

## СЫЫР ШЕШЕГІНЕ ҚАРСЫ ЕГІЛГЕН ЖАНУАРЛАРДЫҢ ҚАН САРЫСУЫНАН ВИРУСТЫ БЕЙТАРАПТАУШЫ АНТИДЕНЕЛЕРДІ БЕЙТАРАПТАУ РЕАКЦИЯСЫНДА АНЫҚТАУ ҮШІН ВИРУСТЫҢ ТИІМДІ ДОЗАСЫН ТАҢДАУ

Жүгінісов К. , Мырзахметова Б. , Туысқанова М\*. , Алиева А.

Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты ЖШС, 080409, Гвардейский қалашығы, Қазақстан Республикасы

\*m.serzhankyzy@biosafety.kz

### ТҮЙІН

Ортопоксвирустарға қарсы вакцина егілген жануарларда гуморалдық иммунитетті серологиялық әдістермен бағалау көп жағдайда қиындықтар тудырып, табысты нәтижелер көрсетпейді. Бұл көбінесе ортопоксвирустарда гуморалдық иммунитетке қарағанда жасушалық иммунитеттің басым роль атқаратындығын байқатады. Осыған байланысты бұл мақалада ортопоксвирустарға қарсы егілген жануарлардың қансарысуының бейтараптау белсенділігін бейтараптау реакциясында анықтау үшін вирустың тиімді дозасын таңдауға бағытталған зерттеу нәтижелері ұсынылған. Зерттеу нәтижелері бойынша вирустың жоғары дозаларында (яғни 100 және 50 ТЦД<sub>50</sub>) зерттелетін қансарысуларының бейтараптау белсенділігі 2 log<sub>2</sub> аспаса, ал төменгі дозаларда бейтараптау белсенділігі 4-тен 6 log<sub>2</sub> дейін көтерілген. Сыыр шешегіне қарсы егілген жануарлардың екпеден кейінгі гуморальдық иммунитеттің бейтараптау реакциясы көмегімен бағалау үшін вирустың сынаққа алынған дозалары арасынан 25 ТЦД<sub>50</sub> дозасы тұрақты, әрі тиімді доза ретінде таңдалды. Бұл вирустың бұл тиімді дозасы жоғары сезімталдылық пен төменгі дозаларды қолдануға мүмкіндік береді.

**Негізгі сөздер:** *сыыр шешегі, orthopoxvirus, гуморалды иммунитет, бейтараптаушы антидене, бейтараптау реакциясы, вирустың оңтайлы дозасы*

### КІРІСПЕ

Сыыр шешегі (СРОХ) *Poxviridae* тұқымдасының *Orthopoxvirus* туысына жататын екі тізбекті ДНҚ-лы (dsDNA) вирус тудыратын зоонозды жұқпалы ауру. Бұл зоонозды ауруға көп жануар түрлері мен адамдар бейім келеді [1]. Жануарлар ортопоксвирустардың табиғаттағы резервуары болады және адам зарарланған жануарлармен жанасқанда шешек берілуі мүмкін. Бірақ сыыр шешегі вирусының (СРХV) табиғаттағы негізгі резервуары, әрі тасымалдаушысы жабайы кеміргіштер екені айтылады [2]. Жалпы СРХV келесі ортопоксвирустармен: мешін шешегінің вирусы (МРХV) [3], түйе шешегінің вирусы (СМЛV) [4], осповакцина вирусы (VACV) [5] және кеңінен таралған адамның табиғи шешегі (халық арасында – «қара шешек» атымен белгілі) қоздырғышы *Variola* вирусымен (VARV) [6] генетикалық жағынан жақын, әрі туыс болып келеді. XX ғасырда қара шешектен шамамен 300-500 миллионға жуық адам қайтыс болған (өлім көрсеткіші, ~ 30%) [7]. Тарихи жаһандық вакцинация науқанынан кейін адам шешегі 1980 жылға қарай бүкіл әлемде жойылды деп ресми түрде жарияланды [8]. Соған қарамастан ортопоксвирустық инфекциялар қоғамдық денсаулыққа елеулі қатер төндіруші инфекциялардың қатарында қалып отыр. Себебі қазіргі таңда СРОХ мен МРОХ-тың адамдар арасында туындауы осының дәлелі [9, 10].

Соңғы жылдары Еуропа елдерінде адамдардың сыыр шешегімен ауырған жағдайлары жиі тіркелген [11, 12]. Ортопоксвирустардың қайта шығуы немесе адамдар мен жануарлар популяциясында ортопоксвирустық індеттердің жиі байқалуы денсаулық сақтау мен ветеринария салалары үшін жаһандық проблемаға айналуы мүмкін. Себебі, адамдардың МРХV [10], СРХV [9], VACV [13] және Ахмет вирусы [14] сияқты ортопоксвирустарды жұқтырғаны немесе ауырғаны туралы ғылыми деректер

бар. Сонымен қатар, әлемнің көптеген елдерінде, атап айтқанда Оңтүстік Америка, Африка, Еуропа, Таяу Шығыс және Азияда ортопоксвирустардың жабайы және үй жануарларының арасында айналымда жүргені тіркелген [15-17]. Ортопоксвирустардың кеңінен таралуына қатысты бұл фактілер қоғамда сала мамандар арасында алаңдаушылық тудырып отыр [18-23], әрі бұл жағдай аталған індеттің этиологиялық агентіне қарсы заманауи, әрі жылдам балау, алдын-алу құралдары мен вирусқа қарсы препараттарды әзірлеуге итермелейді. Соның ішінде екпе аталған індетке қарсы ең тиімді, әрі қауіпсіз шара болып есептеледі.

