

УДК 619:616.981.42

Майлыбаева А.М., Рыскельдинова Ш.Ж., Асанжанова Н.Н.,
Сармыкова М.К., Табынов К.К.

Казахский национальный аграрный университет,
РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности КН
МОН РК (пгт. Гвардейский)

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ГРИППОЗНЫХ ВИРУСНЫХ ВЕКТОРОВ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ БРУЦЕЛЛЕЗНЫЕ ИММУНОДОМИНАНТНЫЕ БЕЛКИ OMP19 ИЛИ CU-ZN-SOD, В КУРИНЫХ ЭМБРИОНАХ

Аннотация

Для создания вакцины против бруцеллеза мелкого рогатого скота (МРС) были сконструированы гриппозные вирусные векторы (ГВВ), экспрессирующие бруцеллезные иммунодоминантные белки Omp19 или Cu-Zn-Sod. В данной работе мы установили оптимальные параметры культивирования указанных ГВВ в куриных эмбрионах (КЭ): возраст КЭ - 10 суток, заражающая доза инфицирования КЭ 100-1000 ЭИД₅₀, температура и продолжительность инкубации - 32-34±0,5°C и 48 ч, соответственно. При соблюдении указанных параметров культивирования можно стабильно получать высокоактивный вирусосодержащий материал с инфекционной активностью не менее 7,0 log₁₀ ЭИД₅₀/см³, что вполне пригодно для приготовления векторной вакцины против бруцеллеза МРС.

Ключевые слова: Гриппозные вирусные векторы, бруцеллез, антиген, рекомбинантные штаммы, куриные эмбрионы, культивирование.

Введение

Бруцеллез - зоонозное заболевание, вызываемое бактериями из рода *Brucella* [1]. Бруцеллез редко приводит к смерти человека, но он может представлять значительный экономический ущерб для владельцев домашних животных из-за потери приплода, снижению надоев и бесплодия [2]. Род *Brucella* включает в себя, по меньшей мере, десять видов (spp.): *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. cetacea*, *B. pinnipedia*, *B. microti*, *B. inopinata* [3]. Классификация видов *Brucella* в основном базируется на предпочитаемых хозяевах (вид животного), хотя в генетическом отношении все они более чем на 94% идентичны между собой [4]. Среди всех видов *Brucella* наибольшей патогенностью для человека обладает *B. melitensis* [5].

Вакцинация животных против бруцеллеза является одной из наиболее экономически эффективных мер по защите здоровья людей в эндемичных районах [6], а также важнейшим инструментом в искоренении заболевания среди сельскохозяйственных животных [7]. Ранее используя в качестве векторов рекомбинантные вирусы гриппа А субтипов H5N1 и H1N1, экспрессирующие бруцеллезные иммунодоминантные белки Omp16 и L7/L12 из открытой рамки считывания NS1 белка, мы достигли успеха в создании вакцины против бруцеллеза КРС (*B. abortus*) [8]. В последние несколько лет мы провели множество исследований, которые наглядно демонстрируют безопасность [9, 10] и высокую эффективность этой вакцины на КРС [11, 12], ее способность индуцировать продолжительный протективный иммунный ответ (не менее 12 мес) [13], а также возможность дифференциации инфицированных животных от вакцинированных [10]. В настоящий момент данная разработка находится на стадии внедрения в практику и коммерциализации в Казахстане.

Успех достигнутый с применением гриппозных вирусных векторов (ГВВ), экспрессирующих бруцеллезные белки, в создании эффективной вакцины против

