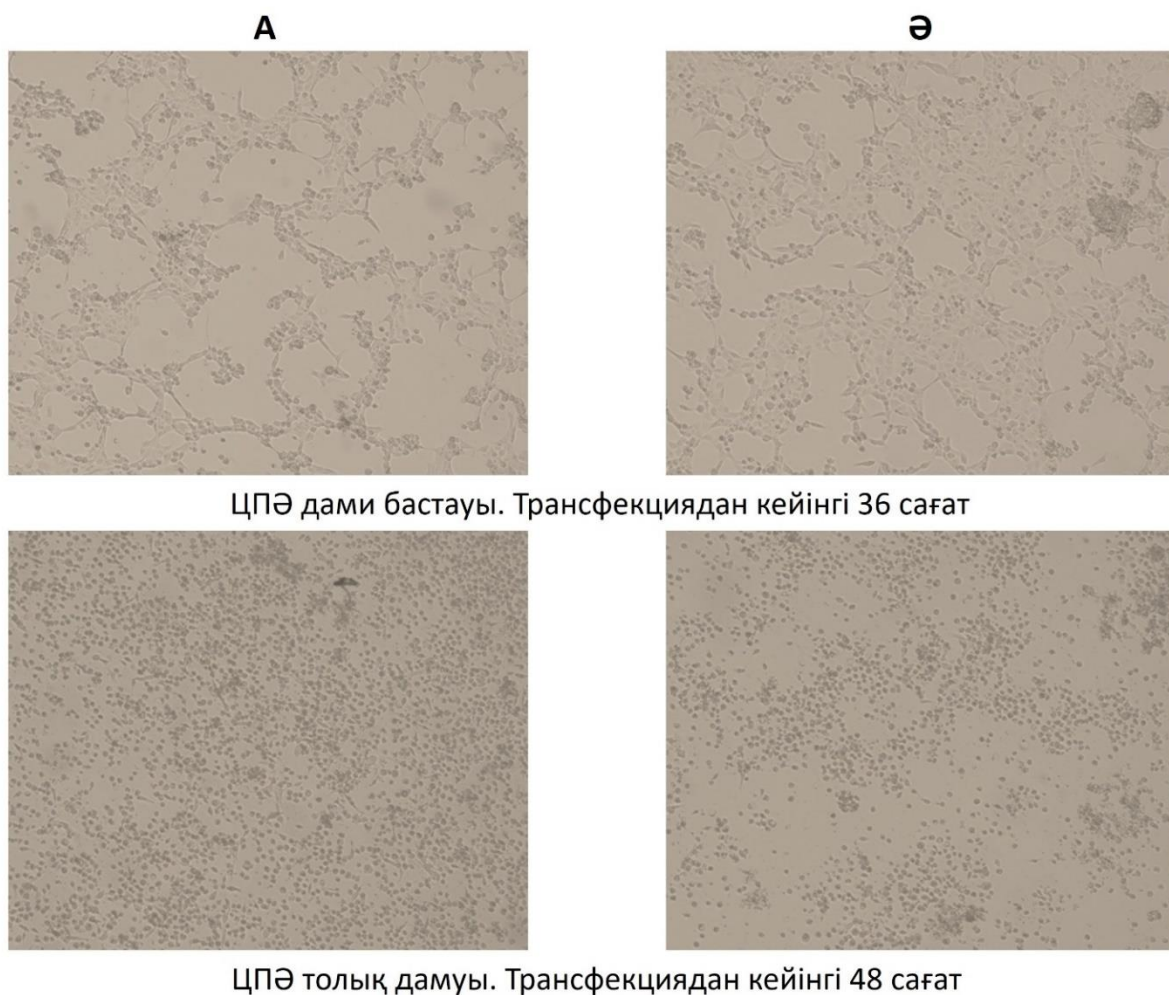
Әрі қарай, жаңа вирустық бөлшектер вирустық рибонуклеопротеидтерден және құрылымдық ақуыздардан жиналады. Бұл жағдайда көрсетілген генетикалық сипаттамалары бар толыққанды А тұмауы вирусының бөлшектерін көп мөлшерде өндіруге жағдай жасалады. Нәтижесінде жұқпалы вирустық бөлшектер де жаңа қалыптасады, олар жасушадан шыққаннан кейін көрші Vero жасушаларын жұқтыруға қабілетті және одан әрі процесс табиғи инфекцияның ағымын қайталайды.

Vero жасуша культурасын трансфекциялау коммерциялық Cell Line Nucleofector® Kit V (Лонза, АҚШ) арқылы әрбір жинақ үшін 8 экспрессиялық плазмиданы пайдалана отырып жүзеге асырылды.

Микобактериялық антигендерді экспрессиялайтын екі рекомбинантты штамм алынды. Рекомбинантты штаммдардың екеуі де А/PR/8/34(H1N1) тұмау вирусының Pb2, PB1, PA, NP гендік сегменттері мен модификацияланған NS гені, А/Астана/6/05 тұмау вирусының беткі антигендері (НА, NA) және М гендерінен тұрады.

A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) (A/PR8/34) тұмау вирусы рекомбинантты штаммдардың жоғары репродуктивті белсенділігінің доноры ретінде пайдаланылды, өйткені ол тауық эмбриондары жүйесінде ерекше жоғары өсу қабілетіне ие және зертханалық жағдайда көптеген пассаждан өту арқылы адам үшін вируленттілігін толығымен жоғалтқан.

Трансфекциялық материал Vero жасуша культурасы бар 6 шұңқырлы планшеттерге себілді. Трансфекциядан кейін бір күннен кейін Vero жасушаларында вирустың айқын цитопатиялық әсері (ЦПӘ) байқалған жоқ. Екі штамм үшін де Vero жасуша культурасында ЦПӘ дамуының алғашқы белгілері трансфекциядан кейін 36 сағаттан кейін байқалды. 48 сағаттан кейін екі рекомбинантты штамдар жағдайында да вирустық ЦПӘ дамуына байланысты жасуша моноқабаты толығымен жойылды (сурет 19). Культуралы сұйықтық үлгілерінде рекомбинантты вирустардың болуы гемагглютинация реакциясында (ГАР) расталды.



А - Рекомбинантты штамм A/Ast/PR8-NS124-TB10.4; Ә - Рекомбинантты штамм A/Ast/PR8-NS124-ESAT6.

Сурет 19 - Трансфекциядан кейін Vero жасуша культурасында рекомбинантты вирустық штаммдардың ЦПӘ дамуы

Трансфекциядан кейін Vero жасуша культурасында вирустық ЦПӨ дамуы 36 сағат ішінде байқалды, бұл трансфекцияның жоғары тиімділігін және трансфекциядан кейінгі алғашқы екі күнде инфекциялық вирустың жиналуын көрсетеді.

Алынған екі рекомбинантты штаммдарды дамып келе жатқан тауық эмбрионының жүйесінде қалпына келтіру бірінші пассажда сәтті орындалды.

Әрі қарай, Vero жасуша культурасында және тауық эмбриондарында пассаждар жүргізілді.

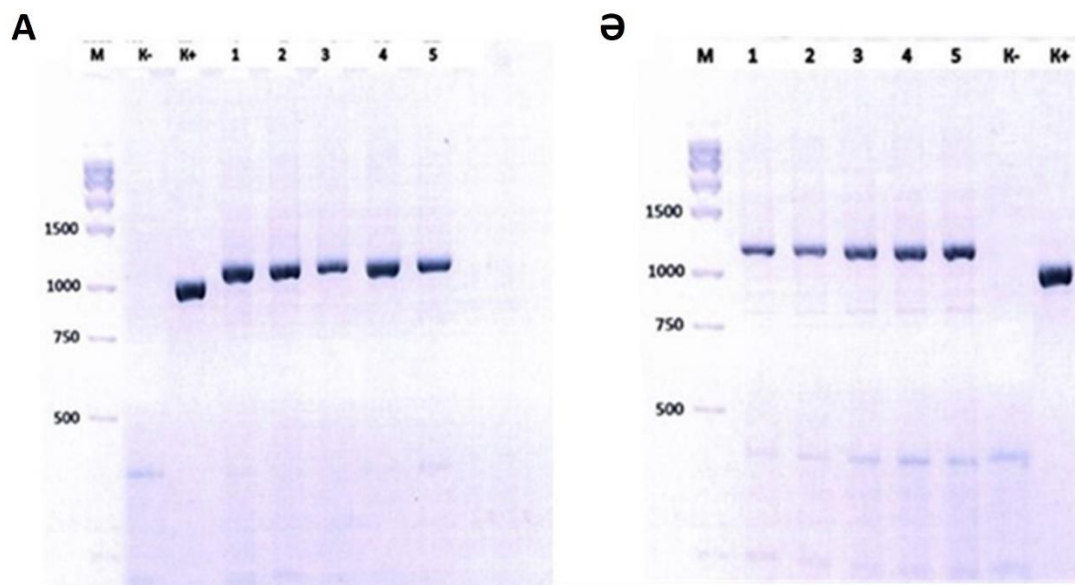
Микобактериялық антигендерді білдіретін рекомбинантты тұмау вирустары 5% көмірқышқыл газына қол жеткізе отырып, DMEM сарысусыз қоректік ортада $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ температурада Vero жасуша культурасында 5 пассажда өсірілді. Бұл өсіру параметрлері ірі қара туберкулезіне қарсы векторлық вакцинаны одан әрі дайындау үшін $7,50-7,75\pm 0,08 \lg \text{TCID}_{50}/\text{мл}$ белсенділігі бар вирустық биомасса алуға мүмкіндік берді.

Біздің зерттеулерімізде ірі қара туберкулезіне қарсы векторлық вакцина нұсқасының ерекшелігі және оның басқа вакциналардан түбегейлі айырмашылығы жасуша культурасының орнына тауық эмбриондарын өндіруші ретінде пайдалану болып табылады. Тауық эмбриондарының қолжетімділігін және олардың бағасын ескере отырып, бұл вакцина өндіру үшін экономикалық тұрғыдан қолайлы және сөзсіз тиімді.

Тауық эмбрионында өсіру үшін Vero жасуша культурасында алынған және гемагглютинация реакциясында оң нәтиже берген 5-ші пассаждың вирустық материалы алынды. Инфекциялық белсенділігі жоғары вирустық массаны алу үшін құс тұмауының А типінен таза Қазақстан Республикасының құс фабрикаларында алынған 10, 11, 12 күндік тауық эмбриондарында рекомбинантты штаммды өсіру температурасы мен шарттары оңтайландырылды. Нәтижесінде тауық эмбриондарында өсіру мына жағдайларда оңтайлы: тәуліктік 10-11 жас аралығындағы, инкубация температурасы $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, қоршаған ортадағы салыстырмалы ылғалдылық $60\pm 0,5\%$. Нәтижесінде ірі қара мал туберкулезіне қарсы векторлық вакцинаны өндіру үшін шамамен $8,00-9,20 \lg \text{EID}_{50}/\text{мл}$ инфекциялық белсенділігі бар вирустық суспензия алынды. Аллантоис сұйығының үлгілерінде рекомбинантты вирустардың болуы ГАР арқылы расталды. Сонымен қатар, микобактериялық NS генінің генетикалық тұрақтылығы әрбір пассаждан кейін КТ-ПТР арқылы бағаланды.

3.1.4 Рекомбинантты тұмау вирусының NS генінің КТ-ПТР арқылы талдау

NS геніндегі микобактерияларды енгізудің генетикалық тұрақтылығы тауық эмбриондарындағы әрбір пассаждан кейін КТ-ПТР арқылы бағаланды. Зерттелетін үзінділердің NS гені жабайы құс тұмауы вирусының NS генімен салыстырылды. КТ-ПТР нәтижелері бойынша микобактерия ақуыздарының кірістірулері бар NS ген сегментінің ұзындығы ұлғайып, ТВ10.4 үлгісі үшін 1170 bp және ESAT-6 үлгісі үшін 1175 bp құрайтыны расталды (сурет 20).



А) TB10.4 үлгілері (1-5 жолақтар); Ә) Esat-6 үлгілері (1-5 жолақтар); М – молекулалық маркердің; К- теріс бақылау (ионсыздандырылған су); К+ - оң бақылау (жабайы NS)

Сурет 20 - NS ген сегментінің электрофореграммасы.

20-суретте көрсетілгендей, NS генінің сегментінде TB10.4 және Esat-6 микобактериялық ақуыздарының кірістірілуі бар екендігі анықталды, ол зерттелген бес пассажда сақталады.

3.1.5 Туберкулез ақуыздарының экспрессиясын растау. Рекомбинантты вирустардың РНҚ сегменттерін секвенирлеу

Жалпы РНҚ микобактериялық гендердің жылдамдығына ие химерикалық NS гені бар тізбекті аймақтарға бесінші пассаждың аллантоикалық сұйықтығынан бөлініп алынды. Секвенирлеу автоматтандырылған 16-капиллярлы секвенсер Genetic Analyzer 3130 xl, Applied Biosystems құрылғысында Сэнгер әдісімен (тоқтатушы дидеоксинуклеотидтерді қолдану арқылы дидеоксиді секвенирлеу) орындалды (Қосымша А).

Genbank деректер қорымен молекулалық-генетикалық және салыстырмалы талдаулар жүргізу үшін NS+кірістіру ген сегменттерінің нуклеотидтер тізбегі талданды. Нәтижелер нуклеотидтер тізбегінің дұрыстығын анықтауға мүмкіндік береді және анықтамалық тізбектерден айырмашылықты көрсете отырып, мақсатты ақуыздар тізбегіне сәйкес келеді.

3.2 Перспективалы вакцина нұсқасын анықтау үшін модельдік зертханалық жануарларда тұмау векторларының қауіпсіздігін, иммуногенділігін және қорғаныштығын алдын ала бағалау

Туберкулезге қарсы вакцинаның неғұрлым перспективалы вакцина кандидаттарының оңтайлы құрамын анықтау, енгізу жолын және дозасын таңдау, сондай-ақ оның эксперименттік жануарлардың ағзасына зиянды

әсерінің сипаты мен ауырлығын анықтау және оның қауіпсіздігін, иммуногенділігін және құрастырылған тұмау векторларының протективтілігін бағалау мақсатында модельдік зертханалық жануарларда ақ тышқандар мен теңіз шошқаларында зерттеулер жүргізілді. Осы мақсатқа жету үшін рандомизация әдісімен ақ тышқандар мен теңіз шошқаларынан эксперименттік топтар құрылды.

3.2.1 Тұмау векторларының қауіпсіздігін ақ тышқандарда бағалау

Жануарлар тәжірибе басталғанға дейін 15 күн карантинде ұсталды. Эксперимент басталғанға дейін микобактериялармен сенсбилизацияланған жануарларды тәжірибеден шығару үшін тері ішілік туберкулин сынамамен аллергиялық зерттеу жүргізілді.

Құрастырылған тұмау векторларының қауіпсіздігі 8-кестеде келтірілген схемаға сәйкес ақ тышқандарға (n = 10) бір рет егу арқылы тексерілді. Зерттеу барысында жануарлардың жалпы жағдайы тіркелді: тамақ пен суды тұтыну, тері және шырышты қабаттардың күйі, мінез-құлық реакциялары, қозғалыс белсенділігі және ақ тышқандардың дене салмағының динамикасы бақыланды.

Кесте 8 - Ақ тышқандар үшін құрылған тәжірибелік топтарға сипаттама

№	Зерттелетін препараттың атауы	Енгізу әдісі	Доза/мл
1	M. bovis штаммының иммунодоминантты Esat-6 ақуызын экспрессиялайтын тұмау векторы	тері астына	1,0 мл
2	M. bovis штаммының иммунодоминантты TB10. 4 ақуызын экспрессиялайтын тұмау векторы	тері астына	1,0 мл
3	M. bovis штаммының иммунодоминантты Esat-6 ақуызын экспрессиялайтын тұмау векторы + Montanide gel адьюванты	тері астына	1,0 мл
4	M. bovis штаммының иммунодоминантты TB10.4 ақуызын экспрессиялайтын тұмау векторы + Montanide gel адьюванты	тері астына	1,0 мл
5	M. bovis штаммының иммунодоминантты TB10.4 және Esat-6 ақуызын экспрессиялайтын тұмау векторы + Montanide gel адьюванты	тері астына	1,0 мл
6	M. bovis штаммының иммунодоминантты TB10.4 және Esat-6 ақуызын экспрессиялайтын тұмау векторы + Montanide gel адьюванты	тері астына	1,5 мл
7	M. bovis штаммының иммунодоминантты TB10.4 және Esat-6 ақуызын экспрессиялайтын тұмау векторы + Montanide gel адьюванты	тері астына	1,0 мл
8	M. bovis штаммының иммунодоминантты TB10.4 және Esat-6 ақуызын экспрессиялайтын тұмау векторы + Montanide gel адьюванты	интраназальды	0,5 мл
9	Физиологиялық ерітінді	интраназальды	0,5 мл
10	Физиологиялық ерітінді + Montanide Gel	интраназальды	0,5 мл

Бұл жұмысты ақ тышқандардың моделі ретінде таңдау әдеби көздердегі бұл жануарлардың адам туберкулезіне қарсы вакцина препараттарын зерттеу кезінде жиі кездесетіндігіне байланысты.

Тұмау векторларының қауіпсіздігін ақ тышқандардың бірінші иммунизациядан кейінгі жалпы жағдайы бойынша анықтау нәтижесінде ақ тышқандардың 10 күндік жалпы жағдайы қалыпты болды (кесте 9). Бақылау кезінде тышқандардың өлімі тіркелмеді.

Кесте 9 – 10 күн ішінде ақ тышқандардың дене салмағының динамикасын бақылау нәтижелері

Жан-р топтарының №	Бақылау күндері										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	1	20,1	20,0	20,2	20,5	20,5	20,8	20,9	21,1	21,3	21,5
	2	21,1	21,1	21,2	22,5	22,7	23,1	23,5	23,7	23,9	24,0
	3	21,2	21,0	21,3	21,4	21,6	22,0	22,3	22,6	22,8	23,0
	4	19,8	19,9	20,1	24,4	24,5	24,9	25,2	25,4	25,6	25,9
	5	20,8	20,5	20,4	21,9	22,3	22,7	23,0	23,4	23,6	23,8
2	1	20,3	20,0	20,2	22,3	22,6	22,9	23,3	23,6	23,9	24,3
	2	20,9	20,7	20,8	21,2	21,6	21,9	22,4	22,6	22,9	23,2
	3	20,6	20,8	20,8	23,0	23,4	23,7	24,5	24,8	25,0	25,3
	4	21,7	21,5	21,7	22,1	22,3	22,5	23,2	23,5	23,7	23,9
	5	21,1	21,0	21,2	23,6	23,8	24,4	25,1	25,3	25,6	25,9
3	1	21,2	20,9	21,1	21,4	21,8	22,2	23,0	23,4	23,6	23,8
	2	20,4	20,2	20,3	22,7	23,1	23,5	24,0	24,3	24,8	25,2
	3	21,3	21,4	21,4	21,5	22,0	22,4	22,7	23,0	23,4	23,6
	4	22,0	22,1	22,4	22,3	22,6	22,9	23,3	23,6	23,9	24,3
	5	20,9	20,5	20,8	21,2	21,6	21,9	22,4	22,6	22,9	23,2
4	1	20,3	20,0	20,5	20,8	20,9	21,1	21,3	21,5	21,8	21,8
	2	22,1	22,1	22,7	23,1	23,5	23,7	23,9	24,0	24,3	24,5
	3	21,4	21,4	21,6	22,0	22,3	22,6	22,8	23,0	23,3	23,5
	4	24,1	24,3	24,5	24,9	25,2	25,4	25,6	25,9	26,2	26,5
	5	21,8	21,9	22,3	22,7	23,0	23,4	23,6	23,8	24,1	24,3
5	1	22,0	21,8	22,4	22,9	23,3	23,6	23,9	24,3	24,7	25,0
	2	20,9	21,0	21,6	21,9	22,4	22,6	22,9	23,2	23,5	23,7
	3	22,6	22,6	23,0	23,7	24,5	24,8	25,0	25,3	25,5	25,8
	4	21,7	22,1	22,3	22,5	23,2	23,5	23,7	23,9	24,1	24,3
	5	23,1	23,6	23,8	24,4	25,1	25,3	25,6	25,9	26,2	26,6
6	1	21,2	21,0	21,1	21,2	22,0	22,4	22,6	22,8	23,0	23,4
	2	22,4	22,7	23,1	23,5	24,0	24,3	24,8	25,2	25,4	25,9
	3	21,3	21,5	22,0	22,4	22,7	23,0	23,4	23,6	23,8	24,1
	4	20,7	20,8	21,2	21,7	22,5	22,7	22,9	23,0	23,3	23,5
	5	20,5	20,6	20,9	21,4	22,0	22,3	22,5	22,9	23,0	23,3
7	1	21,1	21,4	21,8	22,4	22,9	23,0	23,2	23,5	23,9	24,0
	2	21,6	21,5	21,4	21,8	22,3	22,5	23,2	24,0	24,2	24,6
	3	23,1	23,3	23,7	24,0	24,2	24,6	24,9	25,1	25,4	25,9
	4	21,4	21,6	21,9	22,6	23,1	23,5	23,9	24,0	24,3	24,7
	5	21,1	21,3	21,8	22,3	22,6	22,9	23,0	23,2	23,6	23,9

9-кесте жалғасы

8	1	21,2	21,0	21,2	21,1	21,5	21,9	22,0	22,2	23,1	24,0
	2	20,8	20,9	21,3	21,9	22,5	22,9	23,0	23,2	23,7	24,0
	3	22,3	22,5	22,8	23,4	24,0	24,2	24,6	25,0	25,1	25,3
	4	21,7	21,0	21,4	22,0	23,1	23,5	23,9	24,1	24,5	24,9
	5	22,3	22,5	22,9	23,5	24,4	24,9	25,0	25,3	25,9	26,0
9	1	24,1	24,5	24,7	25,0	25,5	25,9	26,1	26,3	26,7	27,1
	2	23,4	23,6	23,8	24,2	24,8	25,1	25,4	25,9	26,1	26,5
	3	22,6	22,8	23,0	23,5	23,9	24,2	24,4	24,9	25,1	25,3
	4	23,2	23,5	23,5	23,9	24,3	24,4	24,6	24,8	24,9	25,2
	5	22,6	22,8	23,1	23,7	24,1	24,9	25,1	25,5	25,9	26,0

Зертханалық ақ тышқандарда тұмау векторларының қауіпсіздігін зерттеу нәтижелері бойынша бақылау кезеңінде барлық жануарлар тірі қалды және олардың ешқайсысында аурудың көрінетін белгілері байқалмады, әр тышқанның тәжірибе соңындағы деенсінің массасы бастапқыға салыстырғанда азайған жоқ, дене салмағының өсуі байқалады.

Осылайша, зерттелген тұмау векторлары ақ тышқандар үшін қауіпсіз болып табылады, сондықтан *M. bovis*-8 туберкулезіне сезімтал жануарлардың иммуногенділігі мен қорғаныш қасиеттерін зерттеу үшін әрі қарай зерттеулерге негіз бола алады (гвинея шошқалары және ірі қара).

3.2.2. Тұмау векторларының қауіпсіздігін теңіз шошқаларында бағалау

Жануарлар тәжірибе басталғанға дейін 15 күн карантинде ұсталды. Эксперимент басталғанға дейін микобактериялармен сенсбилизацияланған жануарларды тәжірибедег шығару үшін тері ішілік туберкулин сынамамен аллергиялық зерттеу жүргізілді.

Бұл жұмыс үшін үлгі жануарлар ретінде теңіз шошқаларының таңдалуы бұл жануарлардың адам және сиыр түрлерінің туберкулез микобактериясын жұқтыруға ең сезімтал болуына байланысты. Инфекциялық процесс тез дамиды және осы инфекцияға тән органдардағы айқын өзгерістердің көрінісімен сипатталады.

Зерттелетін вакцина үлгілерінің қауіпсіздігін бағалау үшін теңіз шошқалары 10-кестеде көрсетілген схемаға сәйкес бір рет вакцинацияланды (сурет 22). Зерттеу барысында жануарлардың жалпы жағдайы тіркеліп: жем мен суды тұтыну, тері мен шырышты қабаттардың жағдайы, мінез-құлық реакциялары, теңіз шошқаларының белсенділігі мен дене салмағының динамикасы бақыланды.

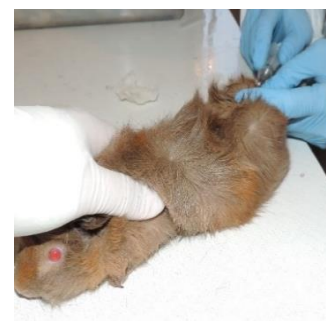
Кесте 10 - Теңіз шошқалары үшін құрылған тәжірибелік топтардың сипаттамасы

№	Зерттелетін препараттың атауы	Енгізу әдісі	Доза/мл
1	<i>M. bovis</i> штаммының иммунодоминантты Esat-6 ақуызын экспрессиялайтын тұмау векторы	тері астына	1,0 мл

10-кесте жалғасы

2	M. bovis штаммының иммунодоминантты ТВ10.4 ақуызын экспрессиялайтын тұмау векторы	тері астына	1,0 мл
3	M. bovis штаммының иммунодоминантты Esat-6 ақуызын экспрессиялайтын тұмау векторы + Montanide gel адьюванты	тері астына	1,0 мл
4	M. bovis штаммының иммунодоминантты ТВ10.4 ақуызын экспрессиялайтын тұмау векторы + Montanide gel адьюванты	тері астына	1,0 мл
5	M. bovis штаммының иммунодоминантты ТВ10.4 және Esat-6 ақуызын экспрессиялайтын тұмау векторы + Montanide gel адьюванты	тері астына	1,0 мл
6	M. bovis штаммының иммунодоминантты ТВ10.4 және Esat-6 ақуызын экспрессиялайтын тұмау векторы + Montanide gel адьюванты	тері астына	1,5 мл
7	M. bovis штаммының иммунодоминантты ТВ10.4 және Esat-6 ақуызын экспрессиялайтын тұмау векторы + Montanide gel адьюванты	тері астына	1,0 мл
8	M. bovis штаммының иммунодоминантты ТВ10.4 және Esat-6 ақуызын экспрессиялайтын тұмау векторы + Montanide gel адьюванты	интраназальды	0,5 мл
-9	Физиологиялық ерітінді	интраназальды	0,5 мл
10	Физиологиялық ерітінді + Montanide Gel	интраназальды	0,5 мл

ІҚМ туберкулезіне қарсы векторлық вакцинаны қолданудың оңтайлы әдісін таңдау мақсатында барлық теңіз шошқаларына сыналатын материалдың үлгілері тері астына және мұрын ішіне енгізілді (сурет 21).



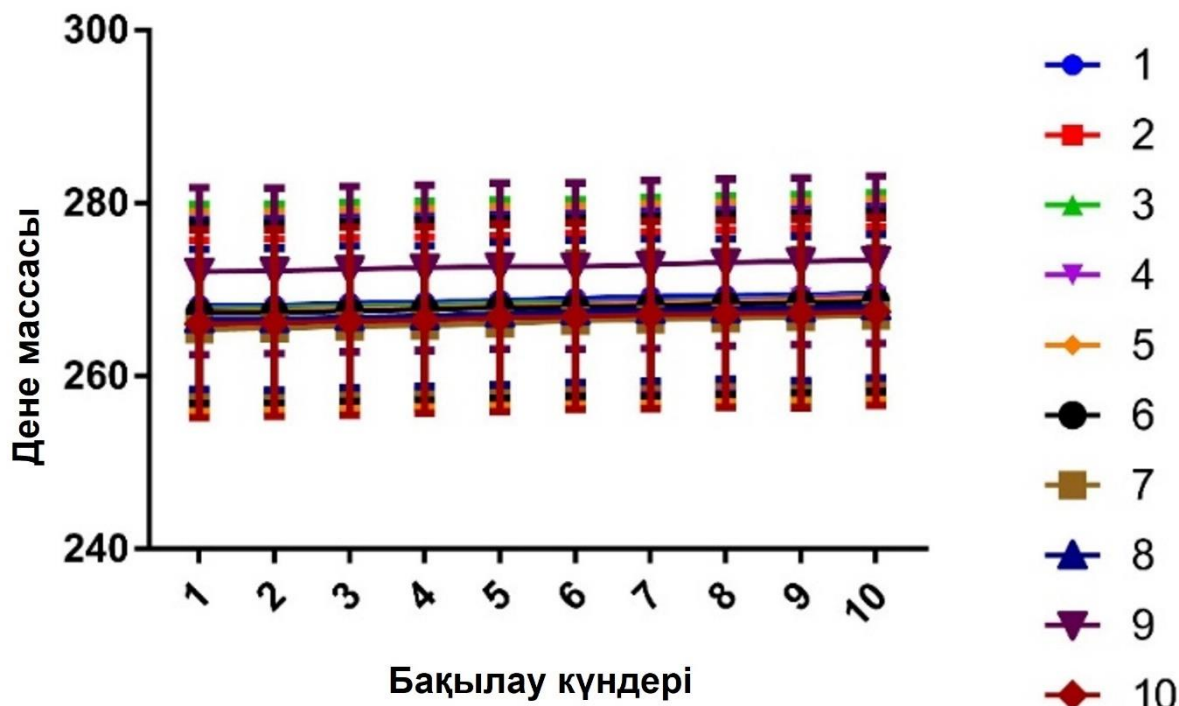
Тері астына вакцина үлгілерін енгізу



Вакцина үлгілерін мұрын интраназальды енгізу

Сурет 21 – Теңіз шошқаларында вакцина нұсқаларының қауіпсіздігін бағалау

Нәтижесінде жасалған тұмау тасымалдаушыларының қауіпсіздігі теңіз шошқаларының бірінші иммунизациядан кейінгі жалпы жағдайымен анықталды, мұнда тірі қалу, ауру, 10 күн бойы тірі салмақтың төмендеуі және теңіз шошқаларының 10 күндегі жалпы жағдайы анықталды және нәтижесі қалыпты болды (сурет 22).