Осы жағдайларды ескере отырып Биологиялық Қауіпсіздік Проблемаларының Ғылыми-зерттеу Институтында ортопоксвирустардың вакциналық штамдарының негізінде сыыр шешегіне қарсы вакцина дайындау технологиясы әзірленді. Әзірге бұл вакцинаның егілген жануарларда гуморалдық иммунитет тудыру қабілетін анықтау кезінде қиындықтар болды (деректер жарияланбаған). Себебі, осы вакцинамен егілген жануарларда екпеден кейінгі гуморалдық иммунитетті коммерциялық иммунды ферменттік талдау (ELISA) жиынтығымен де, бейтараптау реакциясымен де бағалау табысты нәтижелер бермесе де, вакцина жануарларды СРХV вируленттік штаммымен бақылаулық зарарлаудан қорғап қалды (зерттеу нәтижелері жарияланбады). Аталған факт бұл инфекцияға қарсы қолда бар диагностикалық тесттердің бірі бейтараптау реакциясының кейбір параметрлерін пысықтауды қажет етеді. Сонымен қатар, көптеген вирустық инфекциялардың диагностикасында бейтараптау реакциясы «алтын стандарт» [24] әдіс ретінде саналғандықтан бұл зерттеу ғылыми-практикалық қызығушылық тудырып отыр.

Осыған байланысты сыыр шешегіне қарсы егілген жануарлардың инфекцияға қарсы иммундық антиденелік жа-

уапты анықтауда қолданылатын бейтараптау реакциясы үшін вирустың оңтайлы дозасын таңдау жұмыстың мақсаты болып табылды.

### Зерттеу материалдары мен әдістері

*Вирус штамы, жасуша өсіндісі және телімді қан сарысулары*

Зерттеуге Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институтының Микроағзалар коллекциясынан сиыр шешегі вирусының «CP-65K» вакциналық штамы қолданылды. Аталған штамның инфекциялық титрі  $6,50 \pm 0,08 \lg \text{ТЦД}_{50/\text{мл}}$ .

Бейтараптау реакциясын орындауға қозы бүйрегінен алынған алғашқы трипсинделген жасуша өсіндісі және жоғарыда аталған штамнан әзірленген вакцина егілген жануарлардан (таналар, қояндар) 14, 21 және 28 тәуліктерде алынған телімді қан сарысулары қолданылды.

*Бейтараптау реакциясында вирусты бейтараптаушы антиденені анықтау*

Жануарлардан алынған телімді қан сарысуларының құрамында вирусты бейтараптаушы антиденелердің болуын және олардың титрін анықтау бейтараптау реакциясында жүргізілді. Аталған реакция жалпыға белгілі әдістеме бойынша [25] вирустың тұрақты дозасы мен тексерілетін телімді қан сарысуларының әртүрлі сұйылтылымын қолдану арқылы орындалды. Алдымен зерттелетін қан сарысуларының екі еселенген сұйылтымын физиологиялық ерітіндіде әзірленіп, әр сұйылтымына бірдей көлемде вирустық суспензия құйылып мұқият араластырылды. Бұл реакцияға вирустық суспензияның 10, 25, 50 және 100 ТЦД тұратын әртүрлі дозалары қолданылды. Содан кейін вирус-қан сарысуынан тұратын қоспаны  $37^\circ\text{C}$  температурада 60 мин ұсталды. Белгіленген мерзім өткеннен кейін 96 ұяшықты планшетте өсірілген жасуша өсіндісін әзірленген қоспамен, яғни вирустың әртүрлі дозаларымен арластырылған қан сарысуының сұйылтылы-

мымен зарарланды. Вирус-қан сарысуы қоспасымен зарарланған жасуша өсіндісін  $37^\circ\text{C}$  температурада 3-тен 14 тәулікке дейін инкубацияланды. Реакцияның нәтижесін есепке алу вирустың жасушаға цитопатологиялық әсер (ЦПӘ) тудыру қабілетінің пайда болу дәрежесіне қарай жүргізілді. Жасушада ЦПӘ-нің пайда болуын зерттелетін қан сарысуының құрамында телімді антиденелердің жоқтығын білдірсе, ал жасушада ЦПӘ-нің байқалмауы зерттелетін қан сарысуында телімді антиденелердің бар екенін айғақтайды. Антидене титрі сарысудың ең жоғары сұйылту коэффициентінің кері сандық мәні немесе кем дегенде 50% жағдайда вирусты бейтараптандыратын осы сандық мәнің екілік логарифмі ретінде қабылданды.

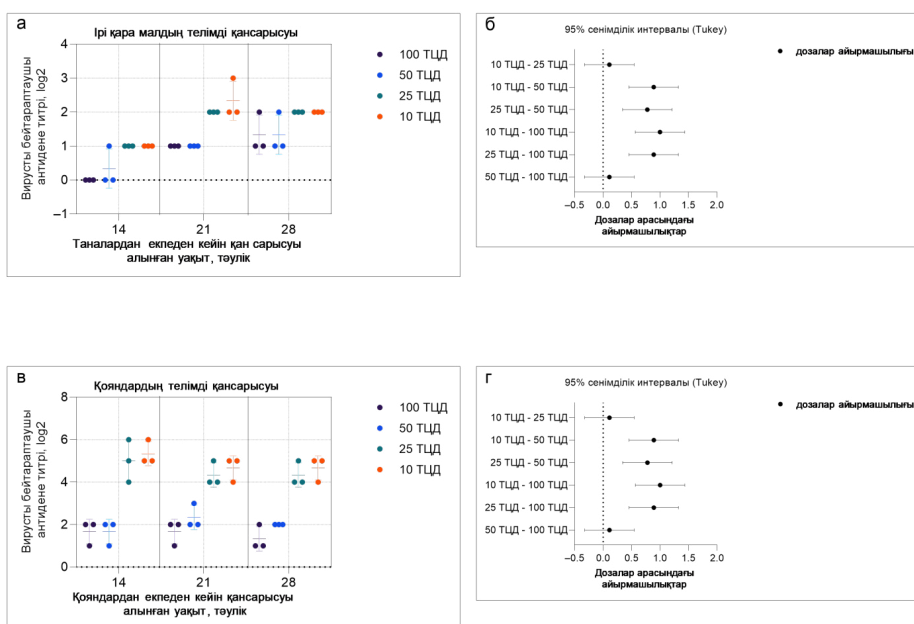
*Нәтижелерді статистикалық өңдеу*

Зерттеу нәтижелерін статистикалық өңдеу GraphPadPrism 9 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) компьютерлік бағдарламасының көмегімен жүргізілді. Бұл ретте алынған сандық көрсеткіштердің орташа (M) мәндері мен стандартты ауытқулары есептелді.