бруцеллеза КРС, послужил хорошим основанием для переноса этой же технологии применительно к овцам и козам, для которых бруцеллез (*B. melitensis*) также является одной из ведущих проблем. При первом испытании вакцины Flu-BA у овец и коз была достигнута 57.1 и 42.9% защита от *B. melitensis* инфекции, соответственно [14], что рассматривалось нами как вполне обнадеживающий результат. Дальнейшее повышение эффективности вакцины предусматривало различные подходы, в том числе касающийся дополнения формуляции препарата другими бруцеллезными белками. Для этой цели были сконструированы два новых ГВВ, экспрессирующих бруцеллезные иммунодоминантные белки Omp19 или Cu-Zn SOD. Принимая во внимание тот факт, что все ГВВ в составе вакцинной формуляции должны иметь высокие титры, то цель настоящих исследований заключалась в оптимизации условий культивирования новых ГВВ в куриных эмбрионах (КЭ). Данная работа обусловлена тем, что условия культивирования (заражающая доза вируса, температура и продолжительность инкубации, возраст КЭ), позволяющие получить максимальный выход вируса, зависят от штаммовых особенностей вируса, а также свойств встроенного чужеродного белка.

Материалы и методы

1. Рекомбинантные штаммы вируса гриппа А, экспрессирующие бруцеллезные антигены:

-рекомбинантный аттенуированный штамм Flu-NS1-124-Omp19 (6:2 реассортант вирусов гриппа A/PuertoRico/8/34 H1N1 и A/chicken/Astana/6/05 H5N1) вируса гриппа, семейства Orthomyxoviridae, рода Influenza virus, типа А, стабильно экспрессирующий бруцеллезный белок Omp19 (поверхностный мембранный) с открытой рамки считывания NS1 гена в положении 124 аминокислоты;

-рекомбинантный аттенуированный штамм Flu-NS1-124-Cu-Zn-Sod (6:2 реассортант вирусов гриппа A/PuertoRico/8/34 H1N1 и A/chicken/Astana/6/05 H5N1) вируса гриппа, семейства Orthomyxoviridae, рода Influenza virus, типа А, стабильно экспрессирующий бруцеллезный рибосомальный белок Cu-Zn-Sod с открытой рамки считывания NS1 гена в положении 124 аминокислоты;

Конструирование вышеизложенных гриппозных векторов проводили по стандартной методике Lonza Nucleofector™ с незначительными изменениями [15].

2. 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.

2.1 Определение оптимальной дозы заражения

Оптимальную заражающую дозу вируса определяли на 10 суточных КЭ (АО «Алель Агро», Алматинская область), инфицированных в дозах от 10 до 10000000 ЭИД₅₀ в аллантоисную полость в объеме 0,2 см³. Зараженные КЭ инкубировали при температуре 34±0,5°C и относительной влажности воздуха 55-60% в течение 48 ч. Уровень накопления вируса оценивали путем титрования в КЭ и постановкой РГА.

2.2 Определение оптимальной температуры инкубирования

Для определения оптимальной температуры инкубирования заражали 10-сут КЭ ГВВ Flu-NS1-124-Omp19 и Flu-NS1-124-Cu-Zn-Sod в дозе 1000 ЭИД₅₀/0,2см³. 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.

2.3 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±0,5°C и относительной влажности воздуха 55-60% в течение 48 ч. Уровень накопления вируса оценивали путем титрования в КЭ и постановкой РГА.

2.4 Определение оптимального срока культивирования КЭ

Для этой цели КЭ 10-суточного возраста инфицировали вирусами в дозе 1000 ЭИД₅₀ с дальнейшим инкубированием при температуре 34±0,5 °С в течение 24, 48, 72 и 96 ч. Уровень накопления вируса оценивали путем титрования в КЭ и постановкой РГА.

3. Определение инфекционной активности ГВВ

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 [16].

4. Определение гемагглютинирующей активности ГВВ

Гемагглютинирующую активность вирусов определяли по общепринятой методике в РГА с использованием 1% взвеси эритроцитов петуха [17].

5. Постановка ОТ-ПЦР

Выделение РНК. Вирусную РНК из вируссодержащей суспензии выделяли с использованием набора QIAmpViral RNA MiniKit, «Qiagen».

ОТ-ПЦР ставили в соответствии с инструкциями производителя (набор SuperScript III One-Step RT-PCR with platinum Taq фирмы «Invitrogen»).

6. Статистическая обработка

Определяли средние арифметические значения исследуемых параметров, а также их стандартную ошибку. Достоверность различий между показателями определяли с использованием статистической программы GraphPadPrism 6 (GraphPadSoftware, Inc., LaJolla, CA, USA). Значение P< 0,05 считали значимым.

