

ISSN 1029-8940 (Print)
ISSN 2524-230X (Online)
УДК 579.62; 578.22
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2023-68-1-38-46>

Поступила в редакцию 02.08.2022
Received 02.08.2022

Ж. С. Абай, С. О. Садикалиева, К. А. Шораева, Б. А. Еспембетов, А. С. Нурпейсова

*Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности,
нгт. Гвардейский, Республика Казахстан*

ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТАБИЛЬНОСТИ РЕКОМБИНАНТНЫХ ВЕКТОРОВ ГРИППА, КОДИРУЮЩИХ БЕЛКИ *MYCOBACTERIUM BOVIS*, С ПОМОЩЬЮ ОТ-ПЦР И ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ИХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Аннотация. Профилактика туберкулеза крупного рогатого скота путем иммунизации традиционными вакцинами и регулярное диагностирование долгое время были основными методами борьбы против данной инфекции. Однако степень защиты от туберкулеза, обеспечиваемая традиционной вакциной БЦЖ, варьируется, и на сегодняшний день причины успешного или неудачного ее применения не ясны. Следовательно, разработка альтернативных безопасных вакцин с более высокой и устойчивой защитой, чем у вакцины БЦЖ, является актуальной. В то же время в основе любой новой вакцины или стратегии вакцинации лежит, как правило, технология изготовления и применения вакцины БЦЖ. Разработанные на основе гриппозных векторов рекомбинантные векторные вакцины показывают большой потенциал и преимущества в обеспечении специфического иммунного ответа.

Цель исследования – оценка ростовых свойств сконструированных рекомбинантных штаммов вируса гриппа, экспрессирующих протективные белки микобактерии, для дальнейшего их использования при создании векторной вакцины против туберкулеза крупного рогатого скота.

В статье представлены результаты работы по культивированию и репродукции рекомбинантных штаммов вируса гриппа. Методами обратной генетики были сконструированы рекомбинантные штаммы вируса гриппа, несущие микобактериальные белки *Mycobacterium bovis* ESAT-6 и TB10.4, в последовательности гена NS. По результатам проведенных работ определены оптимальные условия культивирования рекомбинантных штаммов вируса гриппа. Оба варианта рекомбинантного штамма показали репродуктивную активность в системе развивающихся куриных эмбрионов при оптимальных условиях культивирования.

Оценка с помощью метода ОТ-ПЦР генетической стабильности вставки микобактериальных белков в NS ген вируса гриппа показала, что сегмент гена NS содержит вставку микобактериальных белков TB10.4 и ESAT-6, которая сохраняется на протяжении исследованных пяти пассажей.

Ключевые слова: рекомбинантный вирус гриппа, экспрессия, *Mycobacterium bovis*, культивирование, векторы, генетическая стабильность, ОТ-ПЦР

Для цитирования: Оценка генетической стабильности рекомбинантных векторов гриппа, кодирующих белки *Mycobacterium bovis*, с помощью ОТ-ПЦР и оптимизация условий их культивирования / Ж. С. Абай [др.] // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2023. – Т. 68, № 1. – С. 38–46. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2023-68-1-38-46>

Zhandos S. Abay, Sandugash O. Sadikalieva, Kamshat A. Shorayeva, Bolat A. Espembetov, Ainur S. Nurpeisova

Research Institute of Biological Safety Problems, Guardskii uts, Republic of Kazakhstan

EVALUATION OF THE GENETIC STABILITY OF RECOMBINANT FLU VECTORS ENCODING *MYCOBACTERIUM BOVIS* PROTEINS USING RT-PCR AND OPTIMIZATION OF THEIR CULTIVATION CONDITIONS

Abstract. Prevention by immunizing cattle against tuberculosis with traditional vaccines and regular testing has long been the main method of controlling this infection. However, the non-specificity of the traditional method shows the need for alternative approaches in the creation of anti-infective vaccines. The development of recombinant vector vaccines based on influenza vectors shows great potential and advantages in providing a specific immune response.

The purpose of the study is to evaluate the growth properties of the recombinant influenza virus strains expressing protective proteins of mycobacteria for further use in creating a vector vaccine against bovine tuberculosis.

This article presents the results of work on the cultivation and reproduction of recombinant influenza virus strains. Using reverse genetics methods, recombinant strains of the influenza virus carrying the mycobacterial *Mycobacterium bovis* ESAT-6 and TB10.4 proteins in the NS gene sequence were constructed. Based on the results of the work carried out, the optimal conditions for cultivating recombinant influenza virus strains were determined. Both variants of the recombinant strain showed reproductive activity in the developing chick embryo system, under optimal cultivation conditions.

The evaluation of the genetic stability of the insertion of mycobacterial proteins into the NS gene of the influenza virus was confirmed using the RT-PCR method. As a result, it was found that the NS gene segment contains an insertion of mycobacterial proteins TB10.4 and ESAT-6, which is retained throughout the studied 5 passages.

Keywords: recombinant influenza virus, expression, *Mycobacterium bovis*, cultivation, vectors, genetic stability, RT-PCR

For citation: Abay Zh. S., Sadikalieva S. O., Shorayeva K. A., Espembetov B. A., Nurpeisova A. S. Evaluation of the genetic stability of recombinant flu vectors encoding *Mycobacterium bovis* proteins using RT-PCR and optimization of their cultivation conditions. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2023, vol. 68, no. 1, pp. 38–46 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2023-68-1-38-46>

Введение. Туберкулез крупного рогатого скота (КРС) – это хроническое инфекционное заболевание, возбудителем которого является бактерия *Mycobacterium bovis* [1–3]. Преодолев межвидовой барьер, *M. bovis* может вызывать туберкулез и у многих других домашних и диких животных. Кроме того, туберкулез КРС является зоонозным заболеванием, т. е. при определенных условиях он может естественным образом передаваться от животных к человеку [4–6].