### Зерттеу нәтижелері

Бейтараптау реакциясын қою кезінде вирустың әртүрлі дозаларының (100, 50, 25 және 10 ТЦД) арасынан тиімді дозаны анықтау үшін сиыр шешегіне қарсы егілген ірі қара мал мен қояндардың қан сарысулары қолданылды. Зерттеу нәтижелерін есепке алу он тәуліктік инкубациядан кейін культуралық планшеттерде өсірілген зарарланған жасушаларда ЦПӘ пайда болғанына қарай жүргізілді. Бейтараптандыру титрі ретінде 50%-дан астам жасушаларды ЦПӘ-ден қорғайтын қан сарысуының ең жоғары сұйылтымы алынды. Зерттеу нәтижелері 1-суретте көрсетілді.

Суретте келтірілген нәтижелерді талдасақ ірі қара малдың және қоянның 14, 21 және 28 тәуліктерде алынған қан сарысуы вирустың 100 ТЦД<sub>50</sub> дозасын бейтараптағанымен антидене титрі 1-2 log<sub>2</sub> шамасында болды, тіпті



Сурет 1 – Сиыр шешегіне қарсы егілген жануарлардың (А – таналар, В – қояндар) телімді қан сарысуындағы антидене титрін анықтау үшін вирустың әртүрлі дозаларын қолдану нәтижелері мен қолданылған вирустың дозалары арасындағы сенімділік интервалы (Б – таналар, Г – қояндар) арасындағы айырмашылықтар

кейбір жағдайда қояндардың 14 тәулікте алынған қансарысуы вирусты бейтараптандыра алмады. Вирустың 50 ТЦД<sub>50</sub> дозасында таналар мен қояндардың қансарысуы дәл жоғарыда көрсетілгендей нәтиже көрсетіп антидене титрі 1-2 log<sub>2</sub> шамасын құрады. Ал вирустың 10 және 25 ТЦД<sub>50</sub> дозаларында жануарлардың қансарысулары салыстырмалы түрде вирустың басқа жоғары дозаларына (50 және 100 ТЦД<sub>50</sub>) қарағанда вирусты бейтараптандырды, және таналардың қансарысуының вирусты бейтараптандыру белсенділігі 2-3 log<sub>2</sub> болса, қояндарда 4-6 log<sub>2</sub> аралығында болды.

Дегенмен алынған нәтижелерді статистикалық өңдеу барысында жануарлардың қансарысуларының бейтараптандыру белсенділігі бейтараптау реакциясында вирустың 10 және 25 ТЦД<sub>50</sub> дозаларын қолдану – жоғары дозаларды қолдану барысындағы нәтижелерге қарағанда анағұрлым жоғары болды ( $p \leq 0.005$ ). Бұл ретте 95% сенімділік интервалы төменгі дозаларда айқын көрінді (сурет 2 б,г).

#### *Зерттеу нәтижелерін талқылау*

Ортопоксвирустардың инфекциясы кезінде көбінесе гуморальдық иммунитетке қарағанда жасушалық иммунитеттің ролі басым екендігі айтылады. Аталған факт біздің соңғы ортопоксвирустық инфекцияға қарсы вакциналардың антиденелік және жасушалық иммунды жауаптарын бағалау кезінде де анық байқалды [26]. Яғни, жануарларда ортопоксвирустарға қарсы антиденелік иммунды жауаптың титрі өте төмен немесе оның мүлдем болмағанына қарамастан жануарлар вирустың жабайы типінен болған эксперименталдық зарарлау кезінде ауруға шалдықпастан аман қалды [27]. Бұл жағдай жануарлардағы иммунитетті бағалауда кейбір диагностикалық тесттердің сапасына күмән туғызады. Көптеген вирустық инфекциялардың диагностикасында «алтын стандарт» ретінде қолданылатын осындай диагностикалық тесттердің бірі бейтараптау реакциясы болып табылады [28]. Бұл реакцияның принципі антидене (Nab) вириондармен байланысу арқылы вирустың репликация циклінің бір немесе бірнеше сатыларын блоктады (яғни, жасуша мембранымен рецепторлары арқылы байланысу, ену, жасушалық мембраннан ажырау) немесе вирус бөлшектерінің агрегациясын немесе лизисін тудырады, осылайша вирус жұқпалылығын бейтараптайды немесе төмендетеді [28]. Бұл реакция антиденелердің санын анықтау арқылы белгілі бір патогеннен қорғану ықтималдығын бағалау үшін бұрыннан қолданылған. Сонымен қатар, бейтараптау реакциясы екі нұсқада қойылады: біріншісі антидені, екіншісі антигенді анықтауға қолданылады. Бұдан басқа реакция макроәдіспен пробиркада, лабораториялық жануарларда, тауық эмбриондарында және микро әдіспен культуралық планшеттерде қойылады. Микро әдіс 1990 жылы әзірленді [29]. Бір жағынан қарағанда бейтараптау реакциясы кейбір талаптарға байланысты орындалуы күрделірек: себебі реакцияны қою үшін тірі вирустармен жұмыс істеуге тура келеді және биоқауіпсіздік деңгейі 4, 3 немесе 2+ зертханаларының қажеттілігі (IV, III немесе II класс патогендері болған жағдайда) туындайды. Сонымен қатар реакцияны қою кезіндегі орындалу хаттамасын стандарттаудағы қиындықтар (мысалы, жасуша линиясы, инфекциялық доза, инкубация күндері және нәтижесін есепке алу) бар. Қазіргі кезде бей-

тараптау реакциясын қоюдың көптеген хаттамалары бар, олардың негізгі принциптері сақталғанымен вирустың табиғатына қарай кейбір параметрлері өзгерген: мысалы, жасуша саны және себу шарттары, вирустың дозасы, вирус-сарысу-жасуша кешенін инкубациялау уақыты және нәтижелерін есепке алу және т.б..