Результаты исследований

1. Доза инфицирования КЭ

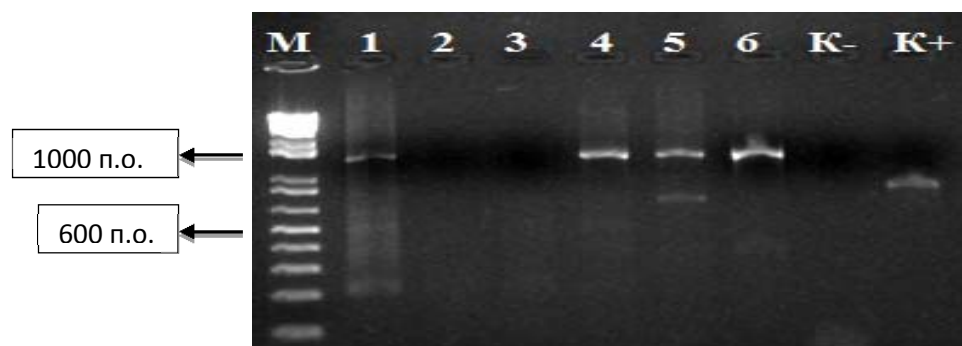
На начальном этапе исследований, при определении оптимальных параметров культивирования рекомбинантных штаммов вируса гриппа А, экспрессирующих бруцеллезные антигены Flu-NS1-124-Omp19, Flu-NS1-124-Cu-Zn-Sod в КЭ, определяли уровень накопления вируса в зависимости от дозы инфицирования. При этом использовали дозы от 10 до 10000000 ЭИД₅₀ при одинаковых условиях культивирования. При культивировании для изготовления векторной вакцины против бруцеллеза MPC одним из важнейших этапов является определение наличия бруцеллезных вставок в NS1 гене вируса гриппа. Далее определяли наличие бруцеллезной вставки в NS1 гене в материалах полученных разными дозами инфицирования с использованием методов ОТ-ПЦР.

Результаты исследований по определению инфекционной и гемагглютинирующей активности вируса в зависимости от заражающей дозы приведены в таблице 1 и определены наличие бруцеллезной вставки в NS1 гене на рисунках 1, 2.

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

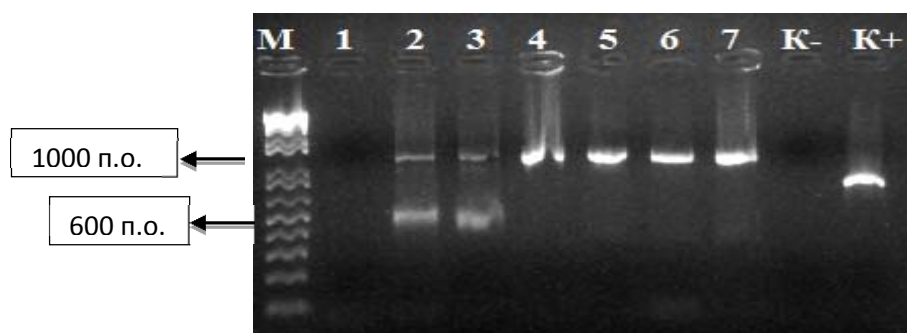
Наименование штамма	Доза заражения, ЭИД ₅₀ /0,2см ³	Инфекционная активность, log ₁₀ ЭИД ₅₀ /см ³ , (x±m), n=3	Гемагглютинирующая активность
Flu-NS1-124-Omp19	10	7,12±0,30	1:16
	100	7,20±0,14	1:32
	1000	8,12±0,08	1:64
	10000	8,45±0,14	1:32
	100000	8,03±0,08	1:64
	1000000	7,95±0,22	1:64

Flu-NS1-124-SOD	10	6,95±0,08	1:8
	100	7,87±0,14	1:16
	1000	7,95±0,08	1:32
	10000	8,37±0,30	1:64
	100000	8,03±0,08	1:128
	1000000	7,95±0,14	1:128
	10000000	7,45±0,14	1:64



М - маркер ДНК, 1–1000000 ЭИД₅₀, 2–100 000 ЭИД₅₀, 3–10 000 ЭИД₅₀, 4 -1000 ЭИД₅₀, 5 -100 ЭИД₅₀, 6 -10 ЭИД₅₀, К⁻ - негативный контроль, К⁺ - ген вируса гриппа A/PuertoRico/8/34 (H1N1).

