

УДК 619:578.831.21:578.821.21

Original Article

ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ШТАММОВ ОРТОПОКСВИРУСОВ ПРИ ПОДБОРЕ СТАБИЛИЗАТОРА ДЛЯ ЛИОФИЛИЗАЦИИ, ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВКЕ**Алиева А.Б.*^{ORCID}, Айдарбекова Д.Б.^{ORCID}, Баракбаев К.Б.^{ORCID}, Алмас Е.К.^{ORCID}, Серикбайов О.Н.^{ORCID}, Кенжебаева М.К.^{ORCID}, Табыс Ш.Т.^{ORCID}, Наханов А.К.^{ORCID}, Жугунисов К.Д.^{ORCID}***ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» Министерства здравоохранения Республики Казахстан, 080409, Жамбылская область, Кордайский район, пгт. Гвардейский, Республики Казахстан
*a.aliyeva@biosafety.kz***АННОТАЦИЯ**

В статье представлены результаты исследований по выбору стабилизатора для штаммов «СР-65К» и «БИЭМГ-51» ортопоксвирусов, способствующий сохранению их биологической активности при лиофилизации, хранении в различных температурно-временных условиях и транспортировке.

Для подбора стабилизирующей среды, обеспечивающей наибольшую сохраняемость вируса в процессе лиофилизации и последующем их хранении в зависимости от состава защитных сред, температуры и срока хранения, нами были приготовлены по 3 образца каждого вакцинного препарата с стабилизирующими добавками: I и V образцы состояли из 5 % пептона и 3 % сахарозы; II и VI образцы – из 3 % пептона и 2 % сахарозы; III и VII образцы – из обезжиренного молока; IV и VIII образцы – контрольные. Все защитные среды добавлялись в вирусные материалы в соотношении 1:1.

В результате проведенных исследований установлено, что из испытанных образцов стабилизирующих сред наиболее защитным свойством для штаммов «СР-65К» ВОК и «БИЭМГ-51» ВОВ обладала стабилизирующая среда, состоящая из смеси пептона (5 %) и сахарозы (3 %) в конечной концентрации, которая обеспечивала сохранности вакцинных штаммов в течение 12 мес. При температуре (2-8) °С и минус (40,0±1,0) °С без существенного снижения их биологической активности (6,50±0,14 lg ТЦД₅₀/см³ и 6,25±0,14 lg ТЦД₅₀/см³, соответственно).

Ключевые слова: вирус оспы коров, штамм, стабилизирующая среда, лиофилизация, хранение, стабильность.

ВВЕДЕНИЕ

Оспа коров (*Variola vaccina*) – контагиозная вирусная болезнь крупного рогатого скота, характеризующаяся лихорадкой и папулезно-пустулезной сыпью на коже и слизистых оболочках. В естественных условиях, кроме коров, к вирусу восприимчивы лошади, мулы, буйволы, ослы, верблюды, кролики и человек [1].

Резервуаром многих ортопоксвирусов являются животные и они могут передаваться контактным путем от зараженного животного к человеку. В природе основными хозяевами и переносчиками ортопоксвирусов являются дикие и хищные грызуны [2].

В последние годы во многих странах отмечается увеличение числа зарегистрированных случаев заболевания людей оспой коров [3]. В различных странах повторное появление или появление других ортопоксвирусов в популяциях людей и животных является актуальной глобальной проблемой здравоохранения и ветеринарии [4]. Имеются литературные данные о инфицированиях и заболеваниях человека, вызванных зоонозными ортопоксвирусами, такими как вирус оспы обезьян [5], вирус оспы коров [6], вирус осповакцины [7] и уникальный ортопоксвирус Ахмета [8]. Все вышеперечисленные возбудители относятся к роду Orthoroxvirus, которые представляют собой большие ДНК-содержащие вирусы, то есть близкородственные по гену.

Циркуляция ортопоксвирусов среди диких и домашних животных была зарегистрирована в различных регионах мира, включая Южную Америку, Африку, Европу, Ближний Восток и Азию [9-11]. Эти факты вызывают озабоченность относительно ареалов обитания и распространения ортопоксвирусов, а также их потенциальной спо-

собности вызывать вспышки среди животных и людей, тем самым, оказывая дальнейшее воздействие на здоровье животных и населения [12-17].

Эпидемиологическая обстановка в мире, когда человеческая популяция с каждым годом становится все более беззащитной, характеризуется увеличением заболеваемости людей и животных близкородственными ортопоксвирусными инфекциями. В связи с этим необходимо разрабатывать новые безопасные вакцины против данной инфекции, потому что на сегодняшний день единственным методом борьбы с вирусными инфекциями, доказавшим свою эффективность, является вакцинопрофилактика. Поэтому настоятельной необходимостью является разработка противооспенной (противоортопоксвирусной) вакцины нового поколения, которая была бы безопасна и высоко иммуногенной.

В ветеринарной практике и фармацевтической промышленности, для хранения вирусов и структурных компонентов вирионов использование искусственных питательных сред приводит к значительным и глубоким изменениям культурально-морфологических и биологических свойств. Данная проблема, связанная со стабилизацией биологических материалов, ввиду их лабильности, возникла одновременно с развитием биологической науки. По полученным данным многих исследователей, наиболее перспективным и удобным для практических целей, также одним из традиционных методов и надежным способом сохранения биологических агентов является лиофилизация биопрепаратов [18, 19]. Следует отметить, что в процессе лиофилизации одной из важных задач, которое оказывает влияние на выживаемость микроорганизмов в высушенном состоянии при различных температурах, является выбор оптимальной стабилизирующей среды [20].

