

МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ЛИМФАНГЕНИТА ЛОШАДЕЙ

В этой аннотации приведено сведение о методах диагностики при лимфангите лошадей. В ходе исследований по данным 3 индивидуальных крестьянских хозяйств, лимфангит лошадей по принципу процентно – относительной показателя было проведено экспертиза. Из исследованных 729 голов в 3 хозяйства, 41 голов (5,6%) были больны, из них 7 голов (0,9%) были с летальным исходом.

Ключевые слова: лимфангит лошадей, болезнь лимфангит, лимфатические узлы, абсcess, микроскоп, питательная среда, серология.

УДК 619:616.981.42

**Рыскельдинова Ш.Ж., Кыдырбаев Ж.К., Асанжанова Н.Н., Гоцкина Т.М.,
Кожамкулов Е.М., Инкарбеков Д.А., Табынов К.К.**

*РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической
безопасности КН МОН РК*

УСЛОВИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ГРИППОЗНЫХ ВЕКТОРОВ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ БРУЦЕЛЛЕЗНЫЕ ИММУНОДОМИНАНТНЫЕ БЕЛКИ OMP16 ИЛИ L7/L12, В КУРИНЫХ ЭМБРИОНАХ

Аннотация

С целью специфической профилактики бруцеллеза крупного рогатого скота на основе метода обратной генетики были сконструированы четыре рекомбинантных штамма вируса гриппа А субтипов H5N1 и H1N1, экспрессирующих из открытой рамки считывания гена NS1 бруцеллезные иммунодоминантные белки Omp16 или L7/L12. В данной работе представлены результаты исследований по определению оптимальных параметров культивирования указанных гриппозных векторов в куриных эмбрионах (КЭ). Установлено, что максимальное накопление гриппозных векторов отмечается при следующих условиях культивирования: возраст куриных эмбрионов (КЭ) - 10 суток, заражающая доза инфицирования КЭ 1000-10000 ЭИД₅₀, температура и продолжительность инкубации - 32-34 °С и 48 ч, соответственно. При соблюдении указанных параметров культивирования можно стабильно получать высокоактивный вирусосодержащий материал с инфекционной и гемагглютинирующей активностью не менее 7,0 lg ЭИД₅₀/см³ и 1: 64, соответственно, что вполне пригодно для приготовления векторной вакцины против бруцеллеза крупного рогатого скота (КРС).

Ключевые слова: Гриппозные векторы, бруцеллез, антиген, рекомбинантные штаммы, куриные эмбрионы, крупный рогатый скот.

Введение

Бруцеллез КРС - хроническое зооантропонозное заболевание, распространенное во многих странах мира, наносящее большой экономический ущерб животноводству и представляющее серьезную опасность здоровью людей [1-3]. Несмотря на столетнюю историю открытия возбудителей этой инфекции и, соответственно, столь же длительную историю объединения усилий ученых разных стран, направленных на

разработку и совершенствование средств и методов борьбы с ним, бруцеллез все еще остается одной из главных проблем мировой медицинской и ветеринарной науки.

Для специфической профилактики бруцеллеза КРС в настоящее время используется живые вакцины из аттенуированных штаммов *B. abortus* 19, RB 51. Указанные вакцины обладают высокой иммуногенной эффективностью, но при этом не лишены и серьезных недостатков, связанных в первую очередь с возможностью вызывать аборт у стельных коров, секрецией вакцинного штамма в молоко вакцинированных животных, реверсии, а также сложностью дифференциации вакцинированных животных от инфицированных [4]. Более того вакцинные штаммы обладают патогенностью для людей [5]. Перечисленные недостатки коммерческих вакцин послужили причиной для ограничения вакцинации во многих неблагополучных по бруцеллезу странах, что еще более усугубило эпизоотическую ситуацию по данному заболеванию в мире.

В НИИПББ с целью создания векторной вакцины против бруцеллеза КРС (*Brucella abortus*) использован совершенно новый подход, предполагающий применение вируса гриппа в качестве вектора для доставки генов, экспрессирующих бруцеллезные антигены *in vivo*. Для этого методом обратной генетики сконструированы рекомбинантные штаммы вируса гриппа А (гриппозные векторы) субтипов H5N1 и H1N1, содержащие генетические последовательности вставок бруцеллезных белков L7/L12 (рибосомальный) или Omp16 (поверхностный мембранный) в *NS1* гене, экспрессия которых происходит *in vivo*. Моно и бивалентные вирусные конструкции в режиме прайм (вирусами субтипа H5N1) и бустерной (вирусами субтипа H1N1) иммунизации безопасны для мышей (не вызывают гибели, потери массы тела и патоморфологических изменений), способствует формированию ярко выраженного Th1 клеточного (CD4⁺ лимфоциты I типа) иммунного ответа, а также высокой степени защиты от вирулентного штамма *B. abortus* 544, сопоставимой с коммерческой живой вакциной из штамма *B. abortus* 19. Кроме того, иммунизация животных вирусными конструкциями создает возможность не только для эффективной дифференциации вакцинированных животных от инфицированных, но и дает возможность выявить поголовье больных бруцеллезом животных в вакцинированном стаде [6-8].

Известно, что при разработке технологии изготовления вакцин одним из важнейших этапов является получения высокоактивного вируссодержащего материала на чувствительной системе культивирования. Как правило, в качестве системы культивирования для вирусов гриппа используют куриные эмбрионы (КЭ). Однако при этом условия культивирования (заражающая доза вируса, температура и продолжительность инкубации, возраст КЭ), позволяющие получить максимальный выход вируса, зависят от видовых особенностей вируса, и поэтому должны быть определены экспериментально.