Рисунок 1– Электрофореграмма продуктов амплификации в ОТ-ПЦР NS генов вируса гриппа A/PuertoRico/8/34 (H1N1) дикого типа и гриппозного вирусного вектора Flu-NS1-124-Omp19 в зависимости от заражающей дозы вирусов



М - маркер ДНК, 1– 10000000 ЭИД₅₀, 2–1000000 ЭИД₅₀, 3–100000 ЭИД₅₀, 4–10000 ЭИД₅₀, 5 -1000 ЭИД₅₀, 6 -100 ЭИД₅₀, 7 –10 ЭИД₅₀, К⁻ - негативный контроль, К⁺ - ген вируса гриппа /PuertoRico/8/34 (H1N1).

Рисунок 2 – Электрофореграмма продуктов амплификации в ОТ-ПЦР NS генов вируса гриппа A/PuertoRico/8/34 (H1N1) дикого типа и гриппозного вирусного вектора Cu-Zn-Sod в зависимости от заражающей дозы вирусов.

Данные таблицы 1 показывают, что рекомбинантные штаммы вируса гриппа А, экспрессирующие бруцеллезные антигены Flu-NS1-124-Omp19, Flu-NS1-124-Cu-Zn-Sod со всеми испытанными дозами способны накапливаться в КЭ в достаточно высоких титрах. При этом максимальные значения инфекционной и гемагглютинирующей активности вируса были получены при использовании доз в пределах от 100 до 100000 ЭИД₅₀. Полученные данные показывают зависимость уровня накопления вируса от дозы заражения. Исследование NS1 гена в ОТ-ПЦР показало (рисунки 1 и 2), что оба ГВВ

содержат вставки бруцеллезных белков Omp19 и Cu-Zn-Sod дозах заражения от 10 до 1000 ЭИД₅₀, так как размеры NS1 генов (1110 -1242 пар оснований, соответственно) вирусных конструкций вследствие наличия чужеродной вставки превышали таковые дикого родительского вируса A/PuertoRico/8/34 (H1N1). С увеличением дозы заражения от 10000 до 100000 ЭИД₅₀ на КЭ отмечается рост титров инфекционной и гемагглютинирующей активности, но при ПЦР-анализе ГВВ отсутствуют бруцеллезные вставки.

При использовании дозы вируса от 1000000 до 10000000 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, в том числе утративших бруцеллезные вставки.

На основании вышеизложенного, оптимальной заражающей дозой инфицирования КЭ для штаммов Flu-NS1-124-Omp19 и Flu-NS1-124-Cu-Zn-Sod была принята доза от 10 - 1000 ЭИД₅₀.

2. Температура инкубации вирусов

Последующими исследованиями было установлено влияние температуры инкубирования на репродукцию вирусов в КЭ. Результаты исследований приведены в таблице 2.

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

Наименование штамма	Температура инкубирования	Инфекционная активность, $\log_{10}$ ЭИД ₅₀ /см ³ (x±m), n=3	Гемагглютинирующая активность
Flu-NS1-124-Omp19-H5N1	32±0,5°C	7,78±0,30	1:32
	34±0,5°C	8,28±0,14	1:64
	36±0,5°C	7,87±0,08	1:32
	38±0,5°C	7,28±0,22	1:16
Flu-NS1-124-SOD-H5N1	32±0,5°C	7,62±0,08	1:16
	34±0,5°C	8,03±0,22	1:32
	36±0,5°C	7,95±0,14	1:16
	38±0,5°C	7,03±0,30	1:8