Учитывая вышеизложенное, цель исследования состояла в подборе оптимальной стабилизирующей среды, обеспечивающей наибольшую сохраняемость вирусов в процессе лиофилизации и последующего его хранения при различных температурно-временных режимах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вакцинные штаммы. Для приготовления вакцины использовались штаммы «СР-65К» ВОК 65 пассажного уровня с биологической активностью $6,75 \pm 0,22 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ и «БИЭМГ-51» ВОВ из лаборатории «Коллекция микроорганизмов» «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» с биологической активностью $6,50 \pm 0,18 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

Стабилизирующие среды. При подборе стабилизирующих сред для штаммов «СР-65К» ВОК и «БИЭМГ-51» ВОВ нами использованы среды в следующих конечных концентрациях: 5 % пептона + 3 % сахарозы (образец I); 3 % пептона + 2 % сахарозы (образец II) и обезжиренное коровье молоко (образец III). Стабилизирующие среды смешивали со стерильными вирусосодержащими суспензиями вируса в соотношении 1:1. В опыте в качестве контроля использовали суспензию вируса без защитной среды (образец IV). Для лиофильного высушивания суспензию вируса объединили в равных объемах со стабилизирующей средой, с добавлением антибиотика из расчета 200000 ЕД гентамицина на 2,0 л и поместили в бытовой холодильник при температуре плюс 4 °С на 10-12 час. По истечении времени произвели розлив технической жидкости в ампулы по 1,0 мл, и лиофилизировали на сублимационной установке.

Биологическую активность вирусосодержащих материалов после лиофилизации оценивали по наличию характерных цитопатических действий (ЦПД) вируса на культуре клеток, полученных из почек ягнят (ПЯ) и титры выражали в $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

Лиофилизация вируса. Вакцинную жидкость (ВЖ), состоящая из вирусосодержащей суспензии и стабилизирующей среды, подвергали замораживанию в пределах температуры минус (55-60) °С в течение 8-12 ч с фактическим давлением в камере 0,8-1,0 бар с нагревом полки до плюс (15-30) °С, температура конденсатора в пределах от минус (64-54) °С. После удаления из препаратов около 90% влаги (чтобы сохранить структуру таблеток, конечное содержание влаги должно быть в пределах 2-4 % по массе) проводили досушивание при температуре минус 55°С и температура нагрева полок составляло (25-30) °С и конечная температура биоматериала была (18-24) °С. Общая продолжительность лиофилизации в сублимационном аппарате "Usifrua" (Франция) составляла 72 ч. После высушивания материала ампулы запаивали под вакуумом на карусельно-коллекторном аппарате. Высушенные препараты считались пригодными для практического применения только при наличии вакуума в ампулах. Поэтому все запаиваемые ампулы проверялись на наличие вакуума, с помощью аппарата Д'Арсонваля, где наличие фиолетово-синего свечения в ампулах свидетельствовало о наличии вакуума.

Для изучения сохраняемости вакцинного вируса лиофилизированные ампулы с разными защитными сре-

дами были заложены на хранение при различных температурно-временных режимах: при температурах плюс (37,0±0,5), (22,0±3), (2-8) °С и минус (40,0±1,0) °С сроком до 12 месяцев.

Определение сохраняемости вируса in vitro. По истечении определенного срока хранения нами была изучена сохраняемость штаммов «СР-65К» ВОК и «БИЭМГ-51» ВОВ с разными защитными средами после длительного хранения определяли путем титрования в культуре клеток ПЯ согласно методике [21], извлекали по 3 ампулы и проверяли на соответствие вакцины её характеристикам по следующим параметрам: внешний вид, влажность, наличие вакуума и растворимость. Степень снижения активности вируса оценивали по разнице титра в исходном материале.

Статистическая обработка. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью программ Excel из пакета Microsoft Office 2010 (Microsoft Corp., USA) и Graphpad Prism 9.0. С использованием t-критерия Стьюдента оценивали обнаруженные межгрупповые различия. Результаты представлены в виде ($X \pm m$, где X – среднее арифметическое значение, m – стандартное отклонение). Расчет ЛД_{50} осуществляли по методу Кербера. Статистически значимыми результатами эксперимента считали значения при уровне значимости $P < 0,05$ [21].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

После инфицирования культур клеток ПЯ штаммами «СР-65К» ВОК и «БИЭМГ-51» ВОВ менее чем за 24 часа наблюдалось начало ЦПД вируса, за 32-35 ч отмечалось поражение до 85-95% монослоя клеток (скопление клеток в виде «гроздьев винограда»). В результате, была приготовлена вирусосодержащая суспензия (ВСС) из штаммов «СР-65К» и «БИЭМГ-51» с биологической активностью $6,75 \pm 0,14 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, $6,50 \pm 0,14 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, соответственно и определена их стерильность на отсутствие контаминации бактериальной и грибковой микрофлорой. После объединения ВСС со стабилизирующими средами (пептон 5% + сахароза 3%; пептон 3% + сахароза 2% и обезжиренное молоко) в соотношении 1:1 подвергали их сублимационной сушке. В таблице 1 представлены данные о биологических показателях экспериментальных образцов вакцины против оспы коров до и после лиофилизации.

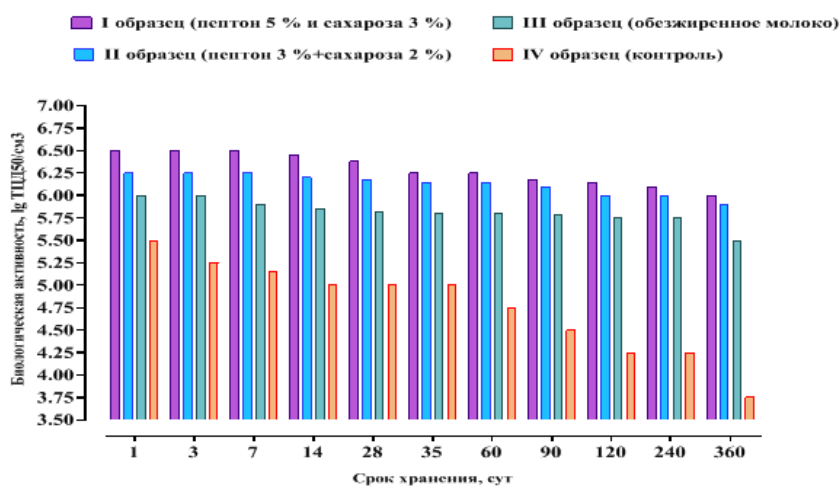
Из данных таблицы 1 видно, что в процессе лиофилизации двух штаммов лучшая сохраняемость вируса была в образцах вакцины I (пептон 5% + сахароза 3%) и II (пептон 3% + сахароза 2%), где снижение биологической активности составило для обоих образцов в пределах до $0,55 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, тогда как снижение активности в III образце с обезжиренным молоком было больше и составило до $0,75 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

