

ПОДБОР УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ВИРУСОВ ГРИППА, ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ ИММУНОДОМИНАНТНЫЕ МИКОБАКТЕРИАЛЬНЫЕ БЕЛКИ *M. BOVIS*

Воронина Е.¹, Абай Ж.^{1,2*}, Нурпейсова А.¹, Абдрахманова Б.³, Джекебеков К.¹, Садикалиева С.¹, Булатов Е.¹, Кожабергенов Н.¹, Закарья К.¹, Шораева К.¹

¹Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности МЗ РК, пгт. Гвардейский, Казахстан

²Казахский Национальный Университет им. аль-Фараби, г. Алматы, Казахстан

³Кыргызский государственный университет им. И. Арабаева, г. Бишкек, Киргизия

* abaizh097@mail.ru

АННОТАЦИЯ

Использование рекомбинантных вирусных векторов является одним из перспективных подходов к созданию вакцин нового поколения против туберкулеза крупного рогатого скота. Для профилактики туберкулеза крупного рогатого скота на основе метода обратной генетики были сконструированы два реассортантных рекомбинантных штамма вируса гриппа А, экспрессирующих микобактериальные белки ESAT-6 и TB-10.4. В результате оптимизации условий культивирования вирусов цитопатическое действие вируса было зафиксировано на культуре клеток Vero. Установлено, что максимальное накопление вирусов отмечается при культивировании в культуре клеток Vero, с использованием бессывороточной среды DMEM при температуре ($37 \pm 0,5$) °C, с доступом 5% углекислого газа. Пик биологической активности рекомбинантных штаммов для обоих образцов достигал на 72 часу исследования и продержался на протяжении 96 ч. Биологическая активность *FLU NS_ESAT 6* составила $7,50 \pm 0,08$ Ig ТЦД50/см³, а для *FLU NS_TB10.4* $7,75 \pm 0,08$ Ig ТЦД50/см³. Полученные результаты являются основой для наработки вирусной биомассы для работ по созданию экспериментальной серии вакцин против туберкулеза крупного рогатого скота.

Ключевые слова: микобактериальные антигены, рекомбинантный штамм вируса гриппа птиц, культивирование, влияние температуры, культура клеток, Vero, MDCK

ВВЕДЕНИЕ

Векторные вакцины на основе гриппозных векторов являются одним из безопасных вакцин для профилактики инфекционных заболеваний людей и животных. Особенностью использования генетической конструкции гриппозного вектора является укорочение транскрибируемой области белка NS1 на 50% и замещение его карбоксильной части последовательностью, кодирующей туберкулезные антигены. Выбор целевых белков определяется тем, что данные белки экспрессируются в разных фазах жизненного цикла микобактерии; содержат охарактеризованные эпитопы для распознавания популяциями CD4+ и CD8+ Т-клеток для формирования сбалансированного протективного иммунного ответа клеточного типа [1].

Среди множества белков, кодируемых геномами эпитопов комплекса *M. tuberculosis*, лишь небольшая группа непосредственно связана с началом заболевания и его развитием. Из этой группы наибольший интерес представляют белки ESAT-6, TB10.4 и HspX – наиболее мощные иммуногены, которые к тому же являются наиболее подходящими кандидатами для гетерологичной вакцинации, успешно применяющиеся по всему миру. В частности, многие белки семейства ESAT-6, к которому относится и антиген TB10.4, наиболее часто используются для создания векторных и ДНК вакцин во всем мире. Эти белки содержатся в вакцинном штамме *M. bovis* БЦЖ и могут быть использованы для бустерной вакцинации, а также не входят в состав современных диагностических тест систем [2].

Известны методы наработки биомассы вирусов гриппа в 10-дневных куриных эмбрионах с использованием стандартных технологических схем, применяемых для производства гриппозных вакцин [3]. Однако, гриппозные

вакцины, производимые с использованием эмбриональных яиц, имеют значительные ограничения, с точки зрения расширения масштабов производства, и поэтому требуются альтернативные методы производства на линиях культуры клеток [4].

Исходя из вышеизложенного, целью настоящего исследования является оптимизация условий культивирования рекомбинантных штаммов вируса гриппа птиц, экспрессирующие микобактериальные белки *M. bovis* на культурах клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ*Получение вирусов*

Два рекомбинантных вируса гриппа, несущие белки *M. bovis* ESAT-6 и TB10.4, были получены методом обратной генетики, путем трансфекции 8 плазмид в культуре клеток Vero набором электропорации Cell Line Nucleofector® Kit (Lonza, США). Часть трансфекционного материала высевали в культуральные планшеты, другую часть вводили в 10-дневные РКЭ. Через 6 часов после трансфекции среда заменялась на 4 мл среды Opti-Pro SFM (Gibco, США) с добавлением 2% культуральной добавки GlutaMax (Gibco, США) и трипсина (1 мг/мл) (Sigma). Через 2 дня после развития цитопатического эффекта собирався супернатант и использовалась для оптимизации параметров культивирования рекомбинантных штаммов в культуре клеток Vero и MDCK. Полученные штаммы были обозначены как *FLU NS_ESAT 6* и *FLU NS_TB10.4*.

Клетки

Клеточные линии Vero и MDCK приобретены из Американской коллекции типовых культур. Клетки Vero и

MDCK адаптированы и далее культивированы в модифицированной Дульбекко среде Игла (DMEM) с 4 мМ l-глутамином [5].

Оптимизация параметров культивирования рекомбинантных вирусов гриппа

Среди параметров культивирования, ввиду существенного влияния на возможность накопления вируса в культуре клеток, определялась оптимальная среда (культура клеток), температура и срок инкубации вирусов.