Сурет 22 – 10 күн бойы теңіз шошқаларының дене салмағының динамикасын бақылау нәтижелері

23-суреттегі мәліметтерден тәжірибе тобындағы теңіз шошқаларының дене салмағының динамикасы бақылау тобындағы ұқсас көрсеткіштерден ерекшеленбеді, барлық жануарларда дене салмағының жоғарылауы байқалды. 10 күн бақылау кезінде жануарлардың өлуі тіркелмеді, тәжірибедегі жануарлар бақылау кезеңінде клиникалық сау және тірі қалды. Теріні және көзге көрінетін шырышты қабаттарды тексергенде өзгерістер анықталмады. Көзден, мұрын патологиялық бөліністер байқалмады. Тәжірибелік жануарларда бұлшықет тонусы орташа болды. Жануарлардың қозғалғыштығы стандартты, физиологиялық нормадан ауытқуы болмады.

3.2.3 Тұмау векторларының теңіз шошқаларында қорғаныс тиімділігін бағалау арқылы иммуногенділігін зерттеу

Иммунизацияланған теңіз шошқаларының иммундық статусын анықтау

Зерттелетін вакцина үлгілерінің иммуногенділігін бағалау үшін теңіз шошқаларына 10-кестеде келтірілген схемаға сәйкес 21 күндік аралықпен екі рет вакцина егілді.

Тәжірибе басталғанға дейін микобактериялармен сенсбилизацияланған жануарларды эксперименттен шығару үшін тері ішілік туберкулин сынамамен аллергиялық зерттеу жүргізілді.

Вакцина үлгілерімен иммунизацияланған теңіз шошқаларының иммундық жағдайын анықтау үшін әрбір вакцинациядан кейін 14 және 21-ші күндері қан үлгілері алынды. Қан үлгілері келесі көрсеткіштер бойынша иммундық жағдайды зерттеу үшін Алматы қаласының «ImmunoTest» клиникалық диагностикалық зертханасына жеткізілді: иммуноглобулиндер: IgM, IgG, IgA, IgE; лимфоциттердің субпопуляциялары: лимфоциттер - CD3, көмекшілер - CD4, цитотоксикалық Т-лимфоциттер CD8; және жалпы қан жасушалары: лейкоциттер, жолақты нейтрофилдер және сегменттелген моноциттер, эозинофилдер. Көрсеткіштерді анықтау нәтижелері төмендегі кестелерде берілген.

Кесте 11 - Бір реттік вакцинациядан кейін теңіз шошқаларының иммуноглобулиндерінің деңгейін анықтау

Жан-р тобы №	Қан алу күндері							
	14 күннен кейін				21 күннен кейін			
	IgM	IgG	IgA	IgE	IgM	IgG	IgA	IgE
1	0,53	1	0,7	13,2	0,63	1	0,7	13,5
2	0,44	0,61	0,5	15,6	0,54	0,66	0,5	15,7
3	0,35	0,37	0,35	18	0,38	0,38	0,35	17
4	0,43	0,5	0,31	16,9	0,47	0,5	0,31	16,9
5	0,58	0,6	0,53	17	0,60	0,7	0,53	18
6	0,3	0,59	0,3	14,1	0,4	0,59	0,3	14,3
7	0,55	0,7	0,52	17	0,48	0,8	0,56	15
8	0,24	0,4	0,4	17	0,26	0,6	0,4	17
9	0,22	0,35	0,41	14,5	0,27	0,36	0,45	14,6
10	0,3	0,2	0,4	20	0,3	0,2	0,4	20

Кесте 12 - Бір реттік вакцинациядан кейін зерттеудің 14-ші күні вакцинацияланған теңіз шошқаларында лимфоциттердің субпопуляциясы мен жалпы қан жасушаларының деңгейін анықтау (жалпы саны)

Жан-р тобы №	Лимфоциттердің субпопуляцияларының және жалпы қан жасушаларының жалпы саны											
	лейкоциттер	нейтрофилдер	моноциттер	эозинофилдер	лимф. (%)	лимф. Абс	CD3 салыст.	CD3 абс.	CD4 салыст.	CD4 абс.	CD8 салыст.	CD8 абс.
1	7,1	16	2	2	80	5,68	48	2,73	29	1,65	21	1,19
2	8	60	9	1	30	2,4	55	1,32	27	0,65	28	0,67
3	7,5	24	7	1	46	0,83	50	2,45	26	1,5	19	1,06
4	7,7	24	2	2	72	5,54	59	3,27	27	2,22	21	1,16

12-кесте жалғасы

5	8,2	27	8	2	69	5,58	44	3,58	40	1,34	25	1,29
6	5,1	17	5	3	77	3,93	28	1,1	19	0,75	10	0,39
7	7,1	37	8	9	68	5,17	27	0,73	39	1,49	19	1,24
8	5,9	34	7	5	54	2,71	32	3,23	16	0,61	17	0,65
9	5,8	54	7	2	37	2,15	30	0,65	20	0,43	9	0,19
10	4,7	17	4	2	77	3,62	28	1,01	19	0,69	11	0,4

Кесте 13 - Бір реттік вакцинациядан кейін зерттеудің 21-ші күні вакцинацияланған теңіз шошқаларында лимфоциттердің субпопуляциясы мен жалпы қан жасушаларының деңгейін анықтау (жалпы саны)

Жан-р тобы №	Лимфоциттердің субпопуляцияларының және жалпы қан жасушаларының жалпы саны											
	лейкоциттер	нейтрофилдер	моноциттер	эозинофилдер	лимф. (%)	лимф. Абс	СД3 салыст.	СД3 абс.	СД4 салыст.	СД4 абс.	СД8 салыст.	СД8 абс.
1	7,0	15	2	2	79	5,68	47	2,72	28	1,64	21	1,19
2	7,9	27	8	2	30	2,4	55	1,32	27	0,65	28	0,66
3	7,5	24	7	2	68	2,72	43	0,73	27	1,4	19	1,06
4	7,6	23	2	2	72	5,54	59	3,27	40	2,22	21	1,16
5	8,0	60	7	2	69	5,18	50	2,58	26	1,34	25	1,29
6	5,1	17	5	3	75	3,93	28	1,1	18	0,73	10	0,38
7	7,1	36	8	8	46	5,56	27	2,44	18	0,49	9	0,23
8	5,8	34	7	5	53	0,83	31	1,23	16	0,60	17	0,65
9	5,7	54	7	2	37	2,15	30	0,64	20	0,42	9	0,19
10	4,6	17	5	2	77	3,62	28	1,01	19	0,69	11	0,3

Қан жасушаларының құрамының өзгеруі бойынша, тұмау векторларымен вакцинацияланған теңіз шошқаларында бақылау топтарымен салыстырғанда иммундық жауап тудырғанын және лимфоциттердің өндірісін арттырғанын анықтауға болады.

Кесте 14 – Ревакцинациядан кейін теңіз шошқаларының иммуноглобулиндерінің деңгейін анықтау

Жан-р тобы №	Қан алу күндері							
	14 күннен кейін				21 күннен кейін			
	IgM	IgG	IgA	IgE	IgM	IgG	IgA	IgE
1	0,93	1,96	0,77	17,6	0,91	1,95	0,76	17,6
2	0,58	0,71	0,53	18,8	0,58	0,72	0,53	18,7
3	0,39	0,7	0,58	18,8	0,38	0,6	0,55	18,2
4	0,32	0,58	0,41	18,9	0,32	0,58	0,41	18,9
5	0,64	0,48	0,45	18,2	0,65	0,48	0,46	18,3

14-кесте жалғасы

6	0,32	0,67	0,41	15,1	0,32	0,67	0,41	15,1
7	0,65	0,47	0,44	18,2	0,66	0,47	0,45	18,3
8	35	0,57	0,41	17,2	35	0,57	0,41	17,2
9	0,3	0,37	0,41	15,6	0,3	0,37	0,41	15,6
10	0,4	0,21	0,44	22,5	0,2	0,20	0,44	22,3

Кесте 15 - Бір реттік вакцинациядан кейін зерттеудің 14 тәулігіне вакцинацияланған теңіз шошқаларындағы лимфоциттер мен жалпы қан жасушаларының субпопуляция деңгейін анықтау (жалпы саны)

Жан-р тобы №	Лимфоциттердің субпопуляцияларының және жалпы қан жасушаларының жалпы саны											
	лейкоциттер	Нейтрофилдер	моноциттер	эозинофилдер	лимф. (%)	лимф. Абс	CD3 салыст.	CD3 абс.	CD4 салыст.	CD4 абс.	CD8 салыст.	CD8 абс.
1	7,4	44	5	1	50	3,7	13	0,48	5	0,19	10	0,37
2	4,9	31	3	2	63	0,08	27	0,83	16	0,49	10	0,31
3	7,3	23	2	1	74	5,4	10	0,54	4	0,22	6	0,32
4	5,8	31	2	1	64	3,71	12	0,45	5	0,19	9	0,33
5	7,2	19	2	2	76	5,47	10	0,55	3	0,16	8	0,44
6	7	21	5	4	69	4,53	16	0,77	12	0,54	4	0,18
7	7,2	40	2	2	55	3,96	13	0,51	5	0,24	7	0,28
8	7,6	23	5	1	69	5,24	20	1,05	13	0,68	8	0,42
9	7,3	33	3	2	61	4,45	15	0,67	6	0,27	9	0,4
10	14	27	7	13	52	7,28	23	1,67	10	0,73	15	1,09

Кесте 16 - Бір реттік вакцинациядан кейін зерттеудің 21-ші күні вакцинацияланған теңіз шошқаларында лимфоциттердің субпопуляциясы мен жалпы қан жасушаларының деңгейін анықтау (жалпы саны)

Жан-р тобы №	Лимфоциттердің субпопуляцияларының және жалпы қан жасушаларының жалпы саны											
	лейкоциттер	нейтрофилдер	моноциттер	эозинофилдер	лимф. (%)	лимф. Абс	CD3 салыст.	CD3 абс.	CD4 салыст.	CD4 абс.	CD8 салыст.	CD8 абс.
1	7,3	42	4	1	49	3,6	13	0,47	5	0,19	10	0,35
2	4,7	31	2	2	61	0,08	27	0,83	16	0,48	10	0,30
3	7,3	23	2	1	74	5,4	10	0,54	4	0,22	6	0,32
4	5,8	31	2	1	64	3,71	12	0,45	5	0,19	9	0,33
5	7,2	19	2	2	76	5,47	10	0,55	3	0,16	8	0,44

16-кесте жалғасы

6	7	21	5	4	67	4,53	15	0,77	12	0,53	4	0,18
7	7,2	40	2	2	55	3,96	13	0,51	5	0,24	7	0,28
8	7,6	23	5	1	68	5,23	20	1,05	13	0,68	8	0,22
9	6,0	33	3	2	61	4,44	15	0,67	6	0,18	9	0,4
10	14	27	7	13	52	7,28	23	1,67	10	0,73	15	1,09

Қан жасушаларының құрамының өзгеруі бойынша, тұмау векторларымен вакцинацияланған теңіз шошқаларында бақылау топтарымен салыстырғанда иммундық жауап тудырғанын және лимфоциттердің өндірісін арттырғанын анықтауға болады.

Қорғаныс тиімділігін бағалау

Теңіз шошқаларындағы қорғаныш тиімділігін бағалау 21 тәулік аралықпен зерттелетін үлгілерді екі рет иммундау арқылы жүргізілді, содан кейін зерттеудің 42 тәулігінде жануарлар 1×10^6 КОЕ/жануарлар мөлшерінде 1,0 мл физиологиялық ерітіндімен оң жақ шап аймағының терісінің астына 0078-*M. bovis*-8/RIBSP вирулентті штаммын енгізу арқылы жұқтырылды (сурет 5). Бақылау жұқтыруынан 30 күннен кейін барлық тәжірибедегі жануарлар эвтаназияланды және патоморфологиялық зерттеулер жүргізілді.

Эвтаназиядан кейін ішкі ағзалар оларда сыртқы түрі туберкулезге тән өзгерістердің бар-жоғына визуалды тексеру және өкпедегі, бауырдағы, көкбауырдағы, аймақтық және басқа лимфатүйіндеріндегі туберкулезді зақымданулардың санын есептеу арқылы зерттелді.

Осы тәжірибенің 30 күнінде алған деректеріміз 0078-*M. bovis*-8/RIBSP штаммын жұқтырған жануарларда бауыр мен өкпеде ұсақ туберкулаларды көрсетті. Басқа мүшелерде туберкулезге тән өзгерістер табылған жоқ. Осы тәжірибеден кейін морфологиялық және микробиологиялық зерттеулер үшін әр топтан 1 теңіз шошқасынан биоматериал алынды.

Аутопсиядан кейін әр жануардан шап лимфа түйіндері, бауыр, өкпе, бүйрек, көкбауыр үлгілері бактериологиялық зерттеу үшін алынды. Материал сынамаларын алу кезінде, сондай-ақ сынамаларды зерттеуге дайындау кезінде адамдардың жұқтыруын және қоршаған орта объектілерінің ластануын болдырмау шаралары қабылданды. Әр жануардан биоматериал алу кезінде бөлек құрал-жабдықтар қолданылды (сурет 23).



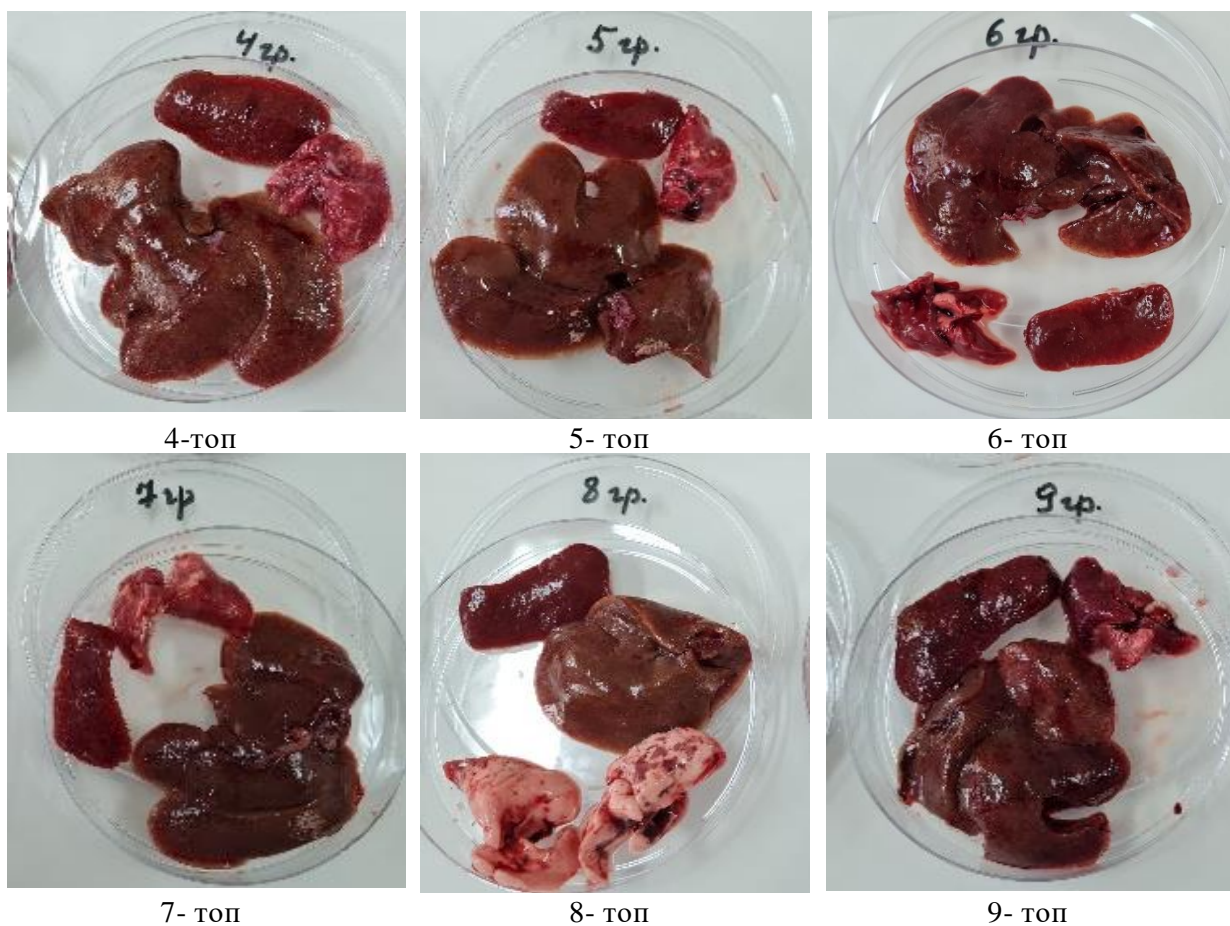
1-топ



2-топ



3-топ



Сурет 23 - Теңіз шошқаларының ішкі мүшелерін зерттеу

23-суреттен көрініп тұрғандай, 1, 2, 3, 4, 8 және 9 топтағы теңіз шошқаларының бауыры мен өкпесінде туберкулездің көптеген зақымдануы, сонымен қатар аймақтық лимфа түйіндерінің ірі бұршақ өлшеміне дейін ұлғаюы анықталды. 5, 6 және 7 тәжірибе тобы жануарларында патогенмен жұқтырғаннан кейін туберкулезге тән өзгерістер анықталмады.

0078-*M.bovis*-8/*RIBSP* вирулентті штаммымен жұқтырған бақылау 10-тобындағы жануарларда ішкі ағзалардағы көрінетін өзгерістер бауырда және кейіннен өкпеде уақыт өте келе зақымдану санының көбеюімен ұсақ туберкулаалармен сипатталды.

Сонымен, ауру теңіз шошқаларының ішкі мүшелерін патоморфологиялық зерттеуде 1, 2, 3, 4, 9 топтағы жануарлар мен басқа топтағы жануарлардың арасында айқын айырмашылықтар анықталды.

Микробиологиялық зерттеулер өкпенің, бауырдың, көкбауырдың, аймақтық және басқа лимфа түйіндерінің суспензиясын жұмыртқа қосылған тығыз Левенштейн-Йенсен қоректік ортасына егу және термостатта 37 °C температурада 2 ай бойы өсіру арқылы жүргізілді. Қоректік ортада өсірілген колонияларды санау арқылы нәтижелер жазылды (17-кесте).

Кесте 17 – Тәжірибе жануарларының мүшелерінің морфологиялық өзгерістері

Тәжірибе топтары	Жануар №	Инфекциядан кейінгі күндер	Өкпе	Бауыр	Көкбауыр	Орташа мәні
1 топ	1	30	10	12	12	34
	2	30	11	20	17	48
	3	30	27	31	25	83
2 топ	4	30	35	44	30	109
	5	30	47	50	30	127
	6	30	14	11	14	39
3 топ	7	30	13	14	17	44
	8	30	18	14	22	54
	9	30	17	11	21	49
4 топ	10	30	20	22	19	61
	11	30	21	3	23	47
	12	30	23	6	15	44
5 топ	13	30	–	7	20	51
	14	30	–	–	–	31
	15	30	–	–	–	29
6 топ	16	30	–	–	–	8
	17	30	–	–	–	7
	18	30	–	–	–	7
7 топ	19	30	–	–	–	3
	20	30	–	–	–	-
	21	30	–	–	–	28
8 топ	22	30	–	5	11	16
	23	30	–	4	9	13
	24	30	–	4	7	11
9 топ	25	30	49	29	42	120
	26	30	53	30	47	130
	27	30	54	31	51	136
10 топ	28	30	65	41	45	151
	29	30	69	56	60	185
	30	30	70	47	60	177

17-кестеде көрсетілгендей, биоматериалға микробиологиялық зерттеулер жүргізу кезінде алынған деректер инфекциядан кейін 30 күннен кейін жануарлардың барлық топтарында алғашқы колониялардың өсуі байқалды. 1, 2, 3, 4, 8, 9 және 10 топтағы тәжірибелік жануарлардың мүшелерінен алынған культураларда микобактериялардың колониялары табылды. Мүшелер ішінде өкпе мен бауыр ең көп ластанған.

Қорытындылай келе, микробиологиялық зерттеулердің нәтижелері жануарлар ағзаларын және иммундық жағдайын сыртқы тексеру деректерімен сәйкес келетінін және 5 және 7 топтағы теңіз шошқаларында туберкулезге қарсы вакцинаның қорғаныш тиімділігі бар екендігін атап өткен жөн.

Осылайша, теңіз шошқаларының қорғаныш тиімділігін бағалаумен иммуногенділігін анықтау бойынша зерттеулер кешенінің жоғарыда

келтірілген нәтижелерін қорытындылай келе, алдын ала ірі қара малға арналған туберкулезге қарсы вакцина үміткерлерінің үлгілері таңдалды:

- *M. bovis* штаммының иммунодоминантты TB10.4 және Esat-6 ақуызын экспрессиялайтын тұмау векторы + Montanide gel адьюванты, 5-топ (көлемі - 1,0 мл, енгізу әдісі - тері астына);

- *M. bovis* штаммының иммунодоминантты TB10.4 және Esat-6 ақуызын экспрессиялайтын тұмау векторы, 7-топ (көлемі - 1,0 мл, енгізу әдісі - тері астына).

Ірі қара малға арналған туберкулезге қарсы вакцина үміткерлерінің бұл үлгілері туберкулезге қарсы вакцинаға әлеуетті үміткер ретінде ірі қара малда *M.bovis*-8 туберкулезіне сезімтал жануарлардың біреуінің иммуногенділігі мен қорғаныш қасиеттерін зерттеу үшін әрі қарайғы зерттеулер үшін таңдау нұсқасы болып табылады.

3.3 Рекомбинантты тұмау векторы негізінде туберкулезге қарсы векторлық вакцина жасау технологиясын әзірлеу

Ірі қара мал туберкулезінің спецификалық профилактикасы мақсатында Биологиялық қауіпсіздік проблемалары ғылыми-зерттеу институтында кері генетика әдісін қолдану арқылы ESAT-6 және TB10.4 микобактериялық ақуыздарды экспрессиялайтын NS1 генінің ашық оқу шеңберінен рекомбинантты тұмау вирусының векторлары құрастырылды:

- FLU NS_ESAT-6;

- FLU NS_TV10.4;

- FLU NS_ESAT-6 - FLU NS_TV10.4.

Vero және MDCK жасуша культураларында және тауық эмбриондарында рекомбинантты векторларды өсіру шарттары оңтайландырылды.

Сарысусыз DMEM ортасын қолданып, Vero жасуша культурасында өсіргенде вирустардың максималды жинақталуы байқалатыны анықталды. Дегенмен, жасуша культурасын пайдалана отырып, векторлық вакциналарды өндіру жоғары еңбек сыйымдылығымен және төмен өндірілу қабілетімен сипатталады; вакцина өндірісінде тауық эмбриондарында өсірудің балама нұсқасы уақыт бойынша тексерілген дәстүрлі процесс; бұл өсіру жүйесінің артықшылықтарының бірі болып табылады. Оның да, бұл вакциналар өндірісін кеңейтуге мүмкіндік береді.

Дегенмен, жасуша культурасын пайдалана отырып, векторлық вакциналарды өндіру жоғары еңбек сыйымдылығымен және төмен өндірістік қабілеттілігімен сипатталады. Вакцина өндірісінде вирустарды өсірудің баламалы нұсқасы дәстүрлі, уақытпен тексерілген процесс болып табылатын тауық эмбриондары жүйесі болып табылады. Бұл жүйенің артықшылықтарының бірі - бұл вакцина өндірісін кеңейтуге мүмкіндік беретін бағасы бойынша да, қажетті уақытта қол жетімді жүйе.

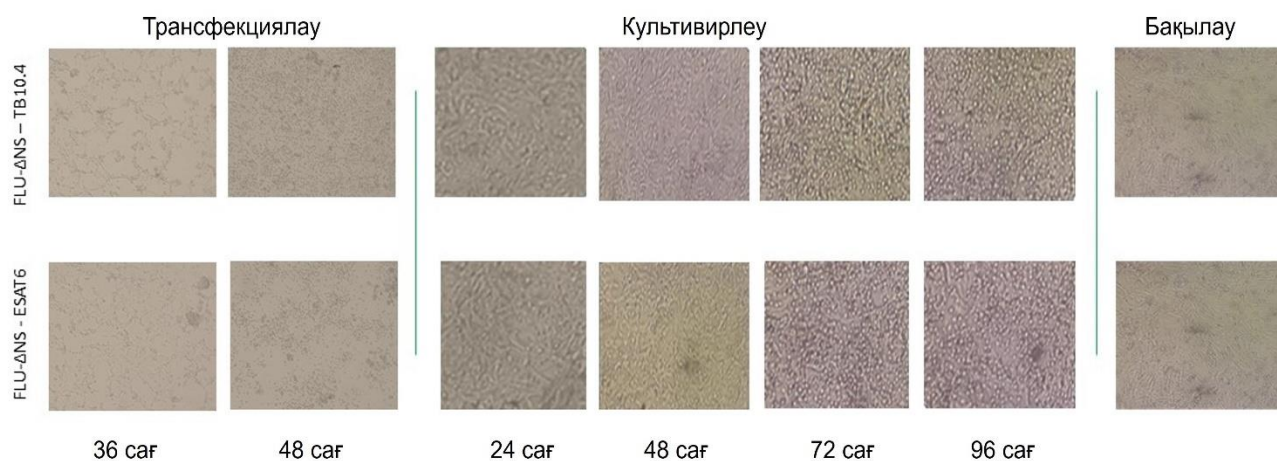
3.3.1 Тауық эмбриондарында микобактериялық антигендерді экспрессиялайтын тұмау векторларын өсірудің оңтайлы параметрлерін әзірлеу

Кері генетиканың гендік-инженерлік әдісімен NS1 қысқартылған ақуызды оқу шеңберінің бөлігі ретінде *M. bovis* туберкулез инфекциясының протективті антигендерін кодтайтын NS химерикалық геномдық фрагменті бар рекомбинантты FLU_ΔNS-ESAT6 және FLU_NS_TB10.4 (модификацияланған HA ыдырау орны бар 5:3 H5N1 реассортанттары) векторлары алынды. Тұмау вирусының гендері pHW2000 плазмидасына клондалған.

Трансфекциялық материалдың бір бөлігі жасуша культурасына себілді, екінші бөлігі тауық эмбриондарына жұқтырылды. Осы кезеңде алынған культура немесе аллантоис сұйықтығының материалында вирустық үлгілердің "нөлдік" пассажи болды.

Екі үлгі үшін де Vero жасуша культурасында ЦПӨ дамуының алғашқы белгілері трансфекциядан кейін 36 сағаттан кейін байқалды. 48 сағаттан кейін жасушалық моноқабат вирустық ЦПӨ дамуы салдарынан толығымен жойылды (сурет 24). Культуралық сұйықтық үлгілерінде рекомбинантты вирустардың болуы гемагглютинация (ГАР) реакциясында расталды.

Әрі қарай трансфекциядан кейін алынған вирустарды өсіру параметрлерін оңтайландыру жұмыстары жүргізілді. Жасуша культурасын вирус жұқтырғаннан кейін бір күн өткен соң, екі жасуша культурасында да айқын ЦПӨ вирусы байқалмады. Екеуі үшін де Vero жасуша культурасында ЦПӨ дамуының алғашқы белгілері культивирлеудің 48 сағатында байқалды. 72-96 сағаттан кейін екі рекомбинантты вектордағы Vero жасушалық моноқабаты вирустық ЦПӨ дамуына байланысты толығымен жойылды (сурет 24).



Сурет 24 - Vero жасуша культурасында рекомбинантты тұмау вирустарының ЦПӨ дамуы

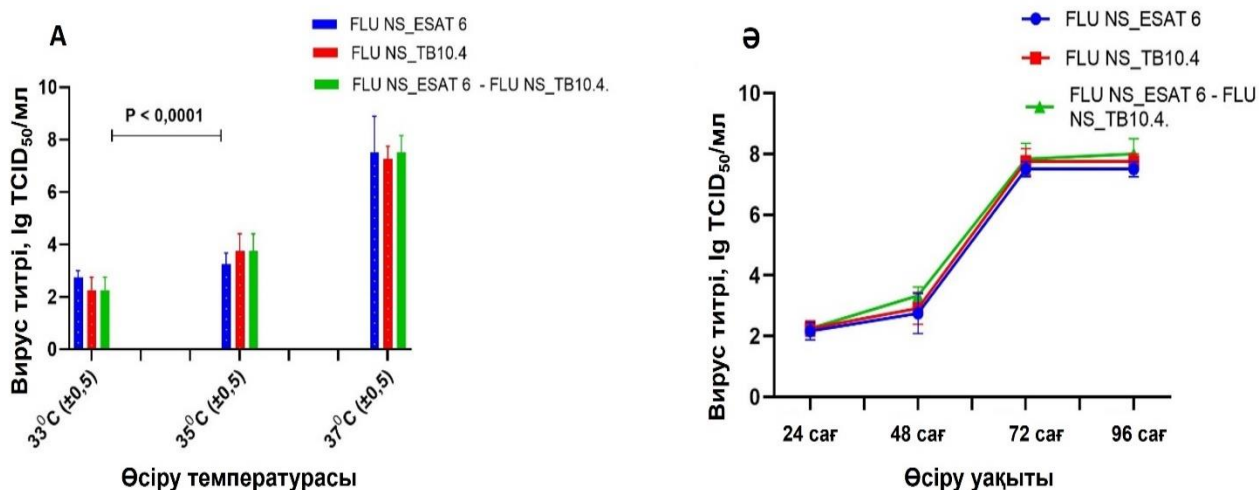
24-суретте көрініп тұрғандай, рекомбинантты штаммдар Vero жасуша культурасына бейімделген. Вирустың белсенділігі культуралды төсеніштерінде инкубациялаудан кейін 4 күн ішінде байқалды; жасуша моноқабатының толық жойылуы 5-ші күні тіркелді. Дегенмен, MDCK жасуша культурасындағы вирустың ЦПӨ өсіруден кейінгі 4 күн ішінде байқалмады.

Әрі қарай әр пассажда вирустың биологиялық белсенділігін анықтау үшін Vero және MDCK жасуша культурасында рекомбинантты векторлардың бірнеше пассажи жүргізілді және өсіруге арналған инкубацияның оңтайлы режимі әртүрлі температурада ($33\pm 0,5^\circ\text{C}$, $35\pm 0,5^\circ\text{C}$, $37\pm 0,5^\circ\text{C}$) зерттелді (сурет 26).