Біздің бұл шағын зерттеуіміз бейтараптау реакциясындағы вирустың тиімді дозасын анықтауға бағытталған. Әдетте бейтараптау реакциясының орындалу хаттамасында вирустың тұрақты дозасы ретінде көбінесе 100-ден 200-ге дейінгі ТЦД<sub>50</sub> қолданылады. Біз ортопоксвирустар бойынша алдыңғы зерттеулерімізде [266 27] және осы уақытқа дейінгі жинақталған тәжірибелерімізге сүйене отырып бейтараптау реакциясына вирустың тұрақты дозасы ретінде 100 ТЦД<sub>50</sub> қолданып келдік. Алайда зерттеу нәтижелері көрсеткендей 100 ТЦД<sub>50</sub> бейтараптау реакциясында қолдану әрдайым сәтті нәтижелер көрсетпеді. Бұл зерттелетін қан сарысуының құрамындағы бейтараптаушы антиденелердің саны мен вирустың дозасының бір-біріне сәйкес келмеуі салдарынан кейбір вириондар бейтараптандырудан бос қалып жасуша рецепторларымен байланысып, нәтижесінде жасушада цитопатологиялық өзгерістер дамиды. Бұл реакцияның жалған нәтиже көрсетуіне соқтыруы мүмкін. Осыған байланысты біз осы зерттеуімізде бейтараптау реакциясына вирустың тұрақты дозасы ретінде әдетте жиі қолданылатын 100 ТЦД<sub>50</sub> мен қатар 50, 25 және 10 ТЦД<sub>50</sub> дозаларын сынақтан өткіздік. Реакция нәтижелері көрсеткендей, вирустың жоғары дозаларында (яғни 100 және 50 ТЦД<sub>50</sub>) зерттелетін қансарысуларының бейтараптау белсенділігі 2 log<sub>2</sub> аспаса, ал төменгі дозаларда бейтараптау белсенділігі 4-тен 6 log<sub>2</sub> дейін көтерілген. Ал басқа зерттеушілер түйе шешегіне қарсы тірі және өлтірілген вакциналардың иммуногенділігін бейтараптау реакциясы көмегімен бағалау кезінде вирустың тұрақты дозасы ретінде 10 ТЦД<sub>50</sub> қолданылған [30-32]. Дәл осыған ұқсас біздің басқа зерттеулерімізде түйе шешегіне қарсы вакцинамен егілген түйелердің қансарысуының белсенділігін бейтараптау реакциясында 100 ТЦД<sub>50</sub> қолданғанда өзіміздің күткен нәтижемізге қол жеткізе алмадық [27]. Осыған ұқсас зерттеулер COVID-19 инфекциясымен ауырған адамдардың қансарысуын талдау кезінде жүргізілген [33]. Адамдардың қансарысуындағы Sars-Cov-2 вирусына антиденелердің болуын тексеру үшін вирустың стандартты дозасы ретінде 100 ТЦД<sub>50</sub> және азайтылған доза ретінде 25 ТЦД<sub>50</sub> қолданылған. Вирустың аз дозасында (25 ТЦД<sub>50</sub>) қансарысуының бейтараптандыру белсенділігі стандартты дозаға (100 ТЦД<sub>50</sub>) қарағанда едәуір жоғары болған. Дәл осындай доза маймыл шешегімен ауырған адамдар мен осповакцина вирусымен егілген адамдардың қан сарысуының салыстырмалы зерттеулерінде де қолданылған [34]. Бұл вирустың аз дозасы жоғары сезімталдылық пен телімділікті көрсете отырып зерттелетін қансарысу үлгісіндегі бейтараптаушы антиденені табуға және оның нақты санын анықтауға ықпал етеді.

Біздің осы шағын зерттеуімізде анықталған вирустың тиімді дозасы ортопоксвирустарға қарсы вакцина егілген жануарлардың қансарысуының бейтараптау белсенділігін анықтауға, вакцинаның иммуногенділігін стандарттауға, бағалауға қолданылатын бейтараптау реакциясын қоюға



қолдануға болады.

## ҚОРЫТЫНДЫ

Жүргізілген зерттеу бойынша алғашқы нәтижелерді талдай келе, әрі ғылыми әдебиеттердегі деректерге сүйене отырып сиыр шешегіне қарсы егілген жануарлардың екпеден кейінгі гуморальдық иммунитетін бейтараптау реакциясы көмегімен бағалау үшін вирустың 25 ТЦД<sub>50</sub> дозасы тұрақты, әрі тиімді доза ретінде таңдалды. Бірақ бұл таңдап алынған доза басқа вирустық инфекцияларға қарсы гуморальдық иммунитетті бағалауға жарамсыз, тек ортопоксвирустардан болған иммундық жауапты анықтауға ғана жарамды болуы мүмкін.

## ҚАРЖЫЛАНДЫРУ

Бұл зерттеу Қазақстан Республикасы Ғылым және жоғары білім министрлігінің Ғылым комитеті қаржыландыратын «Қазақстанда биологиялық қауіпсіздікті қамтамасыз ету жөніндегі шараларды жетілдіру: қауіпті және аса қауіпті инфекцияларға қарсы іс-қимыл» (ЖТН BR218004/0223) ғылыми-техникалық бағдарламасы аясында жүргізілді.

## АЛҒЫС

Бұл зерттеуді жүргізуде зертханалық әдістерді орындауда техникалық көмек көрсеткені үшін авторлар Микроағзалар коллекциясының кіші ғылыми қызметкері М.К. Кенжебаеваға және аға зертханашы Ш.Т. Табысқа алғысын білдіреді.

## МҮДДЕЛЕР ҚАҚТЫҒЫСЫ

Бұл зертеулерге қатысты авторлар арасында келіспеушілік жоқ.

## ҚОЛДАНЫЛҒАН ӘДЕБИЕТТЕР

- Haller SL, Peng C, McFadden G, Rothenburg S. Poxviruses and the evolution of host range and virulence. *Infect Genet Evol.* 2014; p.15–40.
- Chantrey J, Meyer H, Baxby D, Begon M, Bown KJ, Hazel SM, et al. Cowpox: reservoir hosts and geographic range. *Epidemiol Infect.* 1999; p. 455–60.
- Dubois, M.E.; Slifka, M.K. Retrospective analysis of monkeypox infection. *Emerg. Infect. Dis.* 2008, 14, 592. [CrossRef] [PubMed].
- Balamurugan V., Venkatesan G., Bhanuprakash V., Singh R.K. Camelpox, an emerging orthopox viral disease. *Indian J. Virol.* 2013;24:295–305. doi: 10.1007/s13337-013-0145-0.
- Nemeckova S, Hainz P, Otahal P, Gabriel P, Sroller V, Kutinova L: Early gene expression of vaccinia virus strains replicating (Prague) and non-replicating (modified vaccinia virus strain Ankara, MVA) in mammalian cells. *Acta Virol* 2001, p. 243-247.
- Щелкунова Г.А., Щелкунов С.Н. 40 лет без оспы. *Acta Naturae.* 2017; p. 4–12.
- Berche P. Life and death of smallpox. *Presse Med.* 2022 Sep;51(3):104117. doi: 10.1016/j.lpm.2022.104117. Epub 2022 Feb 7. PMID: 35143880.