Определение оптимальной температуры инкубирования

Для определения оптимальной температуры инкубирования культуры клеток Vero и MDCK были заражены вирусами *FLU NS_ESAT 6* и *FLU NS_TB10.4* в дозе 1000 lg ТЦД 50/см³ при 37±0,5°C. Далее инфицированные культуры клеток были инкубированы при температурах 37±0,5°C, 33±0,5°C и 35±0,5°C, и относительной влажности воздуха 55±5% [6].

Определение оптимальных сроков инкубирования

Для определения оптимальных сроков инкубации культуры клеток Vero и MDCK были заражены вирусами *FLU NS_ESAT 6* и *FLU NS_TB10.4* в дозе 1000 lg ТЦД 50/см³. Инфицированные культуры клеток были инкубированы при температурах 37±0,5°C и относительной влажности воздуха 55±5% в течение 24, 48, 72 и 96 часов [1].

Определение биологической активности рекомбинантных штаммов

Биологическая активность рекомбинантных штаммов *FLU NS_ESAT 6* и *FLU NS_TB10.4* определялась по общепринятой методике путем титрования в культуре клеток Vero и MDCK. Учет результатов титрования проводили по методу L. Reed & H. Muench и выражали в lg ТЦД₅₀/см³ [7].

Определение гемагглютинирующей активности рекомбинантных штаммов

Гемагглютинирующая активность рекомбинантных штаммов определялась по общепринятой методике в РГА с использованием 1% взвеси эритроцитов петуха [8].

Оценка наличия генетической вставки методом ОТ-ПЦР

Для подтверждения наличия вставки была проведена амплификация гена NS методом ОТ-ПЦР с определением его размера в сравнении с диким штаммом. Выделение РНК, постановка одноступенчатой ОТ-ПЦР с использованием праймеров NS-RT-Len (прямой праймер) – AGCAAAGCAGGGTGACAAAG; PR8-NS1-3'UTR (обратный праймер) – GAAACAAGGGTGTGTTTTTATGATGAAAT, были проведены согласно общепринятому протоколу.

Электронная микроскопия вирусов

Концентрирование вируса проводилось методом ультрацентрифугирования на ультрацентрифуге Himac CS-150FNX (Япония) при ускорении 366 000 g в течение 20 минут. По окончании центрифугирования надосадочная жидкость удалялась, а осадок суспендировался 1X PBS буфером объемом 100 мкл.

Для электронной микроскопии препараты готовились

адсорбцией на медные сетки с формваровой подложкой, укрепленной углем. Негативное контрастирование проводилось 2%-ным водным раствором фосфорно-вольфрамовой кислоты и исследовалось на трансмиссионном электронном микроскопе JEM-100 CX-II JEOL (Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ, и различных увеличениях. Фотографические снимки были получены из проявленных и закрепленных негативов с помощью фотоувеличителя «Азов».

Статистическая обработка

Определялись среднеарифметические значения исследованных параметров, а также их стандартная ошибка. Достоверность различий между показателями была определена с использованием статистической программы GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Значение P < 0,05 считалось значимым.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Клетки дефицитные по интерферону Vero были трансфицированы плазмидой, экспрессирующая химерную РНК NS гена вируса гриппа, совместно с набором плазмид, экспрессирующих белки полимеразного комплекса, NP, NA, HA и M вируса гриппа. Оба рекомбинантных штамма содержали генные сегменты PB2, PB1, PA, NP, соответствующие последовательностям вируса гриппа A/PR/8/34(H1N1), поверхностные антигены HA, NA и M от вируса гриппа A/Астана/5/05 и модифицированный ген NS вируса гриппа A/PR/8/34(H1N1), кодирующий укороченный до 124 аминокислот белок NS1, слитый в одной рамке считывания с целевыми микобактериальными антигенами. Трансфекция проводилась путем электропорации в соответствии с инструкцией по использованию Cell Line Nucleofector® Kit. Схема получения рекомбинантных штаммов, экспрессирующих микобактериальные антигены (*FLU NS_ESAT 6* и *FLU NS_TB10.4*) методом трансфекции представлена на рисунке 1.

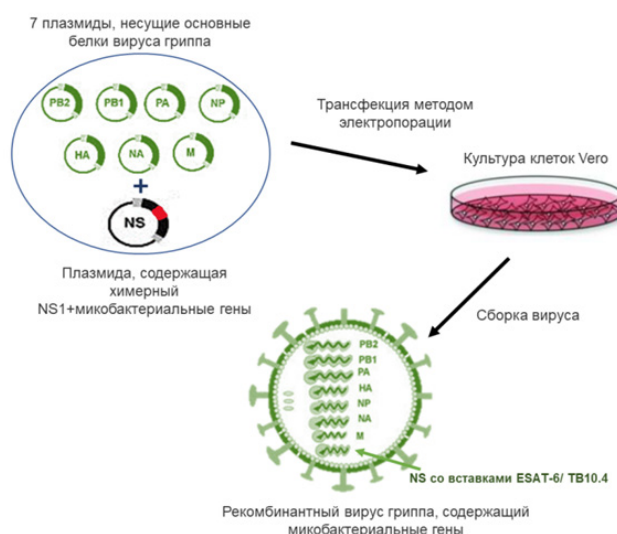


Рисунок 1. Технология получения рекомбинантных штаммов вируса гриппа, экспрессирующих микобактериальные антигены методом трансфекции