Из данных таблицы 2 видно, что апробированные температуры инкубирования могут оказывать существенное влияние на уровень накопления вируса в КЭ. Наибольшее накопление вируса получено в КЭ, инкубация которых проводилась в диапазоне от 32±0,5°C и до 36±0,5°C. Репродуктивная активность рекомбинантных штаммов вируса гриппа А, экспрессирующих бруцеллезные антигены Flu-NS1-124-Omp19 и Flu-NS1-124-Cu-Zn-Sod в КЭ при температуре инкубирования 38±0,5°C была ниже, чем при температурах инкубирования 32±0,5°C, 34±0,5°C и 36±0,5°C. При этом между титрами инфекционной активности вирусов, инкубированных в КЭ при температурах 34±0,5°C и 36±0,5°C, статистически достоверной разницы не выявлено (P>0,05). Таким образом, на основании полученных экспериментальных данных, в качестве оптимальной температуры инкубирования ГВВ Flu-NS1-124-Omp19 и Flu-NS1-124-Cu-Zn-Sod в КЭ нами выбран диапазон в пределах 32±0,5°C - 36±0,5°C.

3. Возраст КЭ для инфицирования

После определения заражающей дозы и сроков инкубирования инфицированных КЭ определяли уровень накопления ГВВ Flu-NS1-124-Omp19 и Flu-NS1-124-Cu-Zn-Sod в зависимости от возраста КЭ. 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 таблице 3.

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

Наименование штамма	Доза заражения, ЭИД ₅₀ /0,2см ³	Возраст КЭ	Инфекционная активность, log ₁₀ ЭИД ₅₀ /см ³ (x±m), n=3	Гемагглютинирующая активность	Средний объем АЖ, см ³ (x±m), n=10
Flu-NS1-124-Omp19-H5N1	100	9	7,20±0,14	1:16	9,3±0,34
		10	8,03±0,30	1:32	10,8±0,27
		11	7,62±0,08	1:32	10,2±0,30
		12	7,53±0,22	1:16	8,4±0,17
		13	7,37±0,08	1:8	6,5±0,42
Flu-NS1-124-SOD-H5N1	100	9	7,03±0,08	1:16	9,2±0,63
		10	7,95±0,22	1:32	10,5±0,34
		11	8,03±0,08	1:16	10,6±0,37
		12	7,95±0,14	1:32	7,0±0,45
		13	7,87±0,08	1:16	6,3±0,20

Из данных таблицы 3 следует, что уровень репродукции ГВВ Flu-NS1-124-Omp19 и Flu-NS1-124-Cu-Zn-Sod в 9-13 сут КЭ высок, при этом показатель инфекционной активности варьировал на уровне от 7,03±0,08 до 8,03±0,30log₁₀ ЭИД₅₀/см³, а гемагглютинирующая от 1:8 до 1:32. Репродукция вируса в КЭ 12-13 сут возраста приводит к снижению объема вирусосодержащей АЖ и к ухудшению ее качества. По результатам проведенных исследований для накопления ГВВ рекомендуются КЭ 10 или 11 сут возраста.

4. Срок культивирования вирусов в КЭ

Заключительным этапом в исследованиях по оптимизации условий культивирования ГВВ Flu-NS1-124-Omp19 и Flu-NS1-124-Cu-Zn-Sod было определение оптимальных сроков культивирования в КЭ. Результаты исследований представлены в таблице 4.

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

Наименование штамма	Сроки инкубирования	Инфекционная активность, log ₁₀ ЭИД ₅₀ /см ³ (x±m), n=3	Гемагглютинирующая активность
Flu-NS1-124-Omp19-H5N1	24	6,20±0,14	1:8
	48	8,12±0,30	1:64
	72	7,95±0,14	1:32
	96	7,28±0,08	1:16
Flu-NS1-124-SOD-H5N1	24	6,03±0,22	1:4
	48	8,03±0,08	1:32
	72	7,78±0,30	1:32
	96	7,12±0,22	1:16

