

**Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и
благополучия человека**

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ВИРУСОЛОГИИ И
БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР»**

На правах рукописи

Сергеев Александр Александрович

Степной сурок – модельный вид животных для оспы обезьян

03.02.02 – вирусология

Диссертация
на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научные руководители:
доктор биологических наук
Шишкина Л.Н.;
кандидат медицинских наук
Сергеев Ар.А.

Кольцово – 2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

Главы	Стр.
ВВЕДЕНИЕ.....	4
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	11
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ: СУЩЕСТВУЮЩИЕ МОДЕЛЬНЫЕ ВИДЫ ЖИВОТНЫХ ДЛЯ ОСПЫ ОБЕЗЬЯН, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ ОЦЕНКЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОТИВОВИРУСНЫХ ПРЕПАРАТОВ.....	11
1.1 Чувствительность подопытных животных и человека к вирусу оспы обезьян.....	11
1.2 Распространение вируса оспы обезьян в организме подопытных животных и человека.....	24
1.3 Патоморфологические изменения у подопытных животных и человека, инфицированных вирусом оспы обезьян.....	35
1.4 Использование модельных видов животных для оспы обезьян с целью оценки эффективности противовирусных препаратов.....	38
1.5 Заключение по обзору литературы.....	45
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	47
2.1 Лабораторные животные.....	47
2.2 Клеточная культура.....	47
2.3 Вирус и определение его концентрации.....	48
2.4 Интраназальное инфицирование кроликов и определение их чувствительности к вирусу.....	48
2.5 Интраназальное инфицирование мини-свиней и определение их чувствительности к вирусу.....	49
2.6 Интраназальное инфицирование мышей и определение их чувствительности к вирусу.....	49
2.7 Способ инфицирования сурков и определения их чувствительности к вирусу.....	50
2.8 Изучение накопления вируса в биоматериалах у сурков.....	51
2.9 Вирусологический анализ проб.....	52
2.10 Оценка остаточной инфекционности фрагментов органов от сурков, за-	

	раженных вирусом.....	53
2.11	Патоморфологические исследования.....	54
2.12	Химически синтезированные соединения.....	54
2.13	Метод определения цитотоксичности и противовирусной активности химических препаратов.....	55
2.14	Оценка противовирусной активности химически синтезированных препаратов в отношении ортопоксвирусов в опытах <i>in vitro</i>	56
2.15	Схема применения и критерий оценки эффективности химически синтезированных соединений на сурках, инфицированных вирусом.....	57
2.16	Определение титров антител к вирусу в сыворотке крови.....	58
2.17	Статистическая обработка результатов.....	58
3	РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	60
3.1	Экспериментальная оценка чувствительности мышей, сурков, кроликов и мини-свиней к вирусу оспы обезьян.....	60
3.2	Распространение вируса оспы обезьян в организме сурков.....	68
3.3	Патоморфологические изменения у сурков, инфицированных вирусом оспы обезьян.....	77
3.4	Оценка эффективности противооспенных препаратов на сурках	86
3.5	Оценка возможности использования степного сурка в качестве модельного вида животных для оспы обезьян на основе полученных теоретических и экспериментальных данных.....	92
3.5.1	Стратегия выбора вида животных, моделирующего оспу обезьян у человека, для оценки эффективности противовирусных препаратов.....	92
3.5.2	Теоретическая оценка чувствительности человека к вирусу.....	98
3.5.3	Сравнение показателей инфицирования вирусом сурков и человека или известных модельных видов животных для оспы обезьян.....	102
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	110
	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	113
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	114
	СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА.....	129

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Кроме вируса натуральной оспы (ВНО), к роду *Orthoroxvirus* (семейство *Poxviridae*) относится еще один патоген, вызывающий особо опасную вирусную инфекцию у людей (острое зооантропонозное заболевание): вирус оспы обезьян (ВОО). Несмотря на то, что этот возбудитель заболевания был открыт около 60 лет тому назад, внимание ученых, врачей инфекционистов и эпидемиологов к этому патогену продолжает только усиливаться в последние десятилетия. Это связано, по крайней мере, с четырьмя причинами:

- высокой патогенностью ВОО для человека (летальность среди людей достигает 17%) [69, 89, 99];
- резким снижением напряженности иммунитета и величины иммунной прослойки у людей к этому патогену (вакцинация против натуральной оспы была прекращена более 30 лет тому назад) [58, 98, 101];
- увеличением масштабности и частоты эпидемических вспышек оспы обезьян в 21-м веке по сравнению с 20-м веком [19, 75, 112];
- ограниченностью спектра разрабатываемых противооспенных лечебно-профилактических химиопрепаратов.

Все это делает актуальной проблему разработки эффективных препаратов для профилактики и лечения натуральной оспы и оспы обезьян. Однако для оценки эффективности действия разрабатываемых противовирусных препаратов на этапах научно-исследовательской работы и доклинических исследований по требованиям российского национального органа контроля (Научный центр экспертизы средств медицинского применения - НЦ ЭСМП), а также Управления по лекарственным препаратам и продовольственным продуктам США (FDA) и Европейского агентства по контролю лекарственных средств (EMA) необходимо иметь не менее двух видов животных, моделирующих соответствующее инфекционное заболевание у человека.

Степень разработанности. К настоящему времени многие исследователи провели поиск животных и выбрали среди них пять видов для оценки эффективности препаратов для оспы обезьян: иммунодефицитных мышей [36, 37, 63], сусликов (*Spermophilus tridecemlineatus*) [60, 78, 85], чернохвостых луговых собачек (*Cynomys ludovicianus*) [43, 72, 86], сонь Келлена (*Graphiurus kelleni*) [83] и низших приматов (*M. fascicularis* и *mullatta*) [57, 131, 127]. Однако все эти виды модельных животных имеют те или иные су-

ущественные недостатки с точки зрения возможности их выращивания в неволе, дороговизны, удобства и адекватности их применения при моделировании оспы обезьян у людей:

- иммунодефицитные мыши при инфицировании ВОО не воспроизводят основную клиническую картину оспоподобного заболевания (сыпь и лимфаденит), могут лишь частично моделировать инфекционный процесс у людей с подавленной иммунной системой, доля которых во время эпидемических вспышек оспы обезьян, вероятно, не очень значительна, и вряд ли могут быть использованы для оценки эффективности противовирусных препаратов, в основе действия которых лежит механизм их влияния на иммунную систему; кроме того, инбредные мыши достаточно дорогие и не отражают разнообразие человеческой популяции, которая по существу представляется аутбредной (межсемейное, межнациональное и межрасовое скрещивание);

- сони Келлена при инфицировании ВОО не воспроизводят основную симптоматику оспоподобного заболевания, не являются лабораторными животными, при выращивании в неволе требуют создания специальных условий, что сложно обеспечить в условиях вирусологического эксперимента, да и стоимость этого вида животных достаточно высокая;

- суслики при инфицировании ВОО не проявляют основную клиническую картину оспоподобного заболевания, не являются лабораторными животными, живут в степных, лесостепных, лугостепных, лесотундровых ландшафтах и трудно приживаются в неволе (плохо размножаются) и поэтому для экспериментов должны, как правило, доставляться из естественной среды обитания;

- чернохвостые луговые собачки в отличие от сусликов, воспроизводят при инфицировании ВОО основную симптоматику оспоподобного заболевания, а также хорошо приживаются в неволе, но имеют существенные недостатки, связанные с тем, что ареал их обитания ограничивается лишь Северной Америкой [13] и отсутствием возможности приобретения этого вида животных в специализированных питомниках нашей страны;

- низшие приматы при заражении проявляют основные клинические признаки оспоподобного заболевания, но являются очень дорогостоящими животными, применение которых в вирусологических экспериментах сопряжено с большой трудоемкостью.

Цели и задачи. Целью нашего исследования было изучить возможность использования степного сурка в качестве модельного вида животных для оспы обезьян.

Для достижения данной цели необходимо было решить следующие задачи:

- 1) провести экспериментальную оценку чувствительности сурков и некоторых других подопытных животных к ВОО: мышей, кроликов и мини-свиней;
- 2) изучить распространение ВОО в организме сурков;
- 3) изучить патоморфологические изменения у сурков, инфицированных ВОО;
- 4) провести оценку эффективности противооспенных препаратов на сурках.
- 5) оценить возможность использования степного сурка в качестве модельного вида животных для оспы обезьян на основе полученных теоретических и экспериментальных данных.

Научная новизна работы. Определена чувствительность сурков к ВОО при интраназальном (и/н) введении: дозы инфицирования от 3,7 lg БОЕ и выше приводили в 100% случаев через 7-9 сут после заражения (п.з.) к появлению выраженной и обширной симптоматики оспоподобного заболевания (гипертермия тела, одно- или двусторонний подчелюстной лимфаденит, дискретная оспоподобная сыпь на коже по всей видимой части поверхности тела и слизистых оболочках, серозно-гнойные ринит, конъюнктивит и блефарит, нарушение координации, тремор конечностей, повышенная агрессивность, взъерошенность шерсти), которая исчезала у выживших сурков через 19 - 25 сут п.з. Показано, что через 13 – 22 сут п.з. 25 – 50% заболевших животных (в экспериментах с использованием двух и более животных на дозу вируса) независимо от величины заражающей дозы погибло, а процент инфицированности сурков, регистрируемый по наличию внешних клинических проявлений оспоподобного заболевания, имел четкую зависимость «доза-эффект». У заболевших сурков после подкожного (п/к) инфицирования вирусом в диапазоне доз от 2,6 до 7,1 lg БОЕ отмечена выраженная клиническая симптоматика, аналогичная той, которая наблюдалась у этого вида животных при и/н заражении, и 100%-й летальный эффект через 12 – 18 сут п.з. Результаты изучения динамики накопления ВОО по органам и тканям сурков при и/н заражении дозой 3,7 lg БОЕ подтвердили сходство с некоторыми известными показателями инфекционного процесса у человека при оспе обезьян и натуральной оспе: генерализованная инфекция, накопление вируса в кожных оспинах (включая величину его концентрации), низкая вероятность выявления вируса в крови при биотитровании и накопление его в слизистой носа. При этом факт размножения вируса не только в органах дыхательной системы сурков, но и в других висцеральных органах согласуется с таковым у модельных видов животных для оспы обезьян. У сурков, и/н инфицированных дозой 3,7 lg БОЕ, определены органы первичного размножения вируса: легкие с трахеей, а также основной механизм распростра-

нения патогена в организме этих животных, в том числе от первичных органов-мишеней: лимфогенный с его размножением в органах лимфатической системы. Показано, что у этих животных органами максимального накопления патогена являются легкие с трахеей, нос (носовая перегородка со слизистой) и кожа, в которых в ряде случаев концентрация вируса превышала 6 lg БОЕ/мл гомогената органа или ткани, выраженное размножение вируса отмечено у инфицированных животных в бифуркационных лимфоузлах и двенадцатиперстной кишке, достигающее концентраций 3 - 4 lg БОЕ/мл. У павших сурков после п/к инфицирования вирусом в дозах 5,6 и 7,1 lg БОЕ/гол. (2,3 и 3,8 lg БОЕ/г массы сурка), накопление патогена в наиболее высоких концентрациях ($\geq 5,7$ lg БОЕ/мл) зарегистрировано в носу (в носовой перегородке со слизистой), трахее, легких, почках, паховых и подмышечных лимфоузлах, яичках или яичниках и в кусочках кожи с оспинами; средние значения этого показателя (от 4,0 до 5,7 lg БОЕ/мл) отмечены в головном мозге, поджелудочной железе, поднижнечелюстных и брыжеечных лимфоузлах, а самые низкие величины концентраций ВОО (<4,0 lg БОЕ/мл) - в сердце, печени и селезенке. У сурков, и/н инфицированных ВОО, зарегистрирован факт присутствия и размножения вируса в традиционных для ортопоксвирусов первичных клетках-мишенях для этого патогена (в клетках системы мононуклеарных фагоцитов и эпителиоцитах в органах респираторного тракта), а также в некоторых других типах клеток (эндотелиоцитах, плазмоцитах, фибробластах, ретикулярных и гладкомышечных клетках).