Далее для изучения защитных свойств стабилизирующих сред лиофилизированные вакцины из двух штаммов хранили при разных температурно-временных режимах плюс (37,0 ± 0,5), (22,0 ± 3), (2-8) °С и минус (40,0 ± 0,5) °С в течение 12 месяцев.

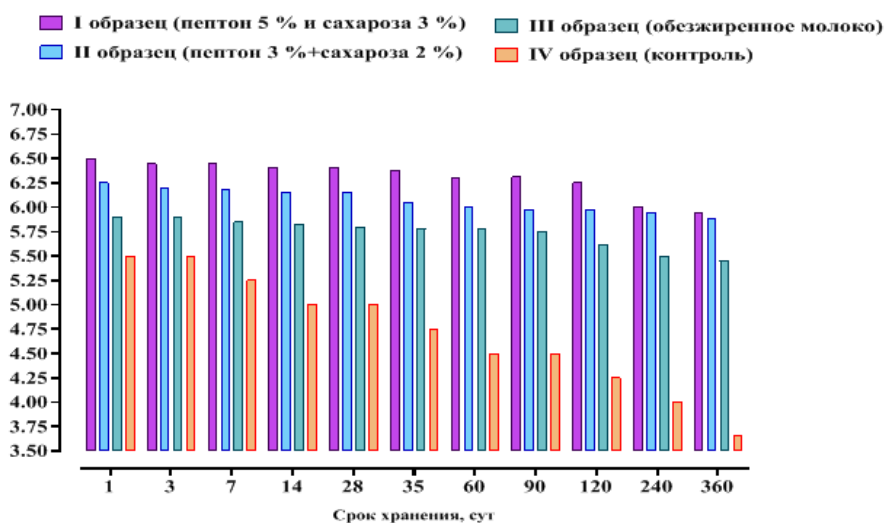
Исследуемые образцы вакцины, приготовленные из

Таблица 1. Результаты определения биологической активности лиофилизированных образцов вакцины в культуре клеток ПЯ до и после лиофилизации ($X \pm m, n=3$)

Штаммы вируса	№ образца и содержание компонентов в ВЖ	Титр вируса до сушки, lg ТЦД ₅₀ /см ³	Титр вируса после сушки, lg ТЦД ₅₀ /см ³
CP-65K	I образец пептон 5% + сахараза 3%	6,75±0,14	6,50±0,14
	II образец пептон 3% + сахараза 2%		6,25±0,14
	III образец обезжиренное молоко		6,00±0,14
«БИЭМГ-51»	IV образец пептон 5% + сахараза 3%	6,50±0,14	6,25±0,14
	V образец пептон 3% + сахараза 2%		6,18±0,17
	VI образец обезжиренное молоко		5,75±0,14



А



Б

Рисунок 1. Сохраняемость лиофилизированной вирусвакцины из штамма «CP-65K» ВОК:

А – показатели биологической активности при температуре плюс (2-8) °С; Б – показатели биологической активности при температуре минус (40,0 ± 1,0) °С.