Из данных таблицы 4 видно, что максимальное накопление ГВВ Flu-NS1-124-Omp19 и Flu-NS1-124-Cu-Zn-Sod отмечается на 48 ч инкубации, где в образцах АЖ гемагглютинирующий титр составлял 1:64 и 1:32, соответственно, а инфекционная активность 8,12±0,30 и 8,03±0,08log₁₀ ЭИД₅₀/см³, соответственно. Дальнейшее увеличение

сроков инкубации в КЭ приводило к снижению инфекционной активности ГВВ Flu-NS1-124-Omp19 и Flu-NS1-124-Cu-Zn-Sod на $0,17-0,25 \log_{10}$ ЭИД₅₀/см³ через 72 ч инкубации и на $0,84-0,91 \log_{10}$ ЭИД₅₀/см³ через 96 ч инкубации. При этом гемагглютинирующая активность ГВВ варьировало от 1:4 до 1:64.

Ранее наша исследовательская группа опубликовала ряд работ по оптимизации условий культивирования рекомбинантных вакцинных штаммов вируса гриппа (сезонный, пандемический, лошадиный грипп), в том числе ГВВ [18-21]. Следует отметить, что результаты настоящих исследований полностью согласуются с ранее проведенными работами.

Выводы

На основании проведенных исследований установлены оптимальные условия культивирования ГВВ Flu-NS1-124-Omp19 и Flu-NS1-124-Cu-Zn-Sod в КЭ, включающие следующие параметры: заражающая доза 100- 1000 ЭИД₅₀/0,2см³; температура инкубации $34 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$; оптимальный возраст КЭ 10-11 сут; продолжительность инкубирования 48 ч. При соблюдении указанных параметров культивирования можно стабильно получать вирусосодержащие АЖ ГВВ Flu-NS1-124-Omp19 и Flu-NS1-124-Cu-Zn-Sod с инфекционной активностью не менее $7,0 \log_{10}$ ЭИД₅₀/см³, что вполне пригодно для приготовления живой векторной вакцины против бруцеллеза МРС.

Литература

1. Bercovich Z. The use of skin delayed-type hypersensitivity as an adjunct test to diagnose brucellosis in cattle: a review. Vet Q. 2000; 22(3):123–130.
2. Xavier M.N., Paixão T.A., Poester F.P., Lage A.P., Santos R.L. Pathological, immunohistochemical and bacteriological study of tissues and milk of cows and fetuses experimentally infected with *Brucella abortus*. J Comp Pathol. 2009; 140(2–3):149–157.
3. Haag A.F., Myka K.K., Arnold M.F., Caro-Hernández P., Ferguson G.P. Importance of lipopolysaccharide and cyclic β -1,2-glucans in *Brucella*-mammalian infections. Int J Microbiol. 2010; 2010:1–12.
4. Chain P.S., Comerci D.J., Tolmasky M.E., Larimer F.W., Malfatti S.A., Vergez L.M., Agüero F., Land M.L., Ugalde R.A., Garcia E. Whole-genome analyses of speciation events in pathogenic *Brucellae*. Infect Immun. 2005; 73(12):8353–8361.
5. Corbel M.J. Brucellosis: an overview. Emerg Infect Dis. 1997; 3(2):213–221.
6. Zinsstag J, Schelling E, Roth F, Bonfoh B, Savigny D, Tanner M. 2007. Human benefits of animal interventions for zoonosis control. Emerg Infect Dis 13: 527–531.
7. Garin-Bastuji B, Blasco J.M., Grayon M., Verger J.M. 1998. *Brucella melitensis* infection in sheep: present and future. Vet Res 29: 255–274.
8. Tabynov K. Influenza viral vector based *Brucella abortus* vaccine: a novel vaccine candidate for veterinary practice. Expert Rev Vaccines. - 2016; 15(10):1237-9.
9. Tabynov K., Kydyrbayev Z., Ryskeldinova S., Yespembetov B., Syrymkyzy N, Akzhunusova I., Sansyzbay A. 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. - 2014;1:101.
10. Tabynov K., Ryskeldinova Sh., Kydyrbayev Zh., Sansyzbay A. Safety of the novel influenza viral vector *Brucella abortus* vaccine in pregnant heifers. Cienc Rural. - 2016;46(1):114-118.
11. Tabynov K., Kydyrbayev Z., Ryskeldinova S., Yespembetov B., Zinina N., Assanzhanova N, et al. 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. - 2014;32:2034-41.