В связи с этим для разработки технологии изготовления векторной вакцины против бруцеллеза КРС целью настоящих исследований являлось определение оптимальных параметров культивирования рекомбинантных штаммов вируса гриппа А, экспрессирующих бруцеллезные антигены Flu-NS1-124-L7/L12-H5N1, Flu-NS1-124-Omp16-H5N1, Flu-NS1-124-L7/L12-H1N1, Flu-NS1-124-Omp16-H1N1 в КЭ.

Материалы и методы

Рекомбинантные штаммы вируса гриппа А, экспрессирующие бруцеллезные антигены:

- рекомбинантный аттенуированный штамм Flu-NS1-124-L7/L12-H5N1 (6:2 реассортант вирусов гриппа A/Puerto Rico/8/34 H1N1 и A/chicken/Astana/6/05 H5N1) вируса гриппа, семейства Orthomyxoviridae, рода Influenzavirus, типа А, стабильно экспрессирующий рибосомальный белок L7/L12 от *Brucella abortus* с открытой рамки

считывания *NSI* гена, депонированный в Коллекции микроорганизмов РГП НИИПББ КН МОН РК (№ М-4-13/D);

-рекомбинантный аттенуированный штамм Flu-NS1-124-Omp16-H5N1 (6:2 реассортант вирусов гриппа A/Puerto Rico/8/34 H1N1 и A/chicken/Astana/6/05 H5N1) вируса гриппа, семейства Orthomyxoviridae, рода Influenzavirus, типа А, стабильно экспрессирующий белок Omp16 (поверхностный мембранный) от *Brucella abortus* с открытой рамки считывания *NSI* гена, депонированный в Коллекции микроорганизмов РГП НИИПББ КН МОН РК (№ М-5-13/D);

-рекомбинантный аттенуированный штамм Flu-NS1-124-L7/L12-H1N1 (6:2 реассортант вирусов гриппа A/Puerto Rico/8/34 H1N1 и A/New Caledonia/20/99 H1N1) вируса гриппа, семейства Orthomyxoviridae, рода Influenzavirus, типа А, стабильно экспрессирующий рибосомальный белок L7/L12 от *Brucella abortus* с открытой рамки считывания *NSI* гена, депонированный в Коллекции микроорганизмов РГП НИИПББ КН МОН РК (№ М-6-13/D);

-рекомбинантный аттенуированный штамм Flu-NS1-124-Omp16-H1N1 (6:2 реассортант вирусов гриппа A/Puerto Rico/8/34 H1N1 и A/New Caledonia/20/99 H1N1) вируса гриппа, семейства Orthomyxoviridae, рода Influenzavirus, типа А, стабильно экспрессирующий белок Omp16 (поверхностный мембранный) от *Brucella abortus* с открытой рамки считывания *NSI* гена, депонированный в Коллекции микроорганизмов РГП НИИПББ КН МОН РК (№ М-7-13/D).

Конструирование вышеизложенных гриппозных векторов проводили по стандартной методике Lonza NucleofectorTM с незначительными изменениями.

- развивающиеся куриные эмбрионы (КЭ) из АО «Алель Агро» (Алматинская область, Казахстан).

Оптимизация параметров культивирования гриппозных вирусных векторов

Среди параметров культивирования, ввиду существенного влияния на возможность накопления вируса в КЭ, определяли оптимальную заражающую дозу, температуру, возраст куриных эмбрионов и срок инкубации вируса.

Определение оптимальной дозы заражения

Оптимальная заражающая доза вирусов определяли на 10 суточных КЭ инфицированных в дозах 1-10000000 ЭИД₅₀ в аллантоисную полость в объеме 0,2 см³. Зараженные КЭ инкубировали при температуре 34±0,5⁰С и относительной влажности воздуха 55-60% в течение 48 ч. Уровень накопления вируса оценивали путем титрования в КЭ и постановкой РГА.

Определение оптимальной температуры инкубирования

Для определения оптимальной температуры инкубирования заражали 10-сут КЭ гриппозными вирусными векторами Flu-NS1-124-L7/L12-H5N1 и Flu-NS1-124-Omp16-H1N1 в дозе 1000 ЭИД₅₀/0,2см³, а векторами Flu-NS1-124-Omp16-H5N1 и Flu-NS1-124-L7/L12-H1N1 в дозе 10 000 ЭИД₅₀/0,2см³. Инфицированные КЭ инкубировали при температурах 32±0,5⁰С, 34±0,5⁰С, 36±0,5⁰С, 38±0,5⁰С и относительной влажности воздуха 55±5% в течение 48 час.

Определение оптимального возраста КЭ

С этой целью инфицировали КЭ 9, 10, 11, 12 и 13 сут возраста в дозах 1000-10000 ЭИД₅₀. Зараженные КЭ инкубировали при температуре 34±0,5⁰С и относительной влажности воздуха 55-60% в течение 48 ч. Уровень накопления вируса оценивали путем титрования в КЭ и постановкой РГА.

Определение оптимального срока культивирования КЭ

Для этой цели КЭ 10-суточного возраста инфицировали вирусами в дозах от 1000 до 10 000 ЭИД₅₀ с дальнейшим инкубированием при температуре 34⁰С в течение 24, 48, 72 и 96 ч. Уровень накопления вируса оценивали путем титрования в КЭ и постановкой РГА.

Определение инфекционной активности гриппозных вирусных векторов

Инфекционная активность вируса определяли по общепринятой методике путем титрования на 10 суточных КЭ. Учет результатов титрования проводили по методу L. Reed & H. Muench и выражали в десятичных логарифмах ЭИД₅₀/см³ [9].

Определение гемагглютинирующей активности гриппозных вирусных векторов

Гемагглютинирующую активность гриппозных вирусных векторов определяли по общепринятой методике в РГА с использованием 1% взвеси эритроцитов петуха [10].

