

ПАТОГЕННОСТЬ И ИММУНОГЕННОСТЬ ВАРИАНТОВ ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ ПРИ РАЗНЫХ СПОСОБАХ ИХ ВВЕДЕНИЯ МЫШАМ

С.Н. Щелкунов, А.А. Сергеев, А.С. Кабанов, С.Н. Якубицкий, Т.В. Бауэр,
С.А. Пьянков

*ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, п. Кольцово,
Новосибирская область, Россия*

Резюме. Вирус осповакцины сыграл ключевую роль в глобальной ликвидации натуральной оспы. Однако при массовой иммунизации вакцинами на основе разных штаммов вируса осповакцины выявлялись случаи тяжелых побочных реакций, иногда завершающиеся летальным исходом, особенно у людей с ослабленной иммунной системой. Поэтому после объявления в 1980 году о ликвидации оспы Всемирная организация здравоохранения рекомендовала прекратить противооспенную вакцинацию. За прошедшие 40 лет человеческая популяция практически утратила иммунитет не только к натуральной оспе, но и к зоонозным ортопоксвирусным инфекциям, таким как оспа обезьян, оспа коров, оспа буйволов, оспа верблюдов. Поэтому в последние годы на разных континентах стали возникать вспышки ортопоксвирусных инфекций человека, которые имеют опасность перерасти в будущем в распространенные эпидемии. В связи с этим возникла необходимость получения безопасных аттенуированных штаммов вируса осповакцины путем направленной инактивации генов вирулентности этого вируса, а также изучения на лабораторных моделях проявления их свойств патогенности и иммуногенности в зависимости от способа введения вирусов в организм животных. Аттенуация вируса осповакцины в настоящее время часто достигается при создании живых рекомбинантных поливалентных вакцин в результате встройки целевых последовательностей ДНК в гены вирулентности векторного вируса, что приводит к их инактивации. Объектами исследования в данной работе стали штамм LIVP вируса осповакцины, используемый в Российской Федерации для противооспенной вакцинации, и полученный на его основе методами генетической инженерии аттенуированный вариант LIVP-GFP, у которого нарушен вирусный ген тимидинкиназы. Данные вирусы вводили мышам-сосункам линии BALB/c интрацеребрально в дозах 10^1 или 10^2 БОЕ/животное для оценки нейровирулентности сравниваемых штаммов вируса осповакцины. Взрослых мышей заражали этими вирусами интраназально, подкожно или внутрикожно в дозах 10^7 или 10^8 БОЕ/животное и контролировали в течение 14 суток наличие клинических проявлений вирусной инфекции. Через 28 суток от начала эксперимента получали индивидуальные сыворотки крови мышей и методом ИФА определяли в них уровень вирус-специфичных антител. Показано, что рекомбинантный штамм LIVP-GFP обладает значительно сниженной нейровирулентностью и патогенностью для мышей по сравнению с исходным штаммом LIVP. Наиболее безопасным и эффективным способом иммунизации для обоих изученных штаммов вируса осповакцины оказалось внутрикожное введение.

Ключевые слова: вирус осповакцины, аттенуация, инфекция, патогенность, иммунный ответ, антитела.

Адрес для переписки:

Щелкунов Сергей Николаевич
630559, Россия, Новосибирская область, п. Кольцово,
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».
Тел.: 8 (903) 939-94-80 (моб.). Факс: 8 (383) 336-74-09.
E-mail: snshchel@vector.nsc.ru, snshchel@rambler.ru

Contacts:

Sergei N. Shchelkunov
630559, Russian Federation, Novosibirsk Region, Koltsovo,
State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector".
Phone: +7 (903) 939-94-80 (mobile). Fax: +7 (383) 336-74-09.
E-mail: snshchel@vector.nsc.ru, snshchel@rambler.ru

Для цитирования:

Щелкунов С.Н., Сергеев А.А., Кабанов А.С., Якубицкий С.Н., Бауэр Т.В.,
Пьянков С.А. Патогенность и иммуногенность вариантов вируса
осповакцины при разных способах их введения мышам // Инфекция
и иммунитет. 2021. Т. 11, № 2. С. 357–364. doi: 10.15789/2220-7619-PAI-1375

Citation:

Shchelkunov S.N., Sergeev A.A., Kabanov A.S., Yakubitskiy S.N., Bauer T.V.,
Pyankov S.A. Route-coupled pathogenicity and immunogenicity of Vaccinia
virus variant inoculated mice // Russian Journal of Infection and Immunity =
Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 2, pp. 357–364. doi: 10.15789/2220-
7619-PAI-1375

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 19-14-00006).

ROUTE-COUPLED PATHOGENICITY AND IMMUNOGENICITY OF VACCINIA VIRUS VARIANT INOCULATED MICE

Shchelkunov S.N., Sergeev A.A., Kabanov A.S., Yakubitskiy S.N., Bauer T.V., Pyankov S.A.