12. *Tabynov K., Yespembetov B., Sansyzbay A.* Novel vector vaccine against *Brucella abortus* based on influenza A viruses expressing *Brucella* L7/L12 or Omp16 proteins: evaluation of protection in pregnant heifers. *Vaccine.* - 2014;32:5889-92.
13. *Tabynov K., Yespembetov B., Ryskeldinova S., Zinina N., Kydyrbayev Zh., Kozhamkulov Y., Inkarebekov D., Sansyzbay A.* Prime-booster vaccination of cattle with an influenza viral vector *Brucella abortus* vaccine induces a long-term protective immune response against *Brucella abortus* infection. *Vaccine.* - 2016;34:438-444.
14. *Tabynov K., Yespembetov B., Matikhan N., Ryskeldinova S., Zinina N., Kydyrbayev Z., Assanzhanova N., Tabynov K., Renukaradhya G.J., Mukhitdinova G., Sansyzbay A.* First evaluation of an influenza viral vector based *Brucella abortus* vaccine in sheep and goats: Assessment of safety, immunogenicity and protective efficacy against *Brucella melitensis* infection. *Vet Microbiol.* - 2016;197:15-20.
15. *Tabynov K., Sansyzbay A., Kydyrbayev Z., Yespembetov B., Ryskeldinova S., Zinina N., et al.* Influenza viral vectors expressing the *Brucella* OMP16 or L7/L12 proteins as vaccines against *B. abortus* infection. *Virol J.* - 2014;11:69.
16. *Reed L.J., Muench H.* 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg.* 27: 493–497.
17. WHO. 2002. WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance. Geneva: World Health Organization.
18. *Akzhunusova I., Assanzhanova N., Tabynov K., Abdrakhmanova B., Sansyzbay A.* Optimization of influenza A and B viruses cultivation conditions for preparation of trivalent seasonal influenza split vaccine. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research.* - 2015. 6(6):2375-2381.
19. *Рыскельдинова Ш.Ж., Кыдырбаев Ж.К., Асанжанова Н.Н., Гоцкина Т.М., Кожамкулов Е.М., Инкарбеков Д.А., Табынов К.К.* Условия культивирования гриппозных векторов, экспрессирующих бруцеллезные иммунодоминантные белки Omp16 или L7/L12, в куриных эмбрионах. *Исследования, результаты.* – 2014. - №4. – С. 64-74.
20. *Рыскельдинова Ш.Ж., Кыдырбаев Ж.К., Асанжанова Н.Н., Кожамкулов Е.М., Инкарбеков Д.А., Булатов Е.А., Табынов К.К.* Оптимизация параметров культивирования реассортантного холодаадаптированного штамма А/НК/Otar/6:2/2010 (H3N8) вируса гриппа на куриных эмбрионах. *Исследования, результаты.* – 2016. - №3(71). – С. 78-85.
21. *Майлыбаева А.М., Рыскельдинова Ш.Ж., Асанжанова Н.Н., Кыдырбаев Ж.К., Еспембетов Б.А., Сармыкова М.К., Табынов Қ.Қ.* Тұмау вирустық векторларының бруцеллездік Omp19 және Cu-Zn SOD протеиндерін кспрессиялайтын генетикалық ендірмелерінің тұрақтылығын бағалау. *Ізденістер, нәтижелер.* - 2016. - №3(71), - Б. 63-67.