Во многих промышленно развитых странах для полноценного роста и развития сельскохозяйственных животных проводятся профилактические мероприятия, основанные на регулярном тестировании на туберкулин и удалении инфицированных животных, что способствует снижению и даже искоренению заболеваемости туберкулезом в стадах КРС [7]. Таким образом, вакцинация является одним из основных инструментов, позволяющих остановить распространение инфекции.

За последние десятилетия иммунизация классическими инактивированными и живыми аттенуированными вакцинами позволила успешно контролировать многие инфекции и существенно снизить уровень заболеваемости. Однако остается достаточно большое число бактериальных патогенов, для которых иммунизация при помощи традиционных подходов нецелесообразна. Чаще всего это обусловлено недостаточной безопасностью таких вакцин, а также узкой специфичностью вырабатываемого иммунитета и высокой степенью вариабельности антигенных свойств патогена, позволяющих ему легко уходить от иммунного барьера организма-хозяина [8].

Альтернативой традиционным подходам является разработка векторных вакцин против различных инфекций, с помощью которых можно осуществлять доставку в клетки хозяина и экспрессировать фрагменты генов специфических антигенов. Эффективный дизайн векторной вакцины позволит добиться комплексной стимуляции иммунного ответа, его высокой специфичности и обеспечения безопасности препарата [8].

Вирусные векторы – перспективный путь адресной доставки и эффективной презентации интересующего антигена иммунной системе организма-реципиента. Допустимость и рациональность использования вируса в качестве вектора определяются по следующим критериям: безопасность; отсутствие предсуществующего и возможность преодоления вырабатываемого при вакцинации иммунитета к самому вирусному вектору, которые необходимы для эффективной выработки иммунного ответа на целевой антиген при первичной и повторной вакцинации; возможность производства векторных вакцин в больших масштабах и др. [8].

Многими исследователями описано применение вируса гриппа в качестве векторной системы [9]. Вирусные векторные вакцины на основе вируса гриппа представляют собой привлекательную альтернативу инактивированным вакцинам, так как гриппозные векторы обеспечивают нативную экспрессию встроенных белков и их доставку в участки индуктивного иммунитета. Кроме того, легкость манипуляции гриппозными векторами дает возможность быстро производить новые векторные вакцины [10].

Цель исследования – оптимизация условий культивирования рекомбинантных штаммов вируса гриппа птиц и изучение генетической стабильности данных штаммов.

Объекты и методы исследования. Объектами исследования являлись рекомбинантные вирусы гриппа птиц, кодирующие протективные белки микобактерии *M. bovis*. Вставленные гены кодируют белки ранней секреции ESAT-6 и TB10.4. Конструкция плазмид была любезно предоставлена лабораторией векторных вакцин НИИ гриппа имени А. А. Смородинцева.

Трансфекция клеток Vero. Клетки Vero, адаптированные к росту в бессывороточной среде на 140-м пассаже, пересеивали однократно в среде DMEM/F12 с добавлением 10 %-ной фетальной

бычьей сыворотки и 2 мМ L-glutamine. Для получения рекомбинантных вирусов клетки Vero были трансфицированы соответствующими плазмидами путем электропорации с использованием оборудования Nucleofector II (Амаха). Часть трансфицированных клеток высевали в лунку 6-луночного культурального планшета, содержащего 4 мл среды с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки, другую часть вносили в 10-дневные развивающиеся куриные эмбрионы (РКЭ). Через 6 ч после трансфекции среду заменяли на 4 мл среды Opti-Pro SFM (Gibco, США) с добавлением 2 % культуральной добавки GlutaMax (Gibco, США) и трипсина (1 мкг/мл) (Sigma). Через 2 дня после развития цитопатического эффекта собирали супернатант и использовали его для заражения РКЭ.

Оценка инфекционной активности вирусов при пассировании штаммов в РКЭ. РКЭ разных возрастов (10, 11 и 12 сут) были инфицированы вирусами в дозе 10^{-4} в объеме 0,2 мл и инкубированы в условиях разного температурного режима и относительной влажности воздуха 55 ± 5 % на протяжении 48 и 72 ч для определения накопляемости, инфекционной и гемагглютинирующей активности вирусов.

Оценка стабильности генетической вставки методом ОТ-ПЦР. Для оценки генетической стабильности вируса проведено пять пассажей в РКЭ при температуре инкубации 34 °С.

Для подтверждения наличия вставки была проведена амплификация гена NS методом ОТ-ПЦР для определения его размера в сравнении с диким штаммом. РНК выделяли из 100 мкл вирус-содержащей жидкости с использованием набора RNeasy kit (Qiagen, США). При проведении одноступенчатой ОТ-ПЦР использовали набор реагентов One-Step RT-PCR+PCR (Ambion, США), ПЦР осуществляли в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 5 мкл One-Step buffer, 1 мкл смеси dNTP, 1 мкл смеси ферментов Enzyme Mix, по 1 мкл прямого и обратного праймеров, 11 мкл воды и 5 мкл РНК.