Осылайша, екі жасуша культурасында үш түрлі температура жағдайында ($33\pm 0,5^\circ\text{C}$, $35\pm 0,5^\circ\text{C}$, $37\pm 0,5^\circ\text{C}$) рекомбинантты векторларды өсіру нәтижесінде ЦПӨ $37\pm 0,5^\circ\text{C}$ Vero жасуша культурасында тіркелді. Ал MDCK культурасында вирустардың өсуі байқалмады, сонымен қатар әртүрлі температуралық жағдайларда ЦПӨ даму белгілерінсіз қалды.

Салыстырмалы сипаттамаларда рекомбинантты векторлардың жұқпалы белсенділігі барлық тексерілген температуралық жағдайларда байқалады, алайда, Vero жасуша культурасының бір қабатында зерттелетін үлгілерді өсіру үшін $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ ең оңтайлы температура болды, өйткені бұл температурада ең жоғары жұқпалы белсенділігінің көрсеткіші алынды, ол орта есеппен FLU NS_ESAT-6 үшін $7,50 \pm 0,08 \lg \text{TCID}_{50}/\text{мл}$, FLU NS_TB10.4 үшін - $7,75 \pm 0,08 \lg \text{TCID}_{50}/\text{мл}$ және FLU NS_ESAT-6 – FLU NS_TB_10.4. үшін - $7,85 \pm 0,09 \lg \text{TCID}_{50}/\text{мл}$ болды (сурет 25, а).

Әрі қарай, Vero жасуша культурасының моноқабатындағы микобактериялық антигендерді экспрессиялайтын рекомбинантты векторлар үшін оңтайлы инкубация уақыттарын анықтау үшін зерттеулер жүргізілді. 24, 48, 72 және 96 сағат бойы инкубациялау үшін жұқтырған Vero жасуша культурасына орнатылды. Ауаның салыстырмалы ылғалдылығы $55 \pm 5\%$ болды (сурет 25, ә).



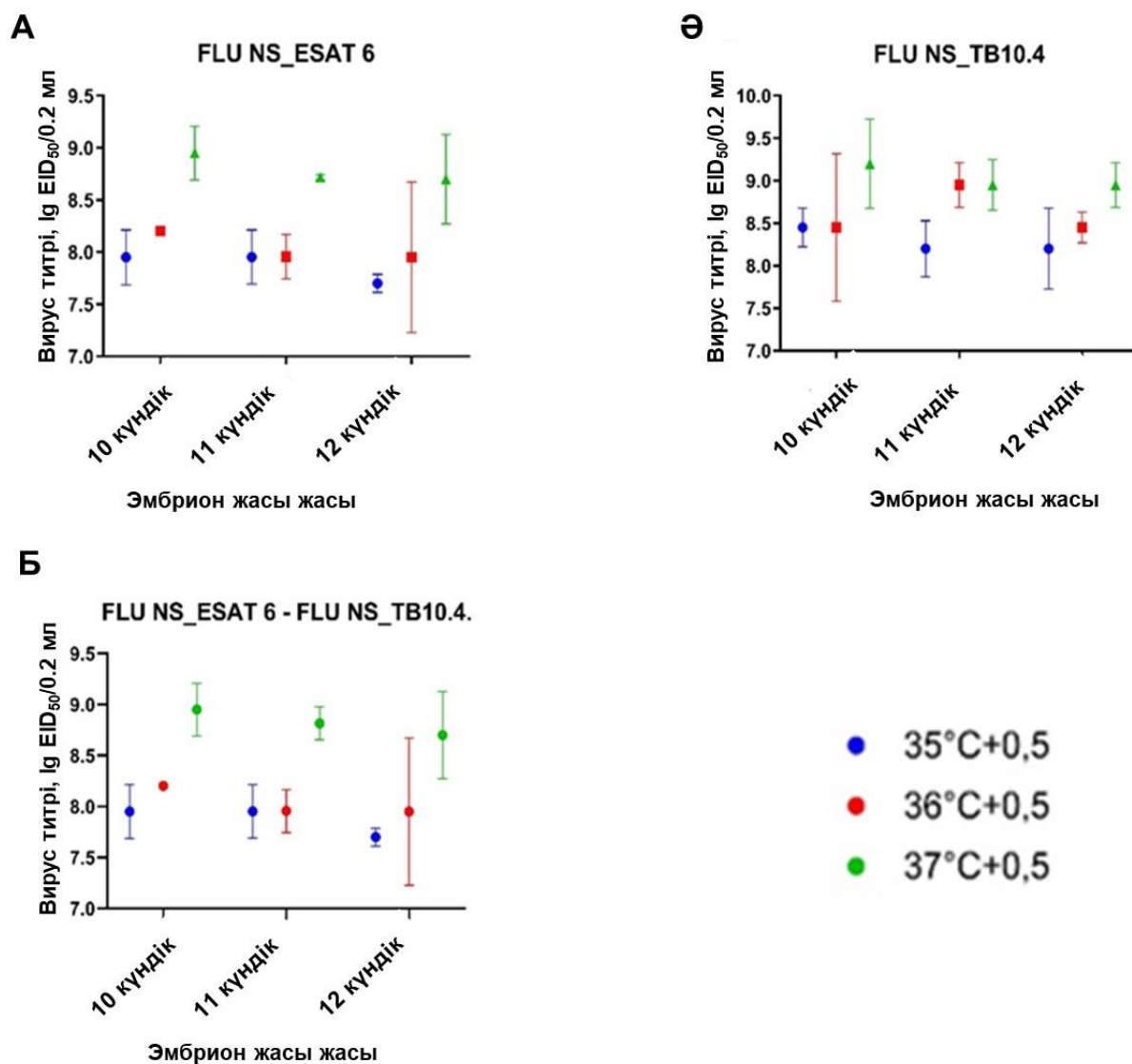
Сурет 25 - Vero жасуша культурасында рекомбинантты векторларды өсірудің биологиялық белсенділігі мен ұзақтығының салыстырмалы сипаттамасы және әртүрлі температурада ($35,0$, $36,0$ және $37,0\pm 0,5^\circ\text{C}$) оңтайлы өсіру жағдайларын таңдау

Vero жасуша культурасында өсіру ұзақтығының салыстырмалы сипаттамасын талдау ЦПӨ 48 сағаттан кейін пайда болып, 96 сағатқа

созылғанын көрсетті. Екі үлгі үшін де рекомбинантты векторлардың биологиялық белсенділігінің шыңы зерттеудің 72 сағатында жетті және 96 сағатқа созылды, мұнда FLU NS_ESAT-6 биологиялық белсенділігі $7,50 \pm 0,08$ lg TCID₅₀/мл, FLU NS_TB10.4 үшін $7,75 \pm 0,08$ lg TCID₅₀/мл және FLU NS_ESAT-6 үшін - FLU NS_TB10.4. – $8,00 \pm 0,00$ lg TCID₅₀/мл болды.

Осылайша, осы зерттеулердің нәтижелері Vero культурасындағы жасуша моноқабатының максималды зақымдануы сарысусыз қоректік орта DMEM көмегімен, бірдей қоректік ортамен үш рет шаю кезінде инкубациядан кейін 72 сағаттан кейін болады деген қорытынды жасауға мүмкіндік береді. Культуралды төсеніштер желдетілетін қақпақпен жабылған. Культура CO₂ инкубаторында ($37 \pm 0,5$) °C температурада 5% көмірқышқыл газымен инкубацияланды.

Тауық эмбриондары жүйесінде рекомбинантты векторларды өсіру шарттарын оңтайландыру үшін БҚПҒЗИ жағдайында эмбриондардың оңтайлы жасын анықтау қажет болды. Осының негізінде 10, 11 және 12 тәуліктік эмбриондарда кандидат вакцина векторлары үшін келесі вирус өсіру шарттары таңдалды. Бұл ретте инкубациялық температураның рекомбинантты векторлардың жинақталуына әсері анықталды. Жұқтырылған эмбриондар әртүрлі температурада (26, 34, 35, 36 және $37 \pm 0,5$ °C) инкубацияланды. Ауаның салыстырмалы ылғалдылығы $55 \pm 5\%$ құрады. 48 және 72 сағаттық инкубациялық жағдайлар да сыналған. Инкубация нәтижесінде гемагглютининдік белсенділігі бірдей (1:64) құрамында вирусы бар материалдар алынды. Сондықтан әрі қарай зерттеу үшін тұмау вирустарының инкубациялық уақыты 48 сағат бойы қолданылды (сурет 26).



А) FLU NS_ESAT-6; Ә) FLU NS_TB10.4; Б) FLU NS_ESAT-6 + FLU NS_TB10.4

Сурет 26 – Тауық эмбриондарында рекомбинантты векторлардың өсу сипаттамалары

26-суреттен көрініп тұрғандай, FLU NS_ESAT-6, FLU NS_TB10.4 және FLU NS_ESAT-6 - FLU NS_TB10.4 рекомбинантты векторлары эмбриондарға бейімделген. Инкубация кезінде жұқтырған эмбриондар өлмейді. Вирустың жинақталуының жоғары қарқыны 10 күндік эмбрион үшін 37+0,5°C инкубациялық температурада байқалады. FLU NS_ESAT-6 рекомбинантты векторы $8,95 \pm 0,07 \lg \text{EID}_{50}/0,2 \text{ мл}$ инфекциялық белсенділікпен 1:64 жоғары гемагглютинациялық белсенділікті көрсетті. FLU NS_TB10.4 рекомбинантты векторы үшін гемагглютинациялау белсенділігі де 1:64 болды, ал инфекциялық белсенділік $9,20 \pm 0,07 \lg \text{EID}_{50}/0,2 \text{ мл}$ болды. FLU NS_ESAT-6 - FLU NS_TB10.4 рекомбинантты векторы үшін гемагглютинациялау белсенділігі де 1:64 болды, ал инфекциялық белсенділік $8,7 \pm 0,4 \lg \text{EID}_{50}/0,2 \text{ мл}$ болды. 26 және 34±0,5°C температура жағдайында зерттеу нәтижелері теріс болды, іс жүзінде вирустың өсуі байқалмады.

Вирустың жинақталу деңгейі жұқтырушы дозаға байланысты анықталды. Зерттеулер біз таңдаған өсіру параметрлері бойынша жүргізілді: 10-күндік тауық эмбриондарында 37+0,5°C температурада және ауаның салыстырмалы ылғалдылығы 55±5%. Эмбриондар аллантаис қуысына 100, 1000, 10000, 50000 және 100000 EID₅₀ дозаларында жұқтырылды.

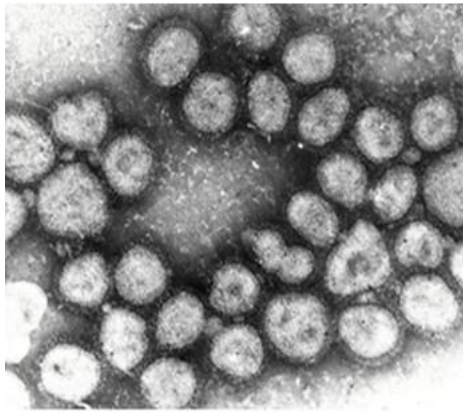
Нәтижесінде, жоғарыда сыналған барлық дозалар (өсірудің басқа параметрлеріне байланысты) жұқпалы да (7,70±0,07-ден 9,20±0,07 lg EID₅₀/мл дейін) және гемагглютинациялаушы (1:16-дан 1:64-ке дейін) белсенділігі бар вирустың жинақталуына ықпал етеді. Сонымен қатар, ең аз дозаларды қолдану (10 және 100 vs. ≥1000 EID₅₀, P мәні <0,0001-ден 0,01-ге дейін) басым түрде гемагглютинациялау белсенділігінің төмендеуіне және ал жоғары дозаларды (100000 vs ≤ 100000 EID₅₀, мәніне P <0,0001 ден 0,02 дейін) инфекциялық белсенділіктің төмен көрсеткіштеріне дейін әкелді. Осының негізінде 1000-10000 EID₅₀ дозалары эмбриондарды жұқтыру үшін оңтайлы дозасы ретінде таңдалды. Бұл дозаларда барлық тексерілген рекомбинантты векторларға қарсы инфекциялық белсенділіктің бірдей жоғары титрлерін қамтамасыз етіп қана қоймайды (штамдар арасындағы айырмашылық, P мәні >0,99-дан 0,13-ке дейін), сонымен қатар жоғары дозалардан кем түспейтін гемагглютинациялық белсенділік титрлері (P мәні 0,99-дан 0,24-ке дейін) жинақталады (кесте 18).

Кесте 18 – Вирустың инфекциялық дозаға байланысты жинақталу деңгейі (X ± m), n=3)

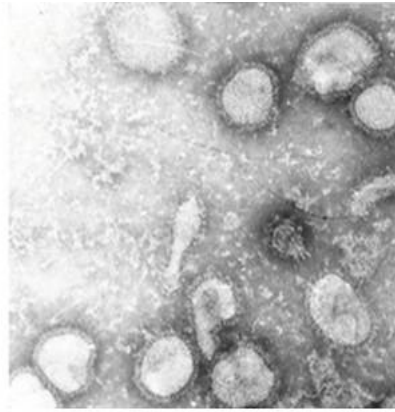
Эмбрионды жұқтыруға арналған доза, EID ₅₀	Белсенділік					
	Гемагглютинациялық			Инфекциялық lg EID ₅₀ /мл		
	FLU NS_ESAT-6	FLU NS_TB10.4	FLU NS_ESAT-6-FLU NS_TB10.4	FLU NS_ESAT-6	FLU NS_TB10.4	FLU NS_ESAT-6-FLU NS_TB10.4
~10	1:32	1:16	1:32	7,45 ± 0,14	8,95 ± 0,14	8,25 ± 0,10
~100	1:32	1:32	1:32	7,95 ± 0,08	9,45 ± 0,08	8,45 ± 0,00
~1000	1:64	1:32	1:64	8,45 ± 0,17	9,70 ± 0,17	9,50 ± 0,16
~10000	1:64	1:64	1:64	8,95 ± 0,24	9,70 ± 0,24	9,70 ± 0,20
~100000	1:64	1:64	1:64	8,45 ± 0,2	9,45 ± 0,2	9,75 ± 0,2
~1000000	1:64	1:64	1:32	8,20 ± 0,12	9,20 ± 0,12	9,70 ± 0,12

NS геніне микобактерия енгізудің генетикалық тұрақтылығы КТ-ПТР арқылы бағаланды. Зерттелетін рекомбинантты вектор үлгілерінің NS гені жабайы құс тұмауы вирусының NS генімен салыстырылды. КТ-ПТР нәтижелері бойынша микобактерия ақуыздарының кірістірулері бар NS ген сегментінің ұзындығы ұлғайып, TB10.4 үлгісі үшін 1170 bp, ал ESAT-6 үлгісі үшін 1175 bp құрайтыны расталды.

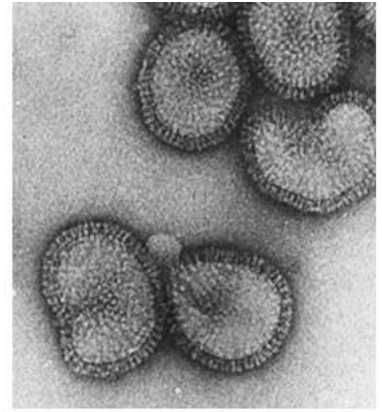
Рекомбинантты векторлардың үлгілері электронды микроскоптың көмегімен зерттелді (сурет 27).



FLU NS_TB10.4



FLU NS_ESAT 6



FLU NS_ESAT 6 –
FLU NS_TB10.4

Сурет 27 - Рекомбинантты векторлардың электронды микроскопиялық кескіні. Сурет JEM-100 CX-II JEOL (Жапония) трансмиссиялық электронды микроскопында 100 000 есе үлкейту кезінде түсірілген

Электрондық микроскопияның нәтижелері вирус құрастыру сәтті болғанын көрсетеді. Вириондардың пішіні сфералық, липидті қос қабаттан түзілген суперкапсидпен жабылған, оның ұзындығы шамамен 10 нм гликопротеинді ұштары бар, олар гемагглютинациялық белсенділікті анықтайды.

3.3.2 Тұмау векторларының бастапқы биомассасын және сапасын бақылау (стерилділік, инфекциялық және гемагглютинациялық белсенділік, микобактериялық кірістірудің болуы)

Суспензияны толық емес (ақаулы) вирустық бөлшектерден босату және жоғары сапалы, біртекті вирустық популяцияны алу үшін «материалдар мен әдістер» бөлімінде көрсетілген әдістемеге сәйкес шекті сұйылту әдісін қолдана отырып, тұмау векторлары эмбриондарда жаңартылды. Вирустық материалды (ВМ) жинау вирустың ең жоғары сұйылтуларымен жұқтырылған эмбриондардан бастап жүргізілді, бұл ГАР-да айқын агглютинация берді.

Жүргізілген жұмыс нәтижелері бойынша инфекциялық және гемагглютинациялық белсенділігі тиісінше $8,45 \pm 0,14$ - $8,86 \pm 0,08$ lg EID₅₀/мл және 1:128 - 1:256 титрлері бар стерильді ВМ (10^{-6} және 10^{-7} , 1 – ші пассаж деңгейіндегі вирустарды сұйылтудан) алынды.

Тәжірибелердің келесі сериясында рекомбинантты штаммдардың жинақталған вирустық материалдарын пайдалана отырып, олар екінші пассажен жүзеге асырды. Пассажен деңгейі 2 орталық сұйылтулардан (10^{-4-5-6}) жиналған ВМ үлгілер бір пулға біріктіріліп, вирустық қорын дайындау үшін пайдаланылды.

Біріншілік вирустық материал дайындау үшін 80-100 мл көлеміндегі рекомбинантты штаммдардың (2-ші пассажен деңгейіндегі) вирустық суспензиялары тұрақтандырушы ортасымен тең көлемде біріктірілді (соңғы концентрацияда 6% пептон және 3% сахарозасы бар), ампулаларға құйылды

және лиофилизацияланды. 150-180 ампула (1 мл) мөлшеріндегі штаммдардың лиофилизацияланған біріншілік вирустық материал дайын сериялары сыртқы түріне, вакуумның болуына, ерігіштігіне, қалдық ылғалдылығына, стерильділігіне, түпнұсқалығына, тауық эмбриондары үшін патогенділігіне, бөгде агенттерге, гемагглютинациялық және инфекциялық белсенділігіне бақыланды. Рекомбинантты штаммдардың біріншілік вирустық материал сапасын бақылау нәтижелері 19-21 кестелерде келтірілген.

Кесте 19 - Тұмаудың біріншілік вирустық материал - FLU NS_ESAT-6 векторының сапасын бақылау нәтижелері

Сапа параметрлері	Нәтижелері
Сыртқы түрі	Вирустары бар ампулалар сызаттарсыз және мазмұны бірдей көлемдегі борпылдақ таблеткалар түріндегі, бөгде қоспаларсыз сұр-ақ түсті
Вакуумның болуы	Вакуум бар
Ерігіштік	Жақсы ериді. Физиологиялық ерітіндіні 1 мл көлемде қосқанда құрғақ масса 40-60 секунд ішінде толығымен ериді және тұнбасыз біртекті суспензия болып табылады.
Ылғалдың массалық үлесі	Үлгілердегі ылғалдың массалық үлесі $2,7 \pm 0,0200\%$ артық емес
Стерильділік	Стерильді
Бөгде агенттер	Бөгде агенттер жоқ (электрондық микроскопия)
Гемагглютинация белсенділігі	1:32-1:64
Инфекциялық белсенділік	$8,2 \pm 0,07 - 8,95 \pm 0,21 \text{ lg EID}_{50}/\text{мл}$

Кесте 20 - Тұмаудың біріншілік вирустық материал - FLU NS_TB10.4 векторының сапасын бақылау нәтижелері

Сапа параметрлері	Нәтижелер
Сыртқы түрі	Вирустары бар ампулалар сызаттарсыз және мазмұны бірдей көлемдегі борпылдақ таблеткалар түріндегі, бөгде қоспаларсыз сұр-ақ түсті
Вакуумның болуы	Вакуум бар
Ерігіштік	Жақсы ериді. Физиологиялық ерітіндіні 1 мл көлемде қосқанда құрғақ масса 40-60 секунд ішінде толығымен ериді және тұнбасыз біртекті суспензия болып табылады.
Ылғалдың массалық үлесі	Үлгілердегі ылғалдың массалық үлесі $2,1 \pm 0,0270\%$ аспайды
Стерильділік	Стерильді
Бөгде агенттер	Бөгде агенттер жоқ (Электронды микроскопия)
Гемагглютинация белсенділігі	1:32-1:64
Инфекциялық белсенділік	$8,75 \pm 0,07 - 9,45 \pm 0,00 \text{ lg EID}_{50}/\text{мл}$

Кесте 21 - Тұмаудың біріншілік вирустық материал - FLU NS_ESAT-6-FLU NS_TB10.4 векторының сапасын бақылау нәтижелері

Сапа параметрлері	Нәтижелер
Сыртқы түрі	Вирустары бар ампулалар сызаттарсыз және мазмұны бірдей көлемдегі борпылдақ таблеткалар түріндегі, бөгде қоспаларсыз сұр-ақ түсті
Вакуумның болуы	Вакуум бар
Ерігіштік	Жақсы ериді. Физиологиялық ерітіндіні 1 мл көлемде қосқанда құрғақ масса 40-60 секунд ішінде толығымен ериді және тұнбасыз біртекті суспензия болып табылады.
Ылғалдың массалық үлесі	Үлгілердегі ылғалдың массалық үлесі $2,8 \pm 0,0205\%$ аспайды
Стерильділік	Стерильді
Сыртқы агенттер	Бөгде агенттер жоқ (Электронды микроскопия)
Гемагглютинация белсенділігі	1:32-1:64
Инфекциялық белсенділік	$8,7 \pm 0,07 - 9,75 \pm 0,22 \text{ Ig EID}_{50}/\text{мл}$

19-21 кестелердің деректері тұмау векторларының дайындалған біріншілік вирустық материал (лиофилизацияланған) сапаны бақылау талаптарына сәйкес келетіндігін көрсетті. Әрбір штаммның барлық ампулалары таңбаланған, тіркелген және қолданар алдында режимдік сақтауға (-70°C) қойылған.

3.3.3 Вакцина өндірісі үшін тәжірибелік биомассаны алу

Модельдік зертханалық жануарларда құрастырылған тұмау векторларының қауіпсіздігін, иммуногенділігін және қорғаныштығын анықтауға арналған зерттеулер кешенінің жоғарыда келтірілген нәтижелері негізінде туберкулезге қарсы вакцинаны дайындау үшін алдын ала FLU NS_ESAT-6 - FLU NS_TB10.4 тұмау векторы таңдалды.

Ірі қара мал туберкулезіне қарсы векторлық вакцинаның тәжірибелік сериясын дайындау және 10 күндік тауық эмбриондарында биомассасын алу мақсатында біз ($37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) температурада, ауаның салыстырмалы ылғалдылығы $55 \pm 5\%$, 48 сағат бойы инкубацияда және белгілеген дозаларда FLU NS_ESAT-6 - FLU NS_TB10.4 тұмау векторын жұқтырылды.

Стерильді бокста тұмау векторының FLU NS_ESAT-6 - FLU NS_TB10.4 биомассасы жиналды. Жиналған материалдың сапасы бақылаудан өтті. Жиналған биомассаның гемагглютинациялық белсенділігі, инфекциялық белсенділігі және стерильділігі анықталды. Орындалған жұмыстардың нәтижелері 22-кестеде көрсетілген.

Кесте 22 - Тұмау векторының биомассасының сапасын тексеру нәтижелері

Рекомбинантты штаммның атауы	Көлемі, л	ГАР-дағы титр	Инфекциялық белсенділік, $\text{Ig EID}_{50}/\text{мл}$	Стерильділік
FLUNS_ESAT-6 - FLUNS_TB10.4	10	1:128	$8,87 \pm 0,22$	стерильді

3.3.4 Тұрақтандырушы орталарды таңдау және вакцинаның оңтайлы құрамын жасау

Вакциналардың сенімді тұрақтылығының кепілі оларды әртүрлі тәсілдермен, атап айтқанда лиофилизация әдісімен кептіру болып табылады. Лيوфилизация кезінде микроорганизмдер теріс температура мен вакуумға ұшырайды, осыған байланысты әртүрлі температуралық-уақыттық режимдерде мұздату, сусыздандыру және ұзақ уақыт кептіру кезінде микроорганизмдердің зақымдануын болдырмайтын әртүрлі қорғаныс тұрақтандырғыш орталарды, көбінесе көмірсу-ақуыз табиғатын пайдаланады [31-36].

Біз сорбиттың, манниттың және сахарозаның қорғаныс әсерін бөлек зерттедік. Тұрақты компоненттер әртүрлі аминқышқылдарының қоспасы болып табылатын пептон болды. Тәжірибелер үшін тұрақтандырушы ортаның 3 нұсқасы дайындалды, олардың құрамы төменде келтірілген:

- Вариант №1: Сорбит - 6 % + пептон - 12 %;
- Вариант №2: Маннит - 6 % + пептон - 12 %;
- Вариант №3: Сахароза - 6 % + пептон – 12 %.

Сонымен қатар, лиофилизацияның оңтайлы режимі пысықталды. Құрамында вирусы бар суспензия тұрақтандырғыш ортамен 1:1 қатынасында араластырылды. Алынған вакцина қоспасы 5 мл-ден құтыға құйылып, 23-кестеде көрсетілген температура-уақыт режимдерінде лиофилизацияланды. Лиюфильді кептіруден кейін вакцина қоспасынан ылғалды кетіру арқылы қорғаныс ортасының компоненттерінің концентрациясы төмендейді. Осылайша, вакцина қоспасындағы қорғаныс ортасының компоненттерінің соңғы концентрациясы: көмірсулар (сорбит, маннитол немесе сахароза) – 3 %, пептон – 6%.

Кесте 23 - Лиюфилизация параметрлерінің вакцина прототиптерінің биологиялық қасиеттерінің сақталуына әсері

Нұсқалар	Лиюфилизация параметрлері					Қорғаныс ортасы	%	Биологиялық белсенділік, Ig EID ₅₀ /мл	
	мұздату, сағат	конденсат орт, t °C	пеште р, t °C	кептіру уақыты, сағат	кептіруге дейін, сағат			кептіруге дейін	кептіруден кейін
I	12	- 64	- 55	35	3	Сорбит Маннит Сахароза	6,0 6,0 6,0	6,27 ±0,17 6,25 ±0,13 6,35 ±0,13	6,13±0,08 6,16±0,17 6,28±0,17
II	10	- 64	-55	35	3	Сорбит Маннит Сахароза	6,0 6,0 6,0	6,27 ±0,17 6,27 ±0,13 6,33 ±0,13	6,22±0,2 56,21±0,17 136,29±0,17

23-кесте жалғасы

III	8	- 64	- 55	38	5	Сорбит	6,0	6,25 ±0,13	6,18±0,2
						Маннит	6,0	6,28 ±0,17	5
						Сахароза	6,0	6,31 ±0,13	6,21±0,0
									86,26±0,13

23-кестедегі мәліметтерден кептіруден кейін зерттелетін қорғаныс ортасы бар вакцина үлгілерінің биологиялық белсенділігінің көрсеткіштерінде айтарлықтай айырмашылықтар жоқ екенін көруге болады. Алайда, кептіру режимінің III нұсқасын қолданған кезде (мұздату уақыты 8 сағат) жалпы кептіру уақыты 50 сағатқа артады. Вакцина үлгілерін II нұсқаның технологиялық режимінде кептіру кезінде жалпы кептіру уақыты 48 сағатты құрайды. Сынақ үлгілері 12 сағат бойы мұздатылған кезде (III нұсқа) жалпы кептіру уақыты 51 сағатты құрады.

Алынған мәліметтерге сүйене отырып, келесі тәжірибелерде кептіру үшін II нұсқаның технологиялық режимі қолданылды, оны пайдалану кезінде жалпы кептіру уақыты 48 сағатты құрады. Осы режимде кептіру арқылы алынған вакцина үлгілері олардың тұрақтылығын зерттеу үшін қоймаға қойылды.

+4°C кезінде 3 ай сақтағаннан кейін сахарозаны пайдалану препарат үлгісінің биологиялық белсенділігін $6,25 \pm 0,17 \text{ lg EID}_{50}/\text{мл}$ деңгейінде сақтауды қамтамасыз етті, ал маннитолды пайдаланған кезде бұл көрсеткіш $5,80 \pm 0,25 \text{ lg EID}_{50}/\text{мл}$ құрады. бөлме температурасында сақтаған кезде маннитолды пайдалану үлгінің биологиялық белсенділігін $5,33 \pm 0,17 \text{ lg EID}_{50}/\text{мл}$ деңгейінде сақтауды қамтамасыз етті, ал сахарозаны енгізу кезінде биологиялық белсенділік көрсеткіші $5,75 \pm 0,08 \text{ lg EID}_{50}/\text{мл}$ болды.

Осылайша, зерттеудің осы кезеңінде ІҚМ туберкулезіне қарсы векторлық вакцинаны сублимациялық тәсілмен кептіру кезінде тұрақтандырушы қоспа ретінде пептон комбинациясымен сахарозаны қолдану ұсынылады.

3.3.5 *Mycobacterium bovis*-ке қарсы векторлық вакцинаның тәжірибелік сериясын дайындау және сапасын бақылау (стерильділік, инфекциялық белсенділік, микобактериялық қосымшаның болуы)

ІҚМ туберкулезінің алдын алу үшін вакцина векторлық вакцина жасау технологиясының репродуктивтілігін институт ішінде бағалау мақсатында әрқайсысының 900 доза мөлшерінде тәжірибелік вакцина сериясының екі нұсқасы дайындалды:

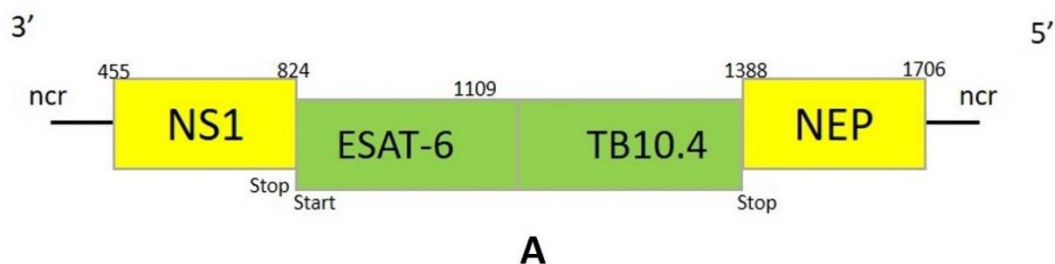
- Құрамында 15% montanide Gel адьюванты бар туберкулезге қарсы векторлық вакцина (вакциналық препарат - 1);

- Туберкулезге қарсы векторлық вакцина (вакциналық препарат - 2).