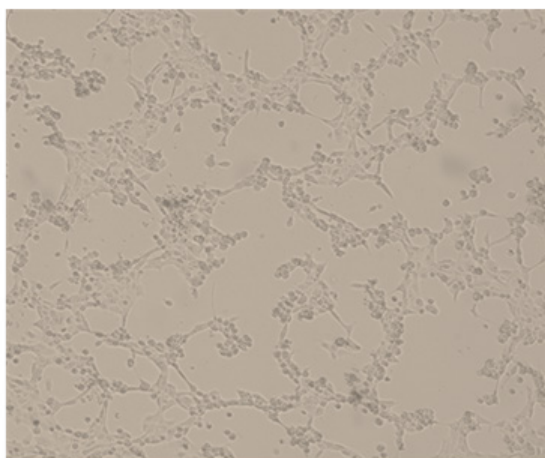
Часть трансфекционного материала высевалась в 6-луночные планшеты (V0), другой частью заражались РКЭ (E0). Полученный на данном этапе материал культураль-

ной или аллантоисной жидкости, содержал «нулевой» пассаж вирусных штаммов. Через сутки после трансфекции на клетках Vero выраженного ЦПД вируса не наблюдалось. Первые признаки развития ЦПД на культуре клеток Vero для обоих штаммов были отмечены через 36 часов после трансфекции. Через 48 часов клеточный монослой был полностью разрушен вследствие развития ви-

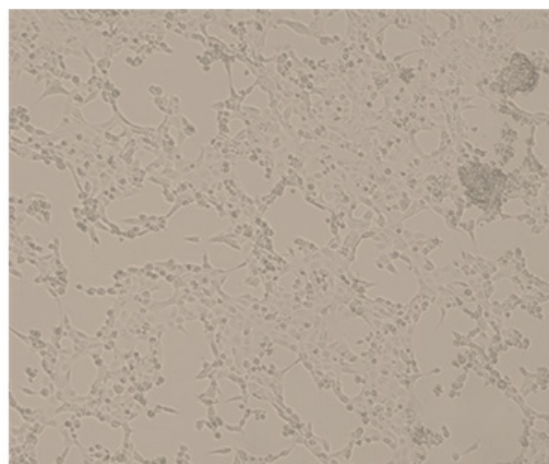
русного ЦПД. Наличие рекомбинантных вирусов в образцах культуральной жидкости было подтверждено в реакции гемагглютинации (РГА).

Анализ аллантоисной жидкости, содержащей «нулевой» пассаж рекомбинантных вирусных штаммов показал отсутствие гемагглютинации для обоих штаммов. Результаты трансфекции представлены на рис. 2 и в таблице 1.

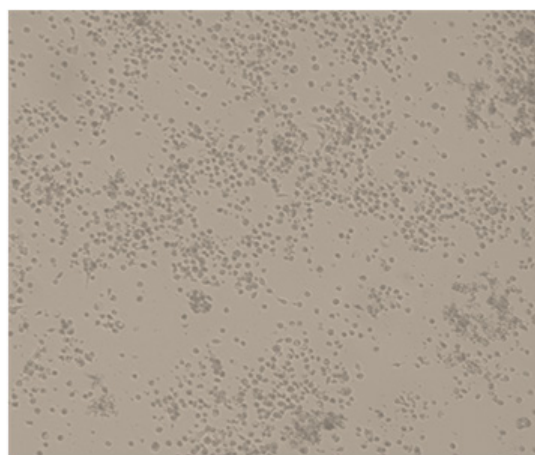
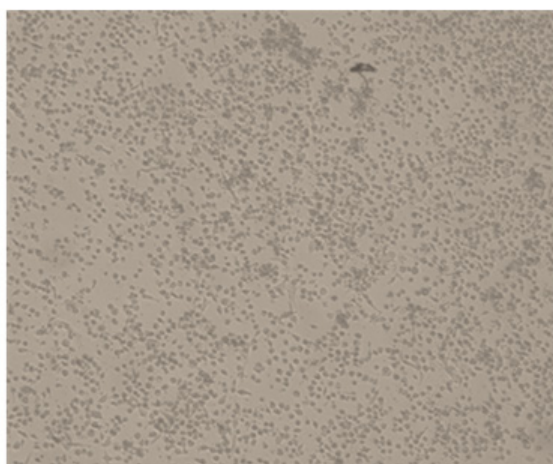
FLU NS_TB10.4



FLU NS_ESAT 6



Начало развития ЦПД. Через 36 часов после трансфекции



Полностью развитое ЦПД. Через 48 часов после трансфекции

Рисунок 2. Развитие ЦПД рекомбинантных вирусов гриппа на культуре клеток Vero после трансфекции

Таблица 1. Результаты трансфекции при сборке рекомбинантных штаммов, экспрессирующих микобактериальные антигены

Название рекомбинантного штамма	Результат трансфекции клеток по данным РГА, ГАЕ	
	РКЭ (E0)	Vero (V0)
«FLU NS_TB10.4»	0	1:4
«FLU NS_ESAT-6»	0	1:8

Далее проводились работы по оптимизации параметров культивирования полученных вирусов после трансфекции. Через сутки после заражения культуры клеток вирусом выраженного ЦПД вируса не наблюдалось на обеих культурах клеток. Первые признаки развития ЦПД на культуре клеток Vero для обоих штаммов были отме-

чены на 48 часы культивирования. Через 72-96 часов клеточный монослой Vero у обоих рекомбинантных штаммов был полностью разрушен вследствие развития вирусного ЦПД (Рис.3).