Для реакции были использованы следующие праймеры: NS-RT-Len (прямой праймер) – AGCAAAAGCAGGGTGACAAAG; PR8-NS1-3UTR (обратный праймер) – GAAACAAGGGTGT TTTTATTAAT. ПЦР проводили в амплификаторе MiniAmp Thermal Cycler (Applied Biosystems) согласно следующему режиму амплификации: 50 °С – 30 мин, 95 °С – 15 мин, затем 35 циклов: 94 °С – 50 с, 54 °С – 50 с, 68 °С – 1 мин, 68 °С – 10 мин.

Результаты ОТ-ПЦР оценивали с помощью горизонтального электрофореза образцов в 1,7 %-ном агарозном геле, содержащем бромистый этидий. В качестве маркера молекулярного веса использовали Start250 («Биолаб Микс», Россия). Электрофорез осуществляли в камере Sub-Cell GT (Bio-rad, США) при 140 В в течение 1,5 ч. Для детекции результатов использовали систему геледокументирования GelDoc Go (Bio-Rad, США).

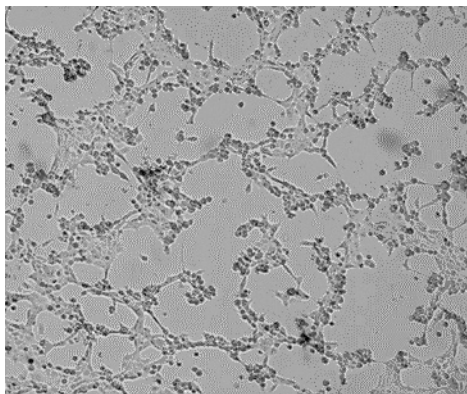
Статистическая обработка данных. Статистическую обработку данных проводили с помощью статистического пакета Statistica (версия 8,0). Полученные результаты представляли в виде следующих показателей описательной статистики: среднегеометрических титров при доверительном интервале 95 %-ного двустороннего дисперсионного анализа ANOVA.

Результаты и их обсуждение. В результате трансфекции методом электропорации восьми плазмид вируса гриппа в клетки Vero были получены два рекомбинантных штамма, экспрессирующих микобактериальные антигены. 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, 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.

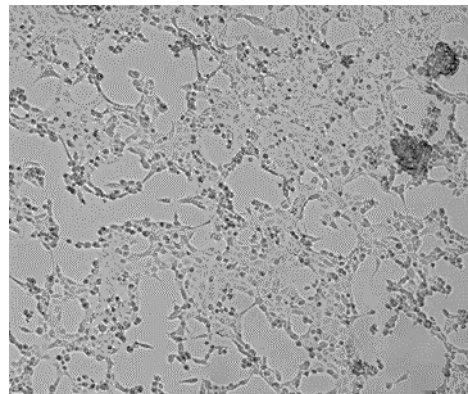
Часть трансфекционного материала высевали в 6-луночные планшеты. Полученный на данном этапе материал культуральной или аллантоисной жидкости содержал «нулевой» пассаж вирусных штаммов. Через сутки после трансфекции на клетках Vero выраженного цитопатического действия (ЦПД) вируса не наблюдалось. Первые признаки развития ЦПД на культуре клеток Vero для обоих штаммов были отмечены через 36 ч после трансфекции. Через 48 ч клеточный монослой у обоих рекомбинантных штаммов был полностью разрушен вследствие развития вирусного ЦПД.

Анализ аллантаоисной жидкости, содержащей «нулевой» пассаж рекомбинантных вирусных штаммов, показал отсутствие гемагглютинации для обоих штаммов. Результаты трансфекции представлены на рис. 1.

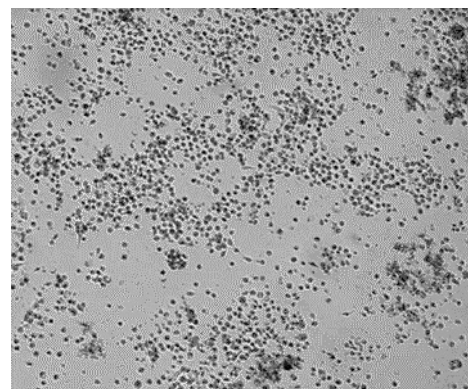
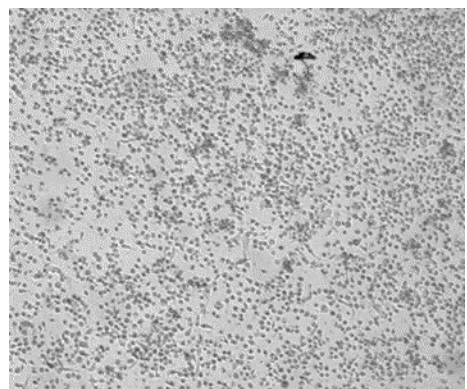
Рекомбинантный штамм, экспрессирующий ТВ10.4



Рекомбинантный штамм, экспрессирующий Esat6



Начало развития ЦПД (через 36 ч после трансфекции)



Полностью развитое ЦПД (через 48 ч после трансфекции)

Рис. 1. Развитие цитопатического действия рекомбинантных вирусных штаммов на культуре клеток Vero после трансфекции

Fig. 1. Development of the cytopathic effect of recombinant viral strains on Vero cell culture after transfection

Для проведения следующего этапа восстановления рекомбинантных штаммов в РКЭ были взяты аликвоты «нулевого» пассажа, полученные на культуре клеток и имеющие положительный результат в реакции гемагглютинации (РГА).