На основе данных изучения диссеминации вируса в организме и/н инфицированных ВОО сурков в дозе 3,7 lg БОЕ, клинической картины инфекции и патоморфологических изменений в их органах и тканях разработана патогенетическая схема заболевания. При изучении лечебно-профилактической активности разрабатываемых противооспепных препаратов (на примере двух химически синтезированных соединений: ST-246 и НИОХ-14) на сурках с применением ВОО подтверждено наличие ранее отмеченного многими исследователями и нами (эксперименты с использованием различных видов ортопоксвирусов, культур клеток и соответствующих известных модельных видов животных) противовирусного эффекта, что свидетельствует о возможности использования для этой цели этого модельного вида животных. В рамках проведенных исследований на сурках с использованием ВОО был получен патент Российской Федерации [23].

Теоретическая и практическая значимость работы. Разработанная методология выбора и оценки показателей инфицирования подопытных животных патогеном в сравнении с таковыми у известных модельных видов животных и человека, основанная

на изучении у них течения инфекционного процесса, может быть использована при поиске модельных видов животных не только для оспы обезьян, но и других генерализованных инфекций вирусной природы. По настоящее время в организациях, проводящих исследования с возбудителями особо опасных инфекций, включая ВОО, используется разработанная нами методика приготовления фрагментов органов и тканей от инфицированных животных для проведения патоморфологических исследований (МУ 1.3.3103-13) [17], с применением которой обеспечивается гарантированная инаktivация данных патогенов в биоматериалах. Исследованное в рамках диссертации модельный вид животных для оспы обезьян (степной сурок) был использован с целью оценки эффективности разрабатываемого в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственном научном центре вирусологии и биотехнологии «Вектор» (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор») перспективного противооспенного препарата НИОХ-14. В том числе благодаря этим исследованиям, данный препарат успешно прошел доклиническое изучение, что открывает перспективу его дальнейшего продвижения в направлении клинических испытаний. Для проведения исследований на сурках с использованием ВОО были применены методы, описанные в разработанной инструкции (Организация и проведение работ с вирусами натуральной оспы и оспы обезьян в корпусе №6: инструкция № 1/02/Булычев Л.Е. [и др.]. – Кольцово: Гос. научн. центр вирусол. и биотехн. «Вектор», 2012. – 43 с.).

Методология и методы исследования. С целью поиска модельных видов животных для оспы обезьян, базируясь на изучении течения инфекционного процесса, в работе использовали методологию, основанную на оценке показателей инфицирования подопытных животных вирусом при заражении через респираторный тракт в сравнении с таковыми у человека или известных модельных видов животных. При этом применяли традиционные вирусологические, серологические, гистологические и электронно-микроскопические методы исследований.

Положения, выносимые на защиту:

1) и/н инфицирование сурков в дозах от 3,7 lg БОЕ и выше сопровождается внешними оспоподобными клиническими признаками заболевания (гипертермия тела, подчелюстной лимфаденит, дискретная оспоподобная сыпь на коже и слизистых оболочках, серозно-гнойные ринит, конъюнктивит и блефарит), при этом их гибель не зависит от дозы инфицирования;

2) легкие и трахея являются органами первичного размножения ВОО при и/н заражении сурков, а основной механизм распространения патогена в организме этих жи-

вотных, в том числе от первичных органов-мишеней - лимфогенный с его размножением в органах лимфатической системы;

3) у сурков, и/н зараженных ВОО, размножение вируса происходит в первичных клетках-мишенях (макрофаги и эпителиоциты органов респираторного тракта), а также в некоторых других типах клеток (эндотелиоцитах, плазмócитах, фибробластах, ретикулярных и гладкомышечных клетках);

4) высокая чувствительность сурков к ВОО при и/н заражении, внешние признаки оспоподобного заболевания и особенности его патогенеза позволяют рекомендовать этот вид животных в качестве лабораторной модели для оценки эффективности медицинских средств защиты в отношении инфекций, вызываемых у человека патогенными для него ортопоксвирусами.

Степень достоверности и апробация результатов. Все результаты работы подвергались статистической обработке стандартными методами с оценкой достоверности отличий при 5 %-м уровне значимости вероятности ошибки ($p \leq 0,05$) для 95 %-го доверительного уровня (I_{95}) [5]. Результаты работы были доложены на международных и российских научных форумах: WHO Advisory Committee on Variola Virus Research Report of the Thirteenth Meeting, Geneva, 31 October – 1 November, 2011; WHO Advisory Committee on Variola Virus Research Report of the Fourteenth Meeting, Geneva, 16 – 17 October, 2012; Научно-практическая конференция “Диагностика и профилактика инфекционных болезней”, Новосибирск, 26 – 28 сентября, 2013; 1-я международная конференция молодых ученых, Новосибирск, 1 - 5 октября, 2014. Кроме того, все экспериментальные данные, представленные в данной диссертации, были опубликованы в 6 печатных работах, включая один патент РФ [11, 23, 28, 33, 153, 159].

Личный вклад соискателя: в разработку стратегии выбора вида животных, моделирующего оспу обезьян у человека, для оценки эффективности противовирусных препаратов; в теоретической оценке чувствительность человека к ВОО и в экспериментальной - сурков, мышей популяции ICR, мини-свиней и кроликов; в изучении динамики распространения ВОО в организме инфицированных сурков; в проведении предварительной сравнительной оценки полученных показателей инфицирования ВОО сурков через респираторный тракт с таковыми у человека (известных модельных видов животных); в использовании разрабатываемой нами модели для оспы обезьян с целью оценки адекватности полученных результатов в эксперименте с ВОО по определению эффективно-

сти препаратов с известной противоопухолевой активностью; в изучении патоморфологических изменений в организме сурков, инфицированных вирусом.

Благодарности. Считаю своим долгом выразить благодарность своим научным руководителям д.б.н. Шишкиной Л.Н. и к.м.н. Сергееву Ар.А., а также д.м.н., профессору Сергееву А.Н. за ту помощь, которую они оказали при разработке плана проведения исследований в рамках данной диссертации, в обсуждении полученных результатов и ее проверке. Благодарю также сотрудников отделов профилактики и лечения особо опасных инфекций и «Коллекция микроорганизмов» Булычева Л.Е., Пьянкова О.В., Боднева С.А., Туманова, Ю.В., Юрганову И.А, Титову К.А., Овчинникову А.С., Галахову Д.О. и Кабанова А.С., которые участвовали вместе со мной в экспериментальных работах с использованием живого ВОО в корпусе № 6, а также сотрудников отдела микроскопических исследований Таранова О.С. и Омигова В.В. за помощь, которую они оказали в проведении патоморфологического изучения органов и тканей сурков, инфицированных ВОО, и сотрудников информационно-аналитического отдела Лобанову Т.П. и Митюнину М.П. за помощь в поиске отечественной и зарубежной научной литературы, необходимой для работы по теме данной диссертации.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 132 страницах машинописного текста, включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение результатов собственных исследований, выводы и список литературы. Диссертация иллюстрирована 19 таблицами и 13 рисунками. Список литературы включает 165 источника, в том числе 130 работ зарубежных авторов.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ: СУЩЕСТВУЮЩИЕ МОДЕЛЬНЫЕ ВИДЫ ЖИВОТНЫХ ДЛЯ ОСПЫ ОБЕЗЬЯН, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ ОЦЕНКЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОТИВОВИРУСНЫХ ПРЕПАРАТОВ

1.1 Чувствительность подопытных животных и человека к вирусу оспы обезьян

ВОО является зооантропонозом. Данный патоген принадлежит к роду *Orthoroxvirus* в семействе *Poxviridae*. ВОО был впервые выявлен в Государственном институте сывороток в Копенгагене, Дания, в 1958 году во время исследования болезни схожей с натуральной оспой среди яванских макаков. Один из выделенных штаммов получил название «Копенгаген» и впоследствии был признан референс-штаммом этого вируса [42]. В последующем подобные вспышки заболевания, вызванного ВОО, среди содержащихся в неволе обезьян продолжали наблюдаться в ряде стран: в США [122, 132], Нидерландах [129] и Франции [118].

В 1971 г. было опубликовано первое сообщение [2] о том, что ВОО может вызывать заболевание у человека, клинически неотличимое от натуральной оспы. Спустя некоторое время была изучена географическая зона, на территории которой регистрируется оспа обезьян у людей. Данная территория, как выяснилось, охватывает Экваториальную часть Центральной и Западной Африки. А через некоторое время стало известно, что не все штаммы ВОО обладают одинаковой вирулентностью [46].

В доступной научной литературе нет информации, связанной с количественной оценкой степени чувствительности человека к ВОО. Однако проведенный информационный анализ, касающийся вызывающих эпидемии вирусных заболеваний (натуральная оспа, грипп, аденовирусная и риновирусная инфекции и др.), для которых основные механизмы передачи инфекции напоминают таковые у оспы обезьян (аэрозольный и контактный) и реализуются в основном через респираторный тракт, свидетельствует о том, что чувствительность невакцинированных людей к этим патогенам достаточно высокая и не превышает 10 вирусных частиц [18, 77, 94]. В то же время сам факт периодического возникновения эпидемических вспышек оспы обезьян на Земном шаре (Африка и Северная Америка) может также говорить о существующей достаточно высокой воспри-

имчивости человека к возбудителю данного заболевания, близкой к таковой при других респираторных инфекциях.

В научной литературе имеется информация о восприимчивости некоторых видов животных к ВОО при различных способах заражения. Такому виду экспериментов подвергали как лабораторных, так и диких и необычных (редких) домашних животных. При этом среди лабораторных животных была изучена чувствительность к ВОО некоторых популяций мышей (включая иммунодефицитных), различных видов крыс, хомяков, морских свинок, кроликов и некоторых видов обезьян, а среди диких и необычных домашних животных – сусликов, различных видов белок, луговых собачек и африканских сонь. Учитывая большой объем исследований, проведенный в данном направлении с использованием различных видов подопытных животных, и с целью систематизации их результатов для лучшего восприятия нами была проведена работа по их обобщению, ориентируясь в основном на сведения, полученные начиная с 50-х годов прошлого столетия. В этом случае при представлении информации по обезьянам основной акцент был сделан на два их вида (*M. fascicularis* и *mulatta*), которые в последующем были использованы в качестве модельных видов животных для оспы обезьян с целью оценки эффективности лечебно-профилактических и профилактических препаратов. Результаты работы по сбору информации, касающейся клинической картины заболевания, включая его исход, у различных видов животных при заражении ВОО, представлены в таблице 1.1.

Проведенный анализ данных научной литературы по вопросу чувствительности различных видов подопытных животных к ВОО при различных способах инфицирования, свидетельствовал о том, что подавляющее большинство ученых пыталось найти восприимчивых к ВОО животных, ориентируясь в основном на воспроизведение ими в максимально возможном диапазоне клинической картины оспы обезьян у человека. При этом особого внимания заслуживают научные работы, связанные с изучением течения заболевания у подопытных животных, при заражении которых использовали методы, нацеленные на введение ВОО в респираторный тракт, что реально моделирует основные механизмы заражения людей во время эпидемических вспышек оспы обезьян (аэрозольный и контактный).