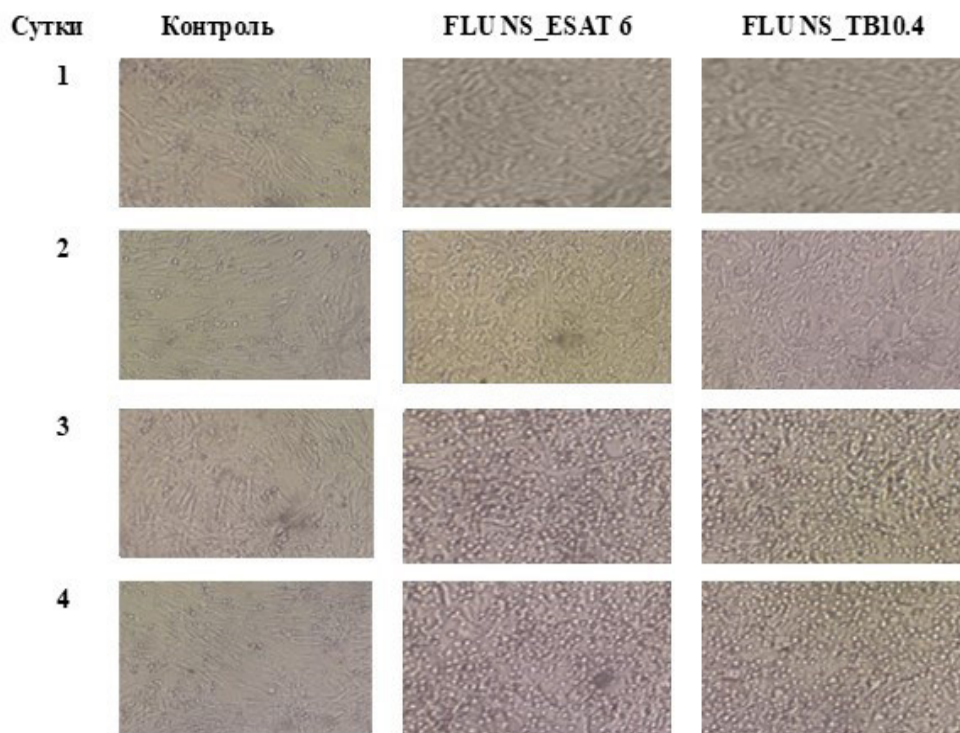


Рисунок 3. Микроскопические снимки культуры клеток Vero, зараженные рекомбинантными штаммами. Снимок получен при 10x увеличении на световом микроскопе MicroOptix.

Как видно из данных рисунка 3 рекомбинантные штаммы адаптированы к культуре клеток Vero. Активность вируса проявлялась в течение 4 суток инкубирования на культуральных матрасах, полное разрушение монослоя клеток было зафиксировано на 5 сутки. Однако, ЦПД вируса в культуре клеток MDCK не был замечен в течении 4 суток культивирования.

Далее были проведены несколько пассажей рекомбинантных штаммов на культуре клеток Vero и MDCK для определения при каждом пассаже биологической активности вируса, а также изучен оптимальный режим инкубирования культивирования при различной температуре ($33\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, $35\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$) (Рис.4).

Таким образом, в результате культивирования рекомбинантных штаммов при трех разных температурных режимах ($33\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, $35\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$) на двух культурах клеток, ЦПД было зафиксировано в культуре клеток Vero при $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. А рост вирусов в культуре MDCK не замечен, и также оставался без признака развития ЦПД при разных температурных режимах.

Анализ данных рисунка 4 показал, что биологическая активность рекомбинантных штаммов экспрессирующие микобактериальные антигены, в сравнительной характеристике, наблюдается во всех испытанных температурных режимах, однако, $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ для культивирования исследуемых образцов в монослое культуры клеток Vero являлся наиболее оптимальной температурой, так как при данной температуре получены наивысшие показатели их инфекционной активности, который в среднем составила $7,50 \pm 0,08 \text{ lg ТЦД } 50/\text{см}^3$ для FLU NS_ESAT 6 и для FLU NS_TB10.4 - $7,75 \pm 0,08 \text{ lg ТЦД } 50/\text{см}^3$.

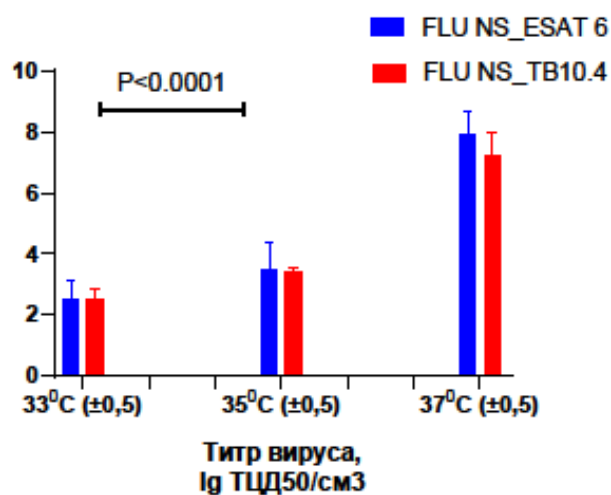


Рисунок 4. Сравнительная характеристика биологической активности рекомбинантных штаммов на культуре клеток Vero и подбор оптимальных условий культивирования при различной температуре

Далее были проведены исследования по определению оптимальных сроков инкубирования рекомбинантных штаммов, экспрессирующие микобактериальные антигены в монослое культуры клеток Vero. Зараженные культуры клеток Vero были заложены для инкубирования на протяжении 24, 48, 72 и 96 часов. Относительная влажность воздуха составляла $55 \pm 5 \%$ (Рис.5).

Анализ сравнительной характеристики длительности культивирования в культуре клеток Vero показал, что ЦПД проявилось через 48 часов и продлилось на протяжении

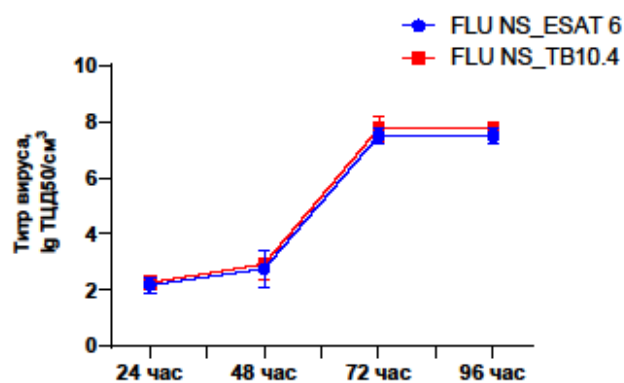


Рисунок 5. Сравнительная характеристика длительности культивирования в культуре клеток Vero рекомбинантных штаммов FLU NS_ESAT 6 и FLU NS_TB10.4

96 часов. Пик биологической активности рекомбинантных штаммов для обоих образцов достигал на 72 часу исследования и продержался на протяжении 96 часов, где биологическая активность FLU NS_ESAT 6 составила $7,50 \pm 0,08$ lg ТЦД₅₀/см³, а для FLU NS_TB10.4 составила $7,75 \pm 0,08$ lg ТЦД₅₀/см³.