- Strassburg MA. The global eradication of smallpox. *Am J Infect Control.* 1982 May;10(2):53-9. doi: 10.1016/0196-6553(82)90003-7. PMID: 7044193.

- Ninove, L.; Domart, Y.; Vervel, C.; Voinot, C.; Salez, N.; Raoult, D.; Meyer, H.; Capek, I.; Zandotti, C.; Charrel, R.N. Cowpox virus transmission from pet rats to humans, France. *Emerg. Infect. Dis.* 2009, 15, 781–784. [CrossRef].

- Dubois, M.E.; Slifka, M.K. Retrospective analysis of monkeypox infection. *Emerg. Infect. Dis.* 2008, 14, 592. [CrossRef] [PubMed].

- Ducournau, C.; Ferrier-Rembert, A.; Ferraris, O.; Joffre, A.; Favier, A.-L.; Flusin, O.; Van Cauteren, D.; Kecir, K.; Auburtin, B.; Védy, S. Concomitant human infections with 2 cowpox virus strains in related cases, France, 2011. *Emerg. Infect. Dis.* 2013, 19, 1996. [CrossRef].

- Vogel, S.; Sárdy, M.; Glos, K.; Korting, H.C.; Ruzicka, T.; Wollenberg, A. The Munich outbreak of cutaneous cowpox infection: Transmission by infected pet rats. *Acta Derm. Venereol.* 2012, p.126–131.

- Oliveira, J.S.; Figueiredo, P.d.O.; Costa, G.B.; De Assis, F.L.; Drumond, B.P.; Da Fonseca, F.G.; Nogueira, M.L.; Kroon, E.G.; de Souza Trindade, G. Vaccinia virus natural infections in Brazil: The good, the bad, and the ugly. *Viruses* 2017, 9. [CrossRef] [PubMed].

- Вора Н.М.; Гелеишвили, М.; Хмаладзе, Э.; Маглакелидзе, Г.; Навдарашвили, А. Человек, Заражение зоонозным ортопоксвирусом в стране Грузии. *N. Engl. J. Med.* 2016, 372, 1223–1230.

- Singh, R.K.; Balamurugan, V.; Bhanuprakash, V.; Venkatesan, G.; Hosamani, M. Emergence and reemergence of vaccinia-like viruses: Global scenario and perspectives. *Indian J. Virol.* 2012, 23, 1–11.

- Franco-Luiz, A.P.M.; Fagundes-Pereira, A.; Costa, G.B.; Alves, P.A.; Oliveira, D.B.; Bonjardim, C.A.; Ferreira, P.C.P.; de Souza Trindade, G.; Panei, C.J.; Galosi, C.M. Spread of vaccinia virus to cattle herds, Argentina, 2011. *Emerg. Infect. Dis.* 2014, 20, 1576.

- Franco-Luiz, A.P.M.; Oliveira, D.B.; Pereira, A.F.; Gasparini, M.C.S.; Bonjardim, C.A.; Ferreira, P.C.P.; de Souza Trindade, G.; Puentes, R.; Furtado, A.; Abrahão, J.S. Detection of vaccinia virus in dairy cattle serum samples from 2009, Uruguay. *Emerg. Infect. Dis.* 2016, 22, 2174.

- Usme-Ciro, J.A.; Paredes, A.; Walteros, D.M.; Tolosa-Pérez, E.N.; Laiton-Donato, K.; del Carmen Pinzón, M.; Petersen, B.W.; Gallardo-Romero, N.F.; Li, Y.; Wilkins, K. Detection and molecular characterization of zoonotic poxviruses circulating in the Amazon region of Colombia, 2014. *Emerg. Infect. Dis.* 2017, 23, 649.

- Doshi, R.H.; Guagliardo, S.A.J.; Doty, J.B.; Babeaux, A.D.; Matheny, A.; Burgado, J.; Townsend, M.B.; Morgan, C.N.; Satheshkumar, P.S.; Ndakala, N. Epidemiologic and ecologic investigations of monkeypox, Likouala Department, Republic of the Congo, 2017. *Emerg. Infect. Dis.* 2019, 25, 273.

- Ducournau, C.; Ferrier-Rembert, A.; Ferraris, O.; Joffre, A.; Favier, A.-L.; Flusin, O.; Van Cauteren, D.; Kecir, K.; Auburtin, B.; Védy, S. Concomitant human infections with 2 cowpox virus strains in related cases, France, 2011. *Emerg.*

Infect. Dis. 2013, 19, 1996. [CrossRef].

21. Vogel, S.; Sárdy, M.; Glos, K.; Korting, H.C.; Ruzicka, T.; Wollenberg, A. The Munich outbreak of cutaneous cowpox infection: Transmission by infected pet rats. *Acta Derm. Venereol.* 2012, p.126–131.

22. de Oliveira, J.S.; Figueiredo, P.d.O.; Costa, G.B.; De Assis, F.L.; Drumond, B.P.; Da Fonseca, F.G.; Nogueira, M.L.; Kroon, E.G.; de Souza Trindade, G. Vaccinia virus natural infections in Brazil: The good, the bad, and the ugly. *Viruses* 2017, 9. [CrossRef] [PubMed].

23. Venkatesan, G.; Balamurugan, V.; Prabhu, M.; Yogisharadha, R.; Bora, D.P.; Gandhale, P.N.; Sankar, M.S.; Kulkarni, A.M.; Singh, R.K.; Bhanuprakash, V. Emerging and re-emerging zoonotic buffalopox infection: A severe outbreak in Kolhapur (Maharashtra), India. *Vet Ital* 2010, p. 439–448.