Для восстановления вируса и получения первого эмбрионального пассажа рекомбинантных вирусных штаммов в РКЭ использовали культуральную жидкость, содержащую «нулевой» пассаж штаммов (V0). С целью получения вирусной массы с более высокой инфекционной активностью в условиях использования в качестве субстрата для выращивания куриных эмбрионов из благополучных по гриппу птиц типа А птицеводческих хозяйств Республики Казахстан нами оптимизированы культуральные свойства вирусов в РКЭ. Для достижения указанной цели необходимо было определить оптимальный возраст эмбрионов в условиях НИИПББ. Для этого были использованы 10-, 11- и 12-суточные РКЭ. Одновременно определяли влияние температуры инкубирования на накопляемость рекомбинантных штаммов (рис. 2).

Выбранные температурные режимы инкубирования не оказывали заметного влияния на накопляемость вирусов и инфекционную активность рекомбинантных штаммов вируса гриппа, выращенных при различных температурных режимах. Однако, согласно результатам проведенного 5-кратного пассажа (V5), наивысший показатель инфекционной активности испытанного материала был достигнут в условиях температурного режима $34 \pm 0,5$ °C при использовании 12-суточных РКЭ (для штамма, экспрессирующего белок ESAT-6, активность составила 8,95lg ЭИД50, для штамма, экспрессирующего белок ТВ10.4, – 10,2lg ЭИД50).

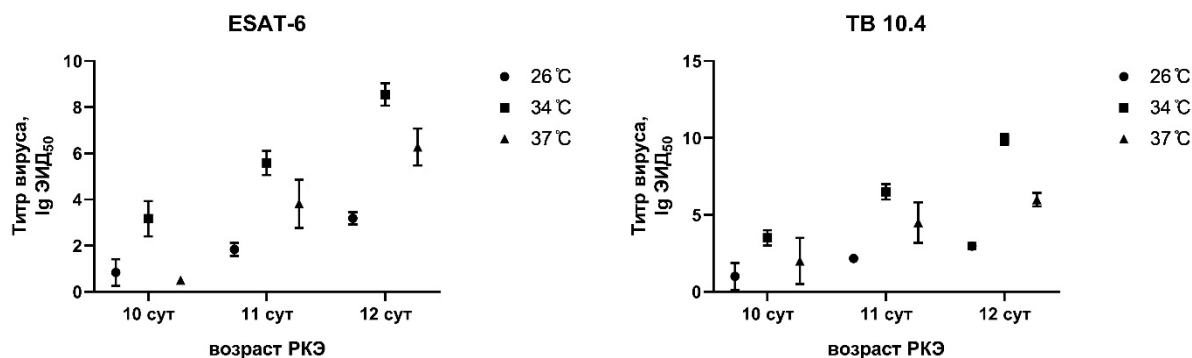


Рис. 2. Этап восстановления рекомбинантных штаммов в РКЭ

Fig. 2. Recovery stage of recombinant strains in ECE

Далее были изучены оптимальные сроки инкубирования инфицированных РКЭ. Зараженные эмбрионы инкубировали на протяжении 48 и 72 ч. В результате 72-часового инкубирования получены вирусосодержащие материалы с высокой гемагглютинирующей активностью (для штамма, экспрессирующего белок ESAT-6, она составила 1:32, для штамма, экспрессирующего белок TB10.4, – 1:64) (рис. 3).

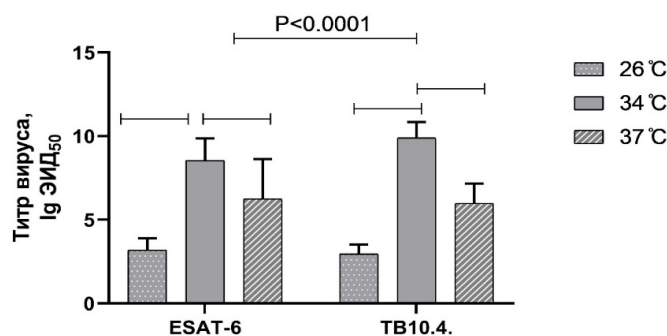


Рис. 3. Оптимизированные условия культивирования рекомбинантных штаммов вируса гриппа в РКЭ

Fig. 3. Optimized conditions for cultivation of recombinant strains of influenza virus in ECE

Таким образом, в ходе дальнейшего исследования рекомбинантные вирусы гриппа инкубировали в течение 72 ч при $34 \pm 0,5$ °C.

Генетическую стабильность микобактериальной вставки в гене *NS* оценивали в ОТ-ПЦР после каждого из пяти пассажей в РКЭ. На электрофореграмме видно, что длина сегмента гена *NS*, содержащего вставки микобактериальных белков, увеличена и составляет 1170 п. о. для TB10.4 и 1175 п. о. для продукта ESAT-6 (рис. 4).

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

Наиболее экономически эффективными средствами предупреждения распространения инфекционных заболеваний являются раннее выявление возбудителя, система оповещения и, естественно, вакцинация. Своевременная профилактика инфекционных и особо опасных заболеваний является основой обеспечения ветеринарной безопасности государства. Разработка профилактических средств нового поколения на основе рекомбинантных белков будет способствовать эпизоотическому благополучию Казахстана. Технология разработки ветеринарных вакцин на основе генетического материала представляет собой новый способ получения вакцин с использованием вирусов в качестве вектора для доставки антигенов.