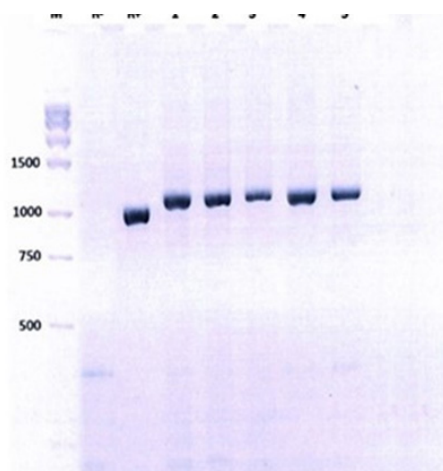
Таким образом, результаты данных исследований по-

зволяют сделать вывод, что максимальное поражение монослоя клеток в культуре Vero наступает через 72 часа инкубирования, при использовании питательной бессывороточной среды DMEM, с трехразовой промывкой этой же питательной средой, при том, что матрас был закрыт вентилируемой крышкой. Культура инкубировалась в CO₂ инкубаторе при температуре $(37 \pm 0,5)$ °C, с доступом 5% углекислого газа.

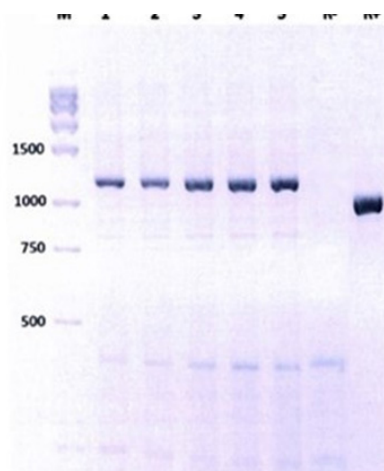
Генетическая стабильность микобактериальной вставки в гене NS оценивалась в ОТ-ПЦР после каждого из пяти пассажей в культуре клеток Vero. Ген NS исследуемых пассажей сравнивался с геном NS дикого вируса гриппа птиц. По результатам ОТ-ПЦР подтверждено, что длина сегмента гена NS, содержащей вставку микобактериальных белков, увеличена и составляет 1170 п.о. для образца TB10.4 и 1175 п.о. для образца ESAT-6 (Рис.6).

Следуя данным рисунка 6, установлено, что сегмент гена NS содержит вставку микобактериальных белков TB10.4 и ESAT-6, которая сохраняется на протяжении исследованных пяти пассажей.

Образцы культуральной жидкости с пятого пассажа на культуре Vero были исследованы с помощью электронного микроскопа (Рис.7).

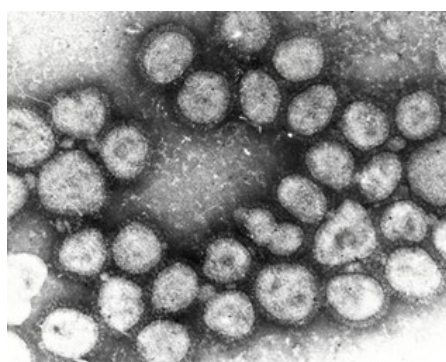


FLU NS_ESAT 6-M. bovis

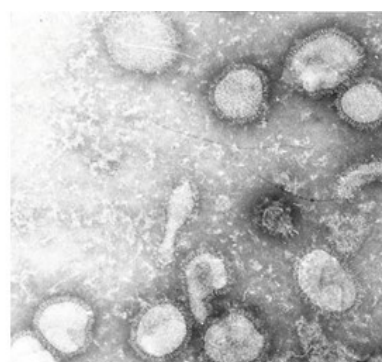


FLU NS_TB10.4-M. bovis

Рисунок 6. Электрофореграмма сегмента гена NS, содержащей микобактериальные вставки (дорожки 1–5 – образцы пассажей; М – маркер молекулярного веса; К– отрицательный контроль (деионизированная вода); К+ – положительный контроль (дикий NS))



FLU NS_TB10.4



FLU NS_ESAT-6

Рисунок 7. Снимок электронной микроскопии рекомбинантных штаммов

Снимок получен при 100 000 разовом увеличении на трансмиссионном электронном микроскопе JEM-100 CX-II JEOL (Япония)

По полученным снимкам, полученные рекомбинантные вирусы соответствуют по морфологии вирусу гриппа птиц. Вирионы имеют сферическую форму, покрыты суперкапсидом, образованным липидным бислоем, который имеет гликопротеиновые шипы длиной около 10 нм определяющие гемагглютинирующую либо нейраминидазную активность.

ОБСУЖДЕНИЕ

Наиболее экономически эффективными средствами предупреждения распространения инфекционных заболеваний являются профилактика в виде вакцинации. Технология разработки ветеринарных вакцин с использованием генетического материала возбудителя представляет собой новый способ получения вакцин, с использованием вирусов в качестве вектора для доставки антигенов. Потенциал вирусных векторов в качестве кандидатов на новые вакцины основывается на возможности экспрессии любого чужеродного антигена с модификацией или без нее *in vivo* [9].