**Майлыбаева А.М., Рыскельдинова Ш.Ж., Асанжанова Н.Н.,
Сармыкова М.К., Табынов Қ.Қ.**

**БРУЦЕЛЛЕЗДІҢ OMP19 НЕМЕСЕ CU-ZN-SOD ИММУНДЫҚ ҮСТЕМДІ БЕЛОКТАРЫН
ЭКСПРЕССИЯЛАЙТЫН ТҰМАУЛЫҚ ВЕКТОРЛАРДЫ ТАУЫҚ ЭМБРИОНДАРЫНДА
ӨСІРУ ЖАҒДАЙЛАРЫН ОҢТАЙЛАНДЫРУ**

Аңдатпа

Ұсақ малдардың бруцеллезіне қарсы вакцинаны жасау үшін бруцеллездің Omp19 немесе Cu-Zn-Sod иммундық үстемді белоктарын экспрессиялайтын, тұмау вирусының векторлары (ТВВ) құрастырылды. Бұл жұмыста ТВВ тауық эмбриондарында (ТЭ) өсірудің қолайлы параметрлерін анықтадық: тауық эмбриондарының (ТЭ) жасы – 10 тәулік, ТЭ жұқтыру дозасы - 100-1000 ЭИД₅₀, температурасы 32-34±0,5°C және өсіру ұзақтығы 48 сағат болатындылығы зерттелді. Егер осы өсіру параметрлері бақыланатын

болса, кем дегенде инфекциялық белсенділігі $7,62 \log_{10} \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$ болатын жоғары вирусты материалды алуға болады, ол ұсақ мал бруцеллезіне қарсы векторлық вакцинаны дайындауға әбден лайықты.

Кілт сөздер: Тұмаулық вирустық векторлар, бруцеллез, антиген, рекомбинанттық штамдар, тауық эмбриондары, ұсақ малдар, өсіру.

**Mailybaeva A.M., Ryskeldinova S.Z., Asanzhanova N.N.,
Sarmyкова M.K., Tabynov K.K.**

OPTIMIZATION IN CHICKEN EMBRYOS CULTIVATION CONDITIONS OF INFLUENZA VIRAL VECTORS EXPRESSING BRUCELLA IMMUNODOMINANT OMP19 OR CU-ZN-SOD PROTEINS

Abstract

To develop a vaccine against ruminants brucellosis the influenza viral vectors (IVV) expressing Brucella immunodominant Omp19 or Cu-Zn-Sod proteins were constructed. In this paper, we have established the optimal parameters for the cultivation of these IVV in chicken embryos (CE): the age of the CE is 10 days, infection dose 100-1000 EID₅₀, the temperature and duration of incubation are $32-34 \pm 0,5^\circ\text{C}$ and 48 h, respectively. Culturing under specified parameters can stably obtain a highly virus-containing material with potency of at least $7.0 \log_{10} \text{EID}_{50}/\text{ml}$, which is suitable for the preparation of a vector vaccine against brucellosis.

Key words: Influenza viral vectors, brucellosis, antigen, recombinant strains, chicken embryos, cultivation.

UDK 619:579.672:869.1:636.592:637.54

Makhmaden K., Sarsembaeva N.B., Mustafina Sh.A., Mustafin N.K., Ibadullayeva A.A.

Kazakh national agrarian university, Almaty

IDENTIFICATION OF LISTERIA IN TURKEY MEAT

Annotation

L. monocytogenes is food pathogen, it is often found in meat raw materials and semi-finished products, since they are resistant to low temperatures and are able to multiply at ambient temperatures and household refrigerators.

In this research, samples of turkey meat, feed and water were tested for the presence of Listeria by using classical method, biochemical tests and biotest. Results from microscopy showed bacteria with characteristics of Listeria. Biochemical tests and results from mice infection proved the presence of Listeria in all samples.

Keywords: *L. monocytogenes*, turkey meat, feed, water, mouse.

Introduction

Listeriosis is a relatively rare but serious disease which occurs in various animals, and there were reported many cases of human infection. The causative agent of this disease is bacteria of Listeria species [1]. Infection, caused by Listeria species, can pose major risks for certain populations, pregnant women, new born babies, older adults, and individuals with weakened immune systems (AIDS patients) [2].

Listeria is genus of Gram positive, rod-shaped with rounded ends, non-sporulative, facultative anaerobic bacteria [2]. The organism is psychotropic and grows at temperature $0-40^\circ\text{C}$. Optimal growth temperature for the members of the genus Listeria is $30-37^\circ\text{C}$, but also can