24. Mack TM, Noble J, Jr, Thomas DB. A prospective study of serum antibody and protection against smallpox. *Am J Trop Med Hyg.* (1972) 21:214–8. doi: 10.4269/ajtmh.1972.21.214, PMID: [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

25. Gates, I., Olson, V., Smith, S., Patel, N., Damon, I., & Karem, K. (2015). Development of a High-Content Orthopoxvirus Infectivity and Neutralization Assays. *PLoS one*, 10(10), e0138836. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138836>

26. Zhugunissov K, Mambetaliyev M, Sarsenkulova N, Tabys S, Kenzhebaeva M, Issimov A, Abduraimov Y. Development of an Inactivated Camelpox Vaccine from Attenuated Camelpox Virus Strain: Safety and Protection in Camels. *Animals (Basel)*. 2023 Apr 30;13(9):1513. doi: 10.3390/ani13091513. PMID: 37174551; PMCID: PMC10177572.

27. Mambetaliyev M, Kilibayev S, Kenzhebaeva M, Sarsenkulova N, Tabys S, Valiyeva A, Muzarap D, Tuyskanova M, Myrzakhmetova B, Rametov N, Sarbassova A, Nurgaziev R, Kerimbayev A, Babiuk S, Zhugunissov K. Field Trials of Live and Inactivated Camelpox Vaccines in Kazakhstan. *Vaccines (Basel)*. 2024 Jun 19;12(6):685. doi: 10.3390/vaccines12060685. PMID: 38932413; PMCID: PMC11209348.

28. Klasse PJ. Neutralization of Virus Infectivity by Antibodies: Old Problems in New Perspectives. *Adv Biol.* 2014;2014:157895. doi: 10.1155/2014/157895. Epub 2014 Sep 9. PMID: 27099867; PMCID: PMC4835181.

29. Bachmann MF, Ecabert B, Kopf M. Influenza virus: a novel method to assess viral and neutralizing antibody titers in vitro. *J Immunol Methods.* 1999 May 27;225(1-2):105-11. doi: 10.1016/s0022-1759(99)00034-4. PMID: 10365787.

30. Khalafalla A.I., El Dirdiri G.A. Laboratory and field investigations of a live attenuated and an inactivated camelpox vaccine. *J. Camel Pract. Res.* 2003;10:191–200.

31. Abdellatif M.M., Ibrahim A.A., Khalafalla A.I. Development and evaluation of a live attenuated camelpox vaccine from a local field isolate of the virus. *Rev. Sci. Tech.* 2014;33:831–838. doi: 10.20506/rst.33.3.2321.

32. Hafez S.M., al-Sukayran A., dela Cruz D., Mazloum K.S., al-Bokmy A.M., al-Mukayel A., Amjad A.M. Development of a live cell culture camelpox

vaccine. *Vaccine.* 1992;10:533–539. doi: 10.1016/0264-410x(92)90353-1.

33. Manenti A, Molesti E, Maggetti M, Torelli A, Lapini G, Montomoli E. The theory and practice of the viral dose in neutralization assay: Insights on SARS-CoV-2 «doublethink» effect. *J Virol Methods.* 2021 Nov;297:114261. doi: 10.1016/j.jviromet.2021.114261. Epub 2021 Aug 14. PMID: 34403775; PMCID: PMC8364219.

34. Manenti A, Solfanelli N, Cantaloni P, Mazzini L, Leonardi M, Benincasa L, Piccini G, Marchi S, Boncioli M, Spertilli Raffaelli C, Tacconi D, Mattiuzzo G, Kistner O, Montomoli E, Trombetta CM. Evaluation of Monkeypox- and Vaccinia virus-neutralizing antibodies in human serum samples after vaccination and natural infection. *Front Public Health.* 2023 Jun 21;11:1195674. doi: 10.3389/fpubh.2023.1195674. PMID: 37415699; PMCID: PMC10321151.

## REFERENCES

1. Haller SL, Peng C, McFadden G, Rothenburg S. Poxviruses and the evolution of host range and virulence. *Infect Genet Evol.* 2014; p.15–40.

2. Chantrey J, Meyer H, Baxby D, Begon M, Bown KJ, Hazel SM, et al. Cowpox: reservoir hosts and geographic range. *Epidemiol Infect.* 1999; p. 455–60.

3. Dubois, M.E.; Slifka, M.K. Retrospective analysis of monkeypox infection. *Emerg. Infect. Dis.* 2008, 14, 592. [CrossRef] [PubMed].

4. Balamurugan V., Venkatesan G., Bhanuprakash V., Singh R.K. Camelpox, an emerging orthopox viral disease. *Indian J. Virol.* 2013;24:295–305. doi: 10.1007/s13337-013-0145-0.

5. Nemeckova S, Hainz P, Otahal P, Gabriel P, Sroller V, Kutinova L: Early gene expression of vaccinia virus strains replicating (Prahá) and non-replicating (modified vaccinia virus strain Ankara, MVA) in mammalian cells. *Acta Virol* 2001, p. 243-247.

6. Shelkunova G.A., Shelkunov S.N. 40 let bez ospy. *Acta Naturae.* 2017; p. 4–12.

7. Berche P. Life and death of smallpox. *Presse Med.* 2022 Sep;51(3):104117. doi: 10.1016/j.lpm.2022.104117. Epub 2022 Feb 7. PMID: 35143880.

8. Strassburg MA. The global eradication of smallpox. *Am J Infect Control.* 1982 May;10(2):53-9. doi: 10.1016/0196-6553(82)90003-7. PMID: 7044193.

9. Ninove, L.; Domart, Y.; Vervel, C.; Voinot, C.; Salez, N.; Raoult, D.; Meyer, H.; Capek, I.; Zandotti, C.; Charrel, R.N. Cowpox virus transmission from pet rats to humans, France. *Emerg. Infect. Dis.* 2009, 15, 781–784. [CrossRef].

10. Dubois, M.E.; Slifka, M.K. Retrospective analysis of monkeypox infection. *Emerg. Infect. Dis.* 2008, 14, 592. [CrossRef] [PubMed].