Примечание: Контроль – нативная вирусная суспензия без стабилизатора

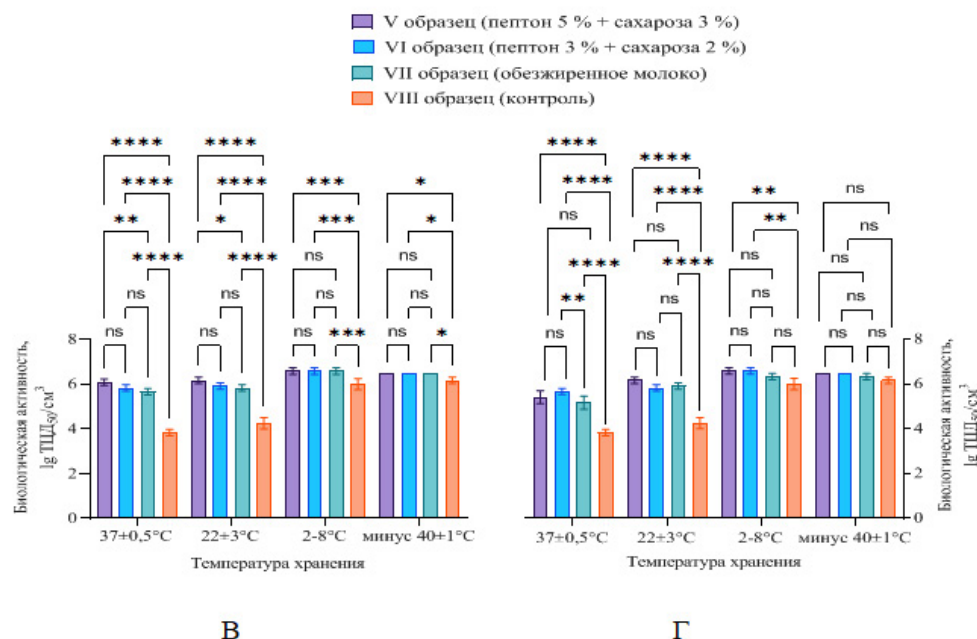
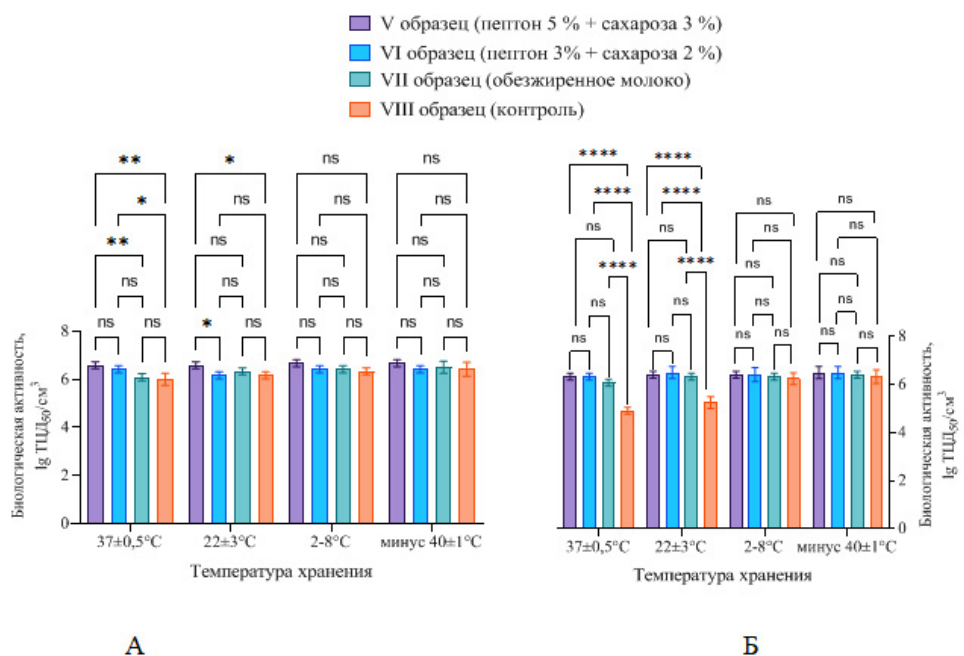
штамма «СР-65К» ВОК с стабилизирующими средами образцов I (пептон 5% + сахароза 3%), II (пептон 3% + сахароза 2%) и III (обезжиренное молоко) исследовались до 3 суток при температурах $(37,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ и $(22,0 \pm 3)^\circ\text{C}$. По результатам исследований установлено, снижение биологической активности штамма «СР-65К» ВОК, по сравнению с исходной культуральной суспензией, при указанных температурах и составило не выше $0,25 \text{ lg TЦД}_{50}/\text{cm}^3$ при использовании среды 5% пептона и 3% сахарозы, $0,50 \text{ lg TЦД}_{50}/\text{cm}^3$ при стабилизирующей среде второго образца и $0,75 \text{ lg TЦД}_{50}/\text{cm}^3$ при использовании обезжиренного молока. Лиофилизированные вакцинные препараты с защитными добавками из пептона и сахарозы представляли собой мелкопористую, компактную массу в виде таблетки, желтовато-серого цвета, а вакцинные образцы, высушенные с обезжиренным молоком пористые таблетки беловатого цвета.

При температурах плюс $(2-8)^\circ\text{C}$ и минус $(40 \pm 1,0)^\circ\text{C}$,

в образцах I (пептон 5% + сахароза 3%) и II (пептон 3% + сахароза 2%) наблюдалась наилучшая сохраняемость вируса в течение 12 мес. Результаты проведенных опытов представлены на рисунке 1 (А, Б).

Согласно рисунку 1 А, от момента лиофилизации (0 сутки) и в течение 360 дней (конечный срок наблюдения) хранения при температурах плюс $(2-8)^\circ\text{C}$ и минус $(40 \pm 1,0)^\circ\text{C}$ (рисунок 1 Б) общее снижение биологической активности вируса оспы коров в образцах вакцины с содержанием (пептона 3-5% и сахарозы 2-3%) было минимальным, в пределах до $0,55 \text{ lg TЦД}_{50}/\text{cm}^3$, тогда как в образце вакцины с обезжиренным молоком достигало до $0,75 \text{ lg TЦД}_{50}/\text{cm}^3$.

Результаты сохраняемости штамма «БИЭМГ-51» ВОВ с различными стабилизирующими средами при разных температурно-временных режимах представлены на рисунке 2 (А, Б, В, Г, Д и Е).



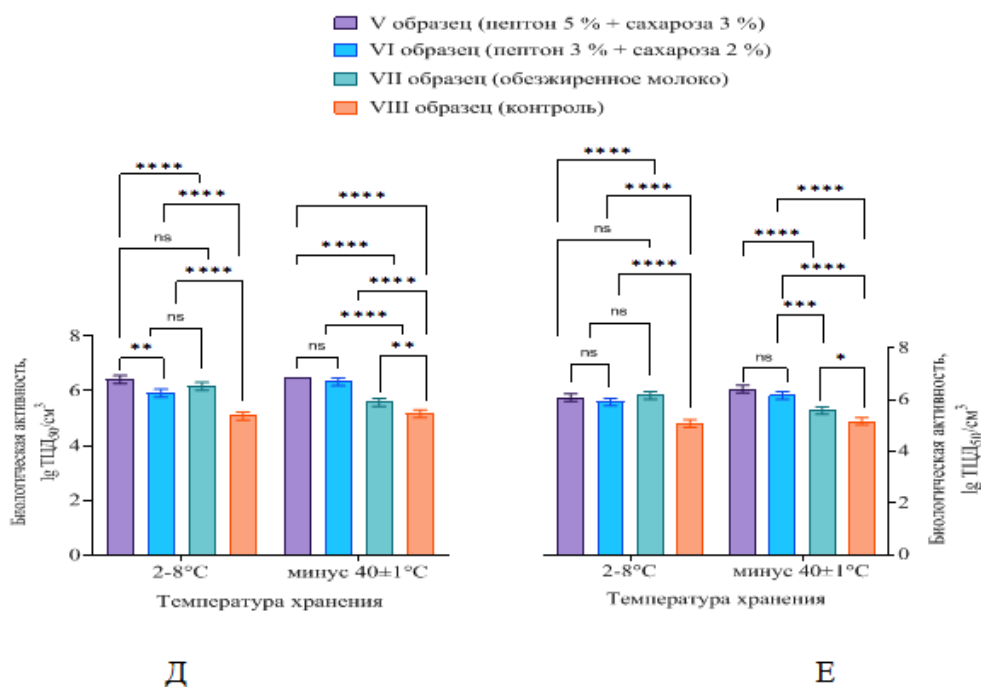


Рисунок 2. Сохраняемость лиофилизированной вирусвакцины против ВОК из штамма «БИЭМГ-51» при разных температурно-временных режимах:

А – после суточного хранения; Б – после 6 суточного хранения; В – после 12 суточного хранения; Г – 30 суточного хранения; Д – 110 суточного хранения; Е – 365 суточного хранения; IV образец состоит из 5 % пептона и 3 % сахарозы; V образец – из 3 % пептона и 2 % сахарозы; VI образец – из обезжиренного коровьего молока и VII образец – нативная вирусная суспензия без стабилизатора.

Примечание: Статистическая обработка данных проведена с использованием программы Graph Pad Prism 9 с двух сторонним методом ANOVA, при этом: **** - $p \leq 0.0001$; *** - $p \leq 0.0001$; ** - $p \leq 0.0091$; * - $p \leq 0.0263$;

На рис. 2, показано, что при температуре $(37,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ образцы вакцины из штамма «БИЭМГ-51» с содержанием (пептона 3-5% и сахарозы 2-3%) хранятся не более 3 сут, а при температуре $(22,0 \pm 3)^\circ\text{C}$ не более 5 суток и наблюдается снижение активности ($p < 0.0001$) $0,75 \text{ lg TCID}_{50}/\text{cm}^3$ и $0,31 \text{ lg TCID}_{50}/\text{cm}^3$, соответственно. Температура хранения при плюс $(2-8)^\circ\text{C}$ и минус $(40,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ положительно повлияла на сохраняемость всех групп независимо от состава защитной среды. В результате исследований по хранению вирусов из штаммов «СР-65К» и «БИЭМГ-51» установлено, что активность вируса без стабилизирующей среды была существенно ниже в сравнении с образцами со стабилизирующими средами ($p < 0.0001$) на протяжении всего срока наблюдения.

Таким образом, на основании данных, представленных на рисунках 1 и 2, можно сделать вывод о том, что сохраняемость штаммов «СР-65К» ВОК и «БИЭМГ-51» ВОВ напрямую зависит от температурно-временных режимов хранения и вида стабилизирующей среды. Сравнительный анализ сохраняемости данных штаммов, независимо от состава стабилизирующей среды, при температурах $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ и $(22 \pm 3)^\circ\text{C}$ хранятся не более 3-5 суток, соответственно. Биологическая активность штаммов вируса в течение всего срока наблюдения (12 мес.) при температурах плюс $(2-8)^\circ\text{C}$ и минус $(40)^\circ\text{C}$ сохранялась в образцах I (5 % пептон + 3 % сахароза) и II (3 % пептон и 2 % сахароза), без существенного снижения биологической активности. Следует отметить, что после лиофилизации титр вируса в образцах вакцины из вышеуказанных вакцинных штаммов без защитной среды снизился

до значений, статистически значимых в сравнении с другими образцами.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Необходимость представленной работы обусловлена значительным распространением заболеваний, вызванных ортопоксвирусами, и увеличением количества исследований, направленных на разработку ветеринарных препаратов для иммунопрофилактики и иммунотерапии и технология производства ветеринарных препаратов включают этапы хранения вирусов, для консервирования которых используют лиофилизацию со стабилизирующими средами.

По литературным данным известно, что на сохранность вирусов в ходе лиофилизации влияют этапы и условия процесса высушивания, подготовка материала и состав защитных сред [22]. К условиям высушивания относятся режимы охлаждения, температура начала сублимации, степень вакуумирования камеры установки для сублимации, обеспечение необходимых значений остаточной влажности. По данным литературы для лиофилизации вирусов необходимо использовать медленное охлаждение, поскольку инфекционная активность лиофилизированных вирусов после быстрого охлаждения снижается [17]. Также в ряде случаев при добавлении в защитную среду некоторых стабилизирующих веществ также происходит снижение инфекционной активности вирусов. Это обусловлено образованием прочных химических связей данных веществ с вирионами в процессе лиофилизации, что приводит к инаktivации вирусов [17, 19].

В ветеринарной практике в качестве стабилизирующих веществ при лиофилизации вирусов используют отдельно или в разных комбинациях пептон, желатин, сахарозу, обезжиренное молоко, глутамат натрия, сыворотку крови позвоночных и ее компоненты [23].

Chifney et al. [24] рекомендовали при лиофилизации аттенуированных штаммов поксвирусов использовать среду, содержащую 2,5% гидролизата лактальбумина и 5 % сахарозы. При хранении лиофилизированного вируса с данной средой защиты не было отмечено снижения его активности в течение 1 года при минус 20°C. Другие авторы [25, 26], при лиофилизации вируса оспы овец, в качестве защитной среды использовали обезжиренное молоко. По результатам исследований Кореба О.А. установлено, что из 14 прописей наилучшим стабилизирующим эффектом в отношении штаммов вируса оспы овец обладала среда, содержащая пептон в концентрации 3-5% и сахарозу – 2,5-5%, которая рекомендована для хранения матричного штамма для приготовления вакцины. Штамма вируса оспы овец, высушенные со стабилизирующими средами, сохранились при температуре 4 °С и минус 20 °С без существенного снижения активности на протяжении года.