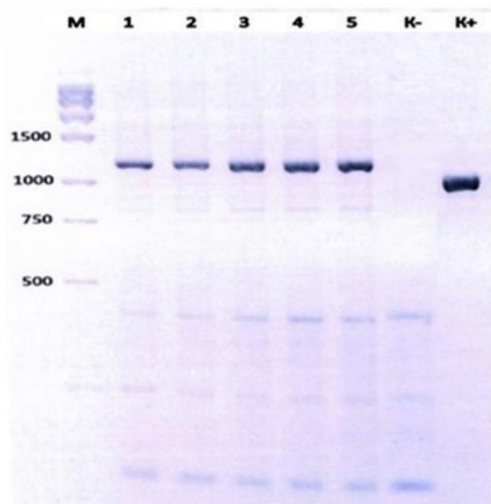
Вакцинаның екі нұсқасы да ГОСТ 28085 сәйкес стерильді. Инфекциялық белсенділік $6,25 \pm 0,02 \text{ lg EID}_{50}/\text{мл}$ - $6,75 \pm 0,07 \text{ lg EID}_{50}/\text{мл}$ болды.

Вирустың әлсіреуіне NS1 ақуызын 124 амин қышқылынан кейін 0078-*M. bovis*-8/*RIBSP* алынған бөгде тізбектерді енгізу арқылы өзгерту арқылы қол

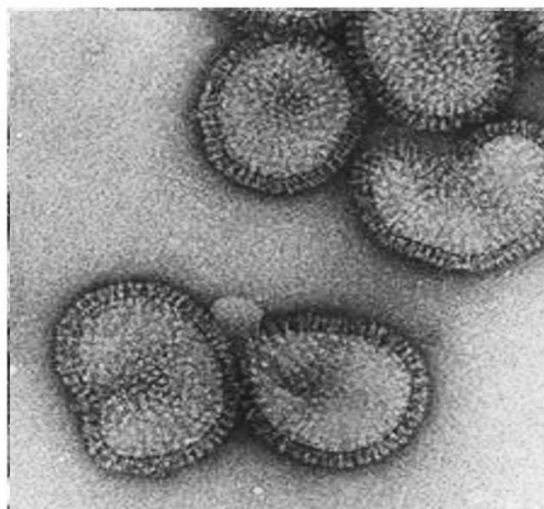
жеткізілді (сурет 28, а). Алынған вирус NS1 химерлі ақуызының бұзылуына байланысты интерферонға қабілетті жасушаларда немесе сүтқоректілерде тиімді өсе алмады, бұл оны репликацияға тапшы вектор етті.



А



Ә



Б

А) NS генінің рекомбинантты сегментінің схемалық бейнесі. Сары тіктөртбұрыш NS бөлімдерін білдіреді; Жасыл тіктөртбұрыштар ESAT-6 және TB10.4 тізбегін көрсетеді. Нуклеотидтердің позициялары жоғарғы жағында көрсетілген; Б) NS1 химерикалық генінің генетикалық тұрақтылығы; Б) рекомбинантты вакцина штаммының вириондарының электронды микрографиясы.

Сурет 28 - Вакцина штаммының құрылысы және молекулалық сипаттамасы

Гомологиядан алынған модельдер тұмау вирусының рекомбинантты штаммдарының бастапқы нұсқасының үшінші құрылымында микобактериялық TB10.4, ESAT-6 антигендерін және пассажды нұсқасын экспрессиялайтын айтарлықтай айырмашылықтарды таппады. Клондаудың бірінші кезеңі NS геномдық сегментіндегі генетикалық химера құрылымының сақталуын көрсетті, бұл КТ-ПТР күшейту өнімдерінің электрофорез нәтижелерімен расталды (сурет 28, ә). Рекомбинантты вириондардың электронды микрографиясы құс тұмауы вирусының морфологиясына сәйкес келеді. Вириондар сфералық пішінді, липидті қос қабаттан түзілген суперкапсидпен жабылған, оның ұзындығы шамамен 10 нм гликопротеин

ұштары бар, гемагглютинациялық немесе нейраминидаза белсенділігін анықтайды (сурет 28, б).

Әрі қарай, қауіпсіздікке арналған вакциналық препараттардың биотехнологиясындағы негізгі маңызды параметрдің бірі талданды. Зерттелетін вакцина үлгілерінің қауіпсіздігін бағалау үшін теңіз шошқалары тері астына енгізу арқылы lg 6.25 EID₅₀/1 мл көлемінде бір рет егілді. Зерттеу барысында жануарлардың жалпы жағдайы тіркелді: жем мен суды тұтыну, тері мен шырышты қабаттардың жағдайы, мінез-құлық реакциялары, қозғалыс белсенділігі және теңіз шошқаларының дене салмағының динамикасы.

Зерттеудің бірінші кезеңінде сыналатын үлгілердің қауіпсіздігі анықталды (сурет 29). Сыналатын үлгілердің зиянсыздығын/реактогенділігін бақылаудың алынған нәтижелерінің деректеріне сәйкес әрбір топтағы егілген теңіз шошқаларында бір рет тері астына енгізгеннен кейін 10 тәулік ішінде аурудың клиникалық белгілері байқалмады. Теріні және көрінетін шырышты қабықтарды тексеру кезінде өзгерістер табылған жоқ. Көзден, мұрын қуысынан, анустан және уретрадан патологиялық разряд байқалмады. Эксперименттік жануарлардағы бұлшықет тонусы қалыпты болды. Жануарлардың моторикасы стандартты, физиологиялық нормадан ауытқусыз. Дененің кеңістіктегі патологиялық жағдайы, жүрістің бұзылуы және қозғалыстарды үйлестіру анықталған жоқ. Сынақ материалын енгізу орнында қабыну белгілері байқалмады. Алайда, кейбір жануарларда ісіну түрінде жергілікті реакция байқалды, ол сынақ үлгісін енгізгеннен кейін 3 күн ішінде толығымен шешілді (кесте 24).

Кесте 24 - Теңіз шошқаларындағы қауіпсіздігін анықтау нәтижелері

Топтар	Өмір сүру, бақылау күндері										Жергілікті реакция	Зерттелетін үлгіні енгізу орнындағы тіндік реакция
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
1	$\frac{0}{8}$	$\frac{0}{8}$	$\frac{0}{8}$	$\frac{0}{8}$	$\frac{0}{8}$	$\frac{0}{8}$	$\frac{0}{8}$	$\frac{0}{8}$	$\frac{0}{8}$	$\frac{0}{8}$	---	---
2	$\frac{0}{8}$	$\frac{0}{8}$	$\frac{0}{8}$	$\frac{0}{8}$	$\frac{0}{8}$	$\frac{0}{8}$	$\frac{0}{8}$	$\frac{0}{8}$	$\frac{0}{8}$	$\frac{0}{8}$	---	---
3	$\frac{0}{8}$	$\frac{0}{8}$	$\frac{0}{8}$	$\frac{0}{8}$	$\frac{0}{8}$	$\frac{0}{8}$	$\frac{0}{8}$	$\frac{0}{8}$	$\frac{0}{8}$	$\frac{0}{8}$	---	---
4	$\frac{0}{8}$	$\frac{0}{8}$	$\frac{0}{8}$	$\frac{0}{8}$	$\frac{0}{8}$	$\frac{0}{8}$	$\frac{0}{8}$	$\frac{0}{8}$	$\frac{0}{8}$	$\frac{0}{8}$	---	---

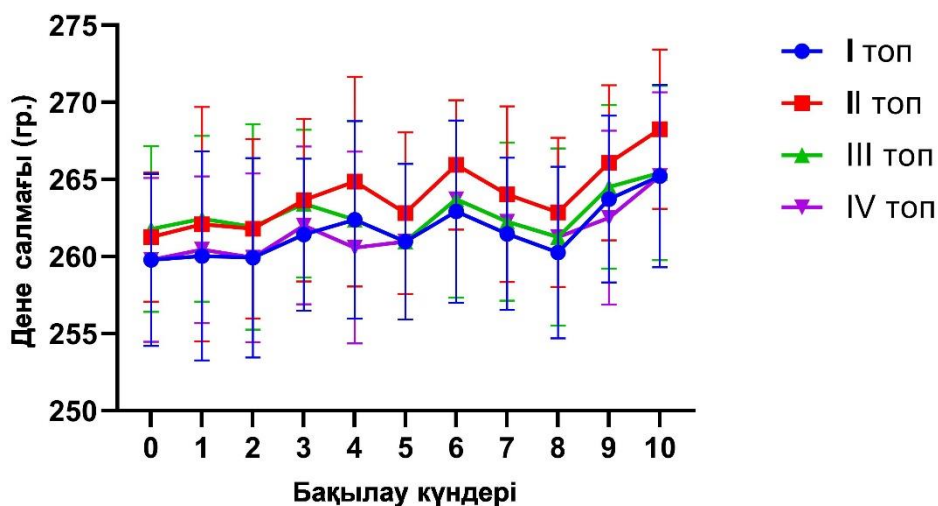
Ескертулер:

- 1) алым – құлаған жануарлардың саны;
- 2) бөлгіш – тірі қалған жануарлардың саны;
- 3) «+» реакциясы шамалы (ақ талшықты дәнекер тінінің бір реттік дискретті өсуі, диаметрі 2,0 - 2,5 мм; 2 «-» реакция жоқ;
- 4) «->» реакция жоқ.

24-кестеде келтірілген деректер туберкулезге қарсы вакциналарды және БЦЖ вакцинасын енгізу теңіз шошқаларының өліміне әкелмейтінін көрсетеді,

сынақ жануарлары бақылау мерзімі бойы 10 тәулік бойы сынақ үлгісін енгізу орнында жергілікті және тіндік реакциясыз клиникалық сау және тірі қалды.

Эксперименттік топтағы теңіз шошқаларының дене салмағының динамикасы бақылау тобындағы ұқсас көрсеткіштерден ерекшеленбеді. Барлық жануарларда дене салмағының жоғарылауы байқалды, бұл 29-суреттегі мәліметтерден көрінеді.



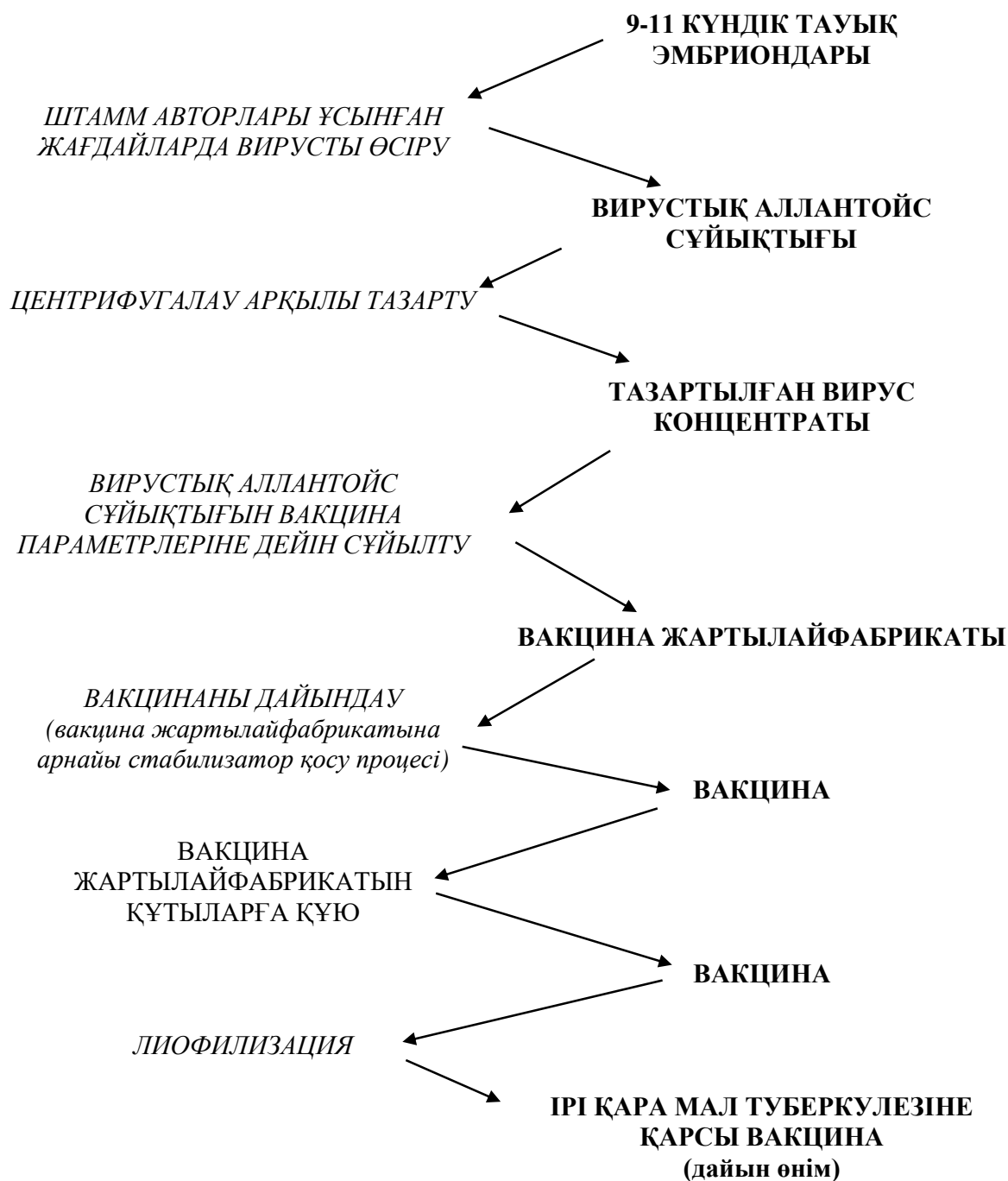
Сурет 29 – Теңіз шошқаларының дене салмағының өзгеруін талдау

Осылайша, жүргізілген зерттеулерге сүйене отырып, вакцинаның екі нұсқасы да ГОСТ 28085 сәйкес стерильді деп қорытынды жасауға болады. Инфекциялық белсенділік $6.25 \pm 0,02 \log \text{EID}_{50}$ - $6,75 \pm 0,07 \log \text{EID}_{50}$ болды. Гомологиядан алынған модельдер тұмау вирусының рекомбинантты штаммдарының бастапқы нұсқасының үшінші құрылымында микобактериялық TB10.4, ESAT-6 антигендерін және жолаушы нұсқасын білдіретін айтарлықтай айырмашылықтарды таппады. Клондаудың бірінші кезеңі NS геномдық сегментіндегі генетикалық химера құрылымының сақталуын көрсетті, бұл КТ-ПТР күшейту өнімдерінің электрофорез нәтижелерімен расталды. Рекомбинантты вириондардың электронды микрографиясы құс тұмауы вирусының морфологиясына сәйкес келеді. Теңіз шошқалары үшін зиянсыз туберкулезге сезімтал жануарлардың бірі.

3.3.5.1 Векторлық вакцинаны алу технологиясы

Ірі қара мал туберкулезіне қарсы жаңа векторлық вакцинаны жасаудың ғылыми және практикалық маңызы зор. Әдебиет көздерінен белгілі болғандай қолданыстағы классикалық вакциналар мен жалпы аталмыш аурудың алдын алу шаралары патогенді қоздырғыштан қорғаныстың жеткіліксіздігін көрсетіп отыр. Сондықтан, ірі қара мал туберкулезіне қарсы нақты алдын алудың тиімді құралын жасау қажеттілігінің орасан зор маңыздылығын ескере отырып, Қазақстан Республикасында алғаш рет ірі қара мал туберкулезіне қарсы векторлық - кандидаттық вакцинаны өндіру технологиясы әзірленді. Әзірленген ірі қара мал туберкулезіне қарсы векторлық - кандидаттық вакцина

ірі қара мал арасында нақты туберкулез профилактикасына арналған және болашақта Қазақстан Республикасының аумағында туберкулездің алдын алу және жою бойынша (кеселдің таралуына) эпизоотияға қарсы жұмыстарды тиімді жүргізуге мүмкіндік береді.



Сурет 30 – Ірі қара мал туберкулезіне қарсы векторлық вакцинасын алудың биотехнологиялық процесі

Ірі қара мал туберкулезіне қарсы жаңа векторлық вакцинасын алудың технологиялық процесі 31-суретте көрсетілген бірнеше кезеңнен тұрады. Алдыңғы бөлімдерде көрсетілгендей, вакцинаның оңтайлы құрамы

анықталды және вакцинаға нормативтік техникалық құжаттама (НТҚ) дайындалды. НТҚ жаңа, жетілдірілген ветеринариялық препараттарға, жемшөп қоспаларына нормативтік-техникалық құжаттаманы бекіту қағидаларына (ҚР АШМ-нің 2021 жылғы 22 сәуірдегі № 133 бұйрығы, 2021 жылғы 28 маусымдағы № 22640) сәйкес әзірленіп, ҚР ДСМ БҚПҒЗИ Бас директорымен 2023 жылдың 30 маусымында бекітілді. НТҚ құрамы келесі құжаттардан тұрады:

- Ұйым стандарты СТ 405-1919-04 ГП-146-2023 «Ірі қара мал туберкулезіне қарсы векторлық вакцина» (Қосымша А);
- «Ірі қара мал туберкулезіне қарсы векторлық вакцинасын» қолдану туралы нұсқаулық, ӘОЖ: 619:615.371:578.828.2 (Қосымша Ә);
- Ірі қара мал туберкулезіне қарсы векторлық вакцинасы өндіру және бақылау нұсқалары (Қосымша Б).

3.3.6 Зертханалық жануарларда және бұзауларда Т-жасушалық иммундық жауапты және вакцинаның қорғаныш қасиетін анықтау

Модельдік зертханалық жануарларда жасалған тұмау тасымалдаушыларының қауіпсіздігін, иммуногенділігін және қорғаныштығын бағалау үшін жүргізілген зерттеулердің негізінде вакцинаға неғұрлым перспективалы үміткерлерді таңдау үшін келесі вакцина үміткерлері таңдалды: құрамында 15% Montanide Gel адьюванты бар туберкулезге қарсы векторлық вакцина (вакциналық препарат - 1); туберкулезге қарсы векторлық вакцина (вакциналық препарат – 2), ол жоғарыдағы бақылаулар бойынша сапа көрсеткіштерін көрсетті.

Әрі қарай, *M. bovis*: Esat-6 және TB10.4 қорғаныш антигендерін білдіретін NS1 тұмауының векторын пайдалана отырып, кері генетика арқылы алынған ІҚМ туберкулезіне қарсы векторлық вакцина үміткерлерінің қауіпсіздігі, иммуногенділігі және қорғаныш тиімділігі ақ тышқандарда, теңіз шошқалары мен ірі қара малда бағаланды. Салыстырмалы бақылау ретінде коммерциялық БЦЖ вакцинасы, теріс бақылау ретінде физиологиялық ерітінді, сондай-ақ жануарлардың интактті тобы қолданылды.

Тышқандардағы векторлық вакцина үміткерлерінің қорғаныс қасиеттерін бағалау

Зерттеудің 42-ші күнінде екі рет вакцинациядан кейін бұзылмаған топтан басқа үш топтағы ақ тышқандар гистологиялық зерттеулер арқылы вакцинаға үміткерлердің протективті белсенділігін әрі қарай зерттеу және 4-суретте көрсетілген схемаға сәйкес эвтаназиядан кейін өкпеден микобактериялардың өсу деңгейін талдау үшін *M. bovis*-8 вирулентті штаммымен жұқтырылды.

Микобактерияларды жұқтырғаннан кейін тышқандардың мінез-құлқы эвтаназияға дейін 30 күн бойы байқалды. *M. bovis* микобактериясымен жануарларды эксперименттік жұқтыру кезінде теріс бақылау тышқандар тобынан басқа (PBS алған) вакциналық кандидаттардың протективті әсері көрсетілді, онда бақылаудың 5, 6 және 7 тәулігіне 1 жануардан өлгені тіркелді.

Өлгенге дейін жануарларда физикалық белсенділіктің болмауы, жүнінің шашыраңқы, тез тыныс алуы және тәбетінің болмауы байқалды. Өлген тышқандардың патологиялық сараптамасы кезінде жедел инфекциялық процеске тән өкпенің, тері астындағы тіннің, бауырдың және бүйректің жедел іркілген гиперемиясының белгілері анықталды.

PBS инъекциясын алған тышқандар тобында жүн жамылғысының өзгеруі, тәбеттің төмендеуі және әрекетсіздік байқалды. Вакцина үміткерлерімен вакцинацияланған тышқандардың тәбетінің төмендеуі байқалды, ол екі күннен кейін қалпына келді және салмақтың өсуі байқалды.

Өкпенің *M. bovis-8*-мен ластану дәрежесі және қорғаныс көрсеткіші 26-кестеде көрсетілген.

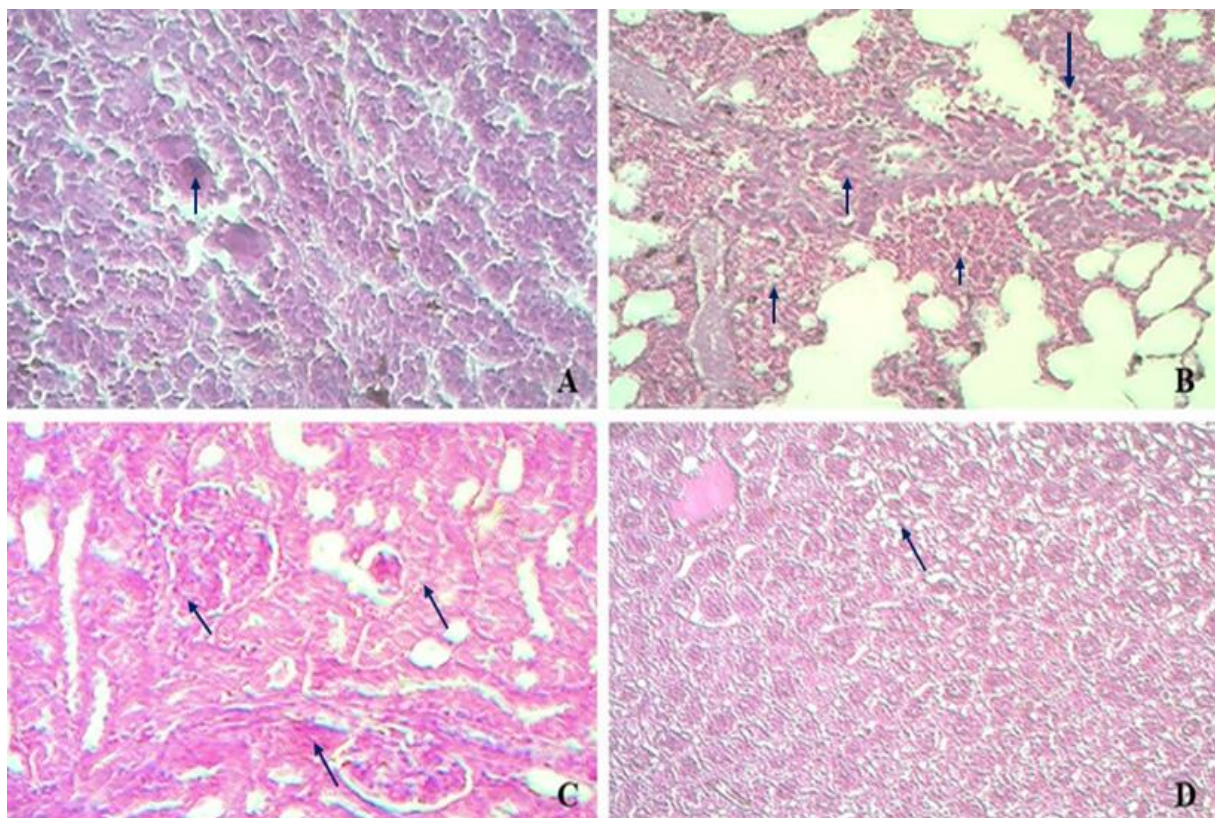
I топта да *M. bovis-8* өсімінің аздап төмендеуі байқалды (сәйкесінше $p < 0,05$), бірақ қорғау индексі айтарлықтай төмен болды (+0,2 lg). II топтағы тышқандарда *M. bovis-8* егуінің жеткілікті төмендеуі байқалды (сәйкесінше $p < 0,01$), қорғау индексі айтарлықтай жоғары болды (+0,62 lg). Барлық осы деректер кандидат вакциналардың профилактикалық әсері туралы айтуға мүмкіндік береді.

Кесте 25 – *M. bovis-8* жұқтырған өкпеден микобактериялардың егілуі

Топтар	Тәжірибе шарттары	lg өкпедегі өміршең бактериялардың саны	Қорғау индексі (lg)
		емдеу басталғаннан кейін 6 аптадан кейін	
I	Esat-6 және TB10.4 + Montanide Gel	2,39±0,182	+0,2
II	Esat-6 және TB10.4	1,97±0,447	+0,62
III	PBS	4,89±0,044	-
IV (интактты)	---	5,62	-

Сәйкесінше, кестедегі мәліметтерден III және IV тышқандар топтарында *M. bovis-8* өсімі байқалады, қорғау көрсеткіші екі топта да байқалмайды.

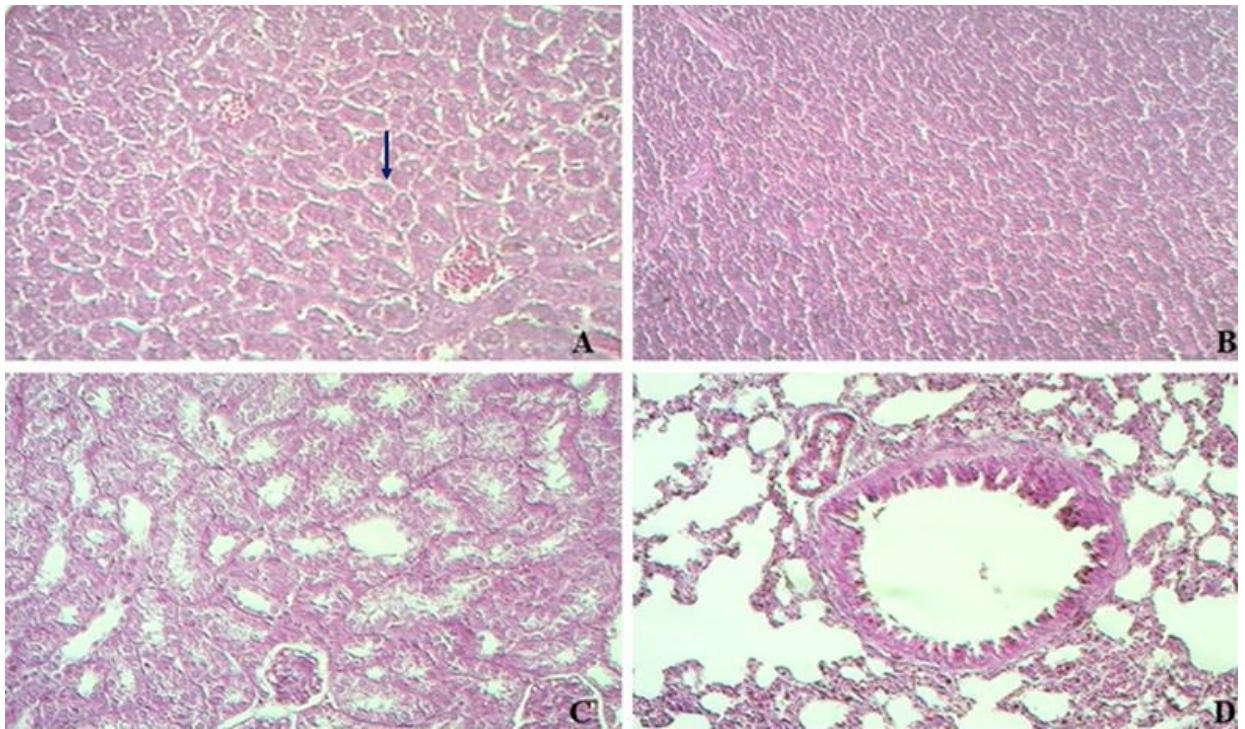
I топтағы тышқандарды гистологиялық зерттеу кезінде лимфоидты фолликулалардың азаюына байланысты көкбауырдың құрылымы аздап өзгерген, онда ірі бір және көп ядролы жасушалар пайда болғаны анықталды. Өкпедегі морфологиялық өзгерістер өнімді перибронхиальды қабынумен сипатталды, ол тамырлардың тоқырауымен ошақты сипатта болды. Бронх эпителийі десквамацияланған. Өкпенің басқа бөліктерінде макрофагтармен өнімді қабынуға байланысты альвеолааралық қалқанның қалыңдауы байқалды. Бүйректің интерстициальды тіндерінде жалғыз макрофагты қабыну байқалады. Түтікшелердің эпителийінде паренхималық дегенерация суреті анықталды. Бауырдың гистологиялық құрылымы гепатоциттердің паренхималық дегенерация ошақтарына байланысты бұзылған. Кейбір аймақтарда некрозданған бауыр жасушалары байқалады (сурет 31, б).



А – көкбауырдағы лимфоциттер мен макрофагтар. Б – өкпедегі альвеолалардың макрофагтарымен бронх эпителийінің десквамациясы және альвеола аралық қабынуымен перибронхиальды қабынуы. В – макрофагтармен аралық қабыну және бүйректің паренхималық дистрофиясы. Г – Бауырдағы гепатоциттердің паренхималық дегенерациясы және өлеттілігі. Сурет 400 есе үлкейтіліп, гематоксилин және эозинмен бояулары арқылы жасалынды

Сурет 31 – Ірі қара мал туберкулезіне қарсы вакцинаның протективтілік қасиетін ақ тышқандарда гистологиялық зерттеу нәтижелері I топтағы тышқандар ұлпаларының гистологиялық құрылымы.