Потенциал вирусных векторов в качестве кандидатов на новые вакцины особенно высок в случае острой потребности в революционных вакцинах, которые индуцируют широкий защитный иммунитет против широкого спектра антигенов. Основным преимуществом вирусных

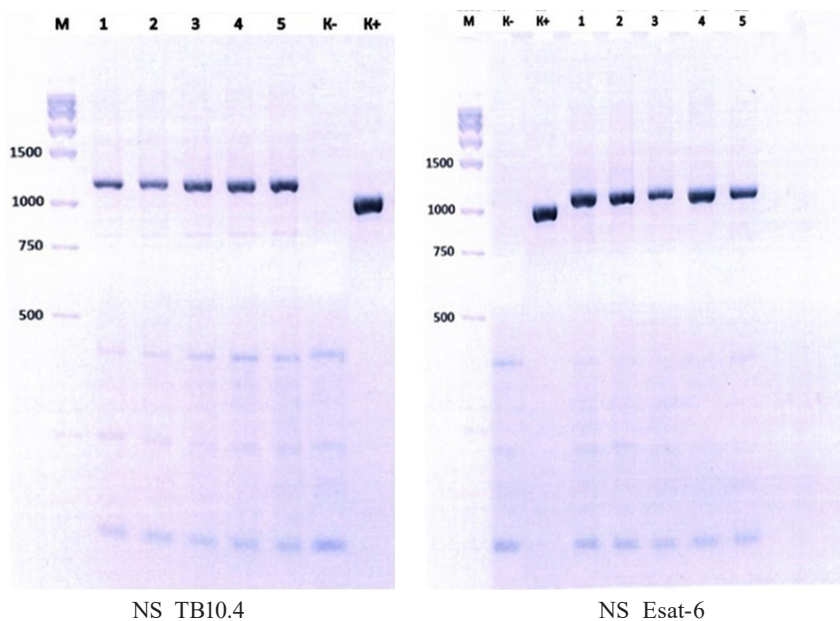


Рис. 4. Электрофореграмма сегмента гена *NS*, содержащего микобактериальные вставки (дорожки 1–5 – вставки в гене *NS*; М – маркер молекулярного веса; К– – отрицательный контроль (деионизированная вода); К+ – положительный контроль (дикий *NS*))

Fig. 4. Electropherogram of the *NS* gene segment containing mycobacterial inserts (lines 1–5, inserts in the *NS* gene; M – molecular weight marker; K– – negative control (deionized water); K+ – positive control (wild *NS*))

векторов является возможность экспрессии любого чужеродного антигена с модификацией или без нее *in vivo*. Поскольку белки экспрессируются в своей нативной активности, индуцируются ответы антител желаемой специфичности. Кроме того, вирусные векторы обеспечивают синтез белка *de novo* в цитоплазме инфицированных клеток, способствуя пролиферации специфических CD8⁺ Т-клеток [9].

Использование вирусов гриппа в качестве вектора является эффективной системой для создания векторных вакцин. В сравнении с другими вирусными векторами данный вирус имеет ряд преимуществ: осуществляют целевую экспрессию и доставку вставленных антигенов, увеличивая иммунный ответ в организме животных и людей; модификация гена *NS* различными чужеродными вставками не изменяет антигенные свойства вируса гриппа, так как не участвует в образовании структуры вириона [11, 12]; гриппозный вектор является более безопасным по сравнению с другими вирусами из-за его неспособности интегрироваться в хромосомы реципиента [13, 14].

При конструировании гриппозных векторов одной из перспективных для генетических манипуляций мишеней является неструктурный NS1 белок вируса гриппа, который в ходе естественной гриппозной инфекции в больших количествах синтезируется в зараженных клетках и вызывает выраженный антительный и Т-клеточный иммунный ответ [15]. В работах последних лет была показана высокая толерантность *NS* гена вируса гриппа к вставкам чужеродных нуклеотидных последовательностей в рамке считывания NS1 белка [16].

При этом за счет основной функции полноразмерного NS белка как антагониста системы интерферонов I типа подобные штаммы теряют способность к полноценной репликации в организме хозяина, что обеспечивает безопасность их использования в качестве вакцинных препаратов [17]. В то же время в зоне вирусной репликации происходит выработка большого количества цитокинов, которые способствуют поляризации иммунного ответа в сторону T_H-1 звена [18].

В нашей работе в качестве вектора был использован вирус гриппа А с открытой рамкой считывания NS1 белка, а в качестве исходного штамма – A/PuertoRico/8/ NS-117 с модифицированным по длине геном *NS*, кодирующим 117 аминокислот N-терминальной области белка (нормальный размер белка NS1 составляет 230 аминокислотных остатков).

В качестве бактериального антигена были выбраны протективные микобактериальные белки, кодирующие гены TB10.4, ESAT-6. Известно, что открытием последних лет является созда-

ние векторных вакцин на основе антигенов *M. bovis*, кодирующих протективные белки [19]. К их числу относятся хорошо изученные белки комплекса Ag85 – TB10.4 и ESAT-6 [20]. По литературным данным, эти белки в моделях на животных показывали высокий уровень защиты от туберкулеза [21].