Подобные исследования были проведены в условиях НИИПББ [27], в которых при подборе защитных сред для аттенуированного штамма «КМ-40» вируса оспы верблюдов были использованы среды в следующих конечных концентрациях: 6,5% пептон; 6,5% пептона + 5% сахарозы; 3% пептона + 0,5% желатина + 3% сахарозы и обезжиренное коровье молоко. В результате проведенных исследований установлено, что оптимальной защитной средой для вируса оспы верблюдов являлись обезжиренное коровье молоко, а также 6,5% пептон. Эти стабилизаторы позволили хранить вирус в течение 15 мес при температуре плюс (2-8) °С и при минус (40,0±1) °С в течение 20 мес (Данные не опубликованы).

Стабилизирующая среда из обезжиренного молока одноконтентная, не сложное в приготовлении, но использование данной среды в наших экспериментах привело к снижению биологической активности вирусов после лиофилизации и не смогла обеспечить длительное хранение, влияя на некоторые биологические свойства. По этой причине данная защитная среда для ортопоксвирусов является нестандартным продуктом, и получение ее требует дополнительных затрат.

Резюмируя вышесказанное, при выборе защитной среды было отдано предпочтение использованию в качестве стабилизатора при изготовлении вакцины против оспы коров, пептону и сахарозе, в конечных концентрациях 5% и 3%, соответственно, где биологическая активность составляла для штаммов «СР-65К» ВОК – 6,50±0,14 lg ТЦД₅₀/см³ и «БИЭМГ-51» ВОВ 6,25±0,14 lg ТЦД₅₀/см³.

По полученным результатам в ходе экспериментов, проведенные нами, более высокие показатели хранения вакцинных штаммов вируса оспы коров в течение года отмечены при температуре (2-8) °С и минус (40,0±1,0) С, где наблюдалось наименьшее снижение биологической активности в образцах I и II. Следует отметить, что температуру минус (40,0±1,0) °С в условиях хозяйства и транспортировки обеспечить трудоёмко, в связи с этим

для хранения и транспортировки вакцинных препаратов при температуре плюс (2-8) °С, является оптимальной и эффективной.

Таким образом, для ортопоксвирусов рекомендуется использовать метод лиофилизации с последующим хранением и транспортировкой при температуре плюс (2-8) °С и допускается хранения при температуре минус (40,0±1,0) °С.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных результатов, для лиофилизации штаммов «СР-65К» ВОК и «БИЭМГ-51» ВОВ была выбрана стабилизирующая среда состоящая из 5% пептона и 3% сахарозы в конечных концентрациях, температура для хранения является плюс (2-8) °С в течение года и рекомендуемая температура для транспортировки.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Комитета науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан (грант № BR218004/0223).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории « Коллекции микроорганизмов» и «Технологии готовых форм биопрепаратов» за оказанную помощь при выполнении научно-исследовательской работы по теме статьи и руководству Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

ЛИТЕРАТУРА

1. Алиева А.Б., Айдарбекова Д.Б., Алимбай Н.Е., Кенжебаева М.К., Табыс Ш.Т., Сәрсенқұлова Н.А., Сылдырбаева А.С., Жугунисов К.Д., Мамбеталиев М.А., Баракбаев К.Б., Абдураимов Е.О., Закарья К.Д. Культивирование коллекционных штаммов ортопоксвирусов в культурах клеток // Известия НАН КР. – 2022. – №3. – С. 42-53.
2. Haller SL, Peng C, McFadden G, Rothenburg S. Poxviruses and the evolution of host range and virulence. *Infect Genet Evol.* – 2014. – P.15–40.
3. Pal M., Singh R., Parmar B.C., Gutama K.P. and Lema A.G. Human cowpox: A viral zoonosis that poses an emerging health threat // *Journal of Advances in Microbiology Research.* – 2022. –№3. – P. 22-26.
4. Dubois, M.E., Slifka M.K. Retrospective analysis of monkeypox infection // *Emerg. Infect. Dis.* – 2008. – №14. – 592 p.
5. Ninove L., Domart Y., Vervel 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. – P. 781–784.
6. Oliveira J.S., Figueiredo P.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].
7. Vora N.M., Li Y., Geleishvili M., Emerson G.L., Khmaladze E., Maghlakelidze G., Navdarashvili A., Zakhshvili K., Kokhreidze M., Endeladze M., Mokverashvili G., Satheshkumar P.S., Gallardo-Romero N., Goldsmith C. S., Metcalfe M. G., Damon I., Maes E. F., Reynolds M.G., Morgan J., Carroll DS. Human infection with a zoonotic orthopoxvirus in the country of Georgia // *The new England journal of medicine*. – 2015. – P. 1223–1230.
8. 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. – P. 1–11.
9. 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 // *Emerging Infectious Diseases*. – 2014. – Vol. 20, № 9. – P. 1576–1578.
10. 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 // *Emerging Infectious Diseases*. – 2016. – Vol. 22, №12. – P. 2174–2177.
11. 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 // *Emerg. Infect. Dis.* – 2017. – Vol. 23, №4. – P. 649–653.
12. Doshi RH, Guagliardo SAJ, Dzabatou-Babeaux A, Likouayoulou C, Ndakala N, Moses C, et al. Strengthening of surveillance during monkeypox outbreak. Republic of the Congo, 2017 // *Emerging Infectious Diseases*. – 2018. – Vol. 24, №6. – P.1158–1160.
13. 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 // *Emerg. Infect. Dis. France*. – 2013. – Vol. 19, №12. – P. 1996–1999. [CrossRef].
14. 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. – Vol. 92, №2. – P.126 – 131.
15. De Oliveira J.S., Figueiredo P.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, Nov. 15. – Vol. 9, №11. – P. 340–344.
16. 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.
17. Львов Д.К., Алимбарова Л.М., Жирнов О.П. Вопросы вирусологии. изд. МИА. – 2022. – №5. – С. 360–364.
18. Tips and techniques for propagating virus in tissue culture and embryonated chicken eggs // *ATCC Virology guide*. – Manassas: ATCC. – 2016. – P. 4 – 6.
19. Pisal S., Wawde G., Salvankar S. et al. Vacuum foam drying for preservation of LaSota virus: effect of additives // *AAPS PharmSciTech* – 2006. – P. 30 – 37.
20. Ашмарин И. П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. // Издательство медицинской литературы. – 1962. – 180 с.
21. Варяница В.В., Высеканцев И.П. Методы хранения сложных РНК- содержащих вирусов // *Проблемы криобиологии и криомедицины*. – 2017. – С. 287–295.
22. Malenovska H. The influence of stabilizers and rates of freezing on preserving of structurally different animal viruses during lyophilization and subsequent storage // *Journal of applied microbiology*. – 2014. – Vol. 117, №6. – P. 1810–1819.
23. Wroblewska Z. et al. The production of varicella zoster virus antiserum in laboratory animals // *Brief. report Archiv. Virol.* – 1982. – P.233–238.
24. Chifney S.T.E., Martin W.B., Ergin H., Koynu A. Factors associated with the production of attenuated sheep pox vaccines // *Res. Vet. Sci.* – 1973. – Vol. 14, №1. – P. 62–68.
25. Mateva Penkova V., Jassim F.A., Thompson JR, Al-Doori T.M., The propagation of an attenuated Sheep pox virus and its use as a vaccine// *Bull. Off. Int. Epiz.* – 1974. – P. 329–339.
26. Лихачева Н.Б., Жидкова Л.А. Атенуированный штамм вируса оспы овец // Тез. докл Науч-произв. конф. ВГНКИ вет. препаратов. – Москва, 1974. – С. 1–2.
27. Разработка технологии изготовления вакцины против оспы верблюдов. Отчет о НИР (заключительный). Гвардейский. – 2015. – 163 с.