Статистическая обработка

Определяли среднеарифметические значения исследуемых параметров, а также их стандартную ошибку. Достоверность различий между показателями определяли с использованием статистической программы GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Значение $P < 0,05$ считали значимым.

Результаты и обсуждение

Доза инфицирования КЭ

На начальном этапе исследований, при определении оптимальных параметров культивирования рекомбинантных штаммов вируса гриппа А, экспрессирующих бруцеллезные антигены Flu-NS1-124-L7/L12-H5N1, NS1-124-Omp16-H5 N1, Flu-NS1-124-L7/L12-H1N1, Flu-NS1-124-Omp16-H1N1 в КЭ, определяли уровень накопления вируса в зависимости от дозы инфицирования. При этом использовали дозы от 1 до 1000000 ЭИД₅₀ при одинаковых условиях культивирования. Результаты исследований по определению инфекционной и гемагглютинирующей активности вируса в зависимости от заражающей дозы приведены на рисунке 1.

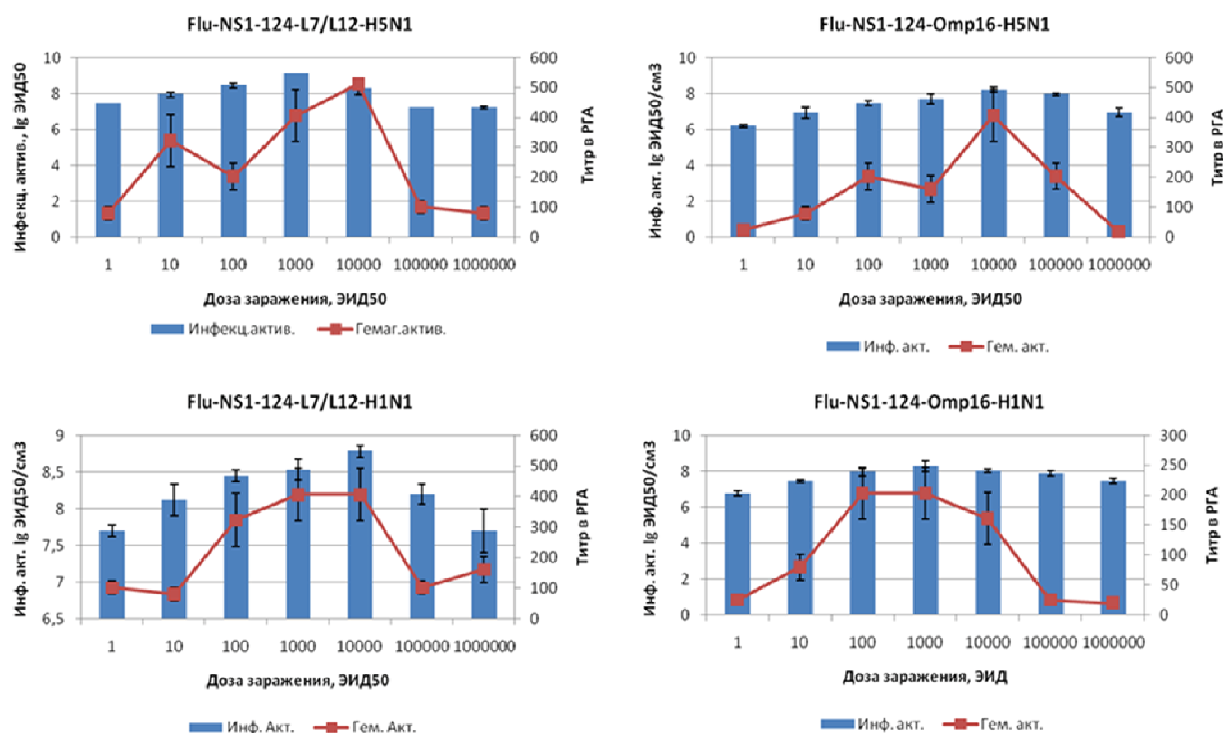


Рисунок 1 - Уровень накопления рекомбинантных штаммов вируса гриппа А, экспрессирующих бруцеллезные антигены, в КЭ в зависимости от заражающей дозы вирусов

Данные рисунка 1. показывают, что рекомбинантные штаммы вируса гриппа А, экспрессирующие бруцеллезные антигены Flu-NS1-124-L7/L12-H5N1, Flu-NS1-124-Omp16-H5N1, Flu-NS1-124-L7/L12-H1N1, Flu-NS1-124-Omp16-H1N1 со всеми

испытанными дозами способны накапливаться в КЭ в достаточно высоких титрах. При этом максимальные значения инфекционной активности вируса были получены при использовании доз в пределах от 1000 до 10 000 ЭИД₅₀.

Наибольшая гемагглютинирующая активность вируса была выявлена в образцах КЭ, инфицированных дозами 10 и 100 000 ЭИД₅₀. Полученные данные показывают зависимость уровня накопления вируса от дозы заражения. С увеличением дозы вируса от 10 до 100 000 ЭИД₅₀ на КЭ отмечается рост титров инфекционной активности. Однако при использовании дозы вируса 1 000 000 ЭИД₅₀ на КЭ, адекватного увеличения как инфекционной, так и гемагглютинирующей активности не последовало, что связано с множественностью инфекции или наличием феномена Фон-Магнуса, при котором образуется большое количество неполных вирусных частиц. Аналогичные результаты получены при определении оптимальной заражающей дозы в КЭ со всеми испытанными рекомбинантными вирусными векторами, экспрессирующими бруцеллезные антигены.

На основании вышеизложенного, оптимальной заражающей дозой инфицирования КЭ для штаммов Flu-NS1-124-L7/L12-H5N1 и Flu-NS1-124-Omp16-H1N1 была принята доза 1000 ЭИД₅₀, а для штаммов Flu-NS1-124-Omp16-H5N1 и Flu-NS1-124-L7/L12-H1N1 - 10 000 ЭИД₅₀.