Использование вирусов гриппа в качестве вектора является более безопасным по сравнению с другими вирусами из-за его неспособности интегрироваться в хромосомы реципиента [6].

В настоящей работе в качестве объекта исследования был использован гриппозный вектор с модифицированным геном NS, который содержит половину нормального размера NS1 белка вируса гриппа, а затем содержит последовательность, кодирующую чужеродный микобактериальный белок.

Два рекомбинантных вируса гриппа, несущие белки *M. bovis* ESAT-6 и TB10.4, были получены методом обратной генетики, путем трансфекции 8 плазмид в культуре клеток набором для электропорации. Рекомбинантные штаммы были обозначены как FLU NS_ESAT 6 и FLU NS_TB10.4.

Наблюдение за ЦПД, индуцированными вирусной инфекцией, является практическим методом определения присутствия и роста вирусов в культуре клеток. В результате культивирования рекомбинантных штаммов на культуре клеток Vero и MDCK, ЦПД вирусов было зафиксировано в культуре клеток Vero, а культура MDCK оставалась без признака развития ЦПД. При начальном развитии ЦПД клетки Vero округляются, и некоторые клетки начинают отделяться от стенок культурального матраса, что вызвано гибелью клеток. Когда большее количество клеток было инфицировано рекомбинантными штаммами вируса гриппа, создавались островки в монослое клеток, и были отделены от культурального матраса.

Установлено, что максимальное накопление вирусов отмечается при культивировании в культуре клеток Vero, с использованием бессывороточной среды DMEM при температуре $(37 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$, с доступом 5% углекислого газа. Пик биологической активности рекомбинантных штаммов для обоих образцов достигался на 72 часу исследования и продержался на протяжении 96 часов, где биологическая активность FLU NS_ESAT 6 составила $7,50 \pm 0,08 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, а для FLU NS_TB10.4 составила $7,75 \pm 0,08 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

Важно подчеркнуть, что данный подход ранее с успехом был использован учеными НИИПББ при создании векторной противотуберкулезной вакцины на основе гриппозных вирусов, экспрессирующие микобактериальные белки ESAT-6 и Ag-85, для здравоохранения (*Mycobacterium tuberculosis*). Нарботка вирусной биомассы в культуре клеток Vero также проходил на бессывороточной среде DMEM. Проведенные комплексные исследования показали ее полную безопасность при испытании на модельных животных, таких как лабораторные мыши и морские свинки [10]. Более того установлено, что вакцина у привитых формирует сильный антиген-специфичный Т-клеточный иммунный ответ, а также высокую протективность, не уступающую, коммерческой вакцине BCG [11,12].

Сегмент гена NS содержит вставку микобактериальных белков TB10.4 и ESAT-6, которая сохраняется на протяжении исследованных пяти пассажей. По снимкам электронной микроскопии, полученные рекомбинантные вирусы соответствуют по морфологии вирусу гриппа птиц.

При соблюдении указанных параметров культивирования можно стабильно получать высокоактивный вирус-содержащий материал с инфекционной активностью не менее $7 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, что вполне пригодно для приготовления векторной вакцины против туберкулеза крупного рогатого скота.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате работ по оптимизации параметров культивирования, такие как культура клеток для наработки вируса, температурный режим и сроки инкубации, были определены следующие оптимальные параметры культивирования рекомбинантных вирусов гриппа птиц: использование культуры клеток Vero на бессывороточной среде DMEM при температуре $(37 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$, с доступом 5% углекислого газа. Культивирование вируса в этих условиях позволяет получать активную вирусную биомассу.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан в рамках грантового проекта № AP09259683 «Разработка технологии изготовления векторной вакцины для профилактики туберкулеза крупного рогатого скота» Министерства образования и науки Республики Казахстан.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сергеева, М.В., Пулькина, А.А., Васильев, К.А., Романовская-Романько, Е.А., Комиссаров, А.Б., Кучур, О.А., Егоров, А.Ю., Цыбалова, Л.М., Стукова, М.А. // Безопасность и иммуногенность холодоадаптированного гриппозного вектора, экспрессирующего антигены ESAT-6 и Ag85A *M. tuberculosis*. *Problems of Virology*. – 2017. - №62(6). – С.266-272
2. Кучур, О.А. // Молекулярно-биологические характеристики вакцинного штамма на основе гриппозного вектора, экспрессирующего протективные белки различных фаз жизненного цикла *M. tuberculosis*. Магистерская

работа. – 2018. - С.9-15.

3. Седова, Е. С., Щербинин, Д. Н., Мигунов, А. И., Смирнов, Ю. А., Логунов, Д. Ю., Шмаров, М. М., Цыбалова, Л. М., Народицкий, Б. С., Киселев, О. И., Гинцбург, А. Л. // Гриппозные рекомбинантные вакцины. *Acta naturae*. – 2012. - №4(15). – С.17-26.

4. Jawinski, K., Hartmann, M., Singh, Ch., Kinnear, E., Busse, D., Ciabattini, A., Fiorino, F., Medaglini, D., Trombetta, C.M., Montomoli, E., Contreras, V., Le Grand, R., Coiffer, C., Primard, Ch., Verrier, B., Tregoring, J. // Recombinant haemagglutinin derived from the ciliated protozoan *Tetrahymena thermophila* is protective against influenza infection. *Sec Vaccines and Molecular Therapeutics*. – 2019. - №10. – С.1-14.

5. Sereinig, S., Stukova, M., Zabolotnyh, N., Ferko, B., Kittel, Ch., Romanova, J., Vinogradova, T., Katinger, H., Kiselev, O., Egorov, A. // Influenza virus NS vectors expressing the *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 protein induce CD4 Th1 immune response and protect animals against tuberculosis challenge. *Clinical and Vaccine Immunology*. – 2006. - №13(8). – С. 898–904.