Таким образом, генно-инженерным методом обратной генетики получены два рекомбинантных штамма с химерным геномным фрагментом гена *NS*, кодирующим антигены *M. bovis* TB10.4 и ESAT6 в составе рамки считывания укороченного белка NS1. Оба рекомбинантных штамма успешно восстановлены в системе куриных эмбрионов. Первый этап клонирования показал сохранность генетической химерной конструкции в *NS*-геномном сегменте, что подтверждено результатами электрофореза продуктов амплификации ОТ-ПЦР.

Специфичность и защитную эффективность антител, вырабатываемых при иммунизации полученной векторной вакциной, туберкулеза КРС с нативным антигеном *M. bovis* предстоит оценить в последующих экспериментах.

Заключение. По результатам анализа репродуктивной активности в РКЭ, а также генетической стабильности в ОТ-ПЦР, рекомбинантные штаммы, экспрессирующие микобактериальные белки ESAT-6 и TB10.4, были отобраны в качестве наиболее перспективных кандидатов новой противотуберкулезной векторной вакцины. Планируются дальнейшие исследования защитной эффективности данной вакцины на экспериментальных моделях животных (морские свинки и белые мыши).

Благодарности. 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.

Acknowledgements. The work was supported by the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan within the framework of grant project No. AP09259683 “Development of technology for the manufacture of a vector vaccine for the prevention of tuberculosis in cattle” of the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan.

Список использованных источников

1. A review on bovine tuberculosis in India / A. K. Refaya [et al.] // Tuberculosis. – 2020. – Vol. 122. – Art. 101923. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2020.101923>
2. Bovine tuberculosis in domestic pigs: Genotyping and distribution of isolates in Argentina / S. Barandiaran [et al.] // Res. Vet. Sci. – 2015. – Vol. 103. – P. 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.09.013>
3. Evaluation of five serologic assays for bovine tuberculosis surveillance in domestic free-range pigs from southern Spain / F. Cardoso-Toset [et al.] // Prev. Vet. Med. – 2017. – Vol. 137. – Pt. A. – P. 101–104. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.12.016>
4. Good, M. Perspectives on the History of Bovine TB and the Role of Tuberculin in Bovine TB Eradication / M. Good, A. Duignan // Vet. Med. Int. – 2011. – Vol. 2011. – Art. 410470. <https://doi.org/10.4061/2011/410470>
5. Zoonotic *Mycobacterium bovis*-induced tuberculosis in humans / B. Muller [et al.] // Emerg. Infect. Dis. – 2013. – Vol. 19, N 6. – P. 899–908. <https://doi.org/10.3201/eid1906.120543>
6. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries / O. Cosivi [et al.] // Emerg. Infect. Dis. – 1998. – Vol. 4, N 1. – P. 59–70. <https://doi.org/10.3201/eid0401.980108>
7. Buddle, B. M. Advances in ante-mortem diagnosis of tuberculosis in cattle / B. M. Buddle, P. G. Livingstone, G. W. de Lisle // NZ Vet. J. – 2009. – Vol. 57, N 4. – P. 173–180. <https://doi.org/10.1080/00480169.2009.36899>
8. Конструирование векторной вакцины на основе холодо-адаптированного вируса гриппа для защиты от бактериальной инфекции, вызываемой стрептококками группы В / Т. А. Смолоногина [и др.] // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2019. – Т. 37, № 1. – С. 25–34.
9. de Vries, R. D. Viral vector-based influenza vaccines / R. D. de Vries, G. F. Rimmelzwaan // Hum. Vaccines Immunother. – 2016. – Vol. 12, N 11. – P. 2881–2901. <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1210729>
10. Tripp, R. A. Virus-vectored influenza virus vaccines / R. A. Tripp, S. M. Tompkins // Viruses. – 2014. – Vol. 6, N 8. – P. 3055–3079. <https://doi.org/10.3390/v6083055>
11. Generation of an Influenza A Virus Vector Expressing Biologically Active Human Interleukin-2 from the NS Gene Segment / C. Kittel [et al.] // J. Virol. – 2005. – Vol. 79, N 16. – P. 10672–10677. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.16.10672-10677.2005>
12. Multiple amino acid residues confer temperature sensitivity to human influenza virus vaccine strains (FluMist) derived from cold-adapted A/Ann Arbor/6/60 / H. Jin [et al.] // Virology. – 2003. – Vol. 306, N 1. – P. 18–24. [https://doi.org/10.1016/s0042-6822\(02\)00035-1](https://doi.org/10.1016/s0042-6822(02)00035-1)
13. Hyperattenuated recombinant influenza A virus nonstructural-protein-encoding vectors induce human immunodeficiency virus type 1 Nef-specific systemic and mucosal immune responses in mice / B. Ferko [et al.] // Virology. – 2001. – Vol. 75, N 19. – P. 8899–8908. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.19.8899-8908.2001>