11. Ducournau, C.; Ferrier-Rembert, A.; Ferraris, O.; Joffre, A.; Favier, A.-L.; Flusin, O.; Van Cauteren, D.; Kecir, K.; Auburtin, B.; Védý, S. Concomitant human infections with 2 cowpox virus strains in related cases, France, 2011. *Emerg. Infect. Dis.* 2013, 19, 1996. [CrossRef].

12. Vogel, S.; Sárdy, M.; Glos, K.; Korting, H.C.; Ruzicka,

- T.; Wollenberg, A. The Munich outbreak of cutaneous cowpox infection: Transmission by infected pet rats. *Acta Derm. Venereol.* 2012, p.126–131.
13. Oliveira, J.S.; Figueiredo, P.d.O.; Costa, G.B.; De Assis, F.L.; Drumond, B.P.; Da Fonseca, F.G.; Nogueira, M.L.; Kroon, E.G.; de Souza Trindade, G. Vaccinia virus natural infections in Brazil: The good, the bad, and the ugly. *Viruses* 2017, 9. [CrossRef] [PubMed].
14. Vora N.M.; Geleishvili, M.; Hmaladze, E.; Maglakelidze, G.; Navdarashvili, A. Chelovek, Zarazhenie zoonoznym ortopoksvirusom v strane Gruzii. *N. Engl. J. Med.* 2016, 372, 1223–1230.
15. Singh, R.K.; Balamurugan, V.; Bhanuprakash, V.; Venkatesan, G.; Hosamani, M. Emergence and reemergence of vaccinia-like viruses: Global scenario and perspectives. *Indian J. Virol.* 2012, 23, 1–11.
16. Franco-Luiz, A.P.M.; Fagundes-Pereira, A.; Costa, G.B.; Alves, P.A.; Oliveira, D.B.; Bonjardim, C.A.; Ferreira, P.C.P.; de Souza Trindade, G.; Panei, C.J.; Galosi, C.M. Spread of vaccinia virus to cattle herds, Argentina, 2011. *Emerg. Infect. Dis.* 2014, 20, 1576.
17. Franco-Luiz, A.P.M.; Oliveira, D.B.; Pereira, A.F.; Gasparini, M.C.S.; Bonjardim, C.A.; Ferreira, P.C.P.; de Souza Trindade, G.; Puentes, R.; Furtado, A.; Abrahão, J.S. Detection of vaccinia virus in dairy cattle serum samples from 2009, Uruguay. *Emerg. Infect. Dis.* 2016, 22, 2174.
18. Usme-Ciro, J.A.; Paredes, A.; Walteros, D.M.; Tolosa-Pérez, E.N.; Laiton-Donato, K.; del Carmen Pinzón, M.; Petersen, B.W.; Gallardo-Romero, N.F.; Li, Y.; Wilkins, K. Detection and molecular characterization of zoonotic poxviruses circulating in the Amazon region of Colombia, 2014. *Emerg. Infect. Dis.* 2017, 23, 649.
19. Doshi, R.H.; Guagliardo, S.A.J.; Doty, J.B.; Babeaux, A.D.; Matheny, A.; Burgado, J.; Townsend, M.B.; Morgan, C.N.; Satheshkumar, P.S.; Ndakala, N. Epidemiologic and ecologic investigations of monkeypox, Likouala Department, Republic of the Congo, 2017. *Emerg. Infect. Dis.* 2019, 25, 273.
20. Ducournau, C.; Ferrier-Rembert, A.; Ferraris, O.; Joffre, A.; Favier, A.-L.; Flusin, O.; Van Cauteren, D.; Kecir, K.; Auburtin, B.; Védy, S. Concomitant human infections with 2 cowpox virus strains in related cases, France, 2011. *Emerg. Infect. Dis.* 2013, 19, 1996. [CrossRef].
21. Vogel, S.; Sárdy, M.; Glos, K.; Korting, H.C.; Ruzicka, T.; Wollenberg, A. The Munich outbreak of cutaneous cowpox infection: Transmission by infected pet rats. *Acta Derm. Venereol.* 2012, p.126–131.
22. de Oliveira, J.S.; Figueiredo, P.d.O.; Costa, G.B.; De Assis, F.L.; Drumond, B.P.; Da Fonseca, F.G.; Nogueira, M.L.; Kroon, E.G.; de Souza Trindade, G. Vaccinia virus natural infections in Brazil: The good, the bad, and the ugly. *Viruses* 2017, 9. [CrossRef] [PubMed].
23. Venkatesan, G.; Balamurugan, V.; Prabhu, M.; Yogisharadhya, R.; Bora, D.P.; Gandhale, P.N.; Sankar, M.S.; Kulkarni, A.M.; Singh, R.K.; Bhanuprakash, V. Emerging and re-emerging zoonotic buffalopox infection: A severe outbreak in Kolhapur (Maharashtra), India. *Vet Ital* 2010, p. 439–448.
24. Mack TM, Noble J, Jr, Thomas DB. A prospective study of serum antibody and protection against smallpox. *Am J Trop Med Hyg.* (1972) 21:214–8. doi: 10.4269/ajtmh.1972.21.214, PMID: [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
25. Gates, I., Olson, V., Smith, S., Patel, N., Damon, I., & Karem, K. (2015). Development of a High-Content Orthopoxvirus Infectivity and Neutralization Assays. *PloS one*, 10(10), e0138836. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138836>
26. Zhugunissoff K, Mambetaliyev M, Sarsenkulova N, Tabys S, Kenzhebaeva M, Issimov A, Abduraimov Y. Development of an Inactivated Camelpox Vaccine from Attenuated Camelpox Virus Strain: Safety and Protection in Camels. *Animals (Basel)*. 2023 Apr 30;13(9):1513. doi: 10.3390/ani13091513. PMID: 37174551; PMCID: PMC10177572.
27. Mambetaliyev M, Kilibayev S, Kenzhebaeva M, Sarsenkulova N, Tabys S, Valiyeva A, Muzarap D, Tuyskanova M, Myrzakhmetova B, Rametov N, Sarbassova A, Nurgaziev R, Kerimbayev A, Babiuk S, Zhugunissoff K. Field Trials of Live and Inactivated Camelpox Vaccines in Kazakhstan. *Vaccines (Basel)*. 2024 Jun 19;12(6):685. doi: 10.3390/vaccines12060685. PMID: 38932413; PMCID: PMC11209348.
28. Klasse PJ. Neutralization of Virus Infectivity by Antibodies: Old Problems in New Perspectives. *Adv Biol.* 2014;2014:157895. doi: 10.1155/2014/157895. Epub 2014 Sep 9. PMID: 27099867; PMCID: PMC4835181.
29. Bachmann MF, Ecabert B, Kopf M. Influenza virus: a novel method to assess viral and neutralizing antibody titers in vitro. *J Immunol Methods.* 1999 May 27;225(1-2):105-11. doi: 10.1016/s0022-1759(99)00034-4. PMID: 10365787.
30. Khalafalla A.I., El Dirdiri G.A. Laboratory and field investigations of a live attenuated and an inactivated camelpox vaccine. *J. Camel Pract. Res.* 2003;10:191–200.
31. Abdellatif M.M., Ibrahim A.A., Khalafalla A.I. Development and evaluation of a live attenuated camelpox vaccine from a local field isolate of the virus. *Rev. Sci. Tech.* 2014;33:831–838. doi: 10.20506/rst.33.3.2321.
32. Hafez S.M., al-Sukayran A., dela Cruz D., Mazloum K.S., al-Bokmy A.M., al-Mukayel A., Amjad A.M. Development of a live cell culture camelpox vaccine. *Vaccine.* 1992;10:533–539. doi: 10.1016/0264-410x(92)90353-l.
33. Manenti A, Molesti E, Maggetti M, Torelli A, Lapini G, Montomoli E. The theory and practice of the viral dose in neutralization assay: Insights on SARS-CoV-2 «doublethink» effect. *J Virol Methods.* 2021 Nov;297:114261. doi: 10.1016/j.jviromet.2021.114261. Epub 2021 Aug 14. PMID: 34403775; PMCID: PMC8364219.
34. Manenti A, Solfanelli N, Cantaloni P, Mazzini L, Leonardi M, Benincasa L, Piccini G, Marchi S, Boncioli M, Spertilli Raffaelli C, Tacconi D, Mattiuzzo G, Kistner O, Montomoli E, Trombetta CM. Evaluation of Monkeypox- and Vaccinia virus-neutralizing antibodies in human serum samples after vaccination and natural infection. *Front Public Health.* 2023 Jun 21;11:1195674. doi: 10.3389/fpubh.2023.1195674. PMID: 37415699; PMCID: PMC10321151.