6. Ferko, B., Stasakova, J., Sereinig, S., Romanova, J., Katinger, D., Niebler, B., Katinger, H., Egorov, A. // Hyperattenuated recombinant influenza A virus nonstructural-protein-encoding vectors induce human immunodeficiency virus type 1 Nef-specific systemic and mucosal immune responses in mice. *Virology*. – 2001. - №75(19). – С. 8899–8908.

7. Reed, L.J, Muench, H. // A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg.* – 1938. – №27. – С.493–497.

8. WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance // Geneva: World Health Organization. 2002. Доступен на: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/68026/WHO_CDS_CSR_NCS_2002.5.pdf?sequence=1.

9. de Vries, R.D., Rimmelzwaan G.F. // Viral vector-based influenza vaccines. *Hum Vaccines Immunother.* – 2016. - №12. – С. 2881–2901.

10. Buzitskaya, Zh., Stosman, K., Khairullin, B., Kassenov, M., Nurpeisova, A., Sansyzybay, A., Shurygina, A-P., Aleksandrov, A., Sivak, K., Stukova, M. // A new intranasal influenza vector-based vaccine TB/FLU-04L against tuberculosis: preclinical safety studies. *Drug Res (Stuttg)*. – 2022. - №.72(5). – С. 255-258.

11. Shurygina, A-P., Buzitskaya, Zh., Stukova, M., Khairullin, B., Kassenov, M., Nurpeysova, A., Zabolotnyh, N.V., Vinogradova, T. // Pre-clinical evaluation of a replication-deficient intranasal influenza vector vaccine expressing two *Mycobacterium* antigens. 45th Union World conference on Lung health, Spain. - 2014. - №5266.

12. Стукова, М.А., Хайруллин, Б.М., Шурыгина, А.-П.С., Бузицкая, Ж.В., Писарева, М.М., Ерофеева, М.К., Грудинин, М.П., Касенов, М.М., Нурпейсова, А.С., Сарсенбаева, Г.Ж., Богданов, Н.В., Егоров, А.Ю., Сансызбай, А.Р., Киселев, О.И. // Новый подход к профилактике и иммунотерапии туберкулеза: мукозальная вакцина на основе рекомбинантных гриппозных векторов. Научно-практическая конференция–биеннале «Грипп: вирусология, эпидемиология, профилактика и лечение», - 2014. – С.27. - Санкт–Петербург.

демиология, профилактика и лечение», - 2014. – С.27. - Санкт–Петербург.

REFERENCES

1. Sergeeva, M.V., Pulkina, A.A., Vasiliev, K.A., Romanovskaya-Romanko, E.A., Komissarov, A.B., Kuchur, O.A., Egorov, A.Yu., Tsybalova, L.M., Stukova, M.A. // Safety and immunogenicity of a cold-adapted influenza vector expressing *M. tuberculosis* ESAT-6 and Ag85A antigens. *Problems of Virology*. – 2017. - №62(6). – P.266-272.

2. Kuchur, O.A. // Molecular and Biological Characteristics of a Vaccine Strain Based on an Influenza Vector Expressing Protective Proteins of Different Phases of the *M. tuberculosis* Life Cycle. Master's work. – 2018. – P.9-15.

3. Sedova, E.S., Shcherbinin, D.N., Migunov, A.I., Smirnov, Yu.A., Logunov, D.Yu., Shmarov, M.M., Tsybalova, L.M., Naroditsky, B.S., Kiselev, O.I., Gintsburg, A. L. // Influenza recombinant vaccines. *Acta naturae*. – 2012. - №4(15). – P.17-26.

4. Jawinski, K., Hartmann, M., Singh, Ch., Kinnear, E., Busse, D., Ciabattini, A., Fiorino, F., Medaglini, D., Trombetta, C.M., Montomoli, E., Contreras, V., Le Grand, R., Coiffer, C., Primard, Ch., Verrier, B., Tregoring, J. // Recombinant haemagglutinin derived from the ciliated protozoan *Tetrahymena thermophila* is protective against influenza infection. *Sec Vaccines and Molecular Therapeutics*. – 2019. - №10. – P.1-14.

5. Sereinig, S., Stukova, M., Zabolotnyh, N., Ferko, B., Kittel, Ch., Romanova, J., Vinogradova, T., Katinger, H., Kiselev, O., Egorov, A. // Influenza virus NS vectors expressing the *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 protein induce CD4 Th1 immune response and protect animals against tuberculosis challenge. *Clinical and Vaccine Immunology*. – 2006. - №13(8). - P. 898–904.

6. Ferko, B., Stasakova, J., Sereinig, S., Romanova, J., Katinger, D., Niebler, B., Katinger, H., Egorov, A. // Hyperattenuated recombinant influenza A virus nonstructural-protein-encoding vectors induce human immunodeficiency virus type 1 Nef-specific systemic and mucosal immune responses in mice. *Virology*. – 2001. - №75(19). – P.8899–8908.

7. Reed, L.J, Muench, H. // A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg.* – 1938. - №27. – P.493–497.

8. WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance // Geneva: World Health Organization. 2002. Available at: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/68026/WHO_CDS_CSR_NCS_2002.5.pdf?sequence=1

9. de Vries, R.D., Rimmelzwaan, G.F. // Viral vector-based influenza vaccines. *Hum Vaccines Immunother.* – 2016. - №12. – P.2881–2901.

10. Buzitskaya, Zh., Stosman, K., Khairullin, B., Kassenov, M., Nurpeisova, A., Sansyzybay, A., Shurygina, A-P., Aleksandrov, A., Sivak, K., Stukova, M. // A new intranasal influenza vector-based vaccine TB/FLU-04L against tuberculosis: preclinical safety studies. *Drug Res (Stuttg)*. – 2022. - №72(5). – P.255-258.