В этом плане все виды испытанных животных можно разделить на три группы:

Таблица 1.1 – Внешние клинические признаки заболевания, включая его исход, у некоторых видов подопытных животных при различных способах заражения вирусом оспы обезьян (ВОО)

Номер ссылки	Род или вид животных	Возраст или масса тела животных	Название штаммов ВОО	Доза заражения (БОЕ)	Способ заражения	Вид клинических признаков заболевания	Процент гибели (при дозе, в БОЕ)	ЛД ₅₀ (БОЕ)
[42]	Аутбредная белая мышь	Взрослые	Copenhagen**	Н/у	И/ц	Энцефалит	100	Н/о
		2-дневные	Copenhagen**	Н/у	И/н	Вялость, адинамия, снижение массы тела	100	Н/о
[115]	Аутбредная белая мышь	8-дневные	Copenhagen**	1,2×10 ⁶ *	И/н, в/бр	Снижение массы тела, адинамия	100	Н/о
					П/о	Снижение массы тела, адинамия	40	Н/о
					В/к	Инфильтрат в месте инокуляции	50	Н/о
				6×10 ² *	И/пл	Отек стопы, генерализованные проявления	100	Н/о
		12-дневные	Copenhagen**	6×10 ² *	И/пл	Отек стопы, генерализованные проявления	60	Н/о
				1,2×10 ⁶ *	П/о	Снижение массы тела, адинамия	24	Н/о
		15-дневные	Copenhagen**	1,2×10 ⁶ *	И/н	Снижение массы тела, адинамия	100	Н/о
[62]	Инбредная мышь BALB/c	4-недельные	USA-2003-044**	10 ⁵	В/бр	Взъерошенность шерсти, потеря аппетита	0	Н/о
			Congo-2003-358***	10 ⁵	В/бр	Взъерошенность шерсти, потеря аппетита	0	Н/о
[63]	Инбредная мышь BALB/c	6-7-недельные	USA-2003-044**	10 ⁵	И/н	Отсутствуют	0	Н/о
					И/пл	Отек стопы, хромота	0	Н/о

Номер ссыл- ки	Род или вид жи- вотных	Возраст или масса жи- вотных	Название штаммов ВОО	Доза за- ражения (БОЕ)	Способ зараже- ния	Наименование клинических призна- ков заболевания	Процент ги- бели (при дозе, в БОЕ)	ЛД ₅₀ (БОЕ)
			Congo- 2003- 358***	10 ⁵	И/н	Взъерошенность шерсти, снижение массы тела	0	Н/о
					И/пл	Отек стопы, хромота, взъерошен- ность шерсти, снижение массы тела	0	Н/о
	Инбред- ная мышь C57BL/6	6-7- недельные	USA- 2003- 044**	10 ⁵	И/н	Отсутствуют	0	Н/о
					И/пл	Отек стопы, хромота	0	Н/о
			Congo- 2003- 358***	10 ⁵	И/н	Взъерошенность шерсти, снижение массы тела	0	Н/о
					И/пл	Отек стопы, хромота	0	Н/о
[36]	Инбред- ная мышь BALB/c	7-недельные	Z79-I- 005***	10 ² - 10 ⁷	И/н	Выгибание спины, взъерошенность шерсти, снижение массы тела	0	Н/о
[62]	Мышь SCID	4-недельные	USA- 2003- 044**	10 ⁵	В/бр	Взъерошенность шерсти, потеря ап- петита	100	Н/о
			Congo- 2003- 358***	10 ⁵	В/бр	Взъерошенность шерсти, потеря ап- петита	100	Н/о
[37]	Мышь C57BL/6 stat1-/-	4-8- недельные	ZAI- 79***	4,7 - 4700	И/н	Снижение массы тела	100 (4700)	47 для сам- цов и 213 для самок

Номер ссыл- ки	Род или вид жи- вотных	Возраст или масса жи- вотных	Название штаммов ВОО	Доза за- ражения (БОЕ)	Способ зараже- ния	Наименование клинических призна- ков заболевания	Процент гибели (при дозе, в БОЕ)	ЛД ₅₀ (БОЕ)
	Мышь 129 stat1-/-	4-8- недельные	ZAI- 79***	470 - 4700	И/н	Снижение массы тела	40 (4700)	Н/о
	Мышь SCID	4-8- недельные	ZAI- 79***	27,5 – 275	И/н	Снижение массы тела	100 (275)	Н/о
[36]	Мышь CAST/EiJ	5-6- недельные	Z79-I- 005***	$10^2 - 10^6$	И/н	Взъерошенность шерсти, выгибание спины, вялость, снижение массы тела	100 (10^4)	680
		9-11- недельные	Z79-I- 005***	$1 - 10^3$	В/бр	Взъерошенность шерсти, выгибание спины, вялость, снижение массы тела	100 (33)	14
		5-9- недельные	USA- 2003- 044**	$10^2 - 10^6$	И/н	Взъерошенность шерсти, выгибание спины, вялость, снижение массы тела	100 (10^5)	7600
	Мышь MOLF/EiJ	5-11- недельные	Z79-I- 005**	2×10^4	И/н	Снижение массы тела	75	Н/о
	Мыши PERA/EiJ	5-11- недельные	Z79-I- 005***	2×10^4	И/н	Снижение массы тела	40	Н/о
[72]	Мышь CAST/EiJ	Не указан	Z79-I- 005***	2×10^4	И/н	Взъерошенность шерсти, выгибание спины, вялость, снижение массы тела	100	Н/о
[115]	Белая крыса	Взрослые	Copenhag en**	Не ука- зана	И/н, с/к, в/в	Отсутствуют	0	Н/о
		1-3-дневные	Copenhag en**	Не ука- зана	И/н	Адинамия	100	Н/о
[114]	Хлопковая крыса	Взрослые	Copenhag en**	10^5 *	В/в	Цианоз, ринит, конъюнктивит, про- грессивное истощение	100	Н/о
					И/н	Цианоз, ринит, конъюнктивит и про- грессивное истощение	50	Н/о

Продолжение таблицы 1.1

Номер ссылки	Род или вид животных	Возраст или масса животных	Название штаммов ВОО	Доза заражения (БОЕ)	Способ заражения	Наименование клинических признаков заболевания	Процент гибели (при дозе, в БОЕ)	ЛД ₅₀ (БОЕ)
[114]	Много-сосковая крыса	Н/у	Copenhagen**	Н/у	В/бр, и/н	Не указаны	Не указан	Н/о
[145]	Морская свинка	Н/у	Copenhagen**	Н/у	Не указан	Отсутствуют	0	Н/о
					И/пл	Отек стопы	0	Н/о
[115]	Морская свинка	1-месячные	Copenhagen**	Н/у	И/н, в/с, п/о, и/пл	Отсутствуют	0	Н/о
[115]	Хомяк	3-недельные	Copenhagen**	$1,5 \times 10^7$ - $5,9 \times 10^7$ *	И/н, п/о, в/с, с/к	Отсутствуют	0	Н/о
[3]	Хомяк	3-недельные	Copenhagen**	10^6 * и 10^7 *	В/с	Отсутствуют	0	Н/о
[42]	Кролик	2-дневные	Copenhagen**	Н/у	В/к, с/к	Не указаны	Не указан	Н/о
[88]	Кролик	Н/у	Copenhagen**	Н/у	И/ц	Менингоэнцефалит	Не указан	Н/о
[115]	Кролик	Взрослые	Copenhagen**	10^7 *	В/в	Генерализованные проявления, сыпь	8	Н/о
				10^6 *	С/к	Пустула в месте инокуляции, генерализованные проявления, сыпь	0	Н/о
					В/к	Инфильтрат в месте инокуляции	0	Н/о
				$1,4 \times 10^9$ *	П/о	Отсутствуют	0	Н/о
		10-дневные	Copenhagen**	10^6 *	И/н	Снижение массы тела, адинамия	83	Н/о
					П/о	Генерализованные проявления, сыпь	85	Н/о

Номер ссыл- ки	Род или вид жи- вотных	Возраст или масса жи- вотных	Название штаммов ВОО	Доза за- ражения (БОЕ)	Способ зараже- ния	Наименование клинических призна- ков заболевания	Процент ги- бели (при дозе, в БОЕ)	ЛД ₅₀ (БОЕ)
[92]	<i>Macaca fascicularis</i>	1-3- годовалые	H/y	6×10^5 - 9×10^5 *	A/з	Сыпь, анорексия	50	H/o
[152]	<i>Macaca fascicularis</i>	Взрослые	V79-I- 005****	10^4 - $1,4 \times 10^5$	A/з	Сыпь, анорексия, лихорадка, кашель, выделения из носа	Не указан	H/o
[138]	<i>M. mulatta</i>	3,8-8,4- килограммо- вые	Zaire- 79***	5×10^6	В/в	Сыпь (от 5 до 100 элементов) в 100% случаев и гипертермия тела в 50% случаев	0	H/o
				2×10^7	В/в	Сыпь в 66% случаев; геморрагиче- ская сыпь в 33% случаев (более 100 элементов) и гипертермия тела	100	
				5×10^8	В/в	Продромальная сыпь, нарушение свертываемости крови, гипертермия тела в 50% случаев	100	
[161]	<i>Macaca fascicularis</i>	Взрослые	ZAI- 79***	90 и 5×10^4	A/з	Сыпь, кашель	100 (5×10^4)	H/o
			COP- 58**	110 и 2×10^4	A/з	Отсутствуют	0	H/o
[160]	<i>Macaca fascicularis</i>	Взрослые	Zr- 599***	10^6	И/н	Сыпь, анорексия	0	H/o
					П/к	Сыпь, анорексия, диарея	75	H/o
			Liberia**	10^6	И/н	Сыпь, анорексия, диарея	0	H/o
					П/к	Сыпь, анорексия, диарея	33	H/o

Номер ссыл- ки	Род или вид жи- вотных	Возраст или масса жи- вотных	Название штаммов ВОО	Доза за- ражения (БОЕ)	Способ зараже- ния	Наименование клинических призна- ков заболевания	Процент ги- бели (при дозе, в БОЕ)	ЛД ₅₀ (БОЕ)
[84]	<i>Macaca fascicularis</i>	Взрослые	V79-I-005***	4×10^4 - 10^6	А/з	Сыпь, гипертермия тела, снижение активности, анорексия, снижение массы тела, лимфаденопатия	66, 66, 82, 66 (4×10^4 , 10^5 , 4×10^5 и 10^6 соотв.)	Н/о
[59]	<i>Macaca fascicularis</i>	Взрослые	Zaire-79***	5×10^4 - 5×10^6	И/б	Сыпь, лихорадка, кашель, затрудненное дыхание	66 (5×10^6), 17 (5×10^5) и 0 (5×10^4)	Н/о
				5×10^4 - 5×10^7	В/в	Сыпь, лихорадка	83, (5×10^7), 17 (5×10^6) и 0 (5×10^5 и 5×10^4)	Н/о
[40]	<i>Macaca fascicularis</i>	Взрослые	Zaire***	$3,42 \times 10^6$, $8,37 \times 10^6$, $3,53 \times 10^7$	И/т	Сыпь, лимфаденопатия, лихорадка	66 ($8,37 \times 10^6$ и $3,53 \times 10^7$)	Н/о
[66]	<i>Macaca mulatta</i>	5-9- годовалые	Мутант- ные ва- рианты V79-I-005***	2×10^5 , 10^6 и 10^7	И/б	Сыпь, гипертермия тела, снижение его массы, кашель, затруднение дыхания	13 (2×10^5), 100 (10^6 и 10^7)	Н/о
[106]	<i>Macaca fascicularis</i>	2,5-10,1- килограммо- вые	V79-I-005***	$3,0 \times 10^4$, $1,0 \times 10^5$, $3,0 \times 10^5$, $9,0 \times 10^5$	А/з	Сыпь, гипертермия тела и снижение его массы	0 (3×10^4), 100 (при остальных дозах)	$7,8 \times 10^4$
[131]	<i>Macaca mulatta</i>	4-8- килограммо- вые	Zaire-79***	$1,5 \times 10^7$, $8,5 \times 10^7$	В/в	Н/у	80 ($1,5 \times 10^7$) и 66 ($8,5 \times 10^7$)	Н/о