Температура инкубации вирусов

Последующими исследованиями было установлено влияние температуры инкубирования на репродукцию вирусов в КЭ. В опытах использовали КЭ 10 сут возраста, которым вводили по 0,2 см³ вирусосодержащего материала рекомбинантных штаммов вируса гриппа А, экспрессирующих бруцеллезные антигены Flu-NS1-124-L7/L12-H5N1 и Flu-NS1-124-Omp16-H1N1 в дозе 1000 ЭИД₅₀/0,2см³, а штаммы Flu-NS1-124-Omp16-H5N1 и Flu-NS1-124-L7/L12-H1N1 в дозе 10 000 ЭИД₅₀/0,2 см³. Инфицированные КЭ инкубировали при температурах 32±0,5°C, 34±0,5°C, 36±0,5°C, 38±0,5°C и относительной влажности воздуха 55±5% в течение 48 ч. Результаты исследований приведены в рисунке 2.

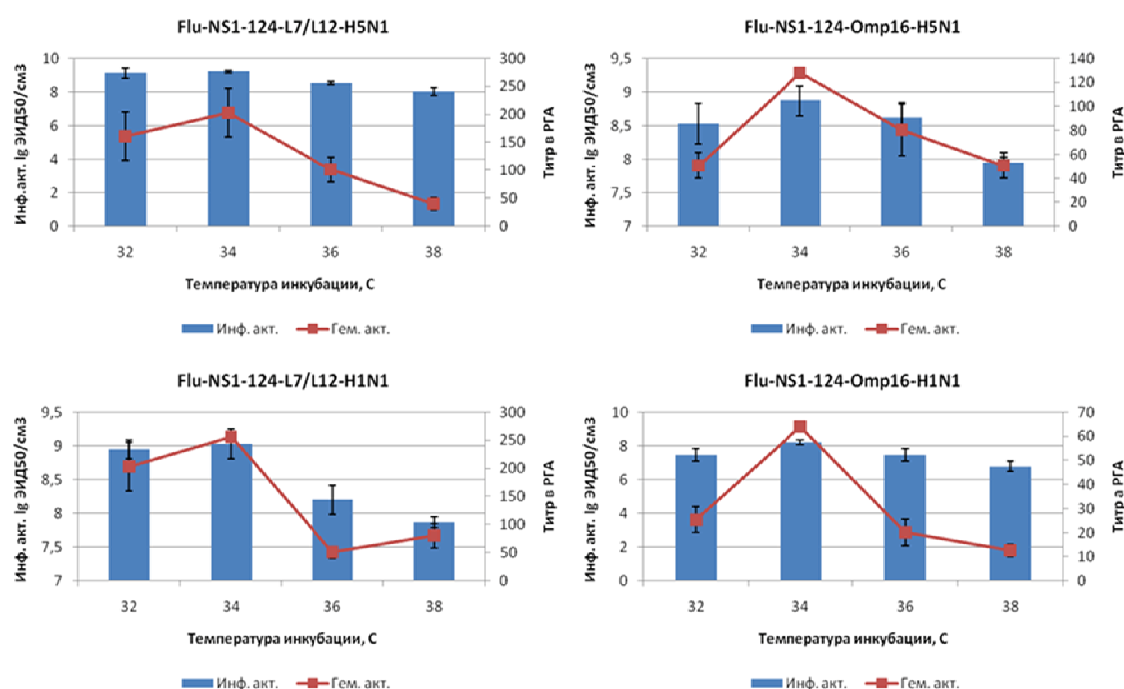


Рисунок 2 - Уровень накопления рекомбинантных штаммов вируса гриппа А, экспрессирующих бруцеллезные антигены в КЭ в зависимости от температуры инкубирования

Из данных рисунка 2 видно, что апробированные температуры инкубирования оказывают существенное влияние на уровень накопления вируса в КЭ. Наибольшее накопление вируса получено в КЭ, инкубация которых проводилась в диапазоне от 32°C и до 36°C. Репродуктивная активность рекомбинантных штаммов вируса гриппа А, экспрессирующих бруцеллезные антигены Flu-NS1-124-L7/L12-H5N1, NS1-124-Omp16-H5N1, Flu-NS1-124-L7/L12-H1N1, Flu-NS1-124-Omp16-H1N1 в КЭ при температуре инкубирования 38°C была ниже, чем при температурах инкубирования 32, 34 и 36°C. При этом между титрами инфекционной активности вирусов, инкубированных в КЭ при температурах 34 и 36°C, статистически достоверной разницы не выявлено ($P>0,100$).

Таким образом, на основании полученных экспериментальных данных, в качестве оптимальной температуры инкубирования рекомбинантных штаммов вируса гриппа А, экспрессирующих бруцеллезные антигены Flu-NS1-124-L7/L12-H5N1, NS1-124-Omp16-H5N1, Flu-NS1-124-L7/L12-H1N1, Flu-NS1-124-Omp16-H1N1 в КЭ нами выбран диапазон температуры в пределах 32-36°C.

Возраст КЭ для инфицирования

После определения заражающей дозы и сроков инкубирования инфицированных КЭ определяли уровень накопления рекомбинантных штаммов вируса гриппа А, экспрессирующих бруцеллезные антигены Flu-NS1-124-L7/L12-H5N1, NS1-124-Omp16-H5N1, Flu-NS1-124-L7/L12-H1N1, Flu-NS1-124-Omp16-H1N1 в зависимости от возраста КЭ. С этой целью инфицировали КЭ 9, 10, 11, 12 и 13 сут возраста в дозах 1000-10000 ЭИД₅₀. Одновременно учитывали объем собираемой с каждого эмбриона АЖ в зависимости от возраста используемых эмбрионов, имеющих большое значение в производстве вакцин. Результаты проведенных исследований приведены в рисунке 3.