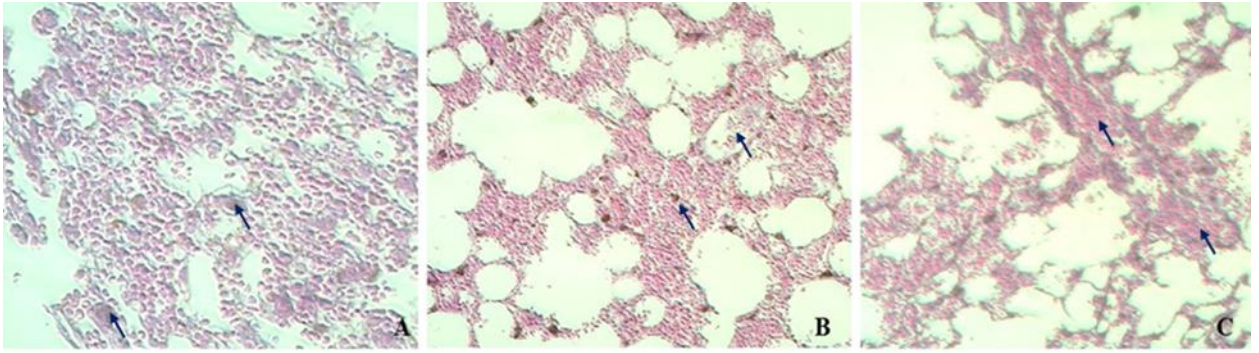
II топтағы ақ тышқандарда жүргізілген гистологиялық зерттеу нәтижелері бауыр тіндерінде айтарлықтай өзгерістердің жоқтығын көрсетеді. Ісіну салдарынан қан тамырларының бітелуі және бауыр синусоидтарының кеңеюі байқалады. Көкбауыр тінінің құрылымы қалыпты, лимфоидты фолликулдары бар қызыл және ақ ұлпалар сақталған, тіндердің ісіну аймақтары бар. Бүйректің құрылымы да сақталған, түтікшелі эпителийдің жалғыз жасушаларында паренхималық дегенерация байқалады. Өкпенің құрылымы толығымен сақталған және қалыпты гистологиялық көрініс бар. Өкпенің бронхтары бар аймағында гистологиялық құрылымы бұзылмаған (сурет 32).



А – Қан тамырларының бітелуі және бауыр тінінің ісінуі. Б – көкбауырдың оқшауланған ісінуі. В – бүйрек құрылымының инфекциядан кейінгі қалпына келіуі. Г – өкпе құрылымының инфекциядан кейінгі қалпына келіуі. Сурет 200 есе үлкейтіліп, гематоксилин және эозинмен боялды.

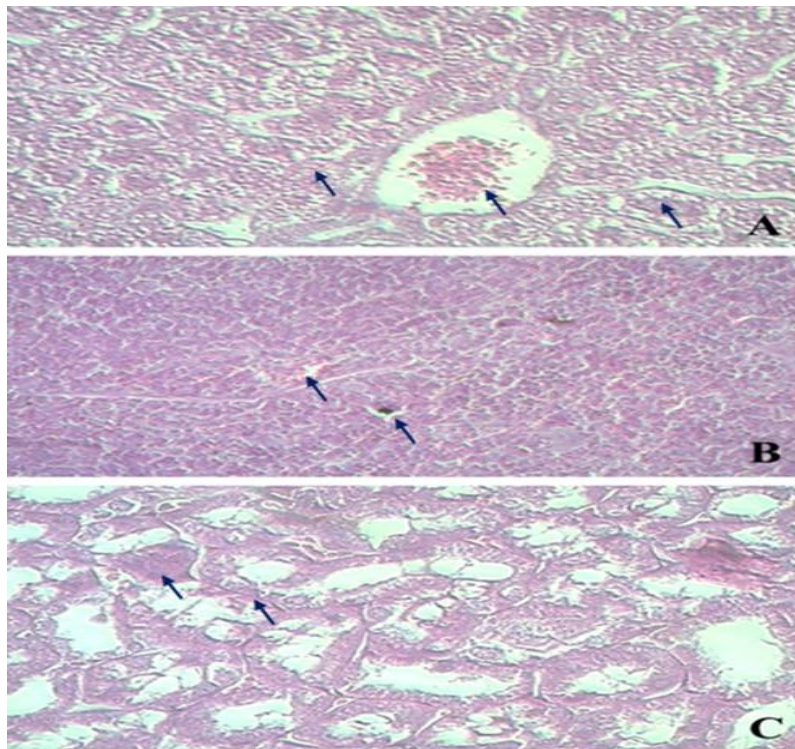
Сурет 32 – Жаңа вакцинаның протективтілік қасиетін ақ тышқандарға гистологиялық зерттеу барысында жүргізілген зерттеулер жүргізгендегі II топ тышқандарының ұлпаларының гистологиялық құрылымы

III топ жануарларының тіндерінің гистологиялық зерттеуі өкпе тінінің құрылымының сақталғанын көрсетті. Ірі бір және көп ядролы жасушалар — макрофагтар — альвеола аралық қалыңдатылған қалқалар мен альвеолалардың жарығында пайда болғаны байқалады. Өкпенің басқа бөліктерінде альвеола аралық қалқалар мен альвеолаларында ошақты серозды геморрагиялық экссудат байқалды. Өкпенің барлық бөліктерінде қан тамырларының тоқырау түріндегі қан айналымының бұзылуы байқалады (сурет – 32, А-Б). Бауырдың гистологиялық құрылымы сақталған, бірақ кейбір аймақтарда көбік тәрізді цитоплазмасы бар және ядросының анық емес сұлбасы бар гепатоциттер пайда болады. Жеке жасушалардың ядролары жоқ және оптикалық бос қызғылт массалар түрінде көрінеді. Орталық көк тамыр қанға толы. Көкбауыр тінін микроскопиялық зерттеу гистологиялық құрылымның сақталғанын көрсетеді, бірақ лимфоидты фолликулалардың азаюы байқалады. Сонымен қатар, үлкен моноклеарлы жасушалар мен қан тамырларының тоқырауы бар. Түтікшелі эпителий дистрофиясы салдарынан бүйрек құрылымы бұзылған. Соңғысының жасушаларында цитоплазмалық сұйықтықпен толтырылған вакуольдер пайда болған. Жасуша ядросы нақты анықталмаған. Ірі көп ядролы жасушалар пайда болған (сурет – 33, А-С).



А – өкпе тінінің макрофаг реакциясы. Б – Өкпе тінінің серозды-геморрагиялық экссудаты. С – Өкпе ұлпасы қан тамырларына толы. Сурет 200 есе үлкейтіліп, гематоксилин және эозинмен бояулары арқылы жасалынды

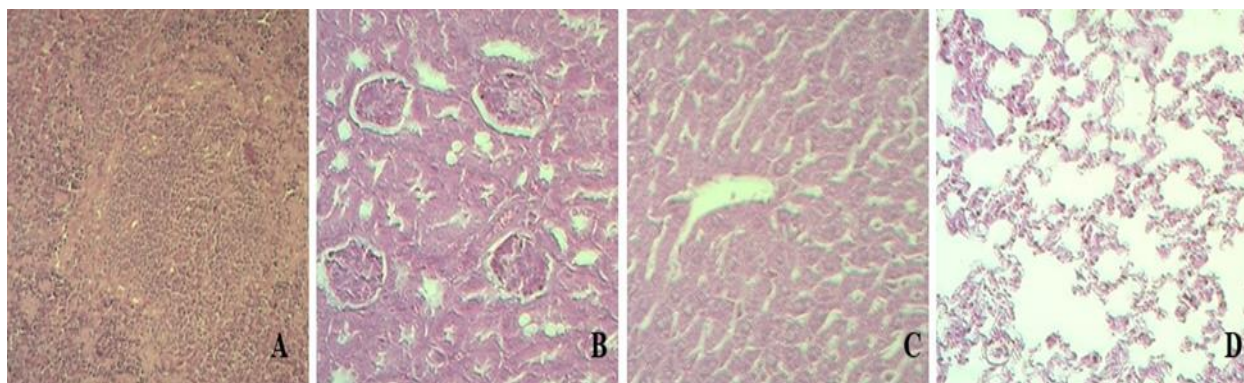
Сурет 33 - Қара мал туберкулезіне қарсы жаңа вакцинаның протективтілік қасиетін ақ тышқандарды гистологиялық әдіспен зерттегенде III топтағы тышқандардың ұлпаларының гистологиялық құрылымы



А – Бауыр тамырларының бітелуі, бауырдағы гепатоциттердің дегенерациясы және өлеттілігі (суретті ұлғайту деңгейі - 400х). В – Көкбауыр тамырының бітелуі, көкбауырдағы мононуклеарлы макрофагтардың пайда болуы (суретті ұлғайту деңгейі - 200х). С – Түтікшелі эпителийдің және бүйректердегі көп ядролы макрофагтардың дистрофиясы (суретті ұлғайту деңгейі - 400х).

Сурет 34 - Қара мал туберкулезіне қарсы жаңа вакцинаның протективтілік қасиетін ақ тышқандарды гистологиялық әдіспен зерттегендегі III топтағы тышқандар ұлпаларының гистологиялық құрылымы

Жоғарыда көрсетілген үш топтың жануарларға жүргізілген гистологиялық зерттеулер нәтижелеріндегі өзгерістерді салыстыру үшін IV топтағы сау – инфекциядан таза тышқандардың ағза тіндерінің үлгілерінің гистологиялық құрылымы пайдаланылды. Көкбауырдың сау құрылымы лимфоидты фолликулалармен ұсынылған айқын қызыл және ақ целлюлозамен сипатталады. Бүйректер қыртысы мен миы өзгермеген құрылымға ие болуы керектігінің суреті байқалады. Бауыр өзінің гистологиялық құрылымын орталық көк тамырмен және сәулелі бауыр сәулелерімен сақтауы керектігі суреттеледі. Сондай-ақ, өкпе тінінің қалыпты гистологиялық құрылымы және оларда өзгеріссіз альвеолалармен, әртүрлі көлемдегі бронхтармен және тамырлармен ұсынылған өзгерістер байқалады (сурет 35, А-Д).



А – көкбауыр, Б – бүйрек, В – бауыр, Г – өкпе. Сурет 200 есе үлкейтіліп, гематоксилин және эозинмен бояулары арқылы жасалынды.

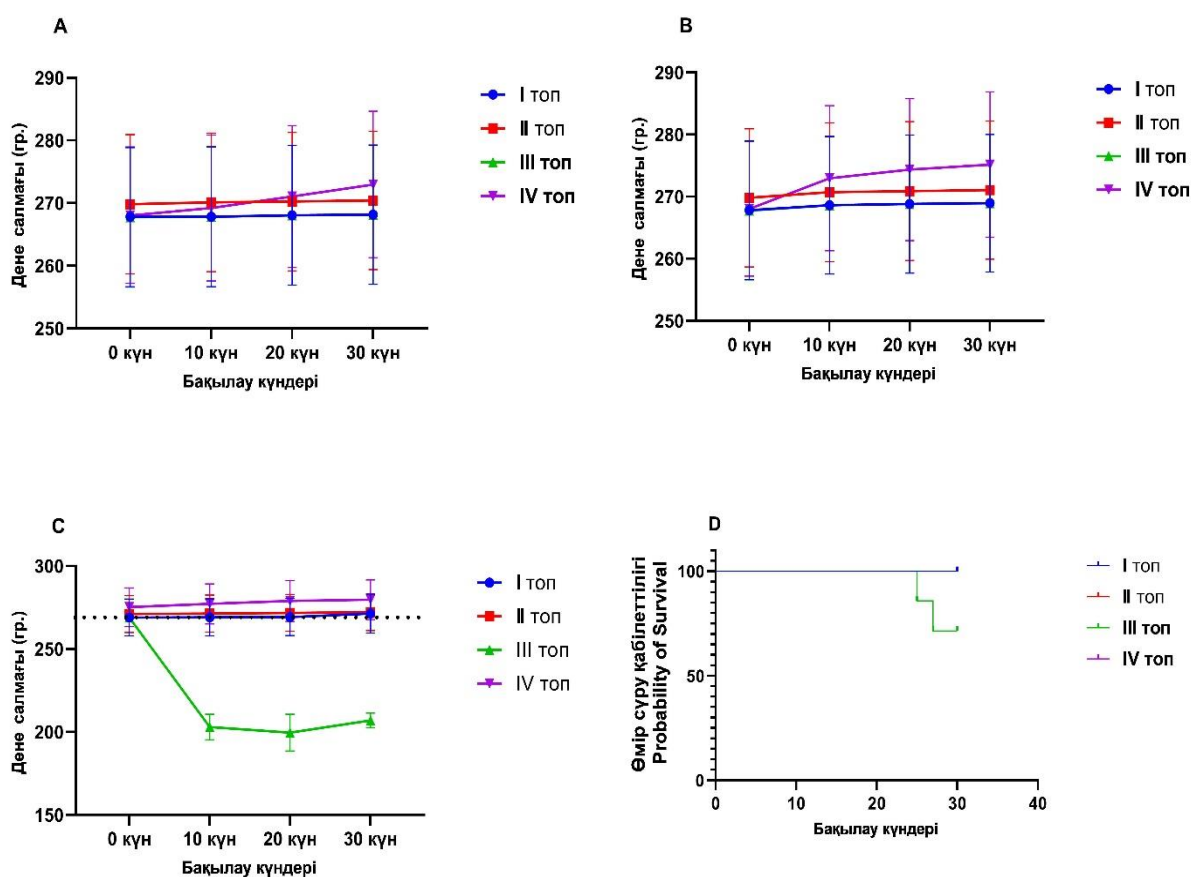
Сурет 35 - Қара мал туберкулезіне қарсы жаңа вакцинаның протективтілік қасиетін ақ тышқандардың гистологиялық әдіспен зерттегендегі IV топтағы сау тышқандар ұлпаларының гистологиялық құрылымы

Осылайша, ақ тышқандарға туберкулездің *M. bovis*-8 уытты штаммымен кеселді әдейі жұқтырғаннан кейінгі эксперименталды және бақылау топтарындағы тышқандардың кейбір органдарының (бауыр, көкбауыр, бүйрек және өкпе) гисто-морфологиялық жағдайын салыстырмалы талдау барысында құрылымдық және функционалдық компоненттерде айтарлықтай морфологиялық айырмашылықтардың болуын көрсетті. Атап айтар болсақ, I, III және IV топтардағы тышқандарды өкпе тіндерінде қан айналымының бұзылуы фонында макрофагтық реакциясы бар өнімді қабыну дамыған. Басқа мүшелерде қоздырғыштың вирулентті қасиеті паренхималық дегенерация және некроз микрофокустары түрінде байқалды. Сонымен қатар жалғыз макрофагтарда анықталды.

Адьювантсыз ірі қара туберкулезіне қарсы кандидат векторлық вакцинамен қосарланған вакцинация (II топ) эксперименталды тышқандардың орган тіндеріндегі деструктивті өзгерістердің ауырлығының төмендеуіне және қалпына келтіру процестерінің жоғарылауына әкелді, бұл кандидаттың айқын қорғаныс әсерін көрсетеді.

Теңіз шошқаларында векторлық вакцинаның қорғаныс қабілетін анықтау

Зерттеудің келесі кезеңінде теңіз шошқаларында вакцина үміткерлерінің қорғаныс тиімділігі анықталды. Теңіз шошқаларындағы протективті тиімділікті бағалау зерттелетін вакцина үлгілерін тері астына енгізу арқылы екі рет иммундау арқылы жүргізілді (1 mL/Ig 6.25 EID₅₀ көлемінде), 21 тәулік аралықпен, содан кейін зерттеудің 42 тәулігіне Жануарлар туберкулездің вирулентті штаммымен 0078-M.bovis-8/RIBSP 1×10^6 КОЕ/жануарлар есебінен жұқтырылды теңіз шошқаларында өлімге әкелетін туберкулез инфекциясын тудыруы мүмкін 1,0 мл физиологиялық ерітіндіде оң жақ шап аймағының терісінің астына енгізілді. Теріс бақылау ретінде физиологиялық ерітінді және бүлінбеген жануарлар тобы қолданылды. Енгізілген зерттеу препараттарының көлемі 1,0 мл (сурет 36).



А) бірінші иммунизациядан кейінгі дене салмағының көрсеткіштері (орташа мән, гр.); В) ревакцинациядан кейінгі дене салмағының көрсеткіштері (орташа мән, гр.); С) вакцинаның протективтілігін анықтау мақсатта туберкулездің M.bovis-8 вирулентті штаммымен кесел жұқтырылғаннан кейінгі дене салмағының көрсеткіштері (орташа мән, гр.); D) туберкулездің M.bovis-8 уытты штаммымен залалдағаннан кейінгі теңіз шошқаларының өміршеңдігін бақылау нәтижелері.

Сурет 36 – Қара мал туберкулезіне қарсы векторлық вакцинаның протективтілік қасиетін теңіз шошқаларында зерттеу нәтижелері

Жануарларды жұқтырғаннан кейін 30 күн бойы дене салмағының динамикасы, туберкулез инфекциясының клиникалық белгілерінің дамуы (летаргия, жүнінің тозуы, дене салмағының төмендеуі), белсенділік деңгейі, тәбетінің төмендеуі талданды, мұнда дене салмағының жылдамдығы эксперименталды топтағы жануарлардың өсуі бір реттік және қосарланған вакцинациядан кейін салыстырмалы бақылау тобымен салыстыруға болатын 6-7 күннен кейін болды. Сонымен бірге оның топаралық айырмашылығы сақталып қана қоймай, бақылау күндерінің соңына дейін өсті. Бұл деректер сынақтан өткен вакцина үміткерлері теңіз шошқаларының дене салмағына теріс әсер етпегендіктен айтарлықтай қызығушылық тудырады.

Топтардың дене салмағы мәндерінің орташа пайыздық ауытқуы үшін стандартты ауытқулар (SD) қате жолақтары ретінде ұсынылған.

Теңіз шошқаларының 0078-*M. bovis*-8/*RIBSP* вирулентті штаммымен инфекциядан кейінгі өмір сүру деңгейі 35-суретте көрсетілген. 0078-*M. bovis*-8/*RIBSP* вирулентті штаммымен жұқтырғаннан кейін теңіз шошқаларының өмір сүру қисықтарының статистикалық талдауы айырмашылықтардың жоғары сенімділігін көрсетті ($P=0.006$ Log rank Test бойынша). Инфекциядан кейінгі теңіз шошқаларының өлу қисықтарын салыстыру зерттелген кандидат вакциналардың ауру жануарлардың өмір сүру ұзақтығына оң әсерін көрсетеді. Инфекциядан кейін 25 және 27 тәулікте бақылау тобында 2 теңіз шошқасы өлді, ал эксперименталды (I және II топтар) және интактілі топтағы (IV топ) жануарлар 100% тірі қалды.

Салыстырмалы бақылау тобындағы теңіз шошқаларында (III топ – физиологиялық ерітінді) инфекциядан кейін инъекция орнында ұлғайған лимфа түйіндері пальпацияланды, ал екі жануарда 25 күннен 27 күнге дейін бақылауда жазылмаған ойық жара пайда болды (сурет 37, Д). Топтағы сегіз шошқаның жоғарыда аталған екі басы өлді, өлім көрсеткіші 30% құрады. Аутопсия кезінде екі теңіз шошқасының да ішкі ағзаларында туберкулездік сипаттағы өзгерістер анықталды. Өкпенің, бауырдың және көкбауырдың бетінде, бір-бірімен біріктірілген жерлерде сұр-сары туберкулездер анықталды. Оң жақ шап лимфа түйіндері мөлшері айтарлықтай ұлғайған, тілік бойынша әдетте кілегейлі ірің бөлінді.

Зерттеудің 30-шы күні сынақтан кейін барлық теңіз шошқалары макроскопиялық және гистологиялық зерттеулер үшін эвтанацияланды. Теңіз шошқаларындағы тәжірибелік туберкулездің ауырлық көрсеткіштері органдардың зақымдану индексімен көрсетілген. Макроскопиялық сурет коллатеральды шап лимфа түйіндерінде спецификалық қабыну ошақтарының болмауымен, сонымен қатар көкбауырдың өкпесінің зақымдану дәрежесінің аз болуымен сипатталды (кесте 26).

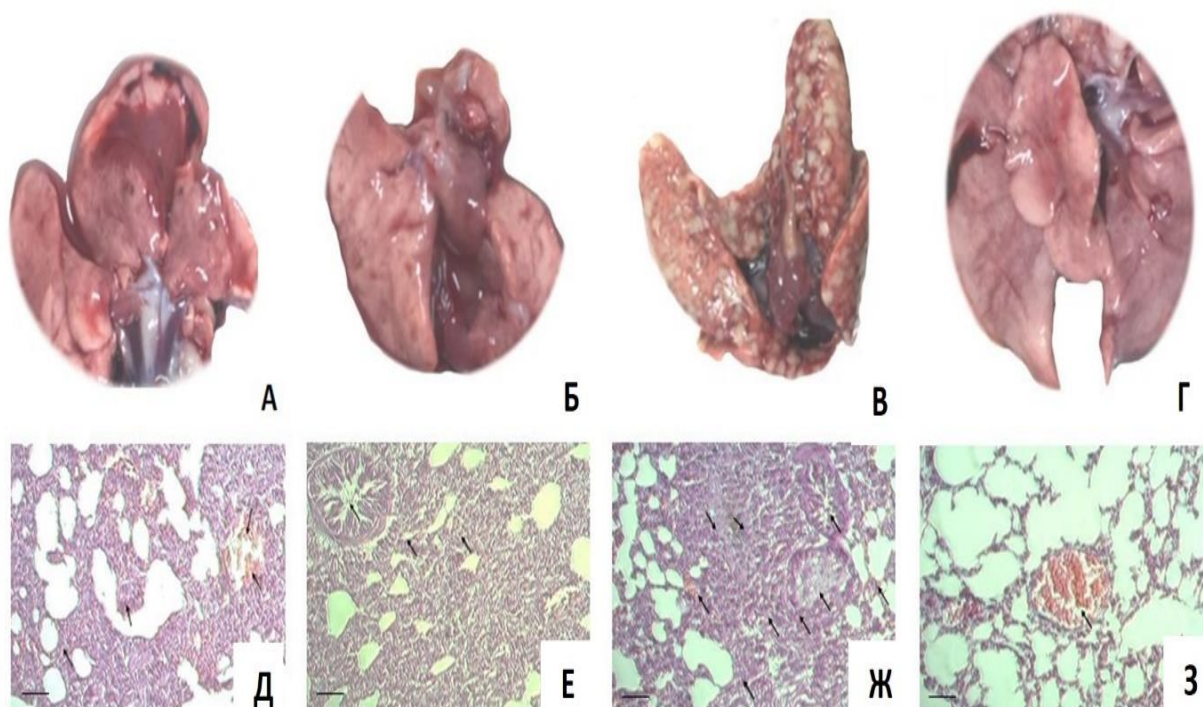
Кесте 26 – Өкпе мен көкбауырдың макроскопиялық зақымдануының индексі

Топтар	Органдардың зақымдану индексі (n=8)		Органдардың зақымдануының жалпы индексі
	Өкпе	Көкбауыр	
I	0,6±0,3	0,25±0,12	0,85

26-кесте жалғасы

II	0,5±0,2	0,25±0,12	0,75
III	3,75±0,12	3,75±0,12	7,5
IV	---	---	---

26-кестедегі мәліметтерден тәжірибелік топтардағы макроскопиялық сурет өкпеде спецификалық қабыну ошақтарының болмауымен (3,75-ке қарсы 0,5-0,6), сондай-ақ көкбауырдағы зақымдану ошақтары - 3,75-ке қарсы 0,25 аз болуымен сипатталғаны анық (37-сурет, а-в). 4-топтағы жануарлардың органдары макроскопиялық өзгерістерсіз қалды, өйткені бұл топтың теңіз шошқалары манипуляциясыз болды (37-сурет, г).



а) өкпедегі жалпы патологияны бағалау үшін жасалынған репрезентативті өкпе фотолары. б) Өкпе тініндегі гистопатологиялық көрініс, сурет 400 есе үлкейтіліп, гематоксилин және эозин бояулары арқылы жасалынды.

Сурет 37 – Ірі қара мал туберкулезіне қарсы векторлық вакцинаның протективтілік қасиетін теңіз шошқаларында зерттеу барысындағы өкпедегі өзгерістердің макроскопиялық және гистопатологиялық көрінісі

Өкпеден гомогенаттың егілуін бағалау салыстырмалы бақылау тобы – 3 топпен салыстырғанда барлық егілген жануарларда микобактериялардың өсуінің айтарлықтай төмендегенін көрсетті (кесте 27).

Гистологиялық талдау өкпе тіндерінде әртүрлі морфологиялық өзгерістерді көрсетті. №1 топ: Бұл топтағы өкпе тінінің құрылымын сақтап, альвеола аралық қалқалардың қалыңдауы және ірі моноклеарлы және көп ядролы жасушалар түрінде ұсынылған макрофагтардың болуы байқалды. Қан тамырларының бітелуі де байқалғанын атап өткен жөн. Бұл өзгерістердің морфологиялық сипаты ошақтылықпен сипатталды (38-сурет, д).

№2 топ: Бұл топта өкпенің альвеола аралық қалқалары жасушалардың көбеюінен қалындаған, спазм салдарынан бронхтың саңылаулары тарылып, бронх айналасында ісінулер байқалған. Микроскопта альвеола аралық қалқаның жасушалық құрамы лимфоциттермен, ірі моноклеарлы жасушалармен және жалғыз эритроциттермен ұсынылған. Қабырғалар да ісіну белгілерін көрсетті (38-сурет, е).

№3 топ: Бұл топтың өкпесінде микронекрозбен бірге жүретін өнімді интерстициальды қабынумен сипатталатын морфологиялық өзгерістер анықталды, олар да ошақты сипатқа ие және қан тамырларының бітелуімен бірге жүреді. Бұл топта бронх эпителийі жоқ, сонымен қатар бронхтардың айналасында ісіну байқалды (38-сурет, г).

№4 топ: Бұл топта өкпе құрылымы сақталған, қан тамырларының бітелуі байқалған (38-сурет, з).

Кесте 27 – *M.bovis*-8 жұқтырған теңіз шошқаларының өкпесінен микобактерияларды бөліп алу

Топтар	Тәжірибе шарттары	Өкпедегі өміршең бактериялардың саны, Lg	Қорғаныс индексі (Lg)
I	Esat-6 және TB10.4 + Montanide Gel	2.27±0.172	+0.2
II	Esat-6 және TB10.4	1.67±0.447	+0.60
III	Физиологиялық ертінді	5.89±0.044	-
IV (инитактты)	---	----	-

1-топта *M.bovis*-8 өсімінің ерекше төмендеуі байқалды ($p < 0,05$); дегенмен, қорғау индексі салыстырмалы түрде төмен болды (+0,2 lg). Бұл ретте 2-топта *M.bovis*-8 изоляциясының айтарлықтай төмендеуі ($p < 0,01$) және сәл жоғары қорғаныс индексі (+0,60 lg) байқалды. Бұл нәтижелер вакцинаға үміткерлердің алдын алу әсерін көрсетеді. 21-кестедегі мәліметтерге сүйене отырып, 3-топта өкпеде *M. bovis*-8 көбейгенін және қорғаныс көрсеткішінің жоқтығын көруге болады.

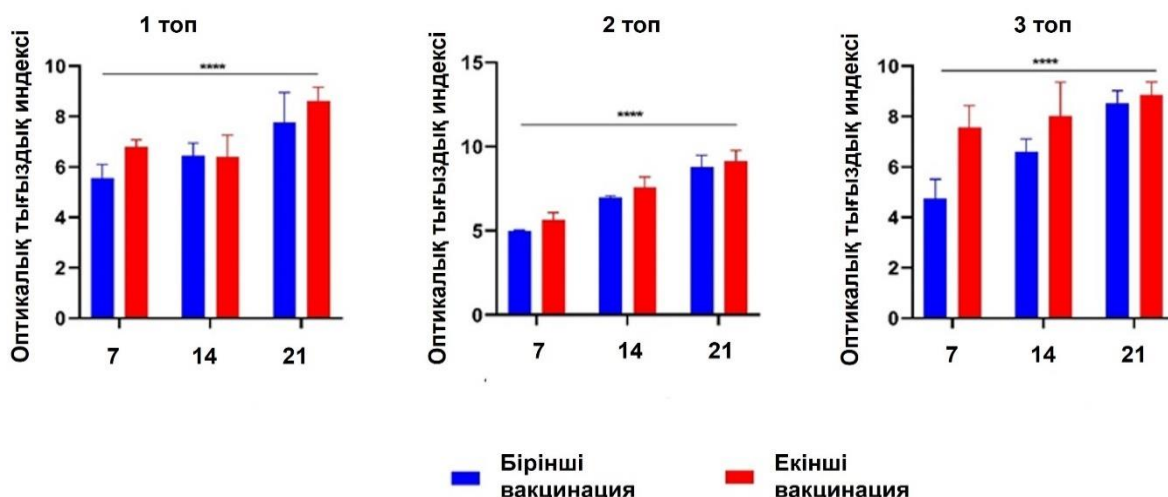
Біздің нәтижелеріміз вакцинаға үміткерлердің екі тұжырымы да қауіпсіз екенін көрсетті: мінез-құлқында ешқандай өзгерістер, жануарлардың өлімі немесе дене салмағының жоғалуы байқалмады. Гистологиялық зерттеулердің деректері, құрамында 15% Montanide Gel адьюванты бар вакцина кандидатымен иммунизацияланған *M. bovis*-8 вирулентті штаммымен жануарларды жұқтыру ішкі органдарда елеулі гистоморфологиялық өзгерістерге әкелмейді деген қорытындыға келуге болады.