Номер ссыл- ки	Род или вид жи- вотных	Возраст или масса жи- вотных	Название штаммов ВОО	Доза за- ражения (БОЕ)	Способ зараже- ния	Наименование клинических призна- ков заболевания	Процент ги- бели (при дозе, в БОЕ)	ЛД ₅₀ (БОЕ)
			Sierra Leone**	$1,5 \times 10^7$, $2,5 \times 10^8$	В/в	Н/у	100 ($1,5 \times 10^7$) и 66 ($2,5 \times 10^8$)	Н/о
[113]	Белка (<i>S. vulgaris</i>)	Взрослые	Z-249***	10^{6*}	И/н, п/о, с/к	Лихорадка, насморк, кашель	100	Н/о
[32]	Белки (<i>F. con- gicus</i> , <i>anerythrus</i> , <i>lemniscatus</i> , <i>pyrrhopus</i> ; <i>P. stan- geri</i> ; <i>H. gambi- anus</i>)	Взрослые	Z-249***	$10^1 - 10^{6*}$	И/н	Вялость, анорексия, нерегулярные конъюнктивит и кашель; нерегуляр- ная сыпь у <i>F. con- gicus</i>	30, 50, 70, 25 и 100 (10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 и 10^5 соотв.)	Н/о
				10^3 – 10^{5*}	П/о	Вялость, анорексия, нерегулярные конъюнктивит и кашель; нерегуляр- ная сыпь у <i>F. con- gicus</i>	50, 50 и 0 (10^3 , 10^4 и 10^5 соотв.)	Н/о
				10^{5*}	С/к	Красные папулы в месте инокуляции	50	Н/о
[85]	Суслик	Взрослые	USA- 2003- 044**	$10^{5,1}$	И/н, в/бр	Анорексия, вялость	100	Н/о
[60]	Суслик	Взрослые	Zair- 79***	100	П/к	Анорексия, вялость, носовое крово- течение	100	0,35
			USA- 2003- 044**	100	П/к	Анорексия, вялость, носовое крово- течение	100	0,46

Продолжение таблицы 1.1

[illegible]

Н/у – не указано
Н/о – не определено
С/к – скарификационно
И/н – интраназально
П/о – перорально
П/к – подкожно
И/пл – интраплантарно
В/к – внутрикожно
В/бр – внутрибрюшинно
И/т – интратрахеально
В/в – внутривенно
И/б – интрабронхиально
И/ц – интрацеребрально
А/з – аэрозольно
В/с – внутрисердечно

- (1-я) животные, воспроизводящие при респираторном заражении основные симптомы оспы обезьян у человека (сыпь и лимфаденит), к которым можно отнести обезьян (*M. fascicularis* и *mulatta*), луговых собачек и белок;

- (2-я) животные, воспроизводящие при респираторном заражении некоторые не основные симптомы оспы обезьян у человека (выделение из носа, конъюнктивит, снижение массы тела, адинамия, гибель), к которым можно отнести аутбредных мышей, 6-7-недельных мышей BALB/c и C57BL/6, иммунодефицитных мышей (4-8-недельные мыши C57BL/6 *stat1*^{-/-}, 129 *stat1*^{-/-} и SCID, 5-9-недельные мыши CAST/EiJ, 5-11-недельные мыши MOLF/EiJ), 1-3-дневных белых крыс, взрослых хлопковых крыс, многососковых крыс, 10-дневных кроликов, сусликов и африканских сонь;

- (3-я) животные, не воспроизводящие при респираторном заражении каких-либо симптомов оспы обезьян у человека, к которым можно отнести морских свинок и хомяков.

В то же время, если говорить о первой группе животных, которые максимально моделируют оспоподобное заболевание, то приравнять их по чувствительности к центральноафриканскому (центр/афр) штамму ВОО достаточно сложно. С одной стороны, проведены попытки определения величины ЛД₅₀ для обезьян (*M. fascicularis*) [106] и луговых собачек [72] при респираторном заражении центр/афр штаммом ВОО ($7,8 \times 10^4$ и $5,9 \times 10^3$ БОЕ соответственно). С другой стороны, сопоставить эти величины достаточно трудно, так как при проведении этих исследований использовались различные штаммы ВОО (V79-I-005 и Congo-2003-358) и способы инфицирования (аэрозольный и и/н), а также при этом не наблюдалась зависимость величины летального эффекта от дозы заражения луговых собачек [72] и низших приматов [84]. Кроме того, величина данного показателя для нечеловекообразных приматов была определена в экспериментах, в которых исследованию подвергалось незначительное количество животных (всего 6 особей). Тем не менее, если абстрагироваться от перечисленных сложностей, то, по всей видимости, чувствительность луговых собачек к исследуемому патогену по показателю летальности выше как минимум в 10 раз, чем у изученных приматов. Причем центр/афр штамм ВОО обладал существенно более высокой вирулентностью для луговых собачек при и/н заражении (в ~30 раз), чем западноафриканский - зап/афр (ЛД₅₀ = $1,29 \times 10^5$ БОЕ). Что касается белок, то значения данного показателя для этих видов животных не было определено вообще.

Кроме того, в научной литературе имеется внушительный объем информации, связанной с изучением эффективности разрабатываемых лечебно-профилактических и профилактических препаратов против оспы обезьян в экспериментах с использованием обезьян - *M. fascicularis* и *mulatta* (п. 1.5), в котором также приводятся данные о результатах воздействия вируса при аэрозольном, интратрахеальном, внутривенном (в/в) и и/н инфицировании интактных животных. В одной из таких научных статей был указан показатель чувствительности обезьян (*M. fascicularis*) при в/в заражении центр/афр штаммом ВОО: ЛД₅₀ = 5×10⁶ БОЕ [134].

Обращает на себя внимание также отсутствие сведений о величине ИД₅₀ ВОО при респираторном инфицировании в отношении животных первой группы, тем не менее, нам удалось по имеющимся экспериментальным данным [72] оценить величины такого показателя для луговых собачек при и/н заражении для центр/афр и зап/афр штаммов (10³ и 10^{2,9} БОЕ соответственно). Сложности с определением ИД₅₀ ВОО для низших приматов, вероятно, были обусловлены тем, что с уменьшением дозы респираторного заражения таких животных происходило лишь снижение степени выраженности основных клинических признаков заболевания, регистрация которых могла быть проведена только субъективно. Тем не менее, некоторые исследователи [146] приводят величину данного показателя для обезьян (*M. fascicularis*) при внутримышечном (в/м) заражении зап/афр штаммом ВОО (1,5 lg БОЕ), которая более чем в 10 раз ниже таковой, рассчитанной нами для луговых собачек при и/н инфицировании. Причем существенно большей чувствительностью к вирусу обладал именно данный вид приматов по сравнению с *M. mulatta* [121].

Обобщая результаты исследований, проведенных с ВОО на животных первой группы, необходимо отметить следующее: если появление заболевания у луговых собачек при инъекционном инфицировании сопровождалось в основном летальным эффектом, который имел зависимость от величины вводимой дозы вируса, то у низших приматов гибель происходила в основном спорадически; в тоже время как у луговых собачек, так и у приматов при инфицировании через респираторный тракт процент гибели не зависел от величины вводимой дозы вируса.

Среди животных, отнесенных нами ко второй группе, самыми чувствительными к центр/афр штамму ВОО (по результатам учета летального эффекта) при респираторном заражении оказались суслики, ЛД₅₀ для которых составляла 0,35 БОЕ [60]. Почти в 50

раз меньшей чувствительностью к вирусу обладали африканские сони ($LD_{50} = 12$ БОЕ) [83] и еще более существенно (в 100 – 2000 раз по сравнению с сусликами) уступали по этому показателю иммунодефицитные мыши C57BL/6 stat1^{-/-} ($LD_{50} = 47$ БОЕ для самцов и $LD_{50} = 213$ БОЕ для самок) и CAST/EiJ ($LD_{50} = 680$ БОЕ) [36, 37].

Таким образом, сведения, собранные из литературных источников по вопросу чувствительности различных видов подопытных животных к ВОО, свидетельствовали о том, что практически все ученые ориентировались в данном направлении, связанном с поиском модельных видов животных для оспы обезьян, лишь на воспроизведение клинической картины этого заболевания. При этом дальнейшему более подробному изучению и последующему использованию в качестве модельных видов животных для оценки эффективности разрабатываемых противооспенных препаратов были подвергнуты только пять их видов: луговые собачки, обезьяны (*M. fascicularis* и *mulatta*), суслики, африканские сони и иммунодефицитные мыши (CAST/EiJ и C57BL/6 stat1^{-/-}).

1.2 Распространение вируса оспы обезьян в организме подопытных животных и человека

Учитывая то, что несколько видов подопытных животных, из числа исследованных, по данным научной литературы (подраздел 1.2), обладали высокой или средней степени выраженности чувствительностью к ВОО, проявляя те или иные признаки оспоподобного заболевания, основное внимание в данном обзоре будет уделено именно этим животным. Вопросу, связанному с изучением динамики накопления ВОО в организме экспериментально инфицированных животных, посвящено достаточно много научных публикаций, по которым результаты исследований в обобщенном виде представлены в таблице 1.2.

Обращает на себя внимание то факт, что относительно подробное изучение с широким спектром исследуемых органов было проведено на различных видах подопытных животных (мыши, сони, суслики и луговые собачки), зараженных ВОО разными способами.

Таблица 1.2 - Накопление вируса в органах, тканях и биологических жидкостях различных видов животных, инфицированных вирусом оспы обезьян (ВОО) разными способами и дозами

Номер ссылки	Вид, возраст или масса тела животных	Название штамма ВОО, доза заражения, в БОЕ, и способ	Срок появления ВОО, сут п.з. (вид биоматериала)	Максимальный титр ВОО, в lg БОЕ/мл (вид биоматериала и срок регистрации вируса, сут п.з.)
[74]	Мышь CAST/EiJ	Z79-I-005**, и/н, 10^2	4 (легкие, селезенка), 8 (печень, почки)	6,3 (легкие, 13), 2,0 (печень, 13), 5,0 (селезенка, 8), 1,0 (почки, 8), 0,0 (головной мозг)
		Z79-I-005**, и/н, 10^4	0 - 2 (легкие, селезенка, печень, головной мозг), 4 (почки)	8,5 (легкие, 6), 5,5 (печень, 8), 5,5 (селезенка, 5), 4,5 (почки, 8), 5,5 (головной мозг, 8)
		Z79-I-005**, и/н, 10^6	0 - 2 (легкие, селезенка, печень, почки), 4 (головной мозг)	9,0 (легкие, 6), 7,5 (печень, 6), 8,3 (селезенка, 6), 5,3 (почки, 6), 6,0 (головной мозг, 8)
	Мышь BALB/c	Z79-I-005**, и/н, 10^4	0 - 2 (легкие), 6 (печень)	5,6 (легкие, 6), 2,0 (печень, 6), 0,0 (почки)
		Z79-I-005**, и/н 10^6	0 - 2 (легкие, селезенка, печень) 4 (почки, головной мозг)	8,2 (легкие, 6), 3,5 (печень, 8), 3,0 (селезенка, 6), 3,2 (почки, 6), 3,7 (головной мозг, 6)
[83]	Взрослые африканские сони	ZAI-79**, и/н, 2×10^4	2 (носовой смыв), 3 (селезенка), 4 (легкие, печень, кровь)	5,2 (носовой смыв, 8), 6,5 (селезенка, 8), 6,5 (легкие, 8), 8,0 (печень, 8) и 4,5 (кровь, 8)
[85]	Взрослые суслики	USA-2003-044***, и/н, $10^{5,1}$	2 - 4 (глоточный смыв), 4 - 6 (кровь)	4,2 - 5,1 (кровь, 7), 4,9 - 6,2 (глоточный смыв, 8)
		USA-2003-044***, в/бр, $10^{5,1}$	3 (кровь), 4 (глоточный смыв)	3,8 - 4,2 (кровь, 5), 3,9 - 6,0 (глоточный смыв, 5)
[60]	Взрослые суслики	ZAI-79**, п/к, 100	2 (кровь, легкие, селезенка), 4 (печень)	6,1 (кровь, 10), 6,1 (печень, 10), 7,6 (селезенка, 10), 8,9 (легкие, 10)
		USA-2003-044***, п/к, 100	2 (селезенка), 4 (кровь, печень, легкие)	5,3 (кровь, 10), 8,4 (печень, 10), 7,5 (селезенка, 10), 7,3 (легкие, 10)