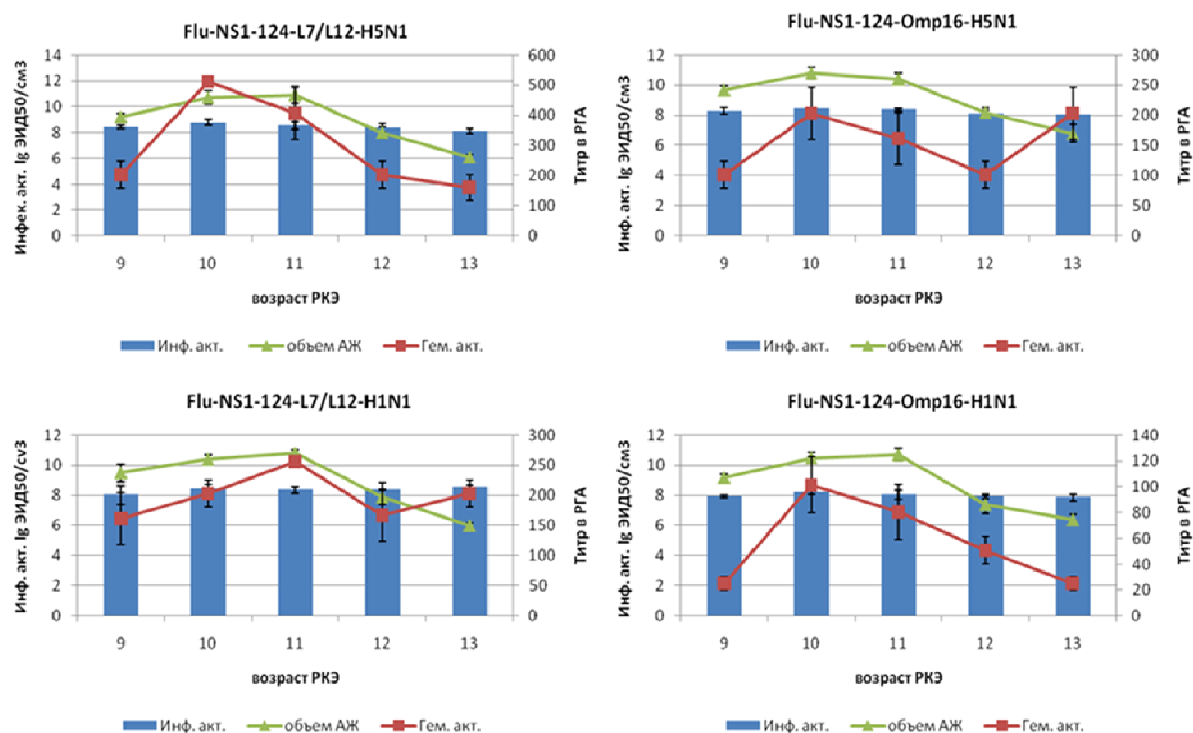


Рисунок 3 - Уровень накопления рекомбинантных штаммов вируса гриппа А, экспрессирующих бруцеллезные антигены в КЭ в зависимости от их возраста

Из данных рисунка 3 следует, что уровень репродукции рекомбинантных штаммов вируса гриппа А, экспрессирующих бруцеллезные антигены Flu-NS1-124-L7/L12-H5N1, NS1-124-Omp16-H5N1, Flu-NS1-124-L7/L12-H1N1, Flu-NS1-124-Omp16-H1N1 в КЭ во всех исследованных (9-13 сут) КЭ высок, при этом показатель инфекционной активности варьировал на уровне от $7,87 \pm 0,22$ до $8,78 \pm 0,22$ lg ЭИД₅₀/см³, а гемагглютинирующая от 1:32 до 1:512. Репродукция вируса в КЭ 12-13 сут. возраста приводит к снижению объема вируссодержащей АЖ и к ухудшению ее качества. По результатам проведенных исследований рекомендуется для выращивания рекомбинантных штаммов вируса гриппа А, экспрессирующих бруцеллезные антигены КЭ 10-11 сут возраста.

Срок культивирования вирусов в КЭ

Заключительным этапом в исследованиях по оптимизации условий культивирования рекомбинантных штаммов вируса гриппа А, экспрессирующих бруцеллезные антигены Flu-NS1-124-L7/L12-H5N1, NS1-124-Omp16-H5N1, Flu-NS1-124-L7/L12-H1N1, Flu-NS1-124-Omp16-H1N1 в КЭ было определение оптимального срока культивирования вируса в КЭ. Для этой цели КЭ 10-суточного возраста инфицировали вирусами в дозах от 1000 до 10 000 ЭИД₅₀ с дальнейшим инкубированием при температуре 34°C в течение 24, 48, 72 и 96 ч. Результаты исследований представлены в рисунке 4.