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Kol'tsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Abstract. Vaccinia virus had played a key role in the global smallpox eradication. However, in case of mass vaccination with various Vaccinia virus strains severe side effects were revealed sometimes ending up with lethal outcomes, especially in immunocompromised humans. Hence, in 1980 the World Health Organization recommended to cancel smallpox vaccination after declaring about smallpox eradication. Over the last 40 years, human population virtually lost immunity not only against smallpox, but also against other zoonotic orthopoxvirus infections, such as monkeypox, cowpox, buffalopox, and camelpox. All of them pose a represent increasing threat to human health and heighten a risk of emerging highly contagious viruses due to natural evolution of previous zoonotic orthopoxviruses. In order to prevent development of small outbreaks into spreading epidemics and, thus, to decrease a risk of emergence due to natural evolution of highly pathogenic for humans orthopoxviruses, efforts should be applied to develop safe new generation live vaccines based on Vaccinia virus with target virulence genes inactivation. These strains should be examined in laboratory animal models inoculated via different routes. Currently, Vaccinia virus often becomes attenuated to create live recombinant vaccines due to inserting target DNA sequences into the virus virulence genes resulting in their inactivation. Vaccinia virus strain LIVP used in the Russian Federation as smallpox vaccine as well as derivative attenuated variant LIVP-GFP created by using genetic engineering methods with inactivating its thymidine kinase gene were examined. Such viruses were intracerebrally inoculated into suckling mice at doses of 10^1 or 10^2 PFU/animal for neurovirulence assessment. Adult mice were infected intranasally, subcutaneously or intradermally at doses of 10^7 or 10^8 PFU/animal and clinical manifestations were analyzed for 14 days. On the 28th day after the onset, blood serum samples were collected from individual mice to measure virus specific antibody level by using ELISA. It was shown that recombinant Vaccinia virus strain LIVP-GFP displayed markedly lowered neurovirulence and pathogenicity for mice as compared to parental LIVP. Finally, intradermal route turned out to demonstrate the most safe and effective profile for immunization with both examined Vaccinia virus strains.

Key words: *Vaccinia virus, attenuation, infection, pathogenicity, immune response, antibodies.*

Введение

40 лет назад в мае 1980 г. на Всемирной ассамблее здравоохранения было объявлено о триумфальном завершении международной программы по глобальной ликвидации оспы. Благодаря строгому противоэпидемическому контролю и массовой вакцинации против оспы удалось победить эту особо опасную инфекцию, которая только в 20 веке унесла жизни не менее 300 млн человек. Дальнейшую вакцинацию против оспы было предложено прекратить, поскольку она в ряде случаев приводила к тяжелым побочным реакциям [4, 17].

Живая противооспенная вакцина первого поколения представляла собой вирус осповакцины (*Vaccinia virus*, VACV), полученный культивированием на скарифицированной коже крупного рогатого скота или других домашних животных. При этом в разных странах использовали различные штаммы VACV, происхождение которых точно не было известно. Штаммы VACV различались между собой по патогенности при инфицировании различных видов лабораторных животных и по реактогенности при вакцинации людей [5, 6, 17]. Чем обусловлены такие различия штаммов VACV, до сих пор не выяснено.

Прекращение противооспенной вакцинации после 1980 г. привело к тому, что в настоящее

время подавляющее большинство людей не имеет иммунитета не только к оспе, но и к инфекциям человека, вызванным близкородственными вирусом натуральной оспы (*Variola virus*, VARV) зоонозными ортопоксвирусами, такими как вирус оспы обезьян (*Monkeypox virus*, MPXV), вирус оспы коров (*Cowpox virus*, CPXV), вирус оспы верблюдов (*Camelpox virus*, CMLV) и VACV. Именно поэтому в последние годы в разных регионах мира участились вспышки ортопоксвирусных инфекций человека, что во все большей степени начинает представлять угрозу для здоровья людей [2, 11, 15, 20]. В связи с этим вновь возникает необходимость иммунизации населения против ортопоксвирусных инфекций в эндемичных по ним районах [16]. Однако классическая противооспенная вакцина первого поколения для этих целей не подходит, поскольку может обуславливать тяжелые побочные реакции, особенно на фоне возросшего в последние десятилетия числа иммунодефицитов людей разной природы (ВИЧ-инфекция и др.) [6, 19]. Поэтому необходимо получать аттенуированные штаммы VACV и изучать их иммуногенные свойства [2, 16, 22].

Известно, что свойства патогенности и иммуногенности VACV зависят от используемого штамма и способа его введения в организм животного [8, 9, 14, 21]. В данной работе нами проведено сравнение свойств штамма Л-ИВП (LIVP)

и полученного на его основе аттенуированного варианта LIVP-GFP с инактивированным геном тимидинкиназы при различных способах и разных дозах введения вирусов мышам.

Материалы и методы

Вирусы. В работе использовали штамм VACV LIVP клон 14 и полученный на его основе рекомбинантный штамм LIVP-GFP со встройкой гена зеленого флуоресцентного белка в вирусный ген тимидинкиназы [13].

Культивирование вирусов. Вирусы выращивали и титровали на культуре клеток почки африканской зеленой мартышки линии CV-1 из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Монослой клеток линии CV-1, выращенный в культуральных флаконах с использованием питательной среды DMEM/F-12 (1:1) (Биолот, Россия), содержащей 10% FBS (Gibco, Германия), заражали вирусом с множественностью 0,1–1,0 БОЕ/клетку и инкубировали 48 ч при температуре 37°C до образования полного ЦПД. Затем зараженные клетки CV-1 подвергали двум циклам замораживания–оттаивания и полученный препарат обрабатывали ультразвуком при частоте 22 кГц. После этого осаждали клеточный дебрис на центрифуге J2-HS Beckman Coulter при 5000 об/мин, 4°C 20 мин. Затем из полученного супернатанта осаждали вирус на центрифуге J2-HS Beckman Coulter при 14 000 об/мин, 4°C 60 мин. Осадок вирусных частиц ресуспендировали в физиологическом растворе (Биолот, Россия), фасовали в пробирки объемом 1,5 мл и хранили при минус 80°C. Титр вируса в полученных образцах определяли методом бляшек.