REFERENCES

1. Alieva A.B., Ajdarbekova D.B., Alimbaj N.E., Kenzhebaeva M.K., Tabys SH.T., Sarsenkulova N.A., Syldyrbaeva A.S., Zhugunisov K.D., Mambetaliev M.A., Barakbaev K.B., Abduraimov E.O., Zakar'ya K.D. Kul'tivirovanie kollekcionnyh shtammov ortopoksvirusov v kul'turah kletok // *Izvestiya NAN KR*. – 2022. – №3. – S. 42–53.
2. Haller SL, Peng C, McFadden G, Rothenburg S. Poxviruses and the evolution of host range and virulence. *Infect Genet Evol.* – 2014. – P.15–40.
3. Pal M., Singh R., Parmar B.C., Gutama K.P. and Lema A.G. Human cowpox: A viral zoonosis that poses an emerging health threat // *Journal of Advances in Microbiology Research*. – 2022. – №3. – P. 22–26.
4. Dubois, M.E., Slika M.K. Retrospective analysis of monkeypox infection // *Emerg. Infect. Dis.* – 2008. – №14. – 592 p.
5. 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. – P. 781–784.

6. Oliveira J.S., Figueiredo P.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].

7. Vora N.M., Li Y., Geleishvili M., Emerson G.L., Khmaladze E., Maghlakelidze G., Navdarashvili A., Zakhshvili K., Kokhreidze M., Endeladze M., Mokverashvili G., Satheskumar P.S., Gallardo-Romero N., Goldsmith C. S., Metcalfe M. G., Damon I., Maes E. F., Reynolds M.G., Morgan J., Carroll DS. Human infection with a zoonotic orthopoxvirus in the country of Georgia // *The new England journal of medicine*. – 2015. – P. 1223–1230.

8. 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. – P. 1–11.

9. 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 // *Emerging Infectious Diseases*. – 2014. – Vol. 20, № 9. – P. 1576-1578.

10. 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 // *Emerging Infectious Diseases*. – 2016. – Vol. 22, №12. – P. 2174–2177.

11. 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 // *Emerg. Infect. Dis.* – 2017. – Vol. 23, №4. – P. 649–653.

12. Doshi RH, Guagliardo SAJ, Dzabatou-Babeaux A, Likouayoulou C, Ndakala N, Moses C, et al. Strengthening of surveillance during monkeypox outbreak. Republic of the Congo, 2017 // *Emerging Infectious Diseases*. – 2018. – Vol. 24, №6. – P.1158–1160.

13. Ducournau C., Ferrier-Rembert A., Ferraris O., Joffre A., Favier A.L., Flusin O., Van Cauteren D., Kecir K., Auburtin B., Védys S. Concomitant human infections with 2 cowpox virus strains in related cases // *Emerg. Infect. Dis.* France. – 2013. – Vol.19, №12. – P. 1996-1999. [CrossRef].

14. 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. – Vol. 92, №2. – P.126 – 131.

15. De Oliveira J.S., Figueiredo P.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, Nov. 15. – Vol. 9, №11. – P. 340-344.

16. 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.

17. L'vov D.K., Alimbarova L.M., Zhirnov O.P. *Voprosy virusologii. izd. MIA.* – 2022. – №5. – S. 360-364.

18. Tips and techniques for propagating virus in tissue culture and embryonated chicken eggs // *ATCC Virology guide*. – Manassas: ATCC. – 2016. – P. 4 – 6.

19. Pisal S., Wawde G., Salvankar . et al. Vacuum foam drying for preservation of LaSota virus: effect of additives // *AAPS PharmSciTech* – 2006. – P. 30-37.

20. Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. Statisticheskie metody v mikrobiologicheskikh issledovaniyah. // *Izdatel'stvo medicinskoj literatury.* – 1962. –180 s.

21. Varyanica V.V., Vysekancev I.P. Metody hraneniya slozhnyh RNK-soderzhashchih virusov // *Problemy kriobiologii i kriomeditsiny.* – 2017. – S. 287-295.

22. Malenovska H. The influence of stabilizers and rates of freezing on preserving of structurally different animal viruses during lyophilization and subsequent storage // *Journal of applied microbiology.* – 2014. – Vol. 117, №6. – P. 1810–1819.

23. Wroblewska Z. et al. The production of varicella zoster virus antiserum in laboratory animals // *Brief. report Archiv. Virol.* – 1982. – P.233-238.