Из данных рисунка 4 видно, что максимальное накопление рекомбинантных штаммов вируса гриппа А, экспрессирующих бруцеллезные антигены Flu-NS1-124-L7/L12-H5N1, Flu-NS1-124-Omp16-H5N1, Flu-NS1-124-L7/L12-H1N1, Flu-NS1-124-Omp16-H1N1 отмечается на 48 ч инкубации, где в образцах АЖ гемагглютинирующий титр составлял от 1:128 до 1:512, а инфекционная активность от $7,95 \pm 0,14$ до $9,20 \pm 0,08$ lg ЭИД₅₀/см³. Дальнейшее увеличение сроков инкубирования в КЭ приводило к снижению инфекционной активности рекомбинантных штаммов вируса гриппа А, экспрессирующих бруцеллезные антигены Flu-NS1-124-L7/L12-H5N1, Flu-NS1-124-Omp16-H5N1, Flu-NS1-124-L7/L12-H1N1, Flu-NS1-124-Omp16-H1N1 на $0,08-0,25$ lg ЭИД₅₀/см³ через 72 ч инкубации и на $0,58$ lg ЭИД₅₀/см³ через 96 ч инкубации, а штамм Flu-NS1-124-Omp16-H1N1 на $0,83$ lg ЭИД₅₀/см³ через 72 ч инкубации и на $0,92$ lg ЭИД₅₀/см³ через 96 ч инкубации, при этом гемагглютинирующая активность всех образцов гриппозных векторов не изменялась.

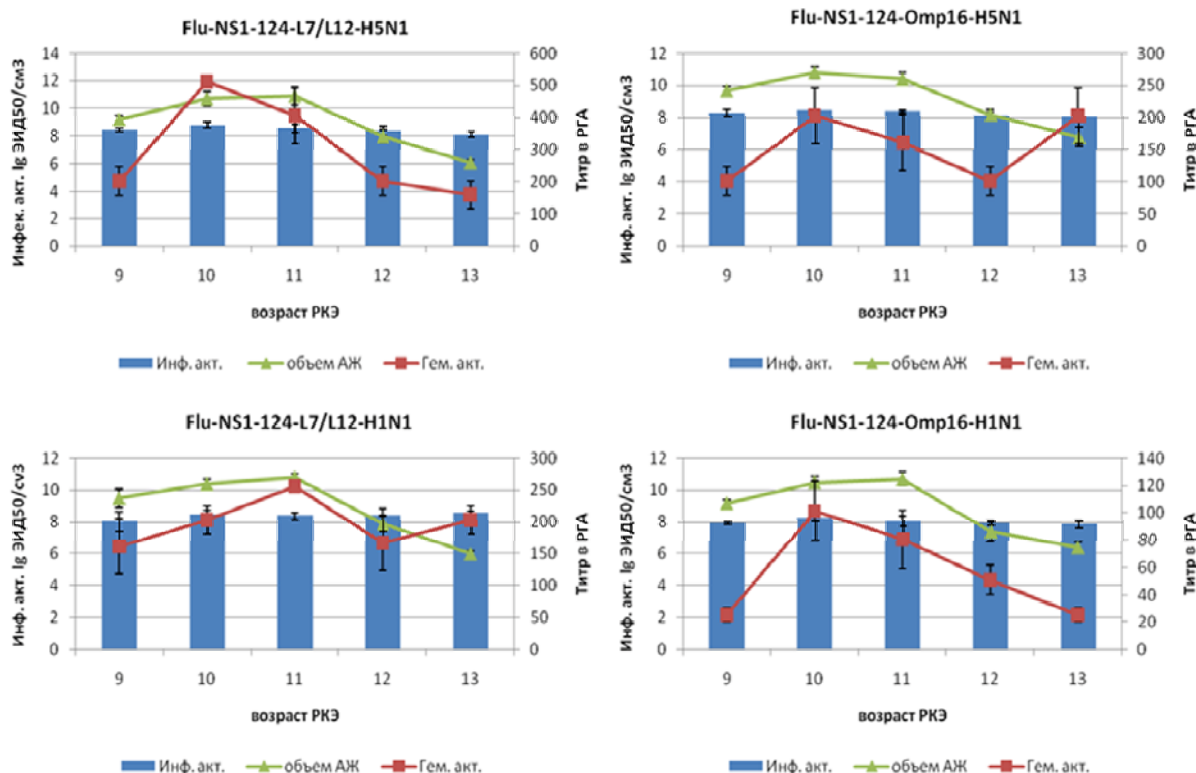


Рисунок 4 - Уровень накопления рекомбинантных штаммов вируса гриппа А, экспрессирующих бруцеллезные антигены в КЭ в зависимости от сроков инкубирования

Таким образом, анализируя полученные экспериментальные данные можно заключить, что оптимальным сроком инкубации рекомбинантных штаммов вируса гриппа А, экспрессирующих бруцеллезные антигены Flu-NS1-124-L7/L12-H5N1, Flu-NS1-124-Omp16-H5N1, Flu-NS1-124-L7/L12-H1N1, Flu-NS1-124-Omp16-H1N1 в КЭ является 48 ч.

Анализируя полученных данных можно заключить, что рекомбинантные штаммы вируса гриппа А, экспрессирующие бруцеллезные антигены со всеми апробированными условиями культивирования способны накапливаться в КЭ. Однако при этом максимальный уровень репродукции гриппозных векторов (свыше 8,0 Ig ЭИД₅₀/см³) отмечается при соблюдении оптимальных условий культивирования, отработанных в процессе исследований. В результате оптимизаций условий культивирования гриппозных векторов удалось повысить их инфекционную активность по сравнению с исходным показателем на 1-2 порядка. Репродукция бруцеллезных конструкций при температурах культивирования (32-36°C) была на 0,92 и 1,42 Ig ЭИД₅₀/см³ выше по сравнению с высокой температурой (38°C). На сегодняшний момент существует ряд публикаций сотрудников НИИПББ по оптимизации условий культивирования рекомбинантных штаммов А/АстанаRG/6:2/2009 (H5N1), А/АстанаRG/5:3/2009 (H5N1) и А/НК/Отар/6:2/2010 вируса гриппа с аналогичными результатами [11, 12].

Наработанные вирусные конструкции: Flu-NS1-124-L7/L12-H5N1, Flu-NS1-124-Omp16-H5N1, Flu-NS1-124-L7/L12-H1N1 и Flu-NS1-124-Omp16-H1N1 с установленными оптимальными параметрами культивирования несмотря на дефектность NS1 гена, обладают хорошими репродуктивными свойствами в КЭ.