Животные. В исследованиях использовали инбредных разнополых мышей линии BALB/c, полученных из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Подопытных животных содержали на стандартном рационе с достаточным количеством воды согласно ветеринарному законодательству и в соответствии с требованиями по гуманному содержанию и использованию животных в экспериментальных исследованиях. Исследования и манипуляции на животных были одобрены комитетом по биоэтике ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Оценка нейровирулентных свойств вирусов на мышях-сосунках. Использовали 2–3-суточных разнополых мышей линии BALB/c. Для изучения выживаемости животных сосунки были распределены в группы по 10 голов, которых интрацеребрально (и/ц) заражали штаммами VACV LIVP или LIVP-GFP в дозах 10^1 и 10^2 БОЕ/10 мкл/животное. Группе отрицательного контроля и/ц вводили 10 мкл физиологическо-

го раствора (ФР). После инфицирования мышей регистрировали их гибель в группах в течение 14 суток.

Заражение взрослых мышей вирусами. Использовали 3–5-недельных разнополых мышей линии BALB/c массой 13–16 г. Интраназальное (и/н) введение препаратов VACV мышам проводили следующим образом: после ингаляционного наркоза диэтиловым эфиром мышам в полость носа вводили вирус-содержащую жидкость либо ФР в объеме 30 мкл суммарно в обе ноздри. Внутривенное (в/к) инфицирование мышей осуществляли путем введения вирусного препарата либо ФР в корень хвоста, а подкожное (п/к) — в холку, используя те же дозы и объемы препаратов, что и при и/н инфицировании. Применяли дозы заражения 10^8 и 10^7 БОЕ/животное. В каждой группе экспериментальных животных было по 5–6 мышей. Мышей ежедневно взвешивали и фиксировали у них внешние клинические признаки заболевания (адинамия, тремор, взъерошенность шерсти) в течение 14 суток. Средние арифметические значения массы тел мышей для каждой группы на временную точку рассчитывали и выражали в процентах от начального веса, а стандартное отклонение среднего вычисляли как описано [12].

Получение сывороток крови мышей. Через 28 суток после введения препаратов VACV у мышей проводили забор проб крови из ретроорбитального венозного синуса с помощью одноразовых стерильных капилляров, после чего животных умерщвляли путем цервикальной дислокации. Из крови мышей была получена сыворотка путем осаждения форменных элементов крови центрифугированием. Индивидуальные образцы сывороток крови мышей хранили при температуре минус 20°C.

Иммуноферментный анализ сывороток крови мышей. В качестве антигена использовали очищенный препарат VACV LIVP. Антиген сорбировали в лунки 96-луночного планшета для ИФА в течение 18–20 ч, затем проводили блокировку-стабилизацию раствором 2,5% триптона ферментативного приготовления и 5%-ной сахарозы в течение 2 ч. Раствор аспирировали из лунок планшета и планшеты высушивали с последующим хранением в герметичном пакете при температуре от 4 до 8°C. Перед проведением процедуры ИФА исследуемые образцы и реагенты выдерживали при комнатной температуре 30–60 мин. Во все лунки планшета вносили по 100 мкл разводящего раствора (РР): 0,1% казеина и 0,1% бычьего сывороточного альбумина. В верхний ряд лунок добавляли еще по 100 мкл РР. Затем в верхний ряд вносили по 2 мкл исследуемых образцов, а также на каждый планшет добавляли два заведомо отрицательных образца из контрольной

группы в качестве отрицательного контроля. В одну лунку планшета в качестве положительного контроля в разведении 1:100 вносили заведомо положительный образец, содержащий антитела к VACV.

Пипетируя и перенося в нижние лунки последовательно по 100 мкл раствора, титровали исследуемые и контрольные отрицательные образцы — сыворотки крови мышей — с разведения 1:100 до 1:12 800. Лунки закрывали клейкой пленкой и инкубировали в термошейкере 60 мин при 37°C и 700 об/мин. Не связавшиеся в иммунные комплексы антитела сыворотки пятикратно отмывали из лунок 400 мкл промычного раствора фосфатно-солевого буфера с добавлением Твин-20 (ФСБ-Т). Вносили по 100 мкл раствора пероксидазного конъюгата IgG козы к Fc-фрагментам IgG мыши, закрывали клейкой пленкой и инкубировали 30 мин при 37°C и 700 об/мин. Не связавшийся в иммунные комплексы конъюгат пятикратно отмывали из лунок 400 мкл ФСБ-Т. Вносили в лунки по 100 мкл хромогена 3,3',5,5'-тетраметилбензидаина в цитрат-фосфатном растворе с перекисью водорода и выдерживали 15 мин при 37°C. Лунки, в которых образовались иммунные комплексы, приобретали синюю окраску. Останавливали реакцию развития окраски внесением в лунки по 50 мкл 1 М серной кислоты (стоп-реагент). Синяя окраска изменялась на желтый цвет. Его интенсивность прямо пропорциональна количеству образовавшихся иммунных комплексов. Регистрировали оптическую плотность раствора в лунках на планшетном сканере при длине волны 450 нм. Титром IgG к антигенам VACV считали среднюю величину от повторов одного образца, титр каждого повтора оценивали по минимум 10%-ному пре-

вышению оптической плотности отрицательного контроля в этом же разведении. Вычисляли средние геометрические значения логарифма обратного титра VACV-специфических IgG по экспериментальным группам и рассчитывали доверительные интервалы для уровня 95%-ной вероятности совпадения каждой выборки с генеральной совокупностью [1].

Результаты

Нейровирулентность штаммов вируса осповакцины. Для сравнительной оценки нейровирулентных свойств штаммов VACV L1VP и L1VP-GFP использовали разнополых мышей-сосунков линии BALB/c. Было сформировано 5 групп по 10 животных. Мышам первой и второй групп и/ц вводили штамм VACV L1VP в дозах 10^1 и 10^2 БОЕ/10 мкл/животное соответственно. Животным третьей и четвертой групп аналогично вводили в дозах 10^1 и 10^2 БОЕ штамм VACV L1VP-GFP. Мышам группы отрицательного контроля вводили и/ц по 10 мкл ФР. Данные по выживаемости мышей в зависимости от использованного штамма и дозы вируса, приведенные на рис. 1, показывают, что VACV с нарушенным геном тимидинкиназы (L1VP-GFP) обладает значительно сниженной нейровирулентностью по сравнению и исходным штаммом L1VP.

Патогенность штаммов вируса осповакцины в зависимости от способа введения мышам. Для сравнительного изучения того, как способ инфицирования и доза вводимого вирусного препарата влияют на проявление патогенных свойств штаммов VACV L1VP и L1VP-GFP, мышам заражали тремя наиболее популярными способами: и/н, в/к или п/к. Инфицирующие

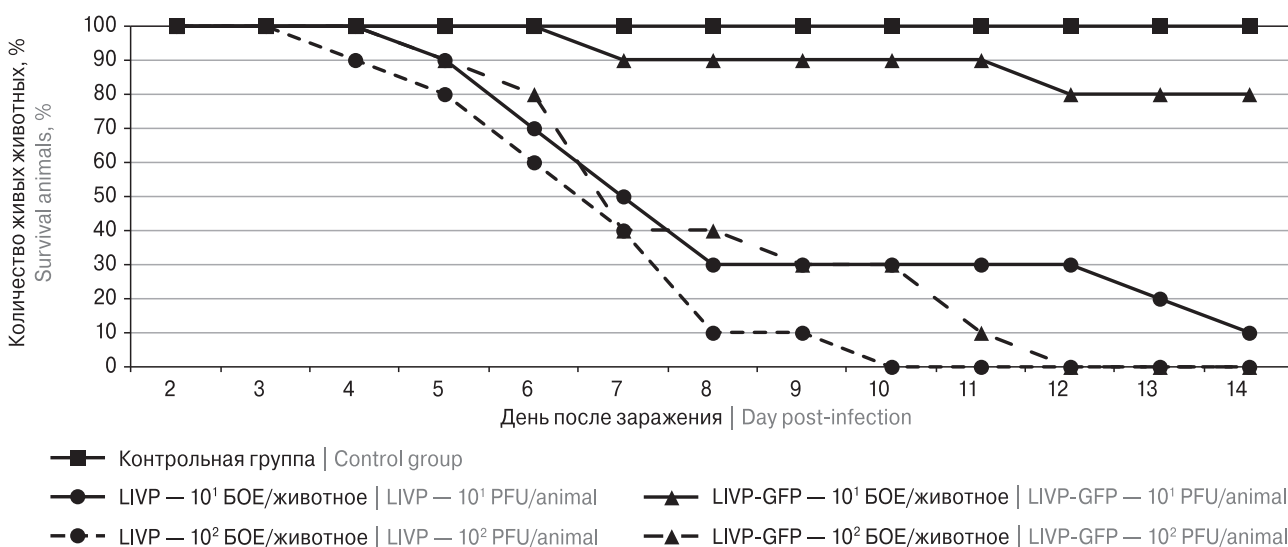


Рисунок 1. Динамика гибели животных, интрацеребрально зараженных вирусами L1VP и L1VP-GFP
Figure 1. Animal death dynamics after intracranial infection by L1VP and L1VP-GFP viruses

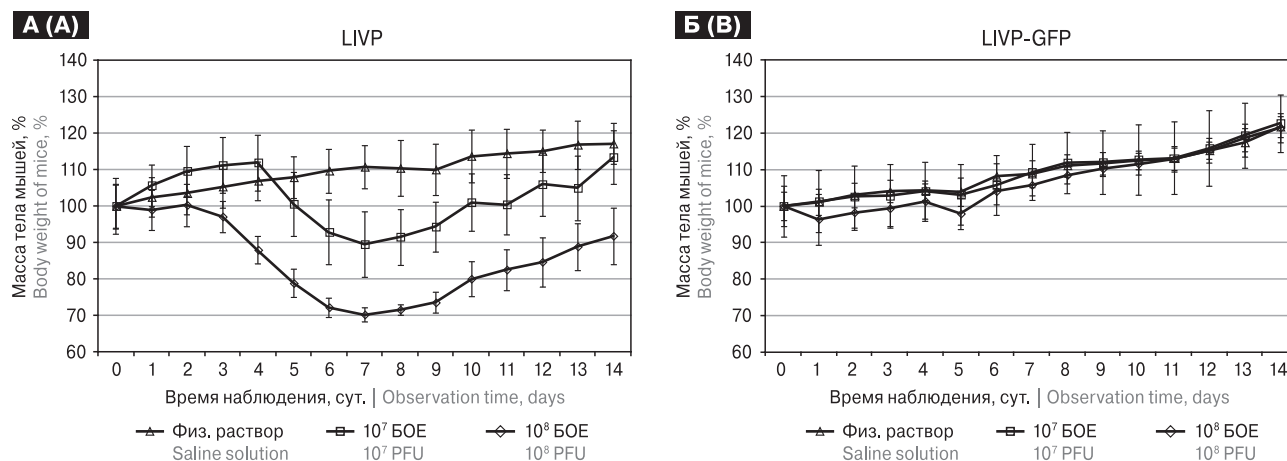


Рисунок 2. Динамика изменения массы тела мышей, интраназально зараженных VACV LIVP (А) и LIVP-GFP (Б)

Figure 2. The dynamics of body weight changes in mice after intranasal infection by VACV LIVP (A) and LIVP-GFP (B)

Примечания. 10^7 БОЕ, 10^8 БОЕ — дозы инфицирования соответствующим вирусом.

Notes. 10^7 PFU, 10^8 PFU — doses of corresponding virus infection.

дозы каждого вируса были 10^7 или 10^8 БОЕ. Поскольку большинство штаммов VACV при инфицировании взрослых мышей обычно не приводят к их гибели, патогенность вариантов этого вируса изучается по изменению массы тела животных после заражения и клиническим проявлениям заболевания (взъерошенность шерсти, адиамина, тремор) [10, 12].

Выраженные клинические проявления инфекции наблюдали при и/н инфицировании мышей VACV LIVP в обеих использованных дозах (рис. 2А). Пик заболевания приходился на 6–8 сут после заражения. В то же время при и/н заражении мышей штаммом LIVP-GFP не было выявлено клинических проявлений заболевания, и изменения массы тела животных

не имели достоверных отличий от соответствующих изменений массы тела животных контрольной группы, подвергшихся и/н введению ФР (рис. 2Б).

При в/к введении обоих штаммов VACV клинические проявления вирусной инфекции не наблюдались, и масса тела экспериментальных животных увеличивалась в ходе наблюдения аналогично данному процессу у контрольных животных (рис. 3).

В группах мышей после п/к инъекции обоих штаммов VACV независимо от дозы вирусов также не обнаружили ни клинических проявлений инфекции, ни достоверных отклонений изменения массы тела мышей в отличие от контрольной группы животных (данные не приведены).

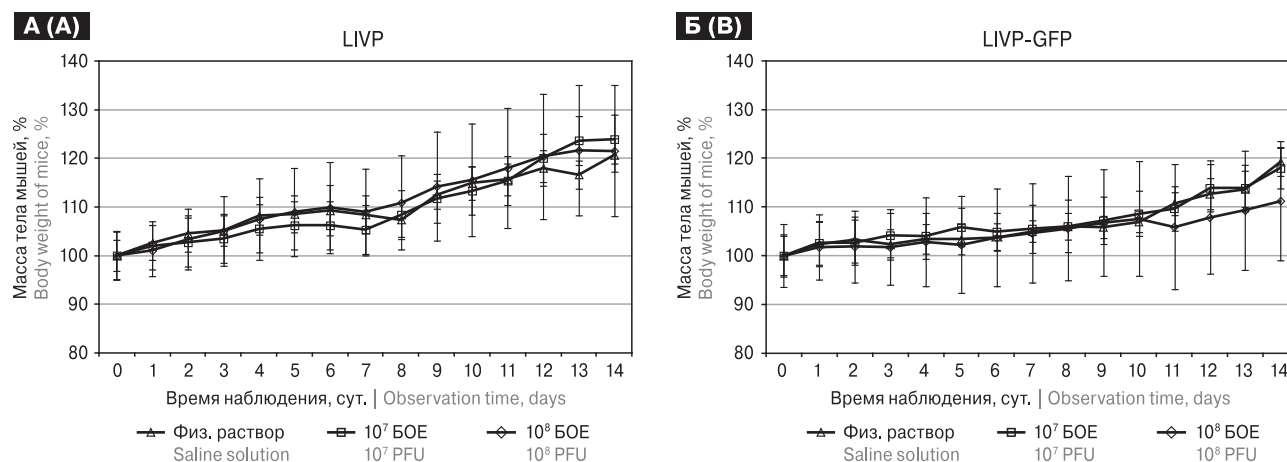


Рисунок 3. Динамика изменения массы тела мышей, внутрикожно зараженных VACV LIVP и LIVP-GFP

Figure 3. The dynamics of body weight changes in mice after intradermally infection by VACV LIVP and LIVP-GFP

Примечания. 10^7 БОЕ, 10^8 БОЕ — дозы инфицирования соответствующим вирусом.

Notes. 10^7 PFU, 10^8 PFU — doses of corresponding virus infection.

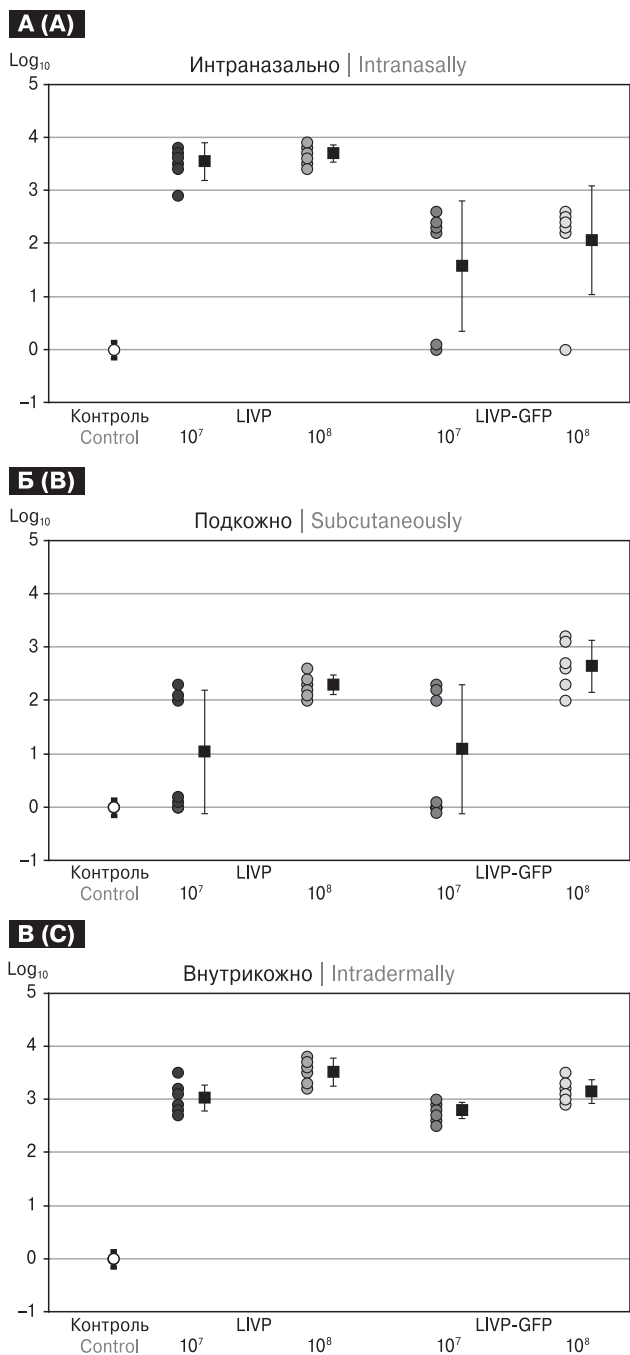


Рисунок 4. Титры VACV-специфических антител в сыворотке крови мышей, инфицированных штаммами VACV L1VP или L1VP-GFP, определенные методом ИФА

Figure 4. Titers of VACV-specific antibodies in sera of mice infected by VACV L1VP or L1VP-GFP assessed by ELISA

Примечания. Черными кружками обозначены данные для каждого животного, черными квадратами — средние геометрические значения и доверительные интервалы для 95%-ной вероятности совпадения с генеральной совокупностью титров IgG к антигенам VACV. К — контроль, 10^7 , 10^8 — дозы инфицирования, БОЕ/животное.

Notes. Data of individual animals are shown by black circles. Black squares — average geometrical values and confidence intervals for the 95% probability of coincidence with the general set of IgG titers to VACV antigens. C — control, 10^7 , 10^8 — infection doses, PFU/animal.

Иммуногенность штаммов вируса осповакцины в зависимости от способа введения мышам. На 28 сутки после заражения каждым из вирусов либо после введения ФР (контрольные группы) проводили индивидуально взятие проб крови у мышей и получали из них сыворотки, которые хранили в замороженном состоянии. Результаты исследования сывороток на наличие антител к антигенам очищенных вирионов VACV L1VP методом иммуноферментного анализа (ИФА) приведены на рис. 4. Как видим, при интраназальном инфицировании вирус L1VP-GFP индуцирует достоверно меньшую продукцию VACV-специфических антител по сравнению со штаммом L1VP. При подкожном введении продукция специфических антител значительно ниже, но для обоих вирусов соизмерима. При внутрикожном заражении уровень вирус-специфических антител существенно выше по сравнению с подкожным способом инфицирования. При этом аттенуированный штамм L1VP-GFP индуцирует синтез VACV-специфических антител, сравнимый по уровню с продукцией антител в ответ на инъекцию L1VP.

Обсуждение

Способ иммунопрофилактики оспы, предложенный Э. Дженнером в конце XVIII в., состоял в инокуляции человеку инфекционного материала из кожных поражений, образующихся при заражении оспой коров (или оспой лошадей) животных или людей [2, 4, 19]. При этом природа инфекционных агентов как оспы коров, так и натуральной оспы была неизвестна, поскольку царство вирусов было открыто лишь спустя столетие. Это привело к тому, что вакцинирующие противооспенные агенты распространялись на разных территориях в течение долгих лет без четкой характеристики. При этом они подвергались множественным циклам размножения/пассажем в организме (обычно на коже) разных животных, таких как телята, кролики, овцы [4, 5, 17], с отбором вариантов, проявляющих менее реактогенные свойства при вакцинации людей. Поэтому исторически в разных географических регионах стали использовать разные штаммы вакцинных вирусов, которые в XX в. отнесли к виду *Vaccinia virus* (VACV), отличному от вида возбудителя оспы коров — *Cowpox virus* (CPXV) [3]. Оба этих вида близкородственны вирусу натуральной оспы, штаммы которого образуют вид *Variola virus* (VARV) и входят в состав рода *Orthopoxvirus* семейства *Poxviridae* [4, 17]. Ортопоксвирусы антигенно и иммунологически близки друг другу и дают перекрестные серологические реакции и обеспечивают иммунную защиту при инфицировании организма родственным ви-

дом вируса. Именно поэтому спорадическое заражение человека вирусом CPXV или прививка VACV обуславливали защиту от оспы.

В ходе международной программы по ликвидации оспы, стартовавшей в 1958 г. и закончившейся в 1980 г., было проведено сравнение ряда наиболее широко используемых для вакцинации штаммов VACV по показателям реактогенности и поствакцинальных осложнений при иммунизации людей и патогенности для лабораторных животных (мыши, кролики). Была выявлена корреляция по этим свойствам между клиническими данными и результатами исследований на лабораторных животных [17]. Выяснилось, что штаммы VACV могут существенно различаться по свойствам патогенности/реактогенности. Кроме того, способ введения вируса может существенно влиять на проявление его патогенных и иммуногенных свойств [7, 8, 9, 14, 18, 21].

В данной работе объектами исследования стал штамм Л-ИВП (LIVP), полученный в Институте вирусных препаратов (Москва) адаптацией штамма Elstree к размножению на коже телят [17], и его вариант LIVP-GFP, в котором нарушен ген тимидинкиназы в результате встройки гена зеленого флуоресцентного белка [13]. Нами было изучено влияние дозы и способа введения данных вирусов на проявление их патогенных и иммуногенных свойств на мышинной модели с целью выбора наиболее оптимального способа иммунизации.

При и/ц введении мышам сосункам было показано, что штамм LIVP-GFP (TK⁻) имеет достоверно сниженные свойства нейровирулентности по сравнению с родительским LIVP (рис. 1). Эти результаты согласуются с ранее опубликованными данными о том, что нарушение гена тимидинкиназы у штамма WR VACV приводит к его значительной аттенуации [5, 7].

Взрослые мыши наибольшую чувствительность к штамму LIVP проявили при интраназальном введении, хотя инфекция не завершилась гибелью животного. При этом в той же системе штамм LIVP-GFP не приводил к развитию заболевания с выраженными клиническими проявлениями (рис. 2). При таких же инфицирующих дозах как для штамма LIVP, так и штамма LIVP-GFP при внутрикожном (рис. 3) или подкожном введении клинических проявлений заболевания не наблюдали.

При иммунизации живой вакциной важно осуществлять выбор дозы и способа инфицирования, которые при минимальном патогенном воздействии на организм вакцинируемого будут индуцировать высокий уровень продукции вирус-специфичных антител. Выполненный в данной работе анализ показал (рис. 4), что в случае подкожного введения штаммов VACV LIVP и LIVP-GFP при низкой патогенности наблюдается и невысокая продукция вирус-специфичных антител. Интраназальное введение штаммов VACV приводит к синтезу специфичных антител в высоких титрах в случае штамма LIVP и в низких — в случае штамма LIVP-GFP. При этом штамм LIVP, в отличие от LIVP-GFP, при данном способе введения вируса проявляет выраженное патогенное воздействие на организм мышей (рис. 2).

Наиболее оптимальным по соотношению патогенность/иммуногенность как для штамма LIVP, так и рекомбинантного LIVP-GFP с нарушенным геном тимидинкиназы можно считать внутрикожное введение (рис. 3, 4). Следует отметить, что ген тимидинкиназы VACV является одной из наиболее часто используемых мишеней для встройки чужеродных генов при создании поливалентных рекомбинантных живых вакцин на основе VACV [5, 13, 18].

Список литературы/References

1. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Медгиз, 1962. 182 с. [Ashmarin I.P., Vorobiev A.A. Statistics methods in microbiological research. Leningrad: Medgiz, 1962. 182 p. (In Russ.)]
2. Шелкунов С.Н., Шелкунова Г.А. Нужно быть готовыми к возврату оспы // Вопросы вирусологии. 2019. Т. 64, № 5. С. 206–214. [Shchelkunov S.N., Shchelkunova G.A. We should be prepared to smallpox re-emergence. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2019, vol. 64, no. 5, pp. 206–214. (In Russ.)] doi: 10.36233/0507-4088-2019-64-5-206-214
3. Downie A.W. The immunological relationship of the virus of spontaneous cowpox to vaccinia virus. *Br. J. Exp. Pathol.*, 1939, vol. 20, pp. 158–176.
4. Fenner F., Henderson D.A., Arita I., Jezek Z., Ladnyi I.D. Smallpox and its eradication. Geneva: WHO, 1988. 1460 p.
5. Jacobs B.L., Langland J.O., Kibler K.V., Denzler K.L., White S.D., Holechek S.A., Wong S., Huynh T., Baskin C.R. Vaccinia virus vaccines: past, present and future. *Antiviral Research*, 2009, vol. 84, pp. 1–13. doi: 10.1016/j.antiviral.2009.06.006
6. Kretzschmar M., Wallinga J., Teunis P., Xing S., Mikolajczyk R. Frequency of adverse events after vaccination with different vaccinia strains. *PLoS Med.*, 2006, vol. 3, no. 8: e272. doi: 10.1371/journal.pmed.0030272
7. Lee M.S., Roos J.M., McGuigan L.C., Smith K.A., Cormier N., Cohen L.K., Roberts B.E., Payne L.G. Molecular attenuation of vaccinia virus: mutant generation and animal characterization. *J. Virol.*, 1992, vol. 66, no. 5, pp. 2617–2630.
8. Manjaly Thomas Z.-R., Satti I., Marshall J.L., Harris S.A., Lopez Ramon R., Hamidi A., Minhinnick A., Riste M., Stockdale L., Lawrie A.M., Vermaak S., Wilkie M., Bettinson H., McShane H. Alternate aerosol and systemic immunization with a recombinant viral vector for tuberculosis, MVA85A: a phase I randomised controlled trial. *PLoS Med.*, 2019, vol. 16, no. 4: e1002790. doi: 10.1371/journal.pmed.1002790
9. McClain D.J., Harrison S., Yeager C.L., Cruz J., Ennis F.A., Gibbs P., Wright M.S., Summers P.L., Arthur J.D., Graham J.A. Immunologic responses to vaccinia vaccines administered by different parenteral routes. *J. Infect. Dis.*, 1997, vol. 175, no. 4, pp. 756–763.

10. McIntosh A.A.G., Smith G.L. Vaccinia virus glycoprotein A34R is required for infectivity of extracellular enveloped virus. *J. Virol.*, 1996, vol. 70, no. 1, pp. 272–281.
11. Olson V.A., Shchelkunov S.N. Are we prepared in case of a possible smallpox-like disease emergence? *Viruses*, 2017, vol. 9: e242. doi:10.3390/v9090242
12. Paran N., Lustig S., Zvi A., Erez N., Israely T., Melamed S., Politi B., Ben-Nathan D., Schneider P., Lachmi B., Israeli O., Stein D., Levin R., Olshevsky U. Active vaccination with vaccinia virus A33 protects mice against lethal vaccinia and ectromelia viruses but not against cowpox virus; elucidation of the specific adaptive immune response. *Virol. J.*, 2013, vol. 10: 229. doi: 10.1186/1743-422X-10-229
13. Petrov I.S., Goncharova E.P., Pozdnyakov S.G., Shchelkunov S.N., Zenkova M.A., Vlasov V.V., Kolosova I.V. Antitumor effect of the LIVP-GFP recombinant vaccinia virus. *Dokl. Biol. Sci.*, 2013, vol. 451, no. 1, pp. 248–252. doi: 10.1134/S0012496613040133
14. Roy S., Jaeson M.I., Li Z., Mahboob S., Jackson R.J., Grubor-Bauk B., Wijesundara D.K., Gowans E.J., Ranasinghe C. Viral vector and route of administration determine the ILC and DC profiles responsible for downstream vaccine-specific immune outcomes. *Vaccine*, 2019, vol. 37, pp. 1266–1276. doi: 10.1016/j.vaccine.2019.01.045
15. Shchelkunov S.N. An increasing danger of zoonotic orthopoxvirus infections. *PLoS Pathog.*, 2013, vol. 9: e1003756. doi: 10.1371/journal.ppat.1003756
16. Shchelkunov S.N. Emergence and reemergence of smallpox: the need in development of a new generation smallpox vaccine. *Vaccine*, 2011, vol. 29S, pp. D49–D53. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.05.037
17. Shchelkunov S.N., Marennikova S.S., Moyer R.W. Orthopoxviruses pathogenic for humans. *New York: Springer*, 2005. 425 p.
18. Shchelkunov S.N., Nesterov A.E., Ryazankin I.A., Ignat'ev G.M., Sandakhchiev L.S. Development of a candidate polyvalent live vaccine against human immunodeficiency, hepatitis B, and orthopoxviruses. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 2003, vol. 390, no. 1–6, pp. 180–183.
19. Shchelkunova G.A., Shchelkunov S.N. 40 years without smallpox. *Acta Naturae*, 2017, vol. 9, no. 4, pp. 4–12.
20. Sklenovska N., Van Ranst M. Emergence of monkeypox as the most important orthopoxvirus infection in humans. *Front. Public Health*, 2018, vol. 6: e241. doi: 10.3389/fpubh.2018.00241
21. Xie L., Zai J., Yi K., Li Y. Intranasal immunization with recombinant vaccinia virus Tiantan harboring Zaire Ebola virus gp elicited systemic and mucosal neutralizing antibody in mice. *Vaccine*, 2019, vol. 37, pp. 3335–3342. doi: 10.1016/j.vaccine.2019.04.070
22. Yakubitskiy S.N., Kolosova I.V., Maksyutov R.A., Shchelkunov S.N. Attenuation of vaccinia virus. *Acta Naturae*, 2015, vol. 7, no. 4, pp. 113–121.

Авторы:

Щелкунов С.Н., д.б.н., профессор, главный научный сотрудник отдела геномных исследований ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», п. Кольцово, Россия;

Сергеев А.А., к.б.н., ведущий научный сотрудник отдела «Коллекция микроорганизмов» ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», п. Кольцово, Россия;

Кабанов А.С., к.б.н., старший научный сотрудник отдела «Коллекция микроорганизмов» ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», п. Кольцово, Россия;

Якубицкий С.Н., младший научный сотрудник отдела геномных исследований ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», п. Кольцово, Россия;

Бауэр Т.В., младший научный сотрудник отдела геномных исследований ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», п. Кольцово, Россия;

Пьянков С.А., ведущий научный сотрудник отдела «Коллекция микроорганизмов» ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», п. Кольцово, Россия.

Authors:

Shchelkunov S.N., PhD, MD (Biology), Professor, Head Researcher, Department of Genomic Research, SRC VB VECTOR, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation;

Sergeev A.A., PhD (Biology), Leading Researcher, Department of Microorganisms Collection, SRC VB VECTOR, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation;

Kabanov A.S., PhD (Biology), Senior Researcher, Department of Microorganisms Collection, SRC VB VECTOR, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation;

Yakubitskiy A.S., Junior Researcher, Department of Genomic Research, SRC VB VECTOR, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation;

Bauer T.V., Junior Researcher, Department of Genomic Research, SRC VB VECTOR, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation.

Pyankov S.A., Leading Researcher, Department of Microorganisms Collection, SRC VB VECTOR, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation.

Поступила в редакцию 07.02.2020

Принята к печати 31.03.2020

Received 07.02.2020

Accepted 31.03.2020