24. Chifney S.T.E., Martin W.B., Ergin H., Koylu A. Factors associated with the production of attenuated sheep pox vaccines // *Res. Vet. Sci.* – 1973. – Vol. 14, – №1. – P. 62–68.

25. Mateva Penkova V., Jassim F.A., Thompson JR, Al-Doori T.M., The propagation of an attenuated Sheep pox virus and its use as a vaccine// *Bull. Off. Int. Epiz.* – 1974. – P. 329-339.

26. Lihacheva N.B., ZHidkova L.A. Attenuirovannyj shtamm virusa ospy ovec // *Tez. dokl. Nauch-proizv. konf. VGNKI vet. preparatov.* – Moskva, 1974. – S. 1-2.

27. Razrabotka tekhnologii izgotovleniya vakciny protiv ospy verblyudov. Otchet o NIR (zaklyuchitel'nyj). *Gvardejskij.* – 2015. – 163 s.

UDC: 619:578.831.21:578.821.21

VIABILITY OF ORTHOPOXVIRUS STRAINS IN THE SELECTION OF A STABILIZER FOR LYOPHILIZATION, STORAGE AND TRANSPORTATION

Aliyeva A.B.*, Aidarbekova D.B., Barakbayev K.B., Almaz E.K., Serikbayov O.N., Kenzhebayeva M.K., Tabys Sh.T., Nakhanov A.K., Zhugunisov K.D.

LLP "Scientific Research Institute of Biological Safety Problems" of the Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan, 080409, Zhambyl region, Kordai district, Gvardeyskiy, Republic of Kazakhstan

*a.aliyeva@biosafety.kz

ANNOTATION

The article presents the results of research on the choice of a stabilizer for strains «CP-65K» and «BIEMG-51» orthopoxviruses, which helps to preserve their biological activity during lyophilization, storage in various temperature and time conditions and transportation.

To select a stabilizing medium that ensures the greatest preservation of the virus during lyophilization and subsequent storage, depending on the composition of protective media, temperature and shelf life, we prepared 3 samples of each vaccine preparation with stabilizing additives: I and V samples consisted of 5 % peptone and 3 % sucrose; II and VI samples - of 3 % peptone and 2 % sucrose; III and VII samples - from skimmed milk; IV and VIII samples - control. All protective media were added to the viral materials in a 1:1 ratio.

As a result of the conducted studies, it was found that of the tested samples of stabilizing media, the most protective property for the strains «CP-65K» CPOX and «BIEMG-51» smallpox vaccine virus had a stabilizing medium consisting of a mixture of peptone (5 %) and sucrose (3 %) in the final concentration, which ensured the safety of vaccine strains for 12 months month. at a temperature of (2-8) °C and minus (40.0±1.0) °C without a significant decrease in their biological activity (6.50±0.14 lg TCID₅₀/cm³ and 6.25±0.14 lg TCID₅₀/cm³, respectively).

Keywords: cowpox virus, strain, stabilizing medium, lyophilization, storage, stability.

ӘОК: 619:578.831.21:578.821.21

ЛИОФИЛИЗАЦИЯЛАУ, САҚТАУ ЖӘНЕ ТАСЫМАЛДАУ ҮШІН ТҰРАҚТАНДАРЫҒЫШТЫ ТАҢДАУ КЕЗІНДЕ ОРТОПОКСВИРУС ШТАМДАРЫНЫҢ ӨМІРШЕНДІГІ

Алиева А.Б.*, Айдарбекова Д.Б., Баракбаев К.Б., Алмас Е.К., Серикбайов О.Н., Кенжебаева М.К., Табыс Ш.Т., Наханов А.К., Жугунисов К.Д.

Қазақстан Республикасы Денсаулық сақтау министрлігінің «Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты» ЖШС, 080409, Жамбыл облысы, Қордай ауданы, Гвардейский қнт., Қазақстан Республикасы

*a.aliyeva@biosafety.kz

ТҮЙІН

Мақалада ортопоксвирустардың «CP-65K» және «БИЭМГ-51» штамдары үшін лиофилизациялау, әртүрлі температуралық-уақыттық жағдайларда сақтау және тасымалдау кезінде олардың биологиялық белсенділігін сақтауға ықпал ететін тұрақтандырғышты таңдау бойынша зерттеулердің нәтижелері келтірілген.

Қорғау ортасының құрамына, температурасына және сақтау мерзіміне байланысты кептіру және кептіруден кейін сақтау процесстерінде вирустың барынша сақталуын қамтамасыз ететін оңтайлы тұрақтандырушы ортаны іріктеу үшін тұрақтандырушы қоспалары бар вакциналық препараттардың 3 үлгісін дайындадық: I және V үлгілер 5 % пептоннан және 3 % сахарозадан; II және VI үлгілер - 3 % пептон мен 2 % сахарозадан; III және VII үлгілер - майсыздандырылған сүттен; IV және VIII үлгілер - бақылау үлгілері. Барлық қорғаныс орталары вирустық материалдарға 1:1 қатынасында қосылды.

Жүргізілген зерттеулер нәтижесінде «CP-65K» (CPOX) штамы және вакцина вирусының штамы «БИЭМГ-51» үшін тұрақтандырушы орталардың сыналған үлгілерінің ішінен ең оңтайлы қорғаныштық қасиетке ие болған 5 % пептон және 3 % сахароза (соңғы концентрацияда) қоспасынан тұратын тұрақтандырғыш орта таңдалды, бұл ортада вирустың биологиялық белсенділігінің айтарлықтай төмендеуіне (тиісінше 6,50±0,14 lg ТЦД₅₀/см³ және 6,25±0,14 lg ТЦД₅₀/см³) °C және минус (40,0±1,0) C кезінде сақталуын қамтамасыз етті.

Түйін сөздер: сиыр шешек вирусы, штамм, тұрақтандырушы орта, мұздату, сақтау, тұрақтылық.