14. Intranasal inoculation of a recombinant influenza virus containing exogenous nucleotides in the NS segment induces mucosal immune response against the exogenous gene product in mice / N. Takasuka [et al.] // *Vaccine*. – 2002. – Vol. 20, N 11–12. – P. 1579–1585. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(01\)00491-1](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(01)00491-1)
15. Transfectant influenza A viruses with long deletions in the NS1 protein grow efficiently in Vero cells / A. Egorov [et al.] // *J. Virol.* – 1998 – Vol. 72, N 8. – P. 6437–6441. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.8.6437-6441.1998>
16. Influenza Viral Vectors Expressing Two Kinds of HA Proteins as Bivalent Vaccine Against Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses of Clade 2.3.4.4 H5 and H7N9 / J. Li [et al.] // *Front Microbiol.* – 2018. – Vol. 9. – Art. 604. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00604>
17. Король, О. И. Туберкулез у детей и возможности его предупреждения / О. И. Король // Туберкулез: проблемы диагностики, лечения и профилактики: тр. Всерос. науч.-практ. конф., 13–14 нояб. 2003 г. / под ред. Ю. Н. Левашева. – СПб., 2003. – С. 100–104.
18. Медуницын, Н. В. Основы иммунопрофилактики и иммунотерапии инфекционных болезней : учеб. пособие / Н. В. Медуницын, В. И. Покровский. – М. : Геотар-Медиа, 2005. – 528 с.
19. Identification of Novel *Mycobacterium bovis* Antigens by Dissection of Crude Protein Fractions / V. Meike [et al.] // *Clin. Vaccine Immunol.* – 2009. – Vol. 16, N 9. – P. 1352–1359. <https://doi.org/10.1128/cvi.00211-09>
20. Pollock, J. M. The potential of the ESAT-6 antigen secreted by virulent mycobacteria for specific diagnosis of tuberculosis / J. M. Pollock, P. Andersen // *J. Infect. Dis.* – 1997. – Vol. 175, N 5. – P. 1251–1254. <https://doi.org/10.1086/593686>
21. Immune responses and protective efficacy of the gene vaccine expressing Ag85B and ESAT6 fusion protein from *Mycobacterium tuberculosis* / Sh. Chang-hong [et al.] // *DNA Cell Biol.* – 2008. – Vol. 27, N 4. – P. 199–207. <https://doi.org/10.1089/dna.2007.0648>

References

1. Refaya A. K., Bhargavi G., Mathew N. Ch., Rajendran A., Krishnamoorthy R., Swaminathan S., Palaniyandi K. A review on bovine tuberculosis in India. *Tuberculosis*, 2020, vol. 122, art. 101923. <https://doi.org/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. *Research in Veterinary Science*, 2015, vol. 103, pp. 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.09.013>
3. Cardoso-Toset F., Luque I., Carrasco L., Jurado-Martos F., Rialde M. A., Venteo A. [et al.]. Evaluation of five serologic assays for bovine tuberculosis surveillance in domestic free-range pigs from southern Spain. *Preventive Veterinary Medicine*, 2017, vol. 1, no. 137, pt. A, pp. 101–104. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.12.016>
4. Good M., Duignan A. Perspectives on the History of Bovine TB and the Role of Tuberculin in Bovine TB. *Veterinary Medicine International*, 2011, vol. 2011, art. 410470. <https://doi.org/10.4061/2011/410470>
5. Müller B., Dürr S., Alonso S., Hattendorf J., Laisse C. J. M., Parsons S. D. C., van Helden P. D., Zinsstag J. Zoonotic *Mycobacterium bovis*-induced tuberculosis in humans. *Emerging Infectious Diseases*, 2013, vol. 19, no. 6, pp. 899–908. <https://doi.org/10.3201/eid1906.120543>
6. Cosivi O., Grange J. M., Daborn C. J., Raviglione M. C., Fujikura T., Cousins D. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerging Infectious Diseases*, 1998, vol. 4, no. 1, pp. 59–70. <https://doi.org/10.3201/eid0401.980108>
7. Buddle B. M., Livingstone P. G., de Lisle G. W. Advances in ante-mortem diagnosis of tuberculosis in cattle. *New Zealand Veterinary Journal*, 2009, vol. 57, no. 4, pp. 173–180. <https://doi.org/10.1080/00480169.2009.36899>
8. Smolonogina T. A., Isakova-Sivak I. N., Kotomina T. S., Evsina A. S., Stepanova E. A., Prokopenko P. I., Leont'eva G. F., Suvorov A. N., Rudenko L. G. Design of a vector vaccine based on a cold-adapted influenza virus to protect against a bacterial infection caused by group B streptococci. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya* [Molecular Genetics, Microbiology and Virology], 2019, vol. 37, no. 1, pp. 25–34 (in Russian).
9. de Vries R. D., Rimmelzwaan G. F. Viral vector-based influenza vaccines. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 2016, vol. 12, no. 11, pp. 2881–2901. <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1210729>
10. Tripp R. A., Tompkins S. M. Virus-vectored influenza virus vaccines. *Viruses*, 2014, vol. 6, no. 8, pp. 3055–3079. <https://doi.org/10.3390/v6083055>
11. Kittel C., Ferko B., Kurz M., Voglauer R., Sereinig S., Romanova J., Stiegler G., Katinger H., Egorov A. Generation of an Influenza A Virus Vector Expressing Biologically Active Human Interleukin-2 from the NS Gene Segment. *Journal of Virology*, 2005, vol. 79, no. 16, pp. 10672–10677. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.16.10672-10677.2005>
12. Jin H., Lu B., Zhou H., Ma Ch., Zhao J., Yang Ch.-F., Kemble G., Greenberg H. Multiple amino acid residues confer temperature sensitivity to human influenza virus vaccine strains (FluMist) derived from cold-adapted A/Ann Arbor/6/60. *Virology*, 2003, vol. 306, no. 1, pp. 18–24. [https://doi.org/10.1016/s0042-6822\(02\)00035-1](https://doi.org/10.1016/s0042-6822(02)00035-1)
13. 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, vol. 75, no. 19, pp. 8899–8908. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.19.8899-8908.2001>
14. Takasuka N., Enami M., Itamura S., Takemori T. Intranasal inoculation of a recombinant influenza virus containing exogenous nucleotides in the NS segment induces mucosal immune response against the exogenous gene product in mice. *Vaccine*, 2002, vol. 20, no. 11–12, pp. 1579–1585. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(01\)00491-1](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(01)00491-1)
15. Egorov A., Brandt S., Sereinig S., Romanova J., Ferko B., Katinger D., Grassauer A., Alexandrova G., Katinger H., Muster T. Transfectant influenza A viruses with long deletions in the NS1 protein grow efficiently in Vero cells. *Journal of Virology*, 1998, vol. 72, no. 8, pp. 6437–6441 <https://doi.org/10.1128/JVI.72.8.6437-6441.1998>