Заключение

На основании проведенных исследований установлены оптимальные условия культивирования рекомбинантных штаммов вируса гриппа А, экспрессирующих бруцеллезные антигены Flu-NS1-124-L7/L12-H5N1, Flu-NS1-124-Omp16-H5N1, Flu-NS1-124-L7/L12-H1N1, Flu-NS1-124-Omp16-H1N1 в КЭ, включающие следующие параметры:

- заражающая доза инфицирования КЭ для штаммов Flu-NS1-124-L7/L12-H5N1 и Flu-NS1-124-Omp16-H1N1 1000 ЭИД₅₀/0,2см³, а для штаммов Flu-NS1-124-Omp16-H5N1 и Flu-NS1-124-L7/L12-H1N1 10 000 ЭИД₅₀/0,2см³;
- температура инкубирования 34 °С;
- оптимальный возраст КЭ 10-11 сут;
- продолжительность инкубирования 48 ч.

При соблюдении указанных параметров культивирования рекомбинантных штаммов вируса гриппа А, экспрессирующих бруцеллезные антигены Flu-NS1-124-L7/L12-H5N1, Flu-NS1-124-Omp16-H5N1, Flu-NS1-124-L7/L12-H1N1, Flu-NS1-124-Omp16-H1N1 можно стабильно получать вирусосодержащую АЖ с инфекционной и гемагглютинирующей активностью не менее 8,0 lg ЭИД₅₀/см³ и 1:512 соответственно, что вполне пригодно для приготовления живой векторной вакцины против бруцеллеза КРС.

Литература

- 1 Козловский С.В., Емельяненко П.А. Ветеринарная микробиология. – М.: Колос, 1982. – 304 с.
- 2 Колычев Н.М., Росманов Р.Г. Ветеринарная микробиология и иммунология. – М.: Колос, 2003. – 432 с.
- 3 Асонов Н.Р. Микробиология. – М.: Колос, 2002. – 350 с.
- 4 Schurig G.G., Sriranganathan N., Corbel M.J. Brucellosis vaccines: past, present and future // Vet Microbiol. – 2002. – Vol. 90. – P. 479–496.
- 5 Ashford D.A., di Pietra J., Lingappa J., Woods C., Noll H., et al. Adverse events in humans associated with accidental exposure to the livestock brucellosis vaccine RB51 // Vaccine. – 2004. – Vol. 22. – P. 3435–3439. Jiang X. and Baldwin C.L. Effects of cytokines on intracellular growth of *Brucella abortus* // Infect Immun. – 1993. – V.61 – P. 124-134.
- 6 Tabynov K, Sansyzbay A, Kydyrbayev Z, Yespembetov B, Ryskeldinova S, Zinina N, Assanzhanova N, Sultankulova K, Sandybayev N, Khairullin B, Kuznetsova I, Ferko B, Egorov A. (2014) Influenza viral vectors expressing the *Brucella* OMP16 or L7/L12 proteins as vaccines against *B. abortus* infection. Virol J. 11:69.
- 7 Tabynov K, Kydyrbayev Z, Ryskeldinova S, Yespembetov B, Zinina N, Assanzhanova N, Kozhamkulov Y, Inkarbekov D, Gotskina T, Sansyzbay A. (2014) Novel influenza virus vectors expressing *Brucella* L7/L12 or Omp16 proteins in cattle induced a strong T-cell immune response, as well as high protectiveness against *B. abortus* infection. Vaccine. 32(18): 2034-41.
- 8 Tabynov K, Kydyrbayev Z, Ryskeldinova S, Yespembetov B, Syrymkyzy N, Akzhunusova I and Sansyzbay A. (2014) Safety of the novel vector vaccine against *Brucella abortus* based on recombinant influenza viruses expressing *Brucella* L7/L12 and OMP16 proteins, in cattle. J Vaccines Immun 1: 101.
- 9 Reed L J, Muench H. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. Am J Hyg, 27: 493–497.
- 10 WHO. 2002. WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance. Geneva: World Health Organization.
- 11 Ершебулов З.Д., Строчков В.М., Рыскельдинова Ш.Ж. и др. Изучение репродуктивных свойств и генетической стабильности рекомбинантных штаммов

A/Astana/RG/5:3/2009 и A/Astana/RG/6:2/2009 вируса гриппа в куриных эмбрионах Международная научная конференция «Современное состояние генетики в Казахстане». Материалы конференции, посвященной 80-летию со дня рождения, 55 летию научно-педагогической деятельности академика НАН РК, Лауреата Государственной премии Казахстана, доктора биологических наук, профессора Ахматуллиной Н.Б. Алматы, Казахстан, 2010.-С.42-44.

12 Асанжанова Н.Н., Табынов К.К., Кыдырбаев Ж.К. Сравнительное изучение репродуктивных свойств клонов реассортантного холодоадаптированного штамма А/НК/Otar/6:2/2010 (H3N8) вируса гриппа на куриных эмбрионах Материалы научн-практ. конф. молод. учен... «Актуальные проблемы и перспективы биологической безопасности» - 2012. – С. 21-29.

Рыскельдинова Ш.Ж., Кыдырбаев Ж.К., Асанжанова Н.Н., Гоцкина Т.М.,
Қожамқұлов Е.М., Іңкәрбеков Д.А., Табынов Қ.Қ.