T-жасушалық иммундық жауапты, сондай-ақ ірі қара малға арналған векторлық вакцинаның қорғаныс қабілетін анықтау

Алдын алу тиімділігін бағалау сынақ вакцина үлгілерімен қосарланған иммунизациядан кейін (2 мл/л 6,25 EID₅₀ көлемінде) жүргізілді. Осы мақсатта

ірі қара мал 0078-M.bovis-8/RIBSP вирулентті штаммымен 1 мл-ге 1×10^6 КТБ/жануар мөлшерінде жұқтырылды және оң жақ шап аймағының тері астына енгізілді. Инфекциядан кейін жануарларды 30 күн бойы бақылап, келесі көрсеткіштерді бағалады: дене салмағы, дене температурасы, клиникалық белгілердің дамуы, белсенділік деңгейі, тәбетінің төмендеуі. Эвтаназиядан кейін бактериялық жүктеме өкпе гомогенатынан бактериялық культураны бағалау арқылы анықталды (сурет 6).

Ірі қара мал туберкулезіне қарсы векторлық вакцина кандидаттарымен және коммерциялық БЦЖ вакцинасымен қосарланған иммунизациядан кейін Т-жасушалық иммунитетті, IFN γ жасушаларының түзілуін салыстырмалы бағалау жүргізілді, нәтижелер ірі қара малдың сынақ топтары арасында айтарлықтай айырмашылықтарды көрсетті, сонымен қатар IFN γ жасушаларының түзілуінің жоғарылауы. 95% сенімділік интервалымен Dunnett's Multiple Comparisons тестінде IFN γ жасушаларының түзілуін талдау әрбір иммундаудан кейін бақылаудың 7, 14 және 21 күндерінде әрбір топта статистикалық маңызды айырмашылықтарды ($P < 0,0001$) көрсетті (сурет 38). PBS алған теріс бақылау малдарының тобында IFN γ жасушалары ИФА-да анықталған жоқ.



Сурет 38 - Бұзауларды қосарланған вакцинациялау кезінде IFN γ жасушаларының түзілу динамикасы

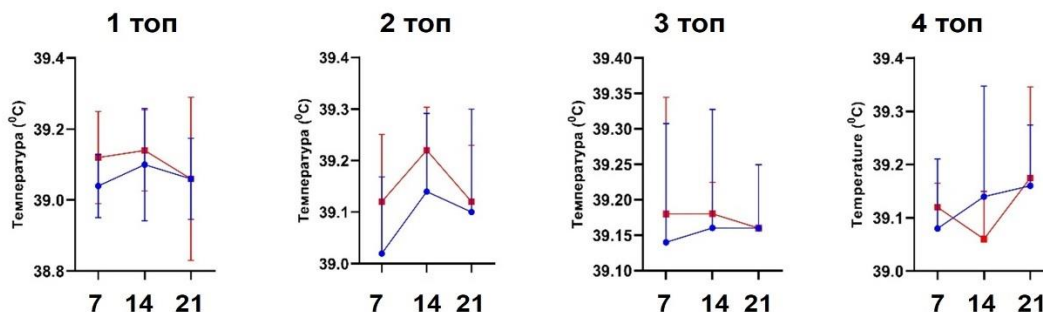
Тері астына енгізу арқылы екі рет иммундаудан кейін зерттелетін вакцина үлгілерінің иммуногендік қасиеттерін зерттеудің жоғарыда келтірілген нәтижелерін қорытындылай келе, антиген мен адьюванттың (A1+3) құрамына қарамастан, зерттелетін вакцина үлгілері және БЦЖ ірі қара малдағы вакцина тұрақты иммунитеттің қалыптасуына себеп болатынын көрсетті.

Вакцинациядан кейін 2-4 аптадан кейін шыңына жететін IFN γ жасушаларының жоғары титрінің қалыптасуы вакцинаның сынақ инфекциясына қарсы қорғаныс тиімділігіне ие екенін дәлелдедік, бұл гистологиялық зерттеулермен расталады.

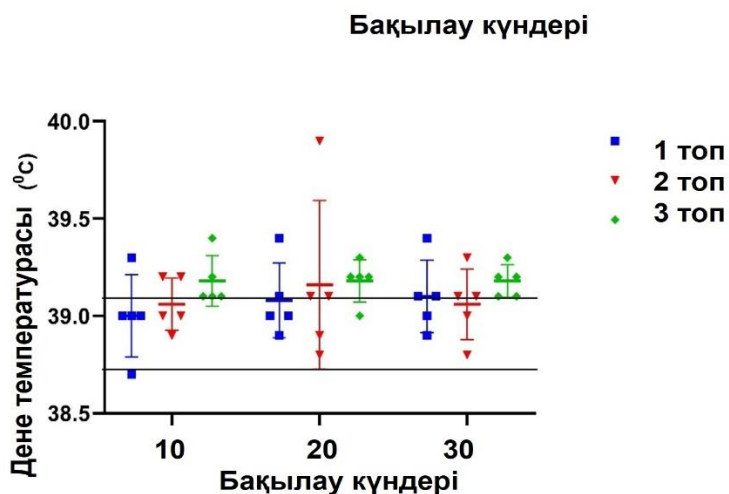
Екі рет егілген ірі қараның M. bovis-8 вирулентті штаммымен инфекцияны бақылау

Зерттелетін кандидаттардың ІҚМ туберкулезіне қарсы векторлық вакцинаны және салыстырмалы бақылау-БЦЖ препаратын әрбір ІҚМ иммундауынан кейінгі жалпы жағдайы 4 және 5-топтағыдай қалыпты болды.

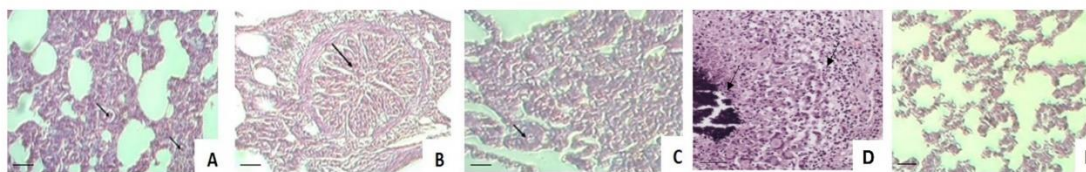
А



Ә



Б



А - қос иммунизациядан кейін ірі қара малдың дене температурасының ауытқуы; Б - вирулентті штаммен жұқтырғаннан кейін ірі қара малдың дене температурасының ауытқуы; В – Өкпенің гистологиясы. А – I топ бұзауының өкпесінің гистологиялық суреті; В – II топ бұзауының өкпесінің гистологиялық суреті; С – III топ бұзауының өкпесінің гистологиялық суреті; D – IV топтағы бұзаудың өкпесінің гистологиялық суреті (бақылау); E – V топтағы бұзаудың өкпесінің гистологиялық суреті (интактілі), қалыпты тін құрылымы.

Сурет 39 - Ірі қара малдың өкпесінің дене температурасының динамикасын және гистологиялық өзгерістерін талдау

Ірі қара малдың бірінші және екінші иммунизациядан кейінгі 0, 7, 14 және 21-ші күндері дене температурасы барлық топтарда қалыпты болды, ерекше ауытқулар байқалмады (сурет 39).

Dunnnett's Multiple Comparisons тестінде 95% сенімділік интервалында оптикалық тығыздық индекстерін (ODI) есептеу арқылы ELISA-да гамма-интерферон IGRA (IFN γ) шығарылуын талдау кезінде бірінші және екінші иммундау арасында статистикалық маңызды айырмашылықтар ($P < 0,0001$) байқалды.

Ірі қара малдың эвтаназиясынан кейін спецификалық қабыну ошақтары жоқ вирулентті штаммның интродукцияланған жері көзбен бағаланды. Жануарлардың аутопсиясынан кейін органдардағы макроскопиялық өзгерістер (шап лимфа түйіндері, бауыр, көкбауыр және өкпе) бағаланды. Ірі қара малдың тәжірибелік сиыр туберкулезінің ауырлық көрсеткіштері мүшелердің зақымдану индексімен көрсетілген. 28-кестеде ішкі ағзалардың макроскопиялық зақымдануының көрсеткіштері берілген.

Кесте 28 - Ішкі мүшелердің макроскопиялық зақымдану көрсеткіші

Топтар	Мүшелердің зақымдану индексі (n=8) орташа мән					Мүшелердің жалпы зақымдану индексі
	Өкпе	Көкбауыр	Бауыр	Шап лимфа түйіндері		
				оң	сол	
I	0,75±0,3	0,25±0,12	0,5±0,3	0,22±0,12	0,21±0,12	1,93±0,3
II	0,5±0,2	0,25±0,12	0,6±0,3	0,25±0,12	0,25±0,12	1,85±0,17
III	0,65±0,2	0,25±0,10	0,5±0,0	0,22±0,12	0,21±0,00	1,83±0,3
IV	1,4±0,5	0,5±0,5	0,5±0,3	0,20±0,2	0,21±0,2	2,81±0,3
V	---	---	---	---	---	---

Зерттелетін үлгілермен қосарланған вакцинациядан кейін ірі қара малдың ағзаларында (өкпе, бауыр, көкбауыр және шап лимфа түйіндері) спецификалық процестің таралуын визуалды бағалау иммунизацияланған барлық жануарларда мүше зақымдануының жалпы индексінің төмендеуін көрсетті. Бесінші топтағы бұзаулардың органдары макроскопиялық өзгерістерсіз қалды, өйткені бұл топтың бұзаулары манипуляциясыз болды.

Вакцинацияланған ірі қара малдың инфекциядан кейінгі дене температурасы бүкіл бақылау кезеңінде негізгі дене температурасының (38,6-сурет) шегінде болды, алайда *M.bovis* вирулентті штаммымен инфекция температураның әртүрлі дәрежеде өзгеруіне әкелді. Оның жоғарылауы инфекциядан кейін 10 күннен 30 күн өткенде ғана тәжірибе топтарында 0,2-0,3⁰C-қа (I-III топтар), ал бақылау тобында 0,2-0,7⁰C-қа (IV топ) байқалды. Инфекцияға дейінгі 3 күндегі дене температурасының орташа мәні 0 нүктесі ретінде қабылданды.

I-топта температураның өзгеруі салыстырмалы түрде аз және тар диапозонда болды. Бұл вакцинаның вирулентті штамға қарсы белгілі бір деңгейде қорғанысты қамтамасыз еткен болуы мүмкін екенін көрсетеді,

өйткені бұзаулардың дене температурасы салыстырмалы түрде тұрақты болып қалды.

2-топта температураның өзгеруі 1-топпен салыстырғанда біршама айқынырақ болды. Дегенмен, температура салыстырмалы түрде тұрақты болып қалды, бұл иммундық жауаптың кейбір деңгейін және ықтимал қорғанысты көрсетеді.

3-топта температураның өзгеруі минималды болды, ал температура барлық бақылау кезеңінде салыстырмалы түрде тұрақты болды. Бұл БЦЖ вакцинасының вирулентті штаммнан тиімді қорғай алатынын көрсетеді, себебі бұзаулардың дене температурасы айтарлықтай өзгермеді.

4-топта температураның өзгеруі вакцинацияланған топтармен салыстырғанда маңыздырақ болды. Бұзаулардың температурасы, әсіресе жұқтырғаннан кейін оныншы және жиырмамыншы күні жоғарылаған. Бұл вакцинацияның болмауы қорғаныстың болмауына әкеліп соқтырады, бұл вирулентті штаммға күшті реакцияға әкеледі.

ІҚМ өкпе тінінің гистологиялық құрылымын талдауға сәйкес І топтағыларда (38-сурет, в) өкпенің құрылымы толығымен сақталғанын көрсетті, жұқа ұсақ тамырлардың пайда болуы түріндегі репаративті процестермен аралық өнімді қабынудың ошақтары байқалады. ІІ топтағы жануарларда өкпе тінінің құрылымы сақталған, өкпенің альвеола аралық қалқалары қалыңдамаған, альвеолалардың саңылауы бос, ісінуден бронх қабырғасы қалыңдаған, спазм салдарынан саңылауы күрт тарылған (38-сурет, в). ІІІ топтағы ірі қара малдың өкпесінің морфологиялық өзгерістері продуктивті интерстициальды қабынумен сипатталды, ол кейбір аймақтарда перде жасушаларының көбеюімен ошақты сипатқа ие болды, ұсақ тамырлы грануляциялық ұлпалар қалыптаса бастады. Өкпенің басқа бөліктерінде макрофагтармен және жаңадан пайда болған жұқа тамырлармен өнімді қабынуға байланысты альвеляр аралық қалқаның қалыңдауы байқалды (38-сурет, в). Өкпенің гистологиялық құрылымы бұзылмаған ірі қара малда ІV топта сақталған. Бронхтардың қабырғалары қалыңдамағанын, эпителий жасушаларының сақталғанын байқауға болады. Қан тамырларының қабырғалары люменде жұқа жалғыз қызыл қан жасушалары. Альвеола аралық қалқалар жұқа, тамырлар құлаған, альвеолалардың саңылауы бос (38-сурет, в).

Гистологиялық зер ттеулерден алынған мәліметтерді талдай отырып, 15% Montanide Gel адьюванты және коммерциялық БЦЖ вакцинасы бар вакцина кандидатымен иммунизацияланған 0078-*M.bovis*-8/*RIBSP* вирулентті штаммымен жануарларды жұқтыру маңызды гистоморфологиялық жағдайға әкелмейді деген қорытындыға келуге болады. Туберкулез моделінің көбеюі вирулентті штаммды енгізу кезінде өкпедегі морфологиялық өзгерістер келесі сипатта болды. Өкпе тіндерінде фокальды сипатқа ие продуктивті, интерстициальды қабыну дамыды. Сонымен қатар, жаңадан пайда болған шағын тамырлармен қалпына келтіру процестері көрініс тапты.

Адьювантсыз вакцинаға кандидатпен иммунизацияланған ірі қара малдың өкпесіндегі гистоморфологиялық өзгерістерді талдау өкпенің

гистологиялық құрылымының бұзылмағанын көрсетті, оларда жануарлардың жалпы жағдайына әсер етпейтін және жұқпалы емес аз ғана өзгерістер бар.

4-ші топтағы бұзаулар өкпе туберкулезі инфекциясының тән гистологиялық өзгерістерін көрсетті, оның ішінде талшықты инкапсуляциямен шектелген көп ошақты некротикалық аймақтар. Казеозды некрозда ядролардың қалдықтары байқалды және аздаған нейтрофилдер мен плазмалық жасушалардан басқа лимфоциттердің, эпителиоидты жасушалардың, макрофагтардың және шашыраңқыланған жасушаларының орташа санының тығыз жинақталуын қамтитын гранулематозды қабыну реакциясымен қоршалған. 5-топтағы бұзаулардың өкпе құрылымы қан тамырларының қалыпты екенін көрсетті, өйткені бұл топтағы бұзаулар ешқандай манипуляциясыз таза болып қалды.

0078-*M.bovis-8/RIBSP* вирулентті штаммымен жұқтырылған ІҚМ эвтаназиясынан кейін жүргізілген өкпеден микобактерия егу нәтижелерін бағалау (30 күннен кейін.), бақылау тобымен салыстырғанда барлық вакцинацияланған жануарларда микобактериялардың өсуінің айтарлықтай төмендегенін көрсетті – 4-топ (кесте 29).

Кесте 29 - *M.bovis-8* жұқтырған ірі қара малдың өкпесінен микобактериялардың бөлінуі

Топтар	Өкпедегі өміршең бактериялардың саны Lg	Қорғаныс индексі (Lg)
I	2.0±0.10	+0.2
II	1.87±0.40	+0.50
III	2.2±0.12	+0.30
IV (control)	5.00±0.043	-
V(intact)	----	қолданылмайды

Ірі қара малды кандидаттық вакциналардың зерттелген үлгілерімен және БЦЖ вакцинасымен имундау PBS алған бақылау тобымен салыстырғанда инфекциядан қорғаныш тиімділігін қамтамасыз етті.

Біздің нәтижелеріміз вакцинаға үміткерлердің екі тұжырымы да қауіпсіз екенін көрсетті: мінез-құлқында ешқандай өзгерістер, жануарлардың өлімі немесе дене салмағының жоғалуы байқалмады. Гистологиялық зерттеулердің деректері 15% Montanide Gel адьюванты және коммерциялық БЦЖ вакцинасы бар вакцина кандидатымен имунизацияланған *M. bovis-8* вирулентті штаммымен жануарларды жұқтыру ішкі органдарда елеулі гистоморфологиялық өзгерістерге әкелмейді деген қорытындыға келуге болады. Адьювантсыз вакцинаға кандидатпен имунизацияланған ірі қара малдың ішкі мүшелеріндегі гистоморфологиялық өзгерістерді талдау ішкі ағзалардың гистологиялық құрылымының бұзылмағанын, оларда жануарлардың жалпы жағдайына әсер етпейтін, тек шамалы өзгерістері бар екенін көрсетті. жұқпалы табиғат.

3.4 Векторлық вакцинаның қауіпсіздігі мен иммуногенділігіне мекемеішілік комиссиялық сынақ жүргізу

Өнідірлген векторлық вакцина тәжірибелік сериясының қауіпсіздігі мен иммуногенділігіне мекемеішілік комиссиялық сынақтар жүргізілді (12.08.2022 ж. № 468-Ө бұйрық).

Комиссиялық сынаққа байланысты келесі құжаттар рәсімделді:

- СТ 405-1919-04 ГП-146–2023 ұйым стандартына сәйкестігіне институт директорының 2022 жылғы 8 желтоқсанда бекіткен вакцинаны комиссиялық сынақтан өткізу бағдарламасы (ҚОСЫМША В);

- Институт директорының 2022 жылғы 8 желтоқсандағы бұйрығымен бекітілген Ірі қара мал туберкулезінің профилактикасы бойынша векторлық вакцинаны комиссиялық сынақтан өткізу туралы есеп.

СТ 405-1919-04 ГП-146–2023 ұйым стандартына сәйкестігіне ірі қара малдың туберкулезінің профилактикасы бойынша векторлық вакцинаның комиссиялық сынақтарының нәтижесінде мыналар анықталды:

- тәжірибелік - вакцинаның өнеркәсіптік сериясы СТ 405-1919-04 GP-146–2023, серия №1 ампулада бөгде заттардан және зеңнен таза сыртқы түрі құрғақ, ұсақ кеуекті сұрғылт ақ түсті таблеткалар түрінде болады. Еріткіші бар ампулалар борпылдақ тұнбалары бар мөлдір сұйықтыққа ұқсайды. Шайқағаннан кейін ақшыл-сұр түсті біртекті суспензия пайда болды;

- Сыналған ампулалардағы ауаның сиректеу дәрежесін (вакуумның болуы) анықтау кезінде қысым мәніне (вакуумдық тереңдік) байланысты газдардың күлгін-көгілдір жарқырауы байқалды. СТ 405-1919-04 ГП-146–2023 ұйым стандартына сәйкес келеді;

- Ресуспензия уақытын (ерігіштігін) анықтау нәтижелері бойынша вакцинаның ерігіштігі 37,6 секундты құрады, бұл СТ 405-1919-04 ГП-146–2023 ұйым стандартына сәйкес келеді;

- вакцинаның сутегі иондарының концентрациясы (рН) $7,1 \pm 0,000219$;

- вакцина ылғалдылығының массалық үлесі 2,1% құрады, бұл СТ 405-1919-04 ГП-146–2023 ұйым стандартына сәйкес келеді;

- стерильділік бойынша вакцина СТ 405-1919-04 ГП-146–2023 көрсетілген ГОСТ 28085-2013 талаптарына сәйкес келеді;

- Зерттелетін вакцинаның биологиялық белсенділігі сәйкесінше 6,28 IgEID50/см3 болды.

- Вакцинаның қауіпсіздігін анықтау нәтижелері бойынша зерттеудің бүкіл кезеңінде барлық тәжірибелік жануарлар клиникалық сау болып қалды, салмағын жоғалтпады, улану белгілері байқалмады. Жануарлардың өлімі тіркелген жоқ. Зерттелетін вакцина зиянсыз;

- Сиыр IFN γ бар микропланшеттегі ферменттік иммуносорбентті талдауда бұзау қан сарысуының иммуногенділігін, Т-жасушалық иммунитетін анықтау нәтижелері бойынша 450 нм толқын ұзындығында өлшенген кезде зерттелетін үлгілердің оптикалық тығыздығы теріс бақылау (OD = 0,130) және оң бақылау мәнінен (OD = 2,0) жоғары болды. Вакцина иммуногенді және ұйым стандартының талаптарына сәйкес келеді.

Сынақ нәтижесінде «Ірі қара мал туберкулезіне қарсы векторлық вакцина» ветеринариялық препараты СТ 405-1919-04 ГП-146–2023 көрсетілген барлық талаптарға сай екені анықталды.

3.5 Ірі қара малға туберкулезге қарсы векторлық вакцинаны қолданудың оңтайлы әдісін таңдау

Ірі қара малға туберкулезге қарсы векторлық вакцинаны қолданудың оңтайлы әдісін таңдау бойынша зерттеулер туберкулезге бейім жануарларға (теңіз шошқалары мен ірі қара мал) жүргізілді.

Ірі қара малға векторлық вакцинаны қолданудың оңтайлы әдісін жасау мақсатында ірі қара малға оңтайлы иммундау режимін анықтау, сондай-ақ векторлық вакцинаның оңтайлы иммундау дозасын анықтау үшін ірі қара малға зерттеулер жүргізілді. Бұл мақсатқа жету үшін рандомизация әдісімен екі жыныстағы бұзаулардың эксперименталды топтары құрылды.

3.5.1 Ірі қара малды туберкулезге қарсы векторлық вакцинамен иммунизациялаудың оңтайлы режимі

Ірі қара малды векторлық вакцинамен иммунизациялаудың оңтайлы режимін таңдау үшін 31-кестеге сәйкес бұзауларға екі рет иммундау жүргізілді. Зерттеу кезінде төлдердің жалпы жағдайы: жемшөп пен суды тұтыну, шырышты қабықтардың жағдайы, мінез-құлық реакциялары, қозғалыс белсенділігі және төлдердің дене температурасының динамикасы тіркелді. Иммунизацияның оңтайлы әдісін таңдағаннан кейін IFN γ жасушаларының түзілуін бағалау үшін әрбір вакцинациядан кейін 7, 14 және 21-ші күндері қан үлгілері алынды.

Кесте 30 - Векторлық вакцинамен иммундау режимін таңдау бойынша бұзаулар үшін құрылған тәжірибелік топтардың сипаттамасы

Топ нөмірі	Зерттелетін препараттың атауы	Енгізу әдісі	Доза/мл
1	Montanide Gel адьюванты жоқ векторлық вакцина	тері астына	2,0 мл
2	Montanide Gel адьюванты жоқ векторлық вакцина	тері ішілік	2,0 мл
3	Montanide Gel адьювантты векторлық вакцина	тері астына	2,0 мл
4	Montanide Gel адьювантты векторлық вакцина	тері ішілік	2,0 мл
5	Физиологиялық ерітінді	тері ішілік	2,0 мл
6	БФР бар Montanide Gel	тері ішілік	2,0 мл

Нәтижесінде екі енгізу әдісімен екі рет иммундау 10 күндік бақылау кезінде бұзаулардың жалпы жағдайына әсер етпеді. Жануарлардың тіршілігін бақылау кезінде бұзаулардың өлімі тіркелген жоқ.

95% сенімділік аралығындағы Dunnett ' s Multiple Comparisons test-тегі IFN γ жасушаларының түзілуін талдау әрбір иммундаудан кейін 7,14 және 21 күндік бақылауда әр топта статистикалық маңызды айырмашылықтарды

($p < 0,0001$) көрсетті. Тері ішіне енгізу әдісімен вакцина алған бұзауларда тері астына егілген бұзаулармен салыстырғанда IFN γ жасушаларының жоғары өндірісі байқалады. Физиологиялық ерітіндімен және БФР бар Montanide Gel-мен емделген теріс бақылау бұзауларында ИФА-дағы IFN γ жасушалары анықталған жоқ.

Ірі қара малды векторлық вакцинамен иммундаудың оңтайлы режимін анықтау нәтижесінде вакцинаны енгізудің тері ішілік әдісімен екі рет иммундау бұзауларда иммундық жауаптың қалыптасуын қамтамасыз ететіні анықталды.

3.5.2 Ірі қара малға арналған векторлық туберкулезге қарсы вакцинаның оңтайлы иммундау дозасын анықтау

Ірі қара малды иммундау үшін векторлық вакцинаның оңтайлы иммундау дозасын анықтау жұмыстары жүргізілді. Бұзаулар 4 топқа ($n=1$ бас/топ) бөлініп, 1 мл, 2 мл, 4 мл және 5 мл көлемінде векторлық вакцинамен екі рет егілді. Жасушалық жауаптың қалыптасуының тиімділігін анықтау үшін қан сарысулары 0, 14, 21 және 42-ші күндері барлық топтарда талданды.

Бұзауларды әртүрлі дозалармен екі рет вакцинациялаудан кейін Т-жасушалық иммунитетті салыстырмалы бағалау бұзаулардың сынақ топтары арасында шамалы айырмашылықтарды көрсетті. IFN γ ең төменгі концентрациясын 1 мл вакцинамен өңделген топ көрсетті.

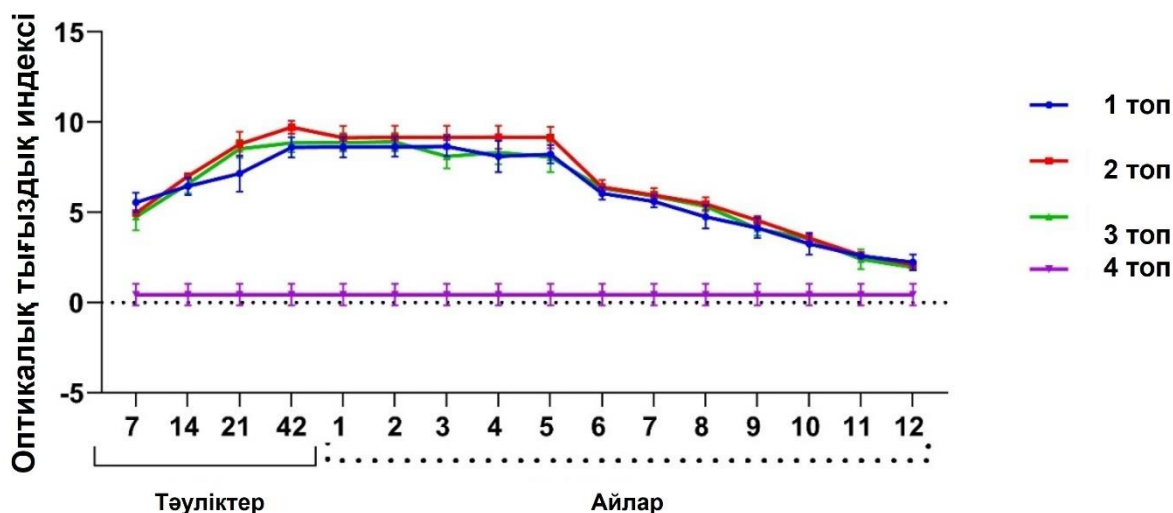
Сиыр туберкулезіне қарсы векторлық вакцина бар ірі қара малға ең тиімді иммундау дозасын анықтау бойынша зерттеулер оңтайлы доза 2 мл екенін көрсетті. IFN γ түзілу бойынша бұзауларға арналған 2 мл вакцина дозасының көрсеткіштері вакцинаның басқа дозаларымен салыстырғанда ең жоғары болып шықты. 2 мл дозада сиыр туберкулезіне қарсы векторлық вакцинаны қолданып бұзауларды иммундау кезінде 21 және 42-ші күндері IFN γ жасушаларының белсенді түзілуімен жануарларда иммундық жауапты индукциялайды.

3.5.3 Вакцинациядан кейін ірі қара малдың қорғаныш иммунды жауап беру мерзімі мен ұзақтығын анықтау

Иммуногенділік пен иммунитеттің ұзақтығын зерттеу үшін жануарларға 21 күн аралықпен сынама үлгілерін тері ішіне енгізу арқылы (2 мл/л 6,25 EID₅₀ көлемінде) екі рет егілді. Содан кейін зерттеудің 7, 14 және 21-ші күндері әрбір вакцинациядан кейін стандартты ИФА әдістерін қолдана отырып, Т-жасушалық иммунитетті (IFN γ жасушалары) бағалау үшін ірі қара малдың мойын венасынан қан алынды. Бірінші егуден кейін 42-ші күні туберкулездің M.bovis-8 вирусты штаммымен инфекция жүргізілді. Бағалау үшін IFN γ жасушаларының түзілу динамикасын анықтау үшін жыл бойына ай сайын қан үлгілері алынды.

Алдын алу тиімділігін бағалау сынақ вакцина үлгілерімен қосарланған иммунизациядан кейін (2 мл/л 6,25 EID₅₀ көлемінде) жүргізілді. Ол үшін ірі қара малды 0078-M. bovis-8/ribsp вирулентті штаммымен жұқтырды, 1 мл-де

1=106 CFU/Жануарлар оң жақ шап аймағының терісінің астына енгізілді. 1 - 6 және 12 ай бойы инфекциядан кейін әр топтан бір бұзау эвтанацияланды және жасушалық иммунитеттің қалыптасуы мен қоздырғыштан қорғану арасындағы корреляцияның салыстырмалы талдауы үшін бактериалды және гистологиялық зерттеу жүргізілді (4сурет 40).



Сурет 40 – 12 айдағы бұзаулардың вакцинациядан кейінгі иммунитетінің қарқындылығы

Ірі қара малда вакцинациядан кейінгі иммунитеттің қарқындылығы векторлық вакцина мен салыстырмалы бақылау – БЦЖ арасында бірдей болмады.

40-суреттен көрініп тұрғандай, зерттелетін ірі қара туберкулезіне қарсы кандидаттық вакциналар олардың иммуногендік сипаттамаларында (интерферон-гамма өндірісі) айырмашылықтарды көрсетеді, бұл алюминий гидроксидінің әсерімен байланысты болуы мүмкін. Бұл вакцинаның арнайы адьюванты иммуногендікті катализдейді және ІҚМ-дың иммундық реакциясына кедергі келтіруі/тежеуі мүмкін. Адьювантты вакцина бесінші айда интерферон гаммасының ең жоғары концентрациясын көрсетеді, ал адьювантты вакцина салыстырмалы түрде төмен концентрациясын көрсетеді. Тұтастай алғанда, екі вакцинаға үміткер де иммундық жауап мүмкіндіктерін және БЦЖ вакцинасының (№III топ) салыстырмалы ұзақтығын көрсетеді.