**ПОДБОР ОПТИМАЛЬНОЙ ДОЗЫ ВИРУСА ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ВИРУС-НЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ АНТИТЕЛ В РЕАКЦИИ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ ИЗ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЖИВОТНЫХ, ВАКЦИНИРОВАННЫХ ПРОТИВ ОСПЫ КОРОВ**

**Жугунисов К.Д.<sup>1</sup>, Мырзахметова Б.Ш.<sup>1</sup>, Туысканова М.С.<sup>1,2\*</sup>, Алиева А.**

*ТОО «Научный Исследовательский Институт Проблем Биологической Безопасности». 080409, пгт.Гвардейский, Республика Казахстан.*

*\*m.serzhankyzy@biosafety.kz*

**АННОТАЦИЯ**

Оценка гуморального иммунитета серологическими методами у животных, вакцинированных против ортопоксвирусов, часто вызывает затруднения и не дает успешных результатов. Это показывает, что клеточный иммунитет играет более важную роль, чем гуморальный иммунитет при ортопоксвирусных инфекциях. В связи с этим в статье представлены результаты исследований, направленных на подбор оптимальной дозы вируса для определения нейтрализующей активности сыворотки крови животных, вакцинированных против ортопоксвирусных инфекций с помощью реакции нейтрализации. По результатам исследований нейтрализующая активность исследуемых сывороток при высоких дозах вируса (то есть 100 и 50 ТЦД<sub>50</sub>) не превышала  $2 \log_2$ , а при меньших дозах нейтрализующая активность возрастала с 4 до 6  $\log_2$ . Доза 25 ТЦД<sub>50</sub> была выбрана как постоянная и эффективная доза среди тестируемых доз вируса для оценки поствакцинального гуморального иммунитета животных, вакцинированных коровьей оспой, с использованием реакции нейтрализации. Выбранная доза вируса способствует обнаружению и определению точного количества нейтрализующих антител в тестируемом образце сыворотки, демонстрируя высокую чувствительность и специфичность.

**Ключевые слова:** оспа коров, orthopoxvirus, гуморальный иммунитет, нейтрализующие антитела, нейтрализующая реакция, оптимальная доза вируса.

**DETERMINATION OF THE EFFECTIVE DOSE OF VIRUS FOR THE DETERMINATION OF VIRUS-NEUTRALIZING ANTIBODIES FROM THE BLOOD SERUM OF ANIMALS VACCINATED AGAINST COWPOX**

**Zhugunisov K., Myrzakhmetova B., Tuyskanova M.\* , Alieva A.**

*Research institute for biological safety problems, LLP. 080409, Gvardeysky, Republic of Kazakhstan.*

*\*m.serzhankyzy@biosafety.kz*

**ABSTRACT**

Assessment of humoral immunity by serological methods in animals vaccinated against orthopoxviruses often causes difficulties. This indicates that cellular immunity plays a more important role than humoral immunity in orthopoxviruses. This article presents the results of a study aimed at choosing the optimal dose of the virus to determine the neutralizing activity of the serum of animals vaccinated against orthopoxviruses in the neutralization test. According to the results of the study, the neutralization activity of the studied sera at high doses of the virus (ie 100 and 50 TCID<sub>50</sub>) did not exceed  $2 \log_2$ , and at lower doses, the neutralization activity was from 4 to 6  $\log_2$ . A dose of 25 TCID<sub>50</sub> was selected as an effective dose among the tested doses of the virus to evaluate post-vaccination humoral immunity of cowpox-vaccinated animals using the neutralization test. This dose contributes to the detection of neutralizing antibody in the sample of the examined serum and its exact quantity, showing high sensitivity and specificity.

**Key words:** cowpox, orthopoxvirus, humoral immunity, neutralizing antibody, neutralizing test, optimal dose of virus