БРУЦЕЛЛЕЗДІҢ OMP16 НЕМЕСЕ L7/L12 ИММУНДЫҚ ҮСТЕМДІ БЕЛОКТАРЫН ЭКСПРЕССИЯЛАЙТЫН ТҰМАУЛЫҚ ВЕКТОРЛАРДЫ ТАУЫҚ ЭМБРИОНДАРЫНДА ӨСІРУ ЖАҒДАЙЛАРЫ

Ірі қара малдардың бруцеллезінің спецификалық алдын алу мақсатымен кері генетикалық әдісі негізінде А субтипті H5N1 және H1N1 тұмау вирусының NS1 генін есептейтін ашық жиектемеден бруцеллездің Omp16 немесе L7/L12 иммундық үстемді белоктарын экспрессиялайтын төрт рекомбинантты штамдары құрастырылды. Бұл жұмыста тұмаулық векторларды тауық эмбриондарында (ТЭ) өсірудің қолайлы параметрлерінің зерттеу нәтижелері көрсетілген. Тұмаулық векторлардың ең көп жинақталуы келесі өсіру жағдайларында: тауық эмбриондарының (ТЭ) жасы – 10 тәулік, ТЭ жұқтыру дозасы - 1000-10000 ЭИД₅₀, температурасы 32-34°C және өсіру ұзақтығы 48 сағатта болатындылығы анықталды. Көрсетілген өсіру параметрлерін сақтау барысында тұрақты түрде инфекциялық және гемагглютининдік белсенділіктері 7,0 lg ЭИД₅₀/см³ және 1:64 кем емес, сәйкес ірі қармалдардың (ІҚМ) бруцеллезіне қарсы векторлы вакцинаны даярлауға белсенділіктері жоғары вирусы бар материалдар алуға болады.

Кілт сөздер: Тұмаулық векторлар, бруцеллез, антиген, рекомбинанттық штамдар, тауық эмбриондары, ірі қара малдар.

Ryskeldinova Sh.Zh., Kydyrbayev Zh.K., Assanzhanova N.N., Gotskina T.M.,
Kozhamkulov Ye.M., Inkarbekov D.A., Tabynov K.K.

CONDITION FOR CULTIVATION OF VIRUS VECTORS EXPRESSING BRUCELLA OMP16OR L7/L12 IMMUNE DOMINANT PROTEINS IN CHICKEN EMBRYOS

Four recombinant strains of influenza virus A H5N1 and H1N1 subtypes expressing from an open frame of reading of NS1 gene of brucellar immune dominant Omp16 or L7/L12 proteins were formed for the specific prophylaxis of brucellosis of cattle on the basis of method of the reverse genetics. The results of researches on definition of the optimal cultivation parameters of indicated influenza virus vectors in the chicken embryos (CE) are presented in this work.

It has been demonstrated that maximal accumulation of virus is noted for following conditions of cultivation: ten-days old chicken embryos, the infecting dose of infection of CE - 1000-10000

EID₅₀, temperature and incubation duration - 32-34 °C and 48 hours, respectively. The specified parameters of cultivation it is possible to receive highly active virus containing material with the infectious and hemagglutininactivity not less than 7,0lg EID₅₀/cm³ and 1:64, respectively, that is quite suitable for preparation of vector vaccine against cattle brucellosis.

Keywords: virus vector, brucella antigen, recombinant strain, chicken embryos, cattle.

УДК 619:616.981.51.

**Сыдыков Б.А., Айтжанов Б.Д., Иванов Н.П., Кожаяев А., Шакенов Б.Н.,
Отарбаев Б., Курманалиулы Н., Мамацашвили Г.Э.**

*Казахский национальный аграрный университет, Алматы
Сельскохозяйственный Институт Ветеринарии и Животноводства, Урумчи*

ЭПИЗООТИЧЕСКАЯ И ЭПИДЕМИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ ПО СИБИРСКОЙ ЯЗВЕ НА УЧАСТКАХ СТРОЯЩИХСЯ ГАЗОПРОВОДНЫХ МАГИСТРАЛЕЙ АЛМАТИНСКОЙ ОБЛАСТИ

Аннотация

В Казахстане, в котором значительные территории являются зонами с высоким риском проявления вспышек сибирской язвы, при строительстве транспортных магистралей, газо-нефтепроводов, других объектов, при которых проводятся земляные работы, необходимо осуществлять мониторинг эпидемической и эпизоотической ситуации по данной инфекции. Исследования показали, что эпизоотическую и эпидемическую ситуацию по сибирской язве в зоне строительства газопроводов «Алматы-Байсерке-Талгар» и «Алматы-Талдыкорган» можно считать умеренно опасной.

Ключевые слова Алматинская область, сибирская язва, вспышка, эпизоотическая ситуация, эпидемическая ситуация, газопровод.

Введение

В Государственной программе развития здравоохранения Республики Казахстан «Саламатты Қазақстан», нацеленной на улучшение здоровья населения, одной из ключевых задач является усиление межсекторального и межведомственного взаимодействия по вопросам охраны здоровья граждан и обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия [1]. Выполнение вышеозначенных задач невозможно без усиления борьбы с особо опасными антропозоонозными заболеваниями, которые могут причинить ущерб как здоровью людей, так и поголовью сельскохозяйственных животных.

Одним из таких заболеваний является сибирская язва, вызываемая возбудителем *Bac. Anthracis*. Ввиду своей исключительной опасности данное заболевание даже рассматривается в некоторых странах в качестве биологического оружия, которое может быть использовано не только в военных целях, но и террористами. Опасность сибирской язвы заключается в молниеносном протекании болезни (от нескольких часов до нескольких дней). При несвоевременно оказанной медицинской или ветеринарной помощи, зараженный человек или животное с высокой долей вероятности погибнут в вышеприведенные сроки [2].

Сибирская язва до настоящего времени остается серьезной проблемой в области ветеринарии и здравоохранения практически во всем мире. По данным ВОЗ заболевания сибирской язвой людей и сельскохозяйственных животных отмечаются в