Номер ссылки	Вид и возраст или масса животных	Название штамма ВОО, доза заражения, в БОЕ, и способ	Срок появления ВОО, сут п.з. (вид биоматериала)	Максимальный титр ВОО, в lg БОЕ/мл (вид биоматериала и срок регистрации вируса, сут п.з.)
[78]	Взрослые суслики	ZAI-1970** ВОО, п/к, 10^2	Н.у.	4,9 (кровь, 7), 7,3 (печень, 7), 8,2 (легкие, 7) и 7,0 (селезенка, 7)
[86]	Взрослые луговые собачки	USA-2003-044***, в/бр, $10^{5,1}$	5 – 6 (кровь и глоточный смыв)	3,5 – 5,4 (кровь, 7 - 10), 2,5 – 5,1 (глоточный смыв, 7 - 10)
		USA-2003-044***, и/н, $10^{5,1}$	3 – 6 (глоточный смыв), 8 – 9 (кровь)	2,3 – 4,5 (кровь, 10 - 15), 3,0 – 5,2 (глоточный смыв, 10 - 18)
[43]	Взрослые луговые собачки	USA-2003-044***, с/к, $10^{4,5}$	6 - 9 (оральный и носовой смывы и кровь), 9 – 12 (кал), 12 - 15 (глазной смыв)	2,5* (кровь, 12 - 15), 5,3 (оральный смыв, 9 – 12), 3,3 (носовой смыв, 18 – 21), 3,3 (кал, 9 - 12), 2,8 (глазной смыв, 12 - 15)
		USA-2003-044***, и/н, $10^{4,5}$	3 - 6 (оральный смыв), 6 – 9 (носовой смыв и кровь), 9 – 12 (кал), 12 - 15 (глазной смыв)	1,8* (кровь, 12 - 15), 4,4 (оральный смыв, 12 - 15), 4,0 (носовой смыв, 15 – 18), 2,5 (кал, 9 - 12), 1,5 (глазной смыв, 12 - 15)
		Congo-2003-358**, с/к, $10^{4,5}$	6 - 9 (оральный, носовой и с места инокуляции смывы, кал и кровь), 9 – 12 (носовой смыв, срез оспины)	2,5* (кровь, 9 - 12), 5,5 (оральный смыв, 12 - 15), 3,2 (носовой смыв, 18 - 21), 2,8 (кал, 12 - 15), 3,0 (глазной смыв, 12 - 15), 5,5 (с места инокуляции смыв, 12 - 15), 4,6 (срез оспины, 12 – 15)
		Congo-2003-358**, и/н, $10^{4,5}$	6 - 9 (оральный, носовой смывы и кровь), 9 – 12 (глазной смыв, кал), 12 – 15 (срез оспины)	2,5* (кровь, 9 - 12), 5,6 (оральный смыв, 12 - 15), 5,5 (носовой смыв, 12 - 15), 5,0 (кал, 15 - 18), 4,2 (глазной смыв, 12 - 15), 3,3 (срез оспины, 12 – 15)
[72]	Взрослые луговые собачки	USA-2003-044***, и/н, $6 \times 10^2 - 6 \times 10^5$	3 – 13 (оральный смыв)	4,3 – 8,0 (оральный смыв, 10 – 16)

Номер ссылки	Вид и возраст или масса животных	Название штамма ВОО, доза заражения, в БОЕ, и способ	Срок появления ВОО, сут п.з. (вид биоматериала)	Максимальный титр ВОО, в lg БОЕ/мл (вид биоматериала и срок регистрации вируса, сут п.з.)
		Congo-2003-358**, и/н, $8 \times 10^2 - 8 \times 10^5$	3 – 6 (оральный смыв)	4,0 – 8,7 (оральный смыв, 10 – 20)
[81]	Луговые собачки	MPXVV-2003-38**, и/н, 10^5	0 - 3 (оральный смыв)	3,5 (оральный смыв, 0 - 3)
		MPXVV-2003-38**, и/н, 10^6	0 – 3 (оральный смыв, кровь)	8,0* (кровь, 0 – 3), 6,8 (оральный смыв, 7 - 14)
[138]	3,8-8,4-килограммовые <i>Macaca mulatta</i>	ZAI-79**, в/в, 2×10^7	2 – 10 (кровь), 6 (глоточный смыв)	3,2 – 7,0 (кровь, 6 - 12), 6,0 – 7,7 (глоточный смыв, 8 - 14)
[119]	Взрослые <i>Macaca fascicularis</i>	MSF#6**, и/т, 10^6	0 - 4 (плазма крови, глоточный смыв)	5,5 – 5,7 (плазма крови, 7 – 15), 2,6 – 2,8 (глоточный смыв, 11 - 14)
		MSF#6**, и/т, 10^7	0 - 4 (плазма крови, глоточный смыв)	6,5 – 6,7 (плазма крови, 15 - 20), 2,7 – 3,0 (глоточный смыв, 10 - 20)
[56]	22-месячные <i>Macaca fascicularis</i>	Zaire 79 (CDC V79-I-005)**, в/в, $3,8 \times 10^7$	2 – 4 (мононуклеарные клетки крови, плазма крови, глоточный смыв)	5,6 (мононуклеарные клетки крови, 6), 1,8 – 7,1 (плазма крови, 6), 3,7 – 4,8 (глоточный смыв, 6)
[57]	3-6-летние <i>Macaca fascicularis</i>	Zaire 79**, в/в, 5×10^7	0 – 4 (мононуклеарные клетки крови)	4,3 – 6,8* (мононуклеарные клетки крови, 7 - 16)
[160]	Взрослые <i>Macaca fascicularis</i>	Zr-599** или Liberia***, и/н или п/к, 10^6	Н/у (кровь)	2,8* и 2,5* (кровь) - при п/к и и/н введении Zr-599† соответственно; 2,3* и 1,5* (кровь) - при п/к и и/н введении Liberia‡ соответственно
[125]	6-летние <i>Macaca fascicularis</i>	Zair-79** ВОО, в/в, 5×10^7	1 – 4 (кровь)	8,5* (кровь, 5 – 8)

Номер ссылки	Вид и возраст или масса животных	Название штамма ВОО, доза заражения, в БОЕ, и способ	Срок появления ВОО, сут п.з. (вид биоматериала)	Максимальный титр ВОО, в lg БОЕ/мл (вид биоматериала и срок регистрации вируса, сут п.з.)
[84]	Взрослые <i>Macaca fascicularis</i>	V79-I-005**, а/з, $4 \times 10^4 - 10^6$	4 (кровь), 4 – 6 (глоточный смыв)	6,5 – 6,8* (кровь, 8 – 12), 7,0 – 8,0* (глоточный смыв, 10): для выживших на 0,3 – 1,0 lg ниже, чем для погибших
[40]	Взрослые <i>Macaca fascicularis</i>	Zaire**, и/т, $3,42 \times 10^6$	0 – 4 (кровь)	5,5 - 6,5* (кровь, 8 - 12)
		Zaire**, и/т, $8,37 \times 10^6$	0 – 2 (кровь)	6,5 - 7,5* (кровь, 8 - 14)
		Zaire**, и/т, $3,53 \times 10^7$	0 – 2 (кровь)	5,5 - 9,0* (кровь, 8 - 10)
[59]	Взрослые <i>Macaca fascicularis</i>	Zaire-79**, в/в, 5×10^7	0 – 2 (кровь), 2 - 7 (оральный смыв), 4 - 6 (носовой смыв)	7,5 – 8,5* (кровь, 5 – 13), 3,3 – 5,1 (оральный смыв, 5 - 12), 4,6 – 6,0 (носовой смыв, 5 - 12)
		Zaire-79**, в/в, 5×10^6	4 - 7 (оральный смыв), 7 - 10 (носовой смыв)	3,0 – 5,7 (оральный смыв, 6 - 14), 3,3 – 5,0 (носовой смыв, 8 - 12)
		Zaire-79**, и/б, 5×10^6	0 – 2 (кровь), 5 - 9 (оральный смыв), 7 - 9 (носовой смыв)	6,7 – 7,0* (кровь, 7 – 20), 3,0 – 4,4 (оральный смыв, 11 - 14), 5,3 – 5,5 (носовой смыв, 9 - 14)
		Zaire-79**, и/б, 5×10^5	5 - 9 (оральный смыв), 5 - 10 (носовой смыв)	2,0 – 2,8 (оральный смыв, 8 - 12), 3,3 – 5,9 (носовой смыв, 5 - 12)
[66]	5-9-годовалые <i>Macaca mulatta</i>	Мутантный вариант V79-I-005** (WT MPXV-Z), и/б, 2×10^5	0 – 4 (кровь), 0 – 7 (бронхоальвеолярный смыв)	3,1 – 4,0 (кровь, 10 – 14), 4,6 – 4,7 (бронхоальвеолярный смыв, 17)
		Мутантный вариант V79-I-005** (D14L KO MPXV-Z), и/б, 2×10^5	0 – 7 (кровь), 0 – 7 (бронхоальвеолярный смыв)	5,7 – 6,0 (кровь, 7 – 21), 7,3 – 8,0 (бронхоальвеолярный смыв, 7 - 10)
[106]	2,5-10,1-килограммовые <i>Macaca fascicularis</i>	V79-I-005**, а/з, $3,0 \times 10^4$	4 – 6 (кровь), 6 – 8 (оральный смыв)	5,5 – 5,6* (кровь, 8, 10), 5,4 – 5,6* (оральный смыв, 10)
		V79-I-005**, а/з, $1,0 \times 10^5$	4 – 6 (кровь), 6 – 8 (оральный смыв)	5,5 – 5,6* (кровь, 8), 4,5 – 5,3* (оральный смыв, 8)

Номер ссылки	Вид и возраст или масса животных	Название штамма ВОО, доза заражения, в БОЕ, и способ	Срок появления ВОО, сут п.з. (вид биоматериала)	Максимальный титр ВОО, в lg БОЕ/мл (вид биоматериала и срок регистрации вируса, сут п.з.)
		V79-I-005**, а/з, $3,0 \times 10^5$	4 (кровь, оральный смыв)	5,7* (кровь, 6), 4,0* (оральный смыв, 6)
		V79-I-005**, а/з, $9,0 \times 10^5$	4 (кровь, оральный смыв)	6,7* (кровь, 10), 6,7* (оральный смыв, 10)
[45]	2-3-летние <i>Maca-ca fascicularis</i>	Zaire 79**, а/з, $2,6 \times 10^5$	0 - 3 (кровь), 0 - 3 (глоточный смыв)	2,2 (кровь, 10), 5,0 (глоточный смыв, 9)
<p>Примечания</p> <p>* Величина, полученная с помощью полимеразной цепной реакции, копии/мл(мг) или копии/100 нг ДНК, или копии/10⁶ монукулеарных клеток крови, сходная с таковой, полученной при титровании методом негативных колоний</p> <p>** Центральноеафриканский штамм</p> <p>*** Западноафриканский штамм</p> <p>БОЕ – бляшкообразующая единица</p> <p>Н/у – не указано</p> <p>П.з. – после заражения</p> <p>С/к – скарификационно</p> <p>И/н – интраназально</p> <p>В/бр – внутрибрюшинно</p> <p>П/к – подкожно</p> <p>В/в – внутривенно</p>				

При этом у них наблюдалась картина явного накопления вируса в различных органах, тканях, биологических жидкостях и испражнениях: кровь, плазма крови, легкие, носовой и глазной смывы, селезенка, печень, глоточный и оральный смывы, головной мозг и кал. Кроме того, у и/н и скарификационно инфицированных луговых собак возбудитель заболевания был обнаружен и в коже (срез оспины) [43].

В отличие от внутрибрюшинного, п/к и скарификационного методов введения ВОО подопытным животным респираторный (и/н) сопровождался его первичным размножением в органах дыхательного тракта, судя по динамике накопления вируса в легких и носовых смывах в сравнении с таковой по другим биоматериалам.

Несмотря на существование большого количества научных публикаций, в той или иной степени посвященных изучению у низших приматов инфекционного процесса, вызванного ВОО при разных способах заражения, имеется лишь скудная экспериментальная информация по вопросу динамики распространения вируса в организме этих животных, которая ограничена лишь результатами его накопления в крови, мононуклеарах и плазме крови, глоточных, носовых, оральных и бронхо-альвеолярных смывах. При этом ряд исследователей отмечает более высокие концентрации вируса в клеточных элементах крови (мононуклеарные клетки), чем в ее плазме [56].

Более широкий спектр биоматериалов для определения концентрации вируса по данным вирусологического, молекулярно-генетического и люминесцентного исследований был взят у нечеловекообразных приматов и других животных, погибших при оспе обезьян или эвтаназированных перед гибелью. Результаты этих исследований в обобщенном виде представлены в таблице 1.3. Из данных этой таблицы видно, что как у мелких подопытных животных, диких и необычных домашних животных, так и у низших приматов к моменту их гибели ВОО обнаруживается практически во всех исследованных биоматериалах. При этом органы и ткани максимального накопления вируса у большинства видов животных не зависимо от способа инфицирования были сходными: легкие, нос, трахея, селезенка, лимфоузлы, костный мозг, тимус, печень, кожа и яички. Существенно более низкие концентрации вируса были обнаружены в сердце, почках и головном мозге.

Таблица 1.3 - Накопление вируса в органах, тканях и биологических жидкостях различных видов животных, погибших после инфицирования вирусом оспы обезьян (ВОО) разными способами и дозами

Номер ссылки	Вид и возраст или масса животных	Название штамма ВОО, доза заражения, в БОЕ, и способ	Срок гибели животных, сут п.з.	Максимальный титр ВОО, в lg БОЕ/мл (вид биоматериала)
[62]	3-4-недельные SCID и BALB/c	MPXV-2003-358****, в/бp, 10^5	11	2,5* (почки), 1,2* (печень), 1,8* (легкие), 4,5* (яички)
		MPXV-Congo***, в/бp, 10^5	9	2,5* (почки), 2,8* (печень), 2,7* (легкие), 4,4* (яички)
[36]	5–11-недельные Мышь CAST/EiJ	Z79-I-005****, и/н, 1×10^4	7 – 10	9,0 (легкие), 6,0 (печень), 5,3 (селезенка)
		Z79-I-005****, в/бp, 2×10^4	5 – 8	8,0 (легкие), 8,5 (печень), 9,0 (селезенка)
		USA-2003-044****, и/н, 10^4 , 10^5 , 10^6	7 – 10	7,5 – 8,3 (легкие), 5,5 – 6,8 (печень), 6,2 – 8,3 (селезенка), 7,5 – 8,3 (яички)
[37]	4-8-недельные мыши C57BL/stat1-/-	ZAI-79****, и/н, $4,6 \times 10^3$	8 (эвтаназируются)	5,2 (легкие), 2,2 (печень), 4,2 (селезенка)
[85]	Взрослые суслики	USA-2003-044****, и/н, $10^{5,1}$	8 – 9	7,2 – 7,9 (печень), 6,4 – 6,8 (селезенка), 5,9 – 6,7 (легкие), 4,4 – 5,3 (почки), 3,5 – 4,5 (сердце), 1,7 – 4,0 (головной мозг)
		USA-2003-044****, в/бp, $10^{5,1}$	6 – 7	7,0 – 7,8 (печень), 6,4 – 6,8 (селезенка), 5,5 – 6,1 (легкие), 4,1 – 5,4 (почки), 3,5 – 5,7 (сердце), 2,0 – 2,8 (головной мозг)
[86]	Взрослые луговые собачки	USA-2003-044****, в/бp, $10^{5,1}$	8 – 11	7,6 – 8,1 (печень), 7,2 – 8,4 (селезенка), 4,3 – 5,4 (почки), 6,7 – 7,1 (легкие), 0,0 – 5,5 (сердце), 0,0 – 3,6 (головной мозг)
		USA-2003-044****, и/н, $10^{5,1}$	11 – 14	0,0 – 3,0 (печень), 0,0 – 2,4 (селезенка), 0,0 – 2,4 (почки), 0,0 – 8,0 (легкие), 0,0 – 4,5 (сердце), 0,0 – 4,7 (головной мозг)
[72]	Взрослые луговые собачки	USA-2003-044****, и/н, 6×10^2 – 6×10^5	13 – 17	5,3 – 7,3 (носовой смыв), 5,7 – 8,0 (оральный смыв), 0,0 – 7,7 (кожа), 0,0 – 6,7 (печень), 2,8 – 7,0 (легкое), 0,0 – 4,0 (кровь), 6,7 – 7,7 (оспина)

Номер ссылки	Вид и возраст или масса животных	Название штамма ВОО, доза заражения, в БОЕ, и способ	Срок гибели животных, сут п.з.	Максимальный титр ВОО, в lg БОЕ/мл (вид биоматериала)
		Congo-2003-358***, и/н, 8×10^2 - 8×10^5	11 – 17	4,0 – 7,5 (носовой смыв), 3,8 – 9,1 (оральный смыв), 3,5 – 8,5 (кожа), 4,9 – 9,4 (печень), 6,9 – 8,5 (легкое), 0,0 – 7,8 (кровь), 5,0 – 8,3 (оспина)
[152]	Взрослые <i>Macaca fascicularis</i>	V79-I-005***, а/з, 10^4 - $1,4 \times 10^5$	Н/у (погибли или эвтаназированы перед гибелью)	6,9 – 8,9 (легкие), <1,7 – 8,4 (селезенка), <1,7 – 8,0 (печень), <1,7 – 6,2 (почки), <1,7 – 6,7 (надпочечники)
[57]	3-6-летние <i>Macaca fascicularis</i>	Zaire 79***, в/в, 5×10^7	9 – 13	6,5 – 9,3 (легкие), 6,6 – 8,2 (кожа), 5,0 – 6,2 (л/у)
[84]	Взрослые <i>Macaca fascicularis</i>	V79-I-005***, а/з, 4×10^4 - 10^6	6 – 11	8,1 – 10,1** (легкие), 7,1 – 9,1** (паховый л/у), 6,0 – 7,5** (аксиллярный л/у, костный мозг), 5,2 – 8,5** (гонады), 7,3 – 8,1** (селезенка), 4,5 – 7,5** (надпочечники, почки, сердце, 12-перстная кишка, тощая кишка, головной мозг), 5,5 – 8,3** (толстая кишка), 6,5 – 10,3** (оспина)
[59]	Взрослые <i>Macaca fascicularis</i>	Zaire-79***, в/в, 5×10^7	Н/у (погибли или эвтаназированы перед гибелью)	5,5 – 6,5 (левое и правое легкое), 3,5 – 7,0 (аксиллярный, подколенный, шейный, бронхиальный, подчелюстной, паховый, медиастинальный, мезентериальный л/у), 4,5 (тимус, селезенка), 6,5 – 7,0 (костный мозг грудины, ребра и таза), 7,1 (ноздри, миндалины), 4,0 (трахея), 6,1 (пищевод), 4,5 (щитовидная железа)
		Zaire-79***, и/б, 5×10^6		4,0 – 7,2 (левое и правое легкое), 3,0 – 7,0 (аксиллярный, подколенный, шейный, бронхиальный, подчелюстной, паховый, медиастинальный, мезентериальный л/у), 5,5 (тимус), 3,5 (селезенка), 5,0 – 5,7 (костный мозг грудины, ребра и таза), 6,7 (ноздри), 5,1 (миндалины), 6,8 (трахея), 3,2 – 3,7 (пищевод, щитовидная железа)

Номер ссылки	Вид и возраст или масса животных	Название штамма ВОО, доза заражения, в БОЕ, и способ	Срок гибели животных, сут п.з.	Максимальный титр ВОО, в lg БОЕ/мл (вид биоматериала)
		Zaire-79***, в/в, 5×10^6		3,3 – 3,8 (левое легкое), 1,8 (подчелюстной л/у), 2,7 (костный мозг грудины), 2,0 (миндалины)
[106]	2,5-10,1-килограммовые <i>Macaca fascicularis</i>	V79-I-005***, а/з, $3,0 \times 10^4$	21 (эвтаназированы)	0,0 - 6,8** (легкие), 0,0** (головной мозг), 0,0 - 2,6** (сердце),
		V79-I-005***, а/з, $1,0 \times 10^5$	8, 9	4,5 – 6,3** (легкие), 0,0 – 2,6** (головной мозг), 3,6** (сердце)
		V79-I-005***, а/з, $3,0 \times 10^5$	7	8,3** (легкие), 3,1** (головной мозг), 4,5** (сердце)
		V79-I-005***, а/з, $9,0 \times 10^5$	10	8,1** (легкие), 3,5** (головной мозг), 4,3** (сердце)
[45]	2-3-летние <i>Macaca fascicularis</i>	Zaire 79***, а/з, $2,6 \times 10^5$	7 – 11	2,5 – 6,0* (селезенка), 1,5 – 3,0* (почки), 1,2 – 3,2* (надпочечники), 2,2 – 3,5* (сердце), 3,2 - 7,0* (левое легкое), 6,2 – 7,0* (правое легкое), 4,0 – 7,2* (миндалины), 0,5 – 4,0* (мезентериальный л/у), 1,0 – 5,8* (печень), 1,5 – 4,2* (паховый л/у), 1,5 – 3,7* (головной мозг)
Примечания * Величина люминесценции, фотонов/сек ** - Величина, полученная с помощью полимеразной цепной реакции, копии/мл (мг) или копии/100 нг ДНК, сходная с таковой, полученной при титровании методом негативных колоний *** Центральнаяафриканский штамм **** Западноафриканский штамм БОЕ – бляшкообразующая единица Л/у – лимфоузел П.з. – после заражения И/н – интраназально В/бр – внутрибрюшинно В/в – внутривенно				

К сожалению, в доступной литературе не представлено данных о накоплении ВОО в органах и тканях больного человека для того, чтобы сравнить их с результатами экспериментальных исследований, проведенных на животных. Имеется лишь информация о количестве вирусных геномных копий (несколько миллионов) в кожных оспинах больных людей [79]. При этом сходное количество вирусных частиц в этой ткани было обнаружено у животных (обезьяны и луговые собачки), которые воспроизводят основные симптомы оспы обезьян у человека [57, 72, 84]. Кроме того, если исходить из общепризнанных соображений, что у человека клиническая картина и патогенез оспы обезьян воспроизводит натуральную оспу с обычным клиническим типом [61], то у больных людей таким типом натуральной оспы уловить виремию удавалось крайне редко (только в продромальном периоде и в ранней стадии высыпания) [14]. Тогда как практически у всех видов исследованных животных, инфицированных ВОО разными способами, включая заражение через респираторный тракт, вирус регулярно обнаруживался в крови в достаточно высоких концентрациях (таблицы 1.2 и 1.3). Возможно, такое несоответствие результатов может быть объяснено использованием большинством ученых в своих экспериментах высоких доз ВОО для заражения изучаемых животных. В пользу этого объяснения говорит, например, тот факт, что вирус редко обнаруживали в крови у луговых собачек, погибших от оспы обезьян после инфицирования низкими дозами вируса (8×10^2 и 6×10^3 БОЕ) [72]. Наличие ВНО в носоглотке и зеве у людей регистрировали не только с момента появления клинической симптоматики [15, 148, 162], но и во второй половине инкубационного периода заболевания [163], и в стадии реконвалесценции [135]. Аналогичные результаты исследований были получены в экспериментах на различных видах подопытных животных, кроме мышей, инфицированных ВОО через респираторный тракт и другими методами (таблица 1.2).

Таким образом, результаты исследований по изучению динамики накопления ВОО по органам и тканям различных видов животных (сони, суслики, луговые собачки, обезьяны - *M. fascicularis* и *mulatta*) при заражении через респираторный тракт и другими методами подтвердили сходство в ряде случаев с некоторыми известными показателями инфекционного процесса у человека при оспе обезьян и натуральной оспе: по факту накопления вируса в кожных оспинах (включая величину его концентрации), а также в крови (в инкубационном периоде и в ранней стадии заболевания) и на слизистых носоглотки (не только с момента появления клинической симптоматики, но и во второй по-

ловине инкубационного периода заболевания, и в стадии реконвалесценции). В то же время отсутствие соответствующих экспериментальных данных по мышам не позволяет нам судить о сходстве инфекционного процесса при оспе обезьян у этих животных и людей.

1.3 Патоморфологические изменения у подопытных животных и человека, инфицированных вирусом оспы обезьян

В доступной научной литературе имеется скудная информация о патоморфологических изменениях в организме людей, погибших от оспы обезьян, и она ограничена в основном макроскопическими, гистологическими и электронно-микроскопическими исследованиями кожных повреждений (сыпозных элементов) [49, 150, 151], а также клиническим описанием лимфаденитов [54, 96, 97]. При этом, по данным световой и электронной микроскопии кожных повреждений (с учетом регистрации признаков размножения ВНО в кератиноцитах), отмечалось сходство с таковыми, наблюдаемыми у людей при натуральной оспе [67]. Большинство исследователей отмечает отсутствие существенных различий между клинической картиной оспы обезьян у людей и обычным и модифицированным клиническими типами натуральной оспы [54, 61, 137], что делает возможным использование результатов изучения патогенеза этих инфекций, как взаимодополняющих друг друга. При этом несколько больше информации, по данным научной литературы, имеется в отношении патоморфологических изменений, наблюдаемых у людей при натуральной оспе и описанных в рамках всего трех публикаций [51, 65, 109], которые базировались на результатах изучения 168 случаев гибели людей от натуральной оспы обычного клинического типа и 43 – от натуральной оспы геморрагического клинического типа (ранний – 30 и поздний – 13), а также на данных разных источников информации. В обобщенном виде результаты этих исследований приведены в обзорной статье [61] и представлены в таблицах 1.4 и 1.5, несколько модифицированных нами с учетом удобства восприятия. Причем в таблице 1.4 дана информация по результатам исследования трупов людей, погибших от натуральной оспы, протекающей как по обычному типу, так и по геморрагическому, а в таблице 1.5 – по людям, погибшим от натуральной оспы, клинический тип которой в то время не был указан.

Таблица 1.4 Спектр патоморфологических изменений в органах и тканях людей, умерших от обычных и геморрагических типов натуральной оспы, по данным [61]

Вид органов и тканей	Виды патоморфологических изменений у человека при разных клинических типах натуральной оспы:	
	обычный	геморрагический
Кожа и слизистые оболочки	Пролиферативный и некрозирующий дерматит с макулопапулезными, везикулопустулезными и десквамирующими проявлениями	Эритема, петехии
Селезенка	Тромбозы и мелкие кровоизлияния	Тромбозы и мелкие кровоизлияния, инфаркты с бактериями
Легкие	Бронхопневмония, отек, ателектазы	Геморрагии и отек
Печень	Гепатомегалия, тромбозы и липидоз	Гепатомегалия, тромбозы и липидоз
Красный костный мозг	Миелоидная гиперплазия	Некрозы с бактериями
Яички	Мультифокальный интерстициальный орхит, дегенерация семенных канатиков, азоспермия, артрит, тромбоз, периваскулярные кровоизлияния	Мультифокальный интерстициальный орхит, дегенерация семенных канальцев, артериит, тромбоз, периваскулярные кровоизлияния
Почки	Мультифокальный лимфоплазматический и гистиоцитарный интерстициальный нефрит	Кровоизлияния в лоханку и мочеточник, мультифокальный лимфоплазматический и гистиоцитарный интерстициальный нефрит

При натуральной оспе у людей были поражены многие исследованные органы и ткани, и патоморфологические изменения пролиферативного и воспалительно-некротического характера часто с кровоизлияниями наблюдали в коже, легких, селезенке, миндалинах, лимфоузлах, красный костный мозг, печени, яичнике, яичках, почках, костях, сердце [51, 65, 109]. Причем степень их выраженности чаще всего зависела от клинического типа заболевания:

- при обычном типе, который напоминает оспу обезьян, эти изменения были в основном пролиферативного и воспалительного вида;
- при геморрагическом типе – воспалительно-некротического вида с геморрагиями.

Таблица 1.5 - Спектр патоморфологических изменений в органах и тканях людей, умерших от натуральной оспы, клинические типы которой не указаны, по данным [61]

Вид органов и тканей	Виды патоморфологических изменений у человека при натуральной оспе
Селезенка	Лимфогистиоцитарный спленит, лимфоидная гиперплазия
Лимфоузел	Гипертрофия, гиперемия, отек, тромбозы, лимфоидный некроз
Миндалины	Лимфоидный некроз
Печень	Гепатоцеллюлярный некроз, некротический гепатит с бактериями, гипертрофия эндотелия и гиперплазия с некрозом, острое субкапсулярное и паренхиматозное кровоизлияние
Яичник	Мультифокальный лимфогистиоцитарный оофорит, фолликулярный, эпителиальный некроз
Матка	Кровоизлияния
Почки	Острый гломерулонефрит
Кость	Гнойный остеомиелит
Органы центральной нервной системы	Менингоэнцефаломиелит
Сердце	Мультифокальный инфаркт, субэндотелиальное кровоизлияние (редко), лимфогистиоцитарный и эозинофильный миокардит и эпикардит (редко)

В скудном объеме была представлена и информация, связанная с изучением некоторых биохимических и гематологических показателей у людей при оспе обезьян, которая ограничивалась лишь результатами исследований, проведенных во время эпидемической вспышки заболевания в США в 2003 году. При этом у 45% заболевших был отмечен лейкоцитоз $(9,13 - 26,8) \times 10^9/\text{л}$, у 50% – гипоальбуминемия 11 - 34 г/л и у 35% - снижение уровня тромбоцитов $(90 - 143) \times 10^9/\text{л}$ [54]. Результаты этих исследований напоминали таковые, отмеченные у больных с обычным клиническим типом натуральной оспы [91, 105, 157]. Кроме того, при исследовании спинномозговой жидкости у одного больного оспой обезьян в разгар заболевания была отмечена повышенная концентрация лейкоцитов - 21 кл./мм³ при норме 0-10 кл./мм³ в основном за счет увеличения доли полиморфонуклеаров (60%) [100].

Если в отношении человека при оспе обезьян сведений о патоморфологических изменениях было крайне мало, то в отношении известных модельных видов животных для этого заболевания такая научная информации представлена в достаточно внушительном объеме, и она касалась луговых собачек [86, 123], обезьян - *M. fascicularis* [40, 41, 45, 56, 57, 59, 84, 92, 106, 108, 121, 125, 128, 147, 152, 160] и *M. mulatta* [131, 138],

сусликов [60, 78, 85], африканских сонь [83] и мышей SCID/BALB, C57BL/6 stat1^{-/-} и 129 stat1^{-/-} [37, 62]. При этом патоморфологические изменения в органах и тканях известных модельных видов животных для оспы обезьян, инфицированных разными способами ВОО, в общем виде напоминают таковые у человека при оспе обезьян и натуральной оспе. При проведении световой и электронной микроскопии, включая иммуногистохимию и иммунофлуоресценцию, органов и тканей инфицированных животных исследователям удалось идентифицировать главные клетки-мишени для вируса, спектр которых достаточно широк и в основном совпадает с описанным для многих других ортопоксвирусных инфекций: макрофаги, эпителиоциты, эндотелиоциты, плазмоциты, фибробласты, ретикулярные и гладкомышечные клетки, кератиноциты, клетки соединительной ткани, перициты, моноциты, гепатоциты, клетки Купфера, дендритные клетки.

Таким образом, все существующие модельные виды животных для оспы обезьян (луговые собачки, обезьяны - *M. fascicularis* и *mulatta*, суслики, африканские сони и иммунодефицитные мыши) при респираторном и других способах заражения в той или иной степени воспроизводили картину патоморфологических изменений во многих органах и тканях, наблюдаемую у людей при оспе обезьян и обычном типе натуральной оспы: воспалительно-пролиферативные и некротические проявления иногда с геморрагиями.

1.4 Использование модельных видов животных для оспы обезьян с целью оценки эффективности противовирусных препаратов

В настоящее время для экстренной профилактики и лечения ортопоксвирусных инфекций на стадии клинических испытаний в США находятся два эффективных и биодоступных при пероральном введении противовирусных препарата: CMX001 (эфирно-липидный аналог цидофовира с активностью на стадии репликации дезоксирибонуклеиновой кислоты - ДНК) [53, 110] и ST-246 (ингибитор выхода вируса из клетки) [39, 68, 90]. Для того чтобы довести данные препараты до этой стадии необходимо было первоначально выполнить комплекс научно-исследовательских работ и доклинических испытаний в опытах *in vitro* с использованием не только вирусов осповакцины, оспы мышей, оспы коров, оспы кроликов, оспы верблюдов, но и целевых, высокопатогенных для человека (ВОО и ВНО), а также *in vivo* на вирусах осповакцины, оспы мышей, оспы коров

и оспы кроликов. При этом огромный массив данных в этих экспериментах, убедительно доказавших наличие выраженной противооспенной активности у цидофовира (CMX001) и ST-246, явился весомым основанием для проведения учеными дальнейших исследований *in vivo* с целью оценки лечебно-профилактической их эффективности с непосредственным использованием возбудителей особо опасных ортопоксвирусных инфекций (ВОО и ВНО), для борьбы с которыми собственно и разрабатывались данные препараты. Результаты данных исследований в обобщенном виде представлены в таблице 1.6.

Как видно из таблицы при проведении исследований по разработке лекарственных средств против ВОО изучению подвергали широкий спектр модельных видов животных для оспы обезьян: луговые собачки, обезьяны (*M. fascicularis* и *mulatta*), суслики, африканские сони и иммунодефицитные мыши (CAST/EiJ и C57BL/6 *stat1*^{-/-}), определяя при этом лечебно-профилактическую активность трех разрабатываемых противооспенных средств (цидофовир, CMX001 - эфирно-липидный аналог цидофовира и ST-246), первые два из которых имели одинаковый механизм противовирусного действия. Несмотря на то, что инфицирование разных видов животных проводилось с использованием различных штаммов ВОО (ZAI-79, ROC-2003-358, V79-I-005 и Zair-79), способов (и/н, интратрахеальном, в/в и п/к) и доз введения (от 5×10^3 до 10^7 БОЕ), результаты этих исследований убедительно показали, что все испытываемые препараты обладали выраженным как профилактическим, так лечебным эффектом. Однако сочетанное введение цидофовира с противооспенной вакциной Dryvax серьезно ухудшало течение оспы обезьян у в/в зараженных низших приматов центр/афр штаммом ВОО по сравнению с таковым, наблюдаемым при одиночном использовании вакцины [57].

Обращает на себя внимание и тот факт, что некоторым авторам удалось получить выраженный экстренно-профилактический эффект при применении одного из препаратов (цидофовир, CMX001 и ST-246) и на иммунодефицитных животных (мышам), и/н инфицированных ВОО. Кроме того, сразу и после и/н заражения вирусом и/н введение экзогенного гомологичного гамма-интерферона мышам CAST/EiJ, имеющим врожденный дефицит по этому цитокину, обеспечивало существенное снижение у них проявлений клинических признаков заболевания, приближая их по данной реакции на патоген к обычным иммунокомпетентным мышам.

Таблица 1.6 - Эффективность различных лечебно-профилактических препаратов в экспериментах на модельных видах животных с использованием вируса оспы обезьян (ВОО)

Номер ссылки	Вид и возраст или масса животных	Название штамма вируса, способ и доза заражения, в БОЕ	Название препаратов (схема их введения)	Процент животных в опыте/контроле, имеющих оцениваемые признаки заболевания (изменение степени их выраженности в опыте по сравнению с контролем)	Процент гибели в опыте/ контроле
[41]	Взрослые <i>Macaca fascicularis</i>	MSF#6* ВОО, и/т, 10^7	Цидофовир (однократно в/в 20 мг/кг) через 24 часа п.з.	100/100 (снижение количество сыпозных элементов)	0/100
[57]	3-6-летние <i>Macaca fascicularis</i>	Zaire 79* ВОО, в/в, 5×10^7 на 55-е сут п.в.	Цидофовир (однократно в/в 20 мг/кг) с Дривах (с/к $2,5 \times 10^5$)	100/100 (увеличение количества сыпозных элементов до 1500, снижение массы тела); 33/100 (наличие кашля, анорексии, нарушения дыхания, дегидратации, депрессивного состояния, адинамии); 100/100 (наличие ДНК ВОО в моноцитах крови); 0/0 (отсутствие ВОО в легких, коже и лимфоузлах после усыпления через 28 сут п.з., включая патоморфологические изменения); 100/100 (наличие повреждений в легких через 28 сут п.з.)	17/67
			Дривах (однократно с/к $2,5 \times 10^5$)	50/100 (резкое уменьшение количества сыпозных элементов до 5); 0/100 (отсутствие изменения массы тела, кашля, анорексии, нарушения дыхания, дегидратации, депрессивного состояния, адинамии); 17/100 (наличие ДНК ВОО в моноцитах крови в низкой концентрации); 0/0 (отсутствие ВОО в легких, коже и лимфоузлах после усыпления через 28 сут п.з.); 0/100 (отсутствие повреждений в легких через 28 сут п.з.)	0/67
[142]	Взрослые <i>Macaca fascicularis</i>	V79-I-005* ВОО, в/в, 5×10^7	ST-246 (п/о ч/з ежедневно по 3, 10, 30 или 300 мг/кг через 3 - 14 сут п.з.)	100/100 (снижение количества сыпозных элементов и уровня ДНК ВОО в крови)	0/100

Номер ссылки	Вид и возраст или масса животных	Название штамма вируса, способ и доза заражения, в БОЕ	Название препаратов (схема их введения)	Процент животных в опыте/контроле, имеющих оцениваемые признаки заболевания (изменение степени их выраженности в опыте по сравнению с контролем)	Процент гибели в опыте/ контроле
[125]	6-летние <i>Macaca fascicularis</i>	Zair-79* BOO, в/в, 5×10^7	ST-246 (п/о ежедневно 300 мг/кг через 1 - 14 и 3 – 16 сут п.з.)	0/100 (отсутствие сыпи, снижение накопление ДНК BOO в крови на 4 - 5 lg чрез 5 - 8 сут п.з., выравнивание через 9 сут п.з. уровней лейкоцитов, альбумина, аспаратамиотрансферазы, алкали фосфатазы, азота мочевины в крови и креатинина)	0/100
[131]	4-8-килограммовые <i>Macaca mulatta</i>	Zaire 79* BOO, в/в, $8,5 \times 10^7$	Цидофовир (однократно в/в 20 мг/кг) через 24 часа п.з.	0/100 (отсутствие окраски поксвирусных антигенов через 4 сут п.з. в иммунных клетках крови: в моноцитах и гранулоцитах и накопления ДНК BOO в крови чрез 4 сут п.з. и задержка с его появлением на 2 – 5 сут)	0/66
[37]	4-8-недельные мыши C57BL/6 stat1-/-	ZAI-79* BOO, и/н, 5×10^3	CMX001 (п/о ч/з 10 мг/кг через 0 сут п/з, 2,5 мг/кг через 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 сут п.з.)	0/100 (отсутствие снижения массы тела более чем на 25%)	0/100
			ST-246 (п/о ч/з 100 мг/кг ежедневно 1 - 10 сут п.з.)	0/100 (отсутствие снижения массы тела более чем на 25%)	0/100
[36]	11-13-недельные иммунодефицитные мыши CAST/EiJ	ZAI-79* BOO, и/н, 10^4	Цидофовир (в/бр 1,3 мг/гол через 4 и 24 часа п.з.)	0/100 (отсутствие снижения массы тела на 20% через 7 - 12 сут п.з., выгибания спины, взъерошенности шерсти и вялости)	0/33

Номер ссылки	Вид и возраст или масса животных	Название штамма вируса, способ и доза заражения, в БОЕ	Название препаратов (схема их введения)	Процент животных в опыте/контроле, имеющих оцениваемые признаки заболевания (изменение степени их выраженности в опыте по сравнению с контролем)	Процент гибели в опыте/ контроле
[74]	Иммунодефицитные мыши CAST/EiJ	Z79-I-005* BOO, и/н, 2×10^4	Мышиный рекомбинантный интерферон-гамма (и/н ежедневно 5 сут по 5×10^3 ед. со дня инфицирования)	100/100 (легкое снижение массы тела, не достигающее 20%, позднее появление в легкой форме вялости, выгибания спины, взъерошенности шерсти)	0/100
[78]	Взрослые суслики	ZAI-1970* BOO, п/к, 10^2	ST-246 (п/о ч/з ежедневно 100 мг/кг через 0 - 14, 1 - 14, 2 - 14 и 3 - 14 сут п.з.)	0/100 (отсутствие анорексии, кровотечений из носа, респираторного дистресса, некроза тканей, накопления BOO в крови, печени, селезенке и легких, лейкоцитоза, трансаминаита и коагулопатии)	0/100
			ST-246 (п/о ч/з ежедневно 100 мг/кг через 4 - 14 сут п.з.)	66/100 (иногда анорексия, кровотечение из носа, респираторный дистресс, некроз тканей, увеличение средняя продолжительность жизни на 7 сут, снижение накопления BOO чрез 7 сут п.з. в крови на 3 lg, а также в печени, селезенке и легких на 5 lg, легкий трансаминит, отсутствие лейкоцитоза и коагулопатии)	33 $\frac{1}{3}$ /100
[76]	3-летние луговые собачки	ROC-2003-358* BOO, и/н, $3,8 \times 10^5$	ST-246 (п/о ч/з ежедневно 30 мг/кг (ч/з) через 0 - 13 сут п.з.)	0/100 (отсутствие явных признаков сыпи, сонливости, выделения из носа, анорексии и потери веса; редкое и в более низких концентрациях выделение вируса из ротоглоточных смывов)	0/75
			ST-246 (п/о ч/з ежедневно 30 мг/кг (ч/з) через 3 - 16 сут п.з.)	0/100 (отсутствие явных признаков сыпи, сонливости, выделения из носа, анорексии и потери веса; частое, но в более низких концентрациях выделение вируса из ротоглоточных смывов)	0/75

Номер ссылки	Вид и возраст или масса животных	Название штамма вируса, способ и доза заражения, в БОЕ	Название препаратов (схема их введения)	Процент животных в опыте/контроле, имеющих оцениваемые признаки заболевания (изменение степени их выраженности в опыте по сравнению с контролем)	Процент гибели в опыте/ контроле
			ST-246 (п/о ч/з 30 мг/кг в день появления сыпи и затем ежедневно 13 сут	100/100 (менее выраженные признаки сыпи, сонливости, выделения из носа, анорексии и потери веса; постоянное, но в более низких концентрациях выделение вируса из ротоглоточных смывов)	0/75
[83]	Взрослые африканские сони	ZAI-79* ВОО, и/н, 75, 4×10^3 , 5×10^3	Цидофовир (в/бр 2 мг/гол. через 0 сут п.з.)	Н.у./100	19/100
Примечания * Центральнаяафриканский штамм Н.у. – не указано БОЕ – бляшкообразующая единица Ч/з – через зонд П.з. – после заражения Д.з. – до заражения С/к – скарификационно И/н – интраназально П/о – перорально В/бр – внутрибрюшинно П/к – подкожно В/м – внутримышечно В/в – внутривенно					

Виды животных, моделирующих оспу обезьян у человека, активно использовали для изучения эффективности действия не только лечебно-профилактических препаратов, что рассматривалось нами выше, но и собственно профилактических (вакцин). При этом, как правило, такие исследования с вакцинными препаратами на начальном этапе в широком диапазоне проводили с применением ортопоксвирусов, относящихся к возбудителям 3-4-й групп патогенности для человека [82, 93, 130], а на завершающей стадии перед получением разрешения в национальных органах контроля на проведение клинических испытаний того или иного профилактического препарата эксперименты выполняли и на высокопатогенных для человека ортопоксвирусах, в частности ВОО, с использованием африканских сонь [83], иммунодефицитных мышей C57BL/6 *stat1* ^{-/-} и CAST/EiJ [36, 37], луговых собачек [81], обезьян - *M. mulatta* [71, 136, 138, 139, 140, 149] и *M. fascicularis* [41, 44, 45, 47, 56, 57, 108, 119, 120, 134, 141].

Большинство модельных видов животных для оспы обезьян, используемых при оценке лечебно-профилактической эффективности разрабатываемых противооспенных химически синтезированных соединений, было применено в экспериментах с вакцинными препаратами. После проведения комплекса доклинических испытаний различных видов вакцин эффективность и безопасность некоторых из них (Imvanex[®], известная как IMVAMUNE[®]; ACAM2000 и LC16m8) успешно была изучена на людях, что позволило в последующем начать производство данных препаратов.

Таким образом, при разработке лечебно-профилактических и профилактических противооспенных препаратов на этапах НИР и доклинических испытаний ученые проводили поэтапную оценку их эффективности: на клеточных культурах и/или модельных видах животных с использованием сначала вирусов осповакцины, оспы мышей, оспы коров, оспы кроликов и оспы верблюдов, а затем возбудителей особо опасных инфекций того же рода вирусов. В экспериментах с ВОО на разных видах известных модельных животных для оспы обезьян продемонстрирована высокая эффективность разрабатываемых в мире в настоящее время двух химически синтезированных соединений (CMX001 и ST-246) и, как минимум, трех вакцинных препаратов (IMVAMUNE[®], ACAM2000 и LC16m8). Полученные результаты исследований по эффективности действия вакцинных препаратов на модельных видах животных подтверждаются соответствующими данными их клинических испытаний.

1.5 Заключение по обзору литературы

Анализ данных литературы показал, что к настоящему времени успешно проведен поиск и использование в экспериментах по оценке разрабатываемых противовирусных препаратов пяти видов модельных животных для оспы обезьян: иммунодефицитные мыши (CAST/EiJ и C57BL/6 stat1^{-/-}), суслики (*Spermophilus tridecemlineatus*), чернохвостые луговые собачки (*Cynomys ludovicianus*), сони Келлена (*Graphiurus kelleni*) и низшие приматы (*Macaca fascicularis* и *mulatta*). Однако все они имеют те или иные существенные недостатки с точки зрения возможности их выращивания в неволе, ограниченности ареала обитания, дороговизны, удобства и адекватности их применения при моделировании оспы обезьян у людей:

- иммунодефицитные мыши при инфицировании ВОО не воспроизводят основную клиническую картину оспоподобного заболевания (сыпь и лимфаденит), могут лишь частично моделировать инфекционный процесс у людей с подавленной иммунной системой, доля которых во время эпидемических вспышек оспы обезьян, вероятно, не очень значительна, и вряд ли могут быть использованы для оценки эффективности противовирусных препаратов, в основе действия которых лежит механизм их влияния на иммунную систему; кроме того, инбредные мыши достаточно дорогие и не отражают разнообразие человеческой популяции, которая по существу представляется аутбредной (межсемейное, межнациональное и межрасовое скрещивание);

- сони Келлена при инфицировании ВОО не воспроизводят основную симптоматику оспоподобного заболевания, не являются лабораторными животными, при