16. Li J., Hou G., Wang Y., Wang S., Peng C., Yu X., Jiang W. Influenza Viral Vectors Expressing Two Kinds of HA Proteins as Bivalent Vaccine Against Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses of Clade 2.3.4.4 H5 and H7N9. *Frontiers in Microbiology*, 2018, vol. 9, art. 604. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00604>

17. Korol' O. I. Tuberculosis in children and the possibilities of its prevention. *Tuberkulez. Problemy diagnostiki, lecheniya i profilaktiki: trudy Vserossiiskoi nauchno-prakticheskoi konferentsii, 13–14 noyabrya 2003 goda* [Tuberculosis. Problems of diagnostics, treatment and prevention: proceedings of the All-Russian scientific and practical conference, November 13–14, 2003]. Saint Petersburg, 2003, pp. 100–104 (in Russian).

18. Medunitsyn N. V., Pokrovskii V. I. Fundamentals of immunoprophylaxis and immunotherapy of infectious diseases. *Study guide*. Moscow, Geotar-Media Publ., 2005. 528 p. (in Russian).

19. 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. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2009, vol. 16, no. 9, pp. 1352–1359. <https://doi.org/10.1128/cvi.00211-09>

20. Pollock J. M., Andersen P. The potential of the ESAT-6 antigen secreted by virulent mycobacteria for specific diagnosis of tuberculosis. *Journal of Infectious Diseases*, 1997, vol. 175, no. 5, pp. 1251–1254. <https://doi.org/10.1086/593686>

21. Chang-hong Sh., Wang X.-W., Zhang H., Zhang T.-F., Wang L.-M., Xu Zh.-K. Immune responses and protective efficacy of the gene vaccine expressing Ag85B and ESAT6 fusion protein from *Mycobacterium tuberculosis*. *DNA and Cell Biology*, 2008, vol. 27, no. 4, pp. 199–207. <https://doi.org/10.1089/dna.2007.0648>

Информация об авторах

Абай Жандос Сайлаубекулы – магистр естеств. наук, мл. науч. сотрудник. Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности (ул. Б. Момышулы, 15, 080409, пгт. Гвардейский, Республика Казахстан). E-mail: abaizh097@mail.ru

Садикалиева Сандугаш Оразбековна – магистр естеств. наук, ст. науч. сотрудник. Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности (ул. Б. Момышулы, 15, 080409, пгт. Гвардейский, Республика Казахстан). E-mail: sadikalieva86@mail.ru

Шораева Камшат Абитхановна – канд. хим. наук, заведующий лабораторией. Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности (ул. Б. Момышулы, 15, 080409, пгт. Гвардейский, Республика Казахстан). E-mail: k.a.shorayeva@mail.ru

Еспембетов Болат Аманбаевич – канд. ветеринар. наук, профессор, заведующий лабораторией. Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности (ул. Б. Момышулы, 15, 080409, пгт. Гвардейский, Республика Казахстан). E-mail: espembetov@mail.ru

Нурпейсова Айнура Султановна – канд. ветеринар. наук, вед. науч. сотрудник. Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности (ул. Б. Момышулы, 15, 080409, пгт. Гвардейский, Республика Казахстан). E-mail: ainurnurpeisova@mail.ru

Information about the authors

Zhandos S. Abay – Master of Natural Sciences, Junior Researcher. Scientific Research Institute of Biological Safety Problems (15, Momysuly Str., 080409, Guardeyskii, Republic of Kazakhstan). E-mail: abaizh097@mail.ru

Sandugash O. Sadikalieva – Master of Natural Sciences, Senior Researcher. Scientific Research Institute of Biological Safety Problems (15, Momysuly Str., 080409, Guardeyskii, Republic of Kazakhstan). E-mail: sadikalieva86@mail.ru

Kamshat A. Shorayeva – Ph. D. (Chem.), Head of the Laboratory. Scientific Research Institute of Biological Safety Problems (15, Momysuly Str., 080409, Guardeyskii, Republic of Kazakhstan). E-mail: k.a.shorayeva@mail.ru

Bolat A. Espembetov – Ph. D. (Veterinary), Professor, Head of the Laboratory. Scientific Research Institute of Biological Safety Problems (15, Momysuly Str., 080409, Guardeyskii, Republic of Kazakhstan). E-mail: espembetov@mail.ru

Ainur S. Nurpeisova – Ph. D. (Veterinary), Leading Researcher. Scientific Research Institute of Biological Safety Problems (15, Momysuly Str., 080409, Guardeyskii, Republic of Kazakhstan). E-mail: ainurnurpeisova@mail.ru