Біздің нәтижелеріміз вакцинаға үміткерлердің екі тұжырымы да қауіпсіз екенін көрсетті: мінез-құлқында ешқандай өзгерістер, жануарлардың өлімі немесе дене салмағының жоғалуы байқалмады. Гистологиялық зерттеулердің деректері 15% Montanide Gel адьюванты және коммерциялық БЦЖ вакцинасы бар вакцина кандидатымен иммунизацияланған *M. bovis*-8 вирулентті штаммымен жануарларды жұқтыру ішкі органдарда елеулі гистоморфологиялық өзгерістерге әкелмейді деген қорытындыға келуге болады. Адьювантсыз вакцинаға кандидатпен иммунизацияланған ірі қара малдың ішкі мүшелеріндегі гистоморфологиялық өзгерістерді талдау ішкі

ағзалардың гистологиялық құрылымының бұзылмағанын, оларда жануарлардың жалпы жағдайына әсер етпейтін, тек шамалы өзгерістері бар екенін көрсетті.

Туберкулезге қарсы *M. bovis* вакцина-кандидаттарының иммуногендік қасиеттерінің тиімділігіне жүргізілген салыстырмалы талдау нәтижесінде ІҚМ-де оптикалық тығыздық индекстерін (ODI) есептеу бойынша ИФА-ға IFN γ максималды шығарылуы байқалды, ол вакцинациядан кейін 21 тәулікке бірдей келеді. IFN γ шығарылымының шыңы 42 күнде жетті. Статистикалық маңызды айырмашылықтар 21-ден 5-ке дейінгі аралықтағы топтарды көрсетті зерттеу айлары ($p \leq 0,000001$). Алайда, босату IFN γ вакцинациядан кейінгі 7 айдан бастап барлық үш топта бірдей деңгейде сақталды.

Вакцинациядан кейін 2-4 аптадан кейін шыңына жететін IFN γ жасушаларының жоғары титрінің қалыптасуы сынақтан қорғайтын вакцина тиімділігіне ие екендігі дәлелденді [53-56]. Вакцинацияның қорғаныш тиімділігін зерттейтін ұқсас зерттеулер IFN γ арқылы IFN γ жасушаларының төменгі титрлерін шығару *M. bovis* инфекциясынан кейін қорғаныстың төмен деңгейіне әкелетінін дәлелдейді [57-59].

Әдебиеттерден БЦЖ вакцинасының қорғаныш тиімділігі *M. bovis* инфекциясынан кейін ELISA әдісімен өлшенген босатылған ESAT-6-спецификалық IFN γ жасушаларының санымен корреляцияланғаны белгілі [59]. Ірі қара малында БЦЖ коммерциялық вакцинасымен иммунизацияланған 0078-*M. Bovis*-8/RIBSP вирулентті штаммымен жануарларды жұқтырғаннан кейінгі қорғаныс тиімділігінің деректері, сондай-ақ құрамында 15% montanide GEL адьюванты бар вакциналық кандидат алған ірі қара мал сияқты өкпенің шамалы гистоморфологиялық өзгерістеріне әкелді. Адьюванты жоқ вакциналық кандидатпен иммундалған ІҚМ өкпесінің гистоморфологиялық өзгерістері өкпенің гистологиялық құрылымы бұзылмағанын, тек жануарлардың жалпы жағдайына әсер етпейтін және жұқпалы емес елеулі өзгерістерге ие екенін көрсетті.

Біздің нәтижелер ІҚМ туберкулезіне қарсы зерттелетін векторлық вакцина-кандидаттың протективті тиімділігін көрсетті, ірі қара қанындағы IFN γ жасушаларының белсенді түзілуінің төмендеуіне қарамастан, зерттеудің 6 айынан кейін иммунитет 12 ай бойы сақталады және иммундық жауаптың мүмкіндіктерін және оның БЦЖ вакцинасынан кем түспейтін ұзақтығын көрсетеді. Жүргізілген зерттеулердің нәтижелері басқа зерттеулермен кешенді түрде осы препаратты Қазақстан Республикасының аумағында ІҚМ туберкулезін жою үшін ұсынуға мүмкіндік берді.

ҚОРЫТЫНДЫ

1. Кері генетика әдісін пайдалана отырып, *M. bovis* Esat-6 және TB10.4 ақуыздарын экспрессиялайтын генетикалық тұрақты рекомбинантты тұмау вирусының штаммдары құрастырылды. Екі рекомбинанттық вирустың құрамы A/PR/8/34(H1N1) штаммы (PB2, PB1, PA, NP және химерикалық NS1 гендері) және A/Астана/6/05 штаммы (беткі антигендер HA, NA және M гендері) гендерінен тұрады.

2. Әзірленген тұмау векторының қауіпсіздігі, иммуногенділігі және қорғаныстық қабілеті зертханалық жануарларға жүргізіліп, нәтижесінде ірі қара малға арналған туберкулезге қарсы вакцина үміткерлерінің үлгілері таңдалды: 1) ESAT-6 және TB10.4 иммунодоминантты ақуыздарын кодтайтын тұмау векторы + Montanide Gel адьюванты (көлемі - 1,0 мл, енгізу әдісі - тері астына); 2) ESAT-6 және TB10.4 иммунодоминантты ақуыздарын кодтайтын тұмау векторы (көлемі – 1,0 мл, енгізу жолы – тері астына).

3. Тұмау векторы негізінде туберкулезге қарсы векторлық вакцинаны өндіру технологиясы әзірленді. Тауық эмбриондарында рекомбинантты вирустарды өсірудің келесі оңтайлы параметрлері пысықталды: жұқтыру дозасы – 1000-10000 EID₅₀; ТЭ жасы – 10 күн; инкубациялау температурасы – 37 °С; инкубациялау мерзімі – 48 сағат. Рекомбинанттық вирусты өсірудің оңтайлы параметрлерінің негізінде өндірілген биомассасының инфекциялық белсенділігі 8,87+ 0,22 lg EID₅₀/мл көрсетті. Вакцинаның қорғаныстық ортасы таңдалды және ІҚМ туберкулезіне қарсы векторлық вакцинаның тәжірибелік сериясы дайындалды.

4. ІҚМ туберкулезіне қарсы векторлық вакцинаны қолданудың оңтайлы әдісі әзірленді. Бұзауларға тері ішіне енгізу арқылы 2 мл/ lg 6,25 EID₅₀ көлемінде 21 күн аралықпен екі реттік вакцинация таңдалды. Бұл иммундау режимі егілген бұзауларда 12 ай бойы (бақылау кезеңі) қарқынды иммунитетті қамтамасыз етті.

5. Вакцинаға үш негізгі құжаттан тұратын нормативтік-техникалық құжаттама әзірленді: 1) Ірі қара мал туберкулезіне қарсы векторлық вакцинаны өндіру және бақылау жөніндегі нұсқаулық; 2) вакцинаның сапасын бақылауға арналған ұйым стандарты (СТ 405-1919-04 ГП-146-2023); 3) вакцинаны қолдану нұсқаулығы.

6. ҚР ДСМ БҚПҒЗИ бас директорының № 468-Ө (08.12.2022 ж.) бұйрығына сәйкес ІҚМ туберкулезіне қарсы векторлық вакцинаның қауіпсіздігіне, иммуногенділігіне және физикалық-биологиялық көрсеткіштеріне мекемеішілік комиссиялық сынақтар жүргізілді. Сынақтар векторлық вакцина СТ 405-1919-04 ГП-146–2023 көрсетілген барлық талаптарға сәйкес келетінін және зиянсыз және иммуногенді екенін көрсетті.

ПАЙДАЛАНЫЛҒАН ӘДБИЕТТЕР ТІЗІМІ

1. Ahmed K.R., Gunapati B., Noelin Ch.M., Ananthi R., Radhika K., Soumya S., Kannan P. A review on bovine tuberculosis in India // *Tuberculosis (Edinb)*. – 2020. – Vol. 122. – P. 101923. – DOI: 10.1016/j.tube.2020.101923.
2. Barandiaran S., Martínez Vivot M., Pérez A.M., Cataldi A.A., Zumárraga M.J. Bovine tuberculosis in domestic pigs: Genotyping and distribution of isolates in Argentina // *Res Vet Sci*. – 2015. – Vol. 103. – P. 44-50. – DOI: 10.1016/j.rvsc.2015.09.013.
3. Cardoso T.F., Luque I., Carrasco L., Jurado M.F., Rivalde M.Á., Venteo Á., Infantes L.J., Bezos J., Rueda P., Tapia I., et al. Evaluation of five serologic assays for bovine tuberculosis surveillance in domestic free-range pigs from southern Spain // *Prev Vet Med*. – 2017. – Vol. 137. – P. 101-104. – DOI: 10.1016/j.prevetmed.2016.12.016.
4. Ghebremariam M.K., Michel A.L., Vernooij J.C., Nielen M., Rutten V.P. Prevalence of bovine tuberculosis in cattle, goats, and camels of traditional livestock raising communities in Eritrea // *BMC Vet Res*. – 2018. – Vol. 14. – P. 73. – DOI: 10.1186/s12917-018-1397-0.
5. Gumi B., Schelling E., Firdessa R., Erenso G., Biffa D., Aseffa A., et al. Low prevalence of bovine tuberculosis in Somali pastoral livestock, southeast Ethiopia // *Trop Anim Health Prod*. – 2012. – Vol. 44. – P. 1445-1450. – DOI: 10.1007/s11250-012-0085-5.
6. Guta S., Casal J., Napp S., Saez J.L., Garcia S.A., Perez V.B., et al. Epidemiological investigation of bovine tuberculosis herd breakdowns in Spain 2009/2011 // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9. – P. 104383. – DOI: 10.1371/journal.pone.0104383.
7. Vercauteren K.C., Lavelle M.J., Campa H. Persistent Spillback of Bovine Tuberculosis From White-Tailed Deer to Cattle in Michigan, USA: Status, Strategies, and Needs // *Front Vet Sci*. – 2018. – Vol. 5. – P. 301. – DOI: 10.3389/fvets.2018.00301.
8. Buddle B.M., Mackintosh C.G. Improving the diagnosis of bovine tuberculosis in farmed deer // *Vet Rec*. – 2017. – Vol. 180. – P. 66-67. – DOI: 10.1136/vr.j270.
9. Nugent G., Gortazar C., Knowles G. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* in wild deer and feral pigs and their roles in the establishment and spread of bovine tuberculosis in New Zealand wildlife // *N Z Vet J*. – 2015. – Vol. 63. – P. 54-67. – DOI: 10.1080/00480169.2014.963792.
10. Busch F., Bannerman F., Liggett S., Griffin F., Clarke J., Lyashchenko K.P., Rhodes S. Control of bovine tuberculosis in a farmed red deer herd in England // *Vet Rec*. – 2017. – Vol. 180. – P. 68. – DOI: 10.1136/vr.103930.
11. Wobeser G. Bovine tuberculosis in Canadian wildlife: an updated history // *Can Vet J*. – 2009. – Vol. 50. – P. 1169-1176.

12. Lipiec M., Nowakowski K., Radulski Ł., Iwaniak W., Ważna A. Badgers as a potential source of bovine tuberculosis – first studies in Poland // *Ann Agric Environ Med.* – 2018. – Vol. 25. – P. 409-410. – DOI: 10.26444/aaem/80984.
13. Atkins P.J., Robinson P.A. Bovine tuberculosis and badgers in Britain: relevance of the past // *Epidemiol Infect.* – 2013. – Vol. 141. – P. 1437-1444. – DOI: 10.1017/S095026881200297X.
14. Brooks P.E., Wood J.L. Eliminating bovine tuberculosis in cattle and badgers: insight from a dynamic model // *Proc Biol Sci.* – 2015. – Vol. 282. – Article 20150374. – DOI: 10.1098/rspb.2015.0374.
15. Starnes A., Wood A. Bovine TB in camelids // *Vet Rec.* – 2007. – Vol. 160. – P. 416. – DOI: 10.1136/vr.160.12.416.
16. Lorenzo J.A., Whitehead C.E., Moreno I., Bezos J., Roy A., Domínguez L., et al. Development and evaluation of a serological assay for the diagnosis of tuberculosis in alpacas and llamas // *Front Vet Sci.* – 2018. – Vol. 5. – P. 189. – DOI: 10.3389/fvets.2018.00189.
17. Zanolari P., Robert N., Lyashchenko K.P., Pfyffer G.E., Greenwald R., Esfandiari J., et al. Tuberculosis caused by *Mycobacterium microti* in South American camelids // *J Vet Intern Med.* – 2009. – Vol. 23. – P. 1266-1272. – DOI: 10.1111/j.1939-1676.2009.0377.x.
18. Rhodes S., Holder T., Clifford D., Dexter I., Brewer J., Smith N., et al. Evaluation of gamma interferon and antibody tuberculosis tests in alpacas // *Clin Vaccine Immunol.* – 2012. – Vol. 19. – P. 1677-1683. – DOI: 10.1128/CVI.00405-12.
19. Valcheva V., Perea C., Savova-Lalkovska T., Dimitrova A., Radulski L., Mokrousov I., et al. *Mycobacterium bovis* and *M. caprae* in Bulgaria: insight into transmission and phylogeography gained through whole-genome sequencing // *BMC Vet Res.* – 2022. – Vol. 18(1). – Article 148. – DOI: 10.1186/s12917-022-03249-w.
20. Borna M., Salome D., Silvia A., Jan H., Cláudio J.M., Sven D.C., et al. Zoonotic *Mycobacterium bovis*-induced tuberculosis in humans // *Emerg Infect Dis.* – 2013. – Vol. 19. – P. 899-908. – DOI: 10.3201/eid1906.120543.
21. Cosivi O., Grange J.M., Daborn C.J., Raviglione M.C., Fujikura T., Cousins D., et al. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries // *Emerg Infect Dis.* – 1998. – Vol. 4. – P. 59–70. – DOI: 10.3201/eid0401.980108.
22. Ayele W.Y., Neill S.D., Zinsstag J., Weiss M.G., Pavlik I. Bovine tuberculosis: an old disease but a new threat to Africa // *Int J Tuberc Lung Dis.* – 2004. – Vol. 8. – P. 924–937.
23. Ocepek M., Pate M., Zolnir D.M., Poljak M. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from human to cattle // *J Clin Microbiol.* – 2005. – Vol. 43. – P. 3555–3557. – DOI: 10.1128/JCM.43.7.3555-3557.2005.
24. Good M., Duignan A. Perspectives on the history of bovine TB and the role of tuberculin in bovine TB eradication // *Vet Med Int.* – 2011. – Vol. 17. – Article 410470. – DOI: 10.4061/2011/410470.

25. Hewinson R.G., Vordermeier H.M., Smith N.H., Gordon S.V. Recent advances in our knowledge of *Mycobacterium bovis*: a feeling for the organism // *Vet Microbiol.* – 2006. – Vol. 112. – P. 127-139. – DOI: 10.1016/j.vetmic.2005.11.050.
26. Domingo M., Vidal E., Marco A. Pathology of bovine tuberculosis // *Res Vet Sci.* – 2014. – Vol. 97. – P. 20-29. – DOI: 10.1016/j.rvsc.2014.03.017.
27. Kantor I.N., LoBue P.A., Thoen C.O. Human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in the United States, Latin America and the Caribbean // *Int J Tuberc Lung Dis.* – 2010. – Vol. 14. – P. 1369–1373.
28. Lobue P.A., Enarson D.A., Thoen C.O. Tuberculosis in humans and animals: an overview // *Int J Tuberc Lung Dis.* – 2010. – Vol. 14. – P. 1075–1078.
29. Tuberculosis article // [Электронный ресурс]. – URL: <http://www.rsn-sk-26.ru/svedeniya-o-boleznyakh-obschikh-dlya-cheloveka-i-zhivotnykh/tuberkulez>
30. Pesciaroli M., Alvarez J., Boniotti M.B., Cagiola M., Di Marco V., Marianelli C., et al. Tuberculosis in domestic animal species // *Res Vet Sci.* – 2014. – Vol. 97. – P. 78-85.
31. Buddle B.M., Vordermeier H.M., Hewinson R.G. Experimental Infection Models of Tuberculosis in Domestic Livestock. *Microbiol Spectr.* 2016. 4:4. DOI: 10.1128/microbiolspec.TBTB2-0017-2016.
32. Shi J., Wen Z., Zhong G., Yang H., Wang C., Huang B., Liu R., He X., Shuai L., Sun Z., Zhao Y., Liu P., Liang L., Cui P., Wang J., Zhang X., Guan Y., Tan W., Wu G., Chen H., Bu Z. Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2. *Science.* 2020; 368:1016-1020. DOI: 10.1126/science.abb7015. Epub 2020 Apr 8.
33. Sakamoto K. The pathology of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Vet Pathol.* 2012; 49:423-39. DOI: 10.1177/0300985811429313. Epub 2012 Jan 18.
34. Jean M.S., Hochberg N.S. Principles of Infectious diseases: transmission, diagnosis, prevention, and control. *Int Encycl Pub Health.* 2017; 22–39. DOI: 10.1016/B978-0-12-803678-5.00516-6.
35. Perez C.J. Pathogenesis and Virulence of *Mycoplasma bovis*. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2020; 36:269-278. DOI: 10.1016/j.cvfa.2020.02.002. Epub 2020 Apr 21.
36. Gormley E., Corner L.A. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection: the badger model as a paradigm for understanding tuberculosis in animals. *Front Vet Sci.* 2018; 4:247. DOI: 10.3389/fvets.2017.00247. eCollection 2017.
37. Marcel A. B., Paul H.E., Lalita R. Revisiting the timetable of tuberculosis. *BMJ.* 2018; 362: k2738. DOI: 10.1136/bmj.k2738.
38. Panorama bulletin. Available at: <https://oiebulletin.com/wp-content/uploads/bulletins/panorama-2019-1-en.pdf>
39. Palmer M.V. *Mycobacterium bovis*: characteristics of wildlife reservoir hosts. *Transbound. Emerg Dis.* 2013; 1:1–13. DOI: 10.1111/tbed.12115.
40. Nader A, Husberg H (1988) Estimación de perdidas por tuberculosis bovina en un rodeo lechero. *Rev Med Vet* 68 : 46–49.

- 41 Ramanujam H. Thiruvengadam K. Singaraj R. Palaniyandi K. Role of abattoir monitoring in determining the prevalence of bovine tuberculosis: A systematic review and meta-analysis. *Transbound Emerg Dis.* 2021; Online ahead of print. DOI: 10.1111/tbed.14118.
- 42 Buddle B.M., Livingstone P.G., de Lisle G.W. Advances in ante-mortem diagnosis of tuberculosis in cattle. *N Z Vet J.* 2009, vol. 57(4), pp. 173-80.
- 43 R. de la Rua-Domenech, A.T. Goodchild, H.M. Vordermeier, R.G. Hewinson, K.H. Christiansen, R.S. Clifton-Hadley. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res Vet Sci.* 2006, vol. 81(2), pp. 190-210.
- 44 Cousins, D.V., 2001. *Mycobacterium bovis* infection and control in domestic livestock. *Rev. Sci. Tech.*, 2001, 20, pp. 71–85
- 45 Wilbur A.K., Buikstra J.E. Patterns of tuberculosis in the Americas – How can modern biomedicine inform the ancient past? *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006; 101 Suppl 2:59-66. DOI: 10.1590/s0074-02762006001000011.
- 46 Machowiak P.A., Blos V.T., Aguilar M., Buikstra J.E. On the origin of American tuberculosis. *Clin Infect Dis.* 2005; 41(4):515-8. DOI: 10.1086/432013.
- 47 Lee O.Y., Wu H.H., Donoghue H.D., Spigelman M., Greenblatt C.L., Bull I.D., Rothschild B.M., Martin L.D., Minnikin D.E., Besra G.S. *Mycobacterium tuberculosis* Complex Lipid Virulence Factors Preserved in the 17,000-Year-Old Skeleton of an Extinct Bison, *Bison antiquus*. *PLoS One.* 2012;7(7):e41923. DOI: 10.1371/journal.pone.0041923.
- 48 Rothschild B.M., Martin L.D. Did ice-age bovids spread tuberculosis? *Naturwissenschaften.* 2006; 93(11):565-9. DOI: 10.1007/s00114-006-0145-7.
- 49 Rothschild B.M., Laub R. Hyperdisease in the late Pleistocene: validation of an early 20th century hypothesis. *Naturwissenschaften.* 2006;93(11):557-64. DOI: 10.1007/s00114-006-0144-8.
- 50 Rothschild B.M., Martin L.D. Frequency of pathology in a large natural sample from Natural Trap Cave with special remarks on erosive disease in the Pleistocene. *Reumatismo.* 2003;55(1):58-65. DOI: 10.4081/reumatismo.2003.58.
- 51 Barberis I., Bragazzi N.L., Galluzzo L., Martini M. The history of tuberculosis: from the first historical records to the isolation of Koch's bacillus. *J Prev Med Hyg.* 2017;58(1):E9-E12.
- 52 Daniel TM. *Pioneers in Medicine and their Impact on Tuberculosis.* Rochester, NY: University of Rochester Press; 2000. pp. 4–4. 29, 46-48, 50-51, 74-76.
- 53 Daniel TM. The history of tuberculosis. *Respir Med.* 2006;100(11):1862–1870. DOI: 10.1016/j.rmed.2006.08.006.
- 54 Roberts C.A., Buikstra J.E. *The bioarchaeology of tuberculosis. A global view on a reemerging disease.* Gainesville: University of Florida Press; 2003.
- 55 Besciu M. The Byzantine physicians. *Bulletin of the Transilvania University of Braşov. Medical Sciences.* 2009;6(51):33–38.
- 56 Barry R. Bloom. *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection, and Control.* Barry R. Bloom. ASM Press, 1994.

- 57 Herzog H. History of tuberculosis. *Respiration* 1998; 65: 5-15.
- 58 Daniel TM. The history of tuberculosis. *Resp Med* 2006; 100: 1862-1870.
- 59 Dormandy T. *The White Death: A History of Tuberculosis*. London: The Hambledon Press, 1999, p. xiv, 2, 4, 13, 34-36, 73-84, 92-94, 101-104, 129-137, 147, 392.
- 60 Dubos R, Dubos J. *The White Plague: Tuberculosis, Man and Society*. Boston; Little, Brown & Co., 1952, p. 7, 10, 13-14, 70-73, 91, 98, 203.
- 61 Garrison FH. *An Introduction to the History of Medicine*. Philadelphia & London: W B Saunders & Co., 1921, p. 109, 288, 411-413, 616.
- 62 Pritchard J, Foley P, Wong H (September 2003). "Langerhans and Langhans: what's misleading in a name?". *Lancet*. 362 (9387): 922.
- 63 Daniel TM. *Pioneers in Medicine and Their Impact on Tuberculosis*. Suffolk, UK; University of Rochester Press, 2000, p. 7-8.
- 64 Yang H., Kruh-Garcia N.A., Dobos K.M. Purified protein derivatives of tuberculin--past, present, and future. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2012 Dec;66(3):273-80.
- 65 Daniel T.M. The history of tuberculosis. *Respir Med*. 2006 Nov;100(11):1862-70.
- 66 Chen J., Gao L., Wu X., Fan Y., Liu M., Peng L., Song J., Li B., Liu A., Bao F. BЦЖ-induced trained immunity: history, mechanisms and potential applications. *J Transl Med*. 2023 Feb 10;21(1):106.
- 67 Migliori G.B., Caminero Luna J., Kurhasani X., van den Boom M., Visca D., D'Ambrosio L., Centis R., Tiberi S. History of prevention, diagnosis, treatment and rehabilitation of pulmonary sequelae of tuberculosis. *Presse Med*. 2022 Sep;51(3):104112.
- 68 Turgenbayev K.A., Borsynbayeva A.M., Plazun A.A., Turgenbayev R.K. Tuberculosis prevalence in animals and humans in the Republic of Kazakhstan *Vet World*. 2021; 14(9):2362-2370. DOI: 10.14202/vetworld.2021.2362-2370.
- 69 Тургенбаев, К. А. Диагностика туберкулеза животных [Текст] / К. А. Тургенбаев// - ТОО «ЛЕМ». - Алматы, 2001. – 141 с.
- 70 Payeur J.V. *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)* 2014:841-853.
- 71 Земсков М.В., Соколов М.И., Земсков В.М. Основы общей микробиологии, вирусологии и иммунологии. Москва, «Колос», 1977. -309.
- 72 Ramos D.F., Tavares L., da Silva P.E., Dellagostin O.A. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates: a review. *Braz J Microbiol*. 2014 Aug 29;45(2):365-72.
- 73 Н.С. Сырым, Б.А. Еспембетов, М. Базарбаев Туберкулез крупного рогатого скота (ЭПИЗООТОЛОГИЯ, ДИАГНОСТИКА, ПРОФИЛАКТИКА) Алматы, 2020. - 350 с.
- 74 Adams L.G., 2001. In vivo and in vitro diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection. *Revue 2. Scientifique et Technique Office International des Epizooties* 20 (1), 304–324.

75. Anon. Bovine Tuberculosis // Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Fifth ed. – Paris: Office International des Epizooties, 2004. – Chapter 2.3.3.
76. Welsh D.M., Cunningham R.T., Corbett D.M., Girvin R.M., McNair J., Skuce R.A., et al. Influence of pathological progression on the balance between cellular and humoral responses in bovine tuberculosis // Immunology. – 2005. – Vol. 114. – P. 101–111.
77. Rothel J.S., Jones S.L., Corner L.A., Cox J.C., Wood P.R. A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon- γ and its use for the detection of tuberculosis in cattle // Aust Vet J. – 1990. – Vol. 67. – P. 134–137.
78. Sedighi T., Varga L. Evaluating the bovine tuberculosis eradication mechanism and its risk factors in England's cattle farms // Int J Environ Res Public Health. – 2021. – Vol. 18(7). – Article 3451. – DOI: 10.3390/ijerph18073451.
79. Chandran A., Williams K., Mendum T., Stewart G., Clark S., Zadi S., et al. Development of a diagnostic compatible БЦЖ vaccine against bovine tuberculosis // Sci Rep. – 2019. – Vol. 9(1). – Article 17791. – DOI: 10.1038/s41598-019-54108-y.
80. Ghazvini K., Khoshbakht R., Tadayon K., Mosavari N., BahramiTaghanaki H.R., et al. Genotyping of Mycobacterium tuberculosis complex isolated from humans and animals in northeastern Iran // Sci Rep. – 2023. – Vol. 13(1). – Article 6746. – DOI: 10.1038/s41598-023-33740-9.
81. Alsayed S.S.R., Gunosewoyo H. Tuberculosis: pathogenesis, current treatment regimens and new drug targets // Int J Mol Sci. – 2023. – Vol. 24(6). – Article 5202. – DOI: 10.3390/ijms24065202.
82. Brockhurst J.K., Villano J.S. The role of animal research in pandemic responses // Comp Med. – 2021. – Vol. 71(5). – P. 359–368. – DOI: 10.30802/AALAS-CM-21-000062.
83. Subramanian S., Srinivasan S., Ramaiyan Selvaraju K., Vinoli P.M., Selladurai S., et al. Defined antigen skin test for bovine tuberculosis retains specificity on revaccination with Bacillus Calmette-Guérin // Front Vet Sci. – 2022. – Vol. 9. – Article 814227. – DOI: 10.3389/fvets.2022.814227.
84. Garcia A.A., Borja E., Reid A., Samy V., Singh S., Whittington R.J., Toribio J. Bovine tuberculosis control in Fiji: retrospective study findings for 2015 to 2020 // Front Vet Sci. – 2022. – Vol. 9. – Article 972120. – DOI: 10.3389/fvets.2022.972120.
85. Ashouri M., Nourani H. Performance of immunohistochemistry versus real-time PCR method for detecting mycobacterial infections of cattle screened by comparative tuberculin test // Vet Res Forum. – 2022. – Vol. 13(2). – P. 223–231. – DOI: 10.30466/vrf.2020.122038.2871.
86. Reichel M.P., Wahl L.C., Hill F.I. Review of diagnostic procedures and approaches to infectious causes of reproductive failures of cattle in Australia and New Zealand // Front Vet Sci. – 2018. – Vol. 5. – Article 222. – DOI: 10.3389/fvets.2018.00222.

87. Abay Z., Nurpeisova A., Shorayeva K., Sadikaliyeva S., Yespembetov B., et al. Safety and protective efficacy of a candidate vector-based vaccine for bovine tuberculosis // *Vaccines (Basel)*. – 2023. – Vol. 11(7). – Article 1199.
88. Воронина Е., Абай Ж., Нурпейсова А., и др. Подбор условий культивирования рекомбинантных вирусов гриппа, экспрессирующие иммунодоминантные микобактериальные белки *M. bovis* // *Eurasian Journal of Applied Biotechnology*. – 2023. – No. 1. – P. 74–82.
89. Nurpeisova A., Abay Z., et al. Determining optimal conditions for growing recombinant vectors to be used in developing a bovine tuberculosis vaccine // *International scientific conference «Research for rural development 2023»*. – Vol. 38. – Latvia, 2023.
90. Абитаев Р.Т., Шораева К.А., Нурпейсова А.С., Сырым Н.С., Абай Ж.С., и др. Подбор и синтез праймеров для наработки генов, кодирующих протективные белки *M. bovis* // *Евразийское Научное Объединение*. – 2021. – No. 10 (80). – С. 159–164.
91. Abay Z., Sadikalieva S., Shorayeva K., et al. Phylogenetic analysis of prospective *M. bovis* antigens with the aim of developing candidate vaccines for bovine tuberculosis // *J Genet Eng Biotechnol*. – 2023. – Vol. 21(1). – Article 99. – DOI: 10.1186/s43141-023-00552-3.
92. Meikle V., Alito A., Llera A.S., Gioffré A., Peralta A., Buddle B.M., Cataldi A. Identification of novel *Mycobacterium bovis* antigens by dissection of crude protein fractions // *Clin Vaccine Immunol*. – 2009. – Vol. 16(9). – P. 1352–1359.
93. Pollock J.M., Andersen P. The potential of the ESAT-6 antigen secreted by virulent mycobacteria for specific diagnosis of tuberculosis // *J Infect Dis*. – 1997. – Vol. 175(5). – P. 1251–1254.
94. Shi C.H., Wang X.W., Zhang H., Zhang T.F., Wang L.M., Xu Z.K. Immune responses and protective efficacy of the gene vaccine expressing Ag85B and ESAT6 fusion protein from *Mycobacterium tuberculosis* // *DNA Cell Biol*. – 2008. – Vol. 27(4). – P. 199–207.
95. Goude R., Parish T. The genetics of cell wall biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis* // *Future Microbiol*. – 2008. – Vol. 3(3). – P. 299–313.
96. de Sousa E.M., da Costa A.C., Trentini M.M., de Araújo Filho J.A., Kipnis A., et al. Immunogenicity of a fusion protein containing immunodominant epitopes of Ag85C, MPT51, and HspX from *Mycobacterium tuberculosis* in mice and active TB infection // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8(9). – DOI: 10.1371.
97. Абай Ж., Шораева К., Садикалиева С., и др. Разработка технологии изготовления векторной вакцины против туберкулеза КРС из рекомбинантного штамма вируса гриппа, экспрессирующего микобактериальные белки Esat-6 и TB10.4 // *Научно-практическая конференция молодых ученых «Молодёжь в науке – 2023»*. – Алматы, 2023.