11. Shurygina, A-P., Buzitskaya, Zh., Stukova, M.,

Khairullin, B., Kassenov, M., Nurpeysova, A., Zabolotnyh, N.V., Vinogradova, T. // Pre-clinical evaluation of a replication-deficient intranasal influenza vector vaccine expressing two Mycobacterium antigens. 45th Union World conference on Lung health, Spain. – 2014. - № 5266.

12. Stukova, M.A., Khairullin, B.M., Shurygina, A.-P.S., Buzitskaya, Zh.V., Pisareva, M.M., Erofeeva, M.K., Grudin, M.P., Kasenov, M.M., Nurpeisova, A.S., Sarsenbayeva, G.Zh., Bogdanov, N.V., Egorov, A.Yu., Sansyzbay, A.R.,

Kiselev, O.I. // A new approach to the prevention and immunotherapy of tuberculosis: mucosal vaccine based on recombinant influenza vectors. Scientific and practical conference-biennale «Influenza: virology, epidemiology, prevention and treatment». - 2014. – P.27. - St. Petersburg.

OPTIMIZATION OF CULTIVATION CONDITIONS FOR RECOMBINANT INFLUENZA VIRUSES EXPRESSING IMMUNODOMINANT M. BOVIS PROTEINS

Voronina E.¹, Abay Zh.^{1,2,*}, Nurpeisova A.¹, Abdrakhmanova B.³, Jekebekov K.¹, Sadikalieva S.¹, Bulatov Ye.¹, Kozyabergenov N.¹, Zakarya K.¹, Shorayeva K.¹

¹Research Institute for Biological Safety Problems, Guardeyskiy uts., Kazakhstan, ²Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan

³I. Arabaev Kyrgyz State University, Bishkek, Kyrgyzstan

*abaizh097@mail.ru

ABSTRACT

The use of recombinant viral vectors is one of the promising approaches to the creation of a new generation of vaccines against bovine tuberculosis. For the prevention of tuberculosis in cattle, two reassortant recombinant strains of influenza A virus expressing mycobacterial proteins ESAT-6 and TB-10.4 were constructed based on the method of reverse genetics. As a result of optimization of virus cultivation conditions, the cytopathic effect of the virus was recorded on the Vero cell culture. It has been established that the maximum accumulation of viruses is noted when cultivating in a Vero cell culture using a serum-free DMEM medium at a temperature of $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$, with access to 5% carbon dioxide. The peak of the biological activity of the recombinant strains for both samples reached at 72 hours of the study and lasted for 96 hours. The biological activity of *FLU NS_ESAT 6* was $7.50 \pm 0.08 \text{ lg TCD}_{50}/\text{cm}^3$, and for *FLU NS_TB10.4* was $7.75 \pm 0.08 \text{ lg TCD}_{50}/\text{cm}^3$. The results obtained are the basis for the development of viral biomass for work on the creation of an experimental series of vaccines against bovine tuberculosis.

Keywords: mycobacterial antigens, recombinant avian influenza virus strain, cultivation, temperature effect, cell culture, Vero, MDCK

М. BOVIS ИММУНОДОМИНАНТТЫ АҚУЫЗДАРДЫ ЭКСПРЕССИЯЛАЙТЫН РЕКОМБИНАНТТЫ ТҰМАУ ВИРУСТАРЫН ӨСІРУ ЖАҒДАЙЛАРЫН ОҢТАЙЛАНДЫРУ

Воронина Е.¹, Абай Ж.^{1,2,*}, Нурпейсова А.¹, Абдрахманова Б.³, Джекебеков К.¹, Садиқалиева С.¹, Булатов Е.¹, Кожабергенев Н.¹, Закарья К.¹, Шораева К.¹

¹Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми зерттеу институты, Гвардейский қтк., Қазақстан

²Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Алматы қ., Қазақстан

³И. Арабаев атындағы Қырғыз мемлекеттік университеті, Бішкек қ., Қырғызстан

*abaizh097@mail.ru

ТҮЙІН

Рекомбинантты вирустық векторларды қолдану ірі қара туберкулезіне қарсы жаңа буын вакциналарын жасаудың перспективалы тәсілдерінің бірі болып табылады. Ірі қара мал туберкулезінің алдын алу үшін кері генетика әдісі негізінде Esat-6 және TB10.4 микобактериялық ақуыздарын экспрессиялайтын тұмау вирусының екі реассортантты рекомбинантты штамдары жасалды. Вирустарды өсіру жағдайларын оңтайландыру нәтижесінде вирустың цитопатиялық әсері Vero жасушаларында тіркелді. Vero жасуша торшаларында вирустардың максималды жинақталуы сарысусыз DMEM қоректік ортасында 5% көмірқышқыл газына қол жеткізе отырып, $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ температурада өсіру кезінде байқалатыны анықталды. Екі вирустың биологиялық белсенділігінің шыңы 72 сағаттық зерттеуге жетті және 96 сағатқа созылды. *FLU NS_Esat 6* биологиялық белсенділігі - $7,50 \pm 0,08 \text{ lg ЦЭТ}_{50}/\text{см}^3$, ал *FLU NS_TB10.4* - $7,75 \pm 0,08 \text{ lg ЦЭТ}_{50}/\text{см}^3$ болды. Алынған нәтижелер ірі қара мал туберкулезіне қарсы вакциналардың эксперименттік сериясын жасау бойынша жұмыстар үшін вирустық биомассаны әзірлеу үшін негіз болып табылады.

Негізгі сөздер: микобактериялық антигендер, құс тұмауы вирусының рекомбинантты штаммы, культивирлеу, температураның әсері, жасуша торшалары, Vero, MDCK.