ҚОСЫМША А – Микобактериялық ген кірістірулері бар NS химерлі геннің тізбектерін теңестіру

pHW2000 NS1-ESAT6 1.2_T7uni_G01 1.2_pcDNA3rev_H01	432 GCTAGCAGTTAACCGGAGTACTGATGGACCCCAATACTGTGTCAGCTTCCAGGTGGACTGTTTCCTTTGGCATGTCCGTAAACCGGTGGCAGATCAGGAGTTA GCTAGCAGTTAACCGGAGTACTGATGGACCCCAATACTGTGTCAGCTTCCAGGTGGACTGTTTCCTTTGGCATGTCCGTAAACCGGTGGCAGATCAGGAGTTA -----	535
.....		
pHW2000 NS1-ESAT6 1.2_T7uni_G01 1.2_pcDNA3rev_H01	536 GGGGATGCTCCGTTCTGGATAGATTGAGGAGGGACCCAGAAGTCTCTGCGTGGCCGAGGCGTACACTGGGGTTGGACATTGAGACGGCTACCGGGCCGGAA GGGGATGCTCCGTTCTGGATAGATTGAGGAGGGACCCAGAAGTCTCTGCGTGGCCGAGGCGTACACTGGGGTTGGACATTGAGACGGCTACCGGGCCGGAA -----ATTCCCTTGAGAAATCAAAGATTCTTGAATTGAGGGCAATCTGGAAAGATTGACCAATTGGCC	639
.....		
pHW2000 NS1-ESAT6 1.2_T7uni_G01 1.2_pcDNA3rev_H01	640 GCAATAGTGGAAACGAATCCTGAAAGAAGAATCTGATGAGGCACCTGAAGATGACAATGGCTTCGGTACCTGCCTCTCGTACCTAACCGACATGACACTTGAAG GCAATAGTGGAAACGAATCCTGAAAGAAGAATCTGATGAGGCACCTGAAGATGACAATGGCTTCGGTACCTGCCTCTCGTACCTAACCGACATGACACTTGAAG TTCCGGTACCTTACCTTCTCGGCTTAACCTTAACCGAACCAATTAACCACTTTGACTAGAGAATGTTCTTAGGATGGATTGGGAGCCATTGCTTCCAT	743
.....		
pHW2000 NS1-ESAT6 1.2_T7uni_G01 1.2_pcDNA3rev_H01	744 AGATGCTAGAGATTGGAGCATGCTCATAACCCAAACAGAAAGTTCGGGGCCCACTATGCATCAGAAATGGACAGGCCATCATGACAGAGCAGCAGTGGAAATTC AGATGCTAGAGATTGGAGCATGCTCATAACCCAAACAGAAAGTTCGGGGCCCACTATGCATCAGAAATGGACAGGCCATCATGACAGAGCAGCAGTGGAAATTC TACCCCAAACAGGACTAGGTTCCGACGGGGCCCACTATGCATCCAGACACTGGAACCCAGGGCCATTCAATTGACAGAGCAGCAGTGGAAATTCGGGGGTAT	847
.....		
pHW2000 NS1-ESAT6 1.2_T7uni_G01 1.2_pcDNA3rev_H01	848 GCGGGTATCGAGGGCCGGCAAGCGCAATCCAGGGAAATGTCACGTCCATTCACTCCCTCTGACGAGGGGAAGCAGTCCCTGACCAAGCTCCGACGGCCCTG GCGGGTATCGAGGGCCGGCAAGCGCAATCCAGGGAAATGTCACGTCCATTCACTCCCTCTGACGAGGGGAAGCAGTCCCTGACCAAGCTCCGACGGCCCTG CGAGGGCCGGCAAGCGCAATCCAGGGAAATGTCACGTCCATTCACTCCCTCTGACGAGGGGAAGCAGTCCCTGACCAAGCTCCGACGGCCCTG	951
.....		
pHW2000 NS1-ESAT6 1.2_T7uni_G01 1.2_pcDNA3rev_H01	952 GGGCGGTAGCGGTTCCGAGGCGTACCAGGGTGTCCAGCAAAAATGGGAGCCACGGCTACCGAGCTGAACAACCGCGCTGCAGAACCTGGCCGGGACGATCAGCG GGGCGGTAGCGGTTCCGAGGCGTACCAGGGTGTCCAGCAAAAATGGGAGCCACGGCTACCGAGCTGAACAACCGCGCTGCAGAACCTGGCCGGGACGATCAGCG CGCATAGCGGTTCCGAGGCGTACCAGGGTGTCCAGCAAAAATGGGAGCCACGGCTACCGAGCTGAACAACCGCGCTGCAGAACCTGGCCGGGACGATCAGCGA	1055
.....		
pHW2000 NS1-ESAT6 1.2_T7uni_G01 1.2_pcDNA3rev_H01	1056 AAGCCGGTCAGGCAATGGCTTTCGACCGAAGCCAACTCACTGGGATGTTCCGCGATAAGAAATATATCTCAAAGCCAAATTTAGTGTCAATTTGATCGCCTC AAGCCGGTCAGGCAATGGCTTTCGACCGAAGCCAACTCACTGGGATGTTCCGCGATAAGAAATATATCTCAAAGCCAAATTTAGTGTCAATTTGATCGCCTC AGCCGGTCAGGCAATGGCTTTCGACCGAAGCCAACTCACTGGGATGTTCCGCGATAAGAAATATATCTCAAAGCCAAATTTAGTGTCAATTTGATCGCCTC	1159
.....		
pHW2000 NS1-ESAT6... 1.2_T7uni_G01 (1.... 1.2_pcDNA3rev_H01...	1160 GAGACACTCATTCTGCTGCGGGCATTACCGAGGAGGGAGCCATTGTTGGAGAAATCAGCCCACTGCCCTCACTTCCAGGACACACCGCCGAGGACGTGAAGAA GAGACACTCATTCTGCTGCGGGCATTACCGAGGAGGGAGCCATTGTTGGAGAAATCAGCCCACTGCCCTCACTTCCAGGACACACCGCCGAGGACGTGAAGAA GAGACACTCATTCTGCTGCGGGCATTACCGAGGAGGGAGCCATTGTTGGAGAAATCAGCCCACTGCCCTCACTTCCAGGACACACCGCCGAGGACGTGAAGAA	1263
.....		
pHW2000 NS1-ESAT6 1.2_T7uni_G01 1.2_pcDNA3rev_H01	1264 CGCAGTGGGAGTGTGATTGCTGGCTTGGAGTGGAAACGCAATACCGTTAGGGTTTCCGAAACTCTGCAAAGATTGCTTGGCCGAGCTCGAACGAGAAATGGCA CGCAGTGGGAGTGTGATTGCTGGCTTGGAGTGGAAACGCAATACCGTTAGGGTTTCCGAAACTCTGCAAAGATTGCTTGGCCGAGCTCGAACGAGAAATGGCA CGCAGTGGGAGTGTGATTGCTGGCTTGGAGTGGAAACGCAATACCGTTAGGGTTTCCGAAACTCTGCAAAGATTGCTTGGCCGAGCTCGAACGAGAAATGGCA	1367
.....		
pHW2000 NS1-ESAT6 1.2_T7uni_G01 1.2_pcDNA3rev_H01	1368 GACCTCCGTTAACTCCTAAGCAGAAAAGGGAGATGGCCGGTACCATCCGCACTGAAGTATGAGTCGAC GACCTCCGTTAACTCCTAAGCAGAAAAGGGAGATGGCCGGTACCATCCGCACTGAAGTATGAGTCGAC GACCTCCGTTAACTCCTAAGCAGAAAAGGGAGATGGCCGGTACCATCCGCACTGAAGTATGAGTCGAC	1435
.....		

pRW2000 NS1-ESAT6-TB10.4 432 526
 3.5_T7umi_A03 GCTAGCAGTTAACCGGAGTACTGATGGACCCCAATACTGTGTCCAGCTTCCAGGTGGACTGTTCTTGGCATGTCCGTAACCGGTGGCAGAT
 3.5_pctNAJrev_B03 CCTAGCAGTTAACCGGAGTACTGATGGACCCCAATACTGTGTCCAGCTTCCAGGTGGACTGTTCTTGGCATGTCCGTAACCGGTGGCAGAT

 pRW2000 NS1-ESAT6-TB10.4 527 621
 3.5_T7umi_A03 CAGGAGTTAGGGGATGCTCCGTTCTGGATAGATTGAGGAGGGACAGAACTCTCTGGTGGCCGAGGCAGTACACTGGGGTTGGCATTGAGAC
 3.5_pctNAJrev_B03 CAGGAGTTAGGGGATGCTCCGTTCTGGATAGATTGAGGAGGGACAGAACTCTCTGGTGGCCGAGGCAGTACACTGGGGTTGGCATTGAGAC

 pRW2000 NS1-ESAT6-TB10.4 622 716
 3.5_T7umi_A03 GGCTACCGGGGCGGGGAAGCAATAGTGGAAAGAACTCTGAAAGAAATCTGATGAGGCCTGAAAGATGCAATGGCTTCCGTAAGCTGCTCTC
 3.5_pctNAJrev_B03 GGCTACCGGGGCGGGGAAGCAATAGTGGAAAGAACTCTGAAAGAAATCTGATGAGGCCTGAAAGATGCAATGGCTTCCGTAAGCTGCTCTC

 pRW2000 NS1-ESAT6-TB10.4 717 811
 3.5_T7umi_A03 GCTAAGTAAACGACATGACACTTGAAGAGATGCTAGAGATTGGAGCATGCTCATAACCAACAGAAAGTGGCGGGGCCACTATGCATCAGAATG
 3.5_pctNAJrev_B03 GCTAAGTAAACGACATGACACTTGAAGAGATGCTAGAGATTGGAGCATGCTCATAACCAACAGAAAGTGGCGGGGCCACTATGCATCAGAATG

 pRW2000 NS1-ESAT6-TB10.4 812 906
 3.5_T7umi_A03 GAACAGCCATCATGACAGACAGCAGCAGTGGAAATTCGCGGGTATGAGGGCCGGCAAGCCCAATCCAGGGAAATGTCAGTCCATTCATTCCCT
 3.5_pctNAJrev_B03 GAACAGCCATCATGACAGACAGCAGCAGTGGAAATTCGCGGGTATGAGGGCCGGCAAGCCCAATCCAGGGAAATGTCAGTCCATTCATTCCCT

 pRW2000 NS1-ESAT6-TB10.4 907 1001
 3.5_T7umi_A03 CTTGACGAGGGGAAGCAGTCCCTGACCAAGCTCGCAGCGGGCTGGGGCGGTAGCGGTTCCGAGGGGTACCGAGGTTCCAGCAAAAATGGGAGG
 3.5_pctNAJrev_B03 CTTGACGAGGGGAAGCAGTCCCTGACCAAGCTCGCAGCGGGCTGGGGCGGTAGCGGTTCCGAGGGGTACCGAGGTTCCAGCAAAAATGGGAGG

 pRW2000 NS1-ESAT6-TB10.4 1002 1096
 3.5_T7umi_A03 CCACGGCTACCGAGCTGAACAAGCGCTGCAGAACTGGCGCGGAGGATCAGCGAAGCGGTCCAGGCAATGGCTTTGACCGAAGGCAAGGTCAC
 3.5_pctNAJrev_B03 CCACGGCTACCGAGCTGAACAAGCGCTGCAGAACTGGCGCGGAGGATCAGCGAAGCGGTCCAGGCAATGGCTTTGACCGAAGGCAAGGTCAC

 pRW2000 NS1-ESAT6-TB10.4 1097 1191
 3.5_T7umi_A03 TGGGATGTTCCATGTCCAAATCATGTACAACCTACCCCGGATGTTGGGTCCAGCGCGGGGATATGGCCGATATGCCGGCACGCTGCAGAGCTT
 3.5_pctNAJrev_B03 TGGGATGTTCCATGTCCAAATCATGTACAACCTACCCCGGATGTTGGGTCCAGCGCGGGGATATGGCCGATATGCCGGCACGCTGCAGAGCTT

 pRW2000 NS1-ESAT6-TB10.4 1192 1286
 3.5_T7umi_A03 GGGTGGCCGAGATCGCGTGGAGCAGGGCGGTTGCGAGATGCGTGGCAGGGCGATACCGGGATCAAGTATCAGGCGTGGCAGGCACAGTGGAAAC
 3.5_pctNAJrev_B03 GGGTGGCCGAGATCGCGTGGAGCAGGGCGGTTGCGAGATGCGTGGCAGGGCGATACCGGGATCAAGTATCAGGCGTGGCAGGCACAGTGGAAAC

 pRW2000 NS1-ESAT6-TB10.4 1287 1381
 3.5_T7umi_A03 AGGCCATGGAAGATTTGGTGGGGCCATCATGCGATGTCCAGCACCCATGAAGCCACCATGGGATGATGGCCCGSACACGGCCGGAAGCC
 3.5_pctNAJrev_B03 AGGCCATGGAAGATTTGGTGGGGCCATCATGCGATGTCCAGCACCCATGAAGCCACCATGGGATGATGGCCCGSACACGGCCGGAAGCC

 pRW2000 NS1-ESAT6-TB10.4 1382 1476
 3.5_T7umi_A03 GCCAAGATAGAATATCTCTCAAGCCAAATTTAGTGTCTATTTGATGCGCTCGAGACACTCACTCTGCTGCGGGCATTACCGAGGAGGG
 3.5_pctNAJrev_B03 GCCAAGATAGAATATCTCTCAAGCCAAATTTAGTGTCTATTTGATGCGCTCGAGACACTCACTCTGCTGCGGGCATTACCGAGGAGGG

 pRW2000 NS1-ESAT6-TB10.4 1477 1571
 3.5_T7umi_A03 AGCCATTGTTGGAGAAATCAGCCCACTGCGCTCACTTCCAGGACACACCGCCGAGGAGGTGAAGAAACAGTGGGAGTGTGATGGTGGCTTGG
 3.5_pctNAJrev_B03 AGCCATTGTTGGAGAAATCAGCCCACTGCGCTCACTTCCAGGACACACCGCCGAGGAGGTGAAGAAACAGTGGGAGTGTGATGGTGGCTTGG

 pRW2000 NS1-ESAT6-TB10.4 1572 1666
 3.5_T7umi_A03 AGTGGAAACGACAAATACCGTATAGGTTTCCGAACTCTGCAAGATTGCTTGGCGGAGCTGAAACGAAATGGCAGACTCCGTTAAGCTCTAAG
 3.5_pctNAJrev_B03 AGTGGAAACGACAAATACCGTATAGGTTTCCGAACTCTGCAAGATTGCTTGGCGGAGCTGAAACGAAATGGCAGACTCCGTTAAGCTCTAAG

 pRW2000 NS1-ESAT6-TB10.4 1667 1714
 3.5_T7umi_A03 CAGAAAAGGAGATGGCGGTACCATCCGCAATGAAATATGAGTGGAC
 3.5_pctNAJrev_B03 CAGAAAAGGAGATGGCGGTACCATCCGCAATGAAATATGAGTGGAC

```

pHW2000 NS1-TB10          432                                     531
2.5_T7uni_E02            GCTAGCAGTTAACCGGAGTACTGATGGACCCCAACTGTGTCCAGCTCCAGGTGGACTGTTTCCTTTGGCATGTCCGTAACCGGTGGCAGATCAGGA
2.5_pcDNA3rev_F02       GCTAGCAGTTAACCGGAGTACTGATGGACCCCAACTGTGTCCAGCTCCAGGTGGACTGTTTCCTTTGGCATGTCCGTAACCGGTGGCAGATCAGGA
-----
.....

pHW2000 NS1-TB10          532                                     631
2.5_T7uni_E02            GTTAGGGGATGCTCCGTTCTCGGATAGATTGAGGAGGGACCAGAAGTCTCTGCGTGGCCGAGGAGTACACTGGGGTTGGACATTGAGACGGCTACGGGG
2.5_pcDNA3rev_F02       GTTAGGGGATGCTCCGTTCTCGGATAGATTGAGGAGGGACCAGAAGTCTCTGCGTGGCCGAGGAGTACACTGGGGTTGGACATTGAGACGGCTACGGGG
-----
.....

pHW2000 NS1-TB10          632                                     731
2.5_T7uni_E02            GCCGGGAAGCAAATAGTGGAAACGAATCCTGAAAGAAGAATCTGATGAGGCCTGAAGATGACAATGGCTTCCGTACCTGCCTCTCGTACCTAACCAGACA
2.5_pcDNA3rev_F02       GCCGGGAAGCAAATAGTGGAAACGAATCCTGAAAGAAGAATCTGATGAGGCCTGAAGATGACAATGGCTTCCGTACCTGCCTCTCGTACCTAACCAGACA
-----
.....

pHW2000 NS1-TB10          732                                     831
2.5_T7uni_E02            TGACACTTGAAGAGATGCTAGAGATTGGAGCATGCTCATACCCAAACAGAAGTCCGGGGCCCACTATGCATCAGAATGGACAGGCCATCATGTCCGA
2.5_pcDNA3rev_F02       TGACACTTGAAGAGATGCTAGAGATTGGAGCATGCTCATACCCAAACAGAAGTCCGGGGCCCACTATGCATCAGAATGGACAGGCCATCATGTCCGA
-----A
.....

pHW2000 NS1-TB10          832                                     931
2.5_T7uni_E02            AATCATGTACAACACTACCCCGGATGTTGGGTCAAGCCGGGATATGGCCGGATATGCCGGCAGCTGCAGAGCTTGGGTGCCGAGATCCCGGTGGAGCAG
2.5_pcDNA3rev_F02       AATCATGTACAACACTACCCCGGATGTTGGGTCAAGCCGGGATATGGCCGGATATGCCGGCAGCTGCAGAGCTTGGGTGCCGAGATCCCGGTGGAGCAG
-----
.....

pHW2000 NS1-TB10 (NS1... 932                                     1031
2.5_T7uni_E02 (2.5_T7... GCCCGTTGCAGAGTCCGTGGCAGGGCGATACCCGGATCACGGTATCAGCGGTGGCAGGCACAGTGGAAACCAGGCCATGGAAGATTTGGTGGGGCCCTATC
2.5_pcDNA3rev_F02 (2.... GCCCGTTGCAGAGTCCGTGGCAGGGCGATACCCGGATCACGGTATCAGCGGTGGCAGGCACAGTGGAAACCAGGCCATGGAAGATTTGGTGGGGCCCTATC
-----
.....

pHW2000 NS1-TB10          1032                                    1131
2.5_T7uni_E02            ATGCGATGTCCAGCACCCATGAAGCCAACACCATGGCGATGATGGCCCGGACACGGCCGAAGCCCAAGATAAAGAAATATTATCCTCAAAGCCAATTT
2.5_pcDNA3rev_F02       ATGCGATGTCCAGCACCCATGAAGCCAACACCATGGCGATGATGGCCCGGACACGGCCGAAGCCCAAGATAAAGAAATATTATCCTCAAAGCCAATTT
-----
.....

pHW2000 NS1-TB10 (NS1... 1132                                    1231
2.5_T7uni_E02 (2.5_T7... TAGTGTATATTTGATCGCCTCGAGACTCATTCTGCTGCGGGCATTACCGAGGAGGGAGCCATTGTTGGAGAAATCAGCCCACTGCCCTCACTTCCA
2.5_pcDNA3rev_F02 (2.... TAGTGTATATTTGATCGCCTCGAGACTCATTCTGCTGCGGGCATTACCGAGGAGGGAGCCATTGTTGGAGAAATCAGCCCACTGCCCTCACTTCCA
-----
.....

pHW2000 NS1-TB10          1232                                    1331
2.5_T7uni_E02            GGACACACCCCGAGGAGCTGAAGAACGAGTGGGAGTCTGATTGGTGGCTTGGAGTGGAAACGACAAATACCGTTAGGGTTCCGAAACTCTGCAAAGAT
2.5_pcDNA3rev_F02       GGACACACCCCGAGGAGCTGAAGAACGAGTGGGAGTCTGATTGGTGGCTTGGAGTGGAAACGACAAATACCGTTAGGGTTCCGAAACTCTGCAAAGAT
-----
.....

pHW2000 NS1-TB10          1332                                    1429
2.5_T7uni_E02            TCGCTTGGCGGAGCTCGAACGAGAATGGCAGACTCCGTTAACTCCTAAGCAGAAAAGGGAGATGGCGGGTACCATCCGCACTGAAGTATGAGTCGAC
2.5_pcDNA3rev_F02       TCGCTTGGCGGAGCTCGAACGAGAATGGCAGACTCCGTTAACTCCTAAGCAGAAAAGGGAGATGGCGGGTACCATCCGCACTGAAGTATGAGTCGAC
-----
.....

```

ҚОСЫМША Ә – Ұйым стандартының мұқабә беті

ҰЙЫМ СТАНДАРТЫ

Биологиялық қауіпсіздік проблемаларын ғылыми-зерттеу институты
Қазақстан Республикасы Денсаулық сақтау министрлігі

ӘОЖ 619:615.371:578.823.2
КП ВЭД 21.20.23

МКС 11.220

БЕКТЕМІН

«Биологиялық қауіпсіздік проблемаларын
ғылыми-зерттеу институты»
ҚР Денсаулық сақтау министрлігі
бас директорының м.а.

«20» 10 А.А. Керімбаев
2023 ж.



ІРІ ҚАРА МАЛ ТУБЕРКУЛЕЗІНЕ ҚАРСЫ ВЕКТОРЛЫҚ ВАКЦИНА

СТ 405-1919-04 ГП-146-2023
(алғаш рет енгізілді)

Жарамдылық мерзімі

« » ж. бастан
« » ж. дейін

ӘЗІРЛЕГЕН

ҚР Денсаулық сақтау министрлігінің
«Биологиялық қауіпсіздік проблемаларын
ғылыми-зерттеу институты»
жетекші ғылыми қызметкері, PhD

«20» 10 А.С. Нұрпейісова
2023 ж.

Қазақстан Республикасы Денсаулық сақтау
министрлігінің «Биологиялық қауіпсіздік
проблемаларын ғылыми-зерттеу институты»
зертхана меңгерушісі, PhD

«20» 10 К.А. Шорасва
2023 ж.

Түпнұсқа ұсынушы:

«Биологиялық қауіпсіздік проблемаларын ғылыми-зерттеу институты» ҚР
ДСМ 080409, Жамбыл облысы,
Қордай ауданы, Гвардейский ктк

Жамбыл облысы

ҚОСЫМША Б – Вакцинаны қолдану нұсқаулығының мұқабә беті

БЕКІТЕМІН
«Биологиялық қауіпсіздік проблемаларын
ғылыми-зерттеу институты»
ҚР Денсаулық сақтау министрлігі
бас директорының
б.м.а. А.А. Керімбаев
« 20 » _____ 2023 ж.

«ІРІ ҚАРА МАЛ ТУБЕРКУЛЕЗІНЕ ҚАРСЫ ВЕКТОРЛЫҚ ВАКЦИНАСЫН» қолдану туралы НҮСҚАУЛЫҚ

Жалпы ережелер

Сауда атауы: «Ірі қара мал туберкулезіне қарсы векторлық вакцина»

Халықаралық патенттік емес атауы: «Ірі қара мал туберкулезіне қарсы векторлық вакцина»

Мақсаты: *M. bovis* микроорганизмі қоздыратын туберкулезге қарсы ірі қара малды (ІҚМ) белсенді иммундау.

Лекарственная форма: Однородная мелконористая масса серовато-белого или серовато-желтого цвета.

Сипаттама: Вакцина препаратының белсенді ингредиенті *M. bovis* штаммының ESAT-6 және TB10.4 микобактериялық антигендерін экспрессиялайтын аттенуирленген рекомбинантты тұмау вирусының штаммы болып табылады, яғни аталмыш штамм PB1, PB2, PA, NP гендері және A/Puerto Rico / 8/34 (H1N1) штаммының гені сонымен қатар A/chicken/Astana/6/05(H5N1) штаммының HA, A және M гендері NS химерінен құрастырылған [вирустың ішкі коды: FLU NS_ESAT 6 және TB10.4]. Рекомбинантты вирустар стандартты кері генетика әдісімен 8 екі бағытты pHW2000 плазмидаларынан жасалынған.

Сыртқы түрі бойынша вакцина стерильді инъекциялық суда толығымен еритін сары сұрлан ашық қоңырға дейін біртекті, құрғақ, ұсақ кеуекті таблеткалар.

Қолданар алдында құрғақ вакцинаны құрамында 10-20% Montanide Gel-01 бар арнайы еріткішпен сұйылтылады.

Еріткіш құрамы: Вакцина құрамында еріткіші 10-20% Монтанид Гель-01 бар инъекциялық су болып табылады.

Қолдану тәсілі: тері ішіне.

Көлемі/дозасы: 2 см³/бір доза.

Бастанқы қаптама: Стерильді құтылар резеңке тығындармен тығыз жабылады және «FLIP-OFF» ашу индикаторы бар алюминий қапшақтармен оралады немесе эвакуацияланады, алюминий қапшақтармен нығайтылған резеңке тығындармен герметикалық түрде жабылады.

Стерильді вакцина ампулалары вакуумда герметикалық жабылған.

ГОСТ 8.579 бойынша дәлдік.

Екінші реттік қаптама: Флакондар ГОСТ 12301 бойынша картон қораптарға салынған. Әрбір қорапта орыс және мемлекеттік тілдегі қолдану жөніндегі нұсқаулық бар.

Сақтау шарттары: +2°C-тан +8°C-ге дейінгі температурада, жарықтан қорғалған жерде сақтау керек. Мұздатпаңыз.

Жарамдылық мерзімі: 12 ай.

Жою: пайдаланылмаған/толық пайдаланылмаған ветеринариялық препарат және қолданылған ампулалар/құтылар, шприцтер, иелер 60 минут қайнатылады және қалдық ретінде арнайы автоклавтық қаптарға (120°C температурада 45 минут) салынып, содан кейін ипператорда жойылады.

ҚОСЫМША В – Өндіру және бақылау нұсқаларының мұқабә беті

ШАРУШЫЛЫҚТЫ БАСҚАРУ ҚҰҚЫҒЫНДАҒЫ РЕСПУБЛИКАЛЫҚ
МЕМЛЕКЕТТІК КӘСПОРЫН
ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ ДЕНСАУЛЫҚ САҚТАУ МИНИСТРЛІГІНІҢ
«БИОЛОГИЯЛЫҚ ҚАУІПСІЗДІК ПРОБЛЕМАЛАРЫН ҒЫЛЫМИ-ЗЕРТТЕУ
ИНСТИТУТЫ»

ӘОЖ 619:615.371:578.823.2
КП ВЭД 21.20.23

МКС 11.220

БЕКІТЕМІН
«Биологиялық қауіпсіздік
проблемаларын ғылыми-зерттеу
институты»
ҚР Денсаулық сақтау министрлігі
бас директорының м.а.
А.А. Керімбаев
« 16 » _____ 2023 ж.



ІРІ ҚАРА МАЛ ТУБЕРКУЛЕЗИНЕ ҚАРСЫ ВЕКТОРЛЫҚ ВАКЦИНА ӨНДІРУ
ЖӘНЕ БАҚЫЛАУ НҰСҚАЛАРЫ

Түпнұсқа ұстаушы:

ШЖҚ РМК «Биологиялық қауіпсіздік
проблемаларын ғылыми-зерттеу институты»
ҚР Денсаулық сақтау министрлігі 080409, Жамбыл облысы,
Қордай ауданы, Гвардейский қтқ

Жамбыл облысы, 2023 ж.

7

ҚОСЫМША Г – Комиссиялық сынақ бағдарламасының мұқабә беті

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ
БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ
(РГП НИИПББ МЗ РК)



УТВЕРЖДАЮ

И.о. генерального директора
РГП НИИПББ МЗ РК

Е.О. Абдураимов
2022 г.

ПРОГРАММА

**комиссионного испытания векторной вакцины для профилактики
туберкулеза крупного рогатого скота**

1. Цель испытания:

Комиссионные испытания физическо-химических и биологических свойств опытно-промышленных серий векторной вакцины для профилактики туберкулеза крупного рогатого скота.

2. Место проведения испытаний:

Испытательная лаборатория «Контроль технологии и биопрепаратов» и изолятор №204, НИИПББ МЗ РК.

3. Сроки исследований: начало – 08.12.2022 г.

окончание – 24.02.2023 г.

4. Испытуемый материал:

- векторная вакцина для профилактики туберкулеза крупного рогатого скота, изготовленная в Научно-исследовательском институте проблем биологической безопасности МЗ РК серия №011222;

5. Методы испытания

5.1 Определение внешнего вида, цвета, наличия посторонней примеси, плесени, трещин ампул (флаконов)

Определение внешнего вида, наличия посторонней примеси, плесени, изменения консистенции, трещин ампул (флаконов) проводят визуально в проходящем свете. Одновременно проверяют запайку ампул и плотность укупорки флаконов. Вакцина должна быть в виде сухой мелкопористой таблетки, серовато-белого или серовато-желтого цвета, без наличия посторонней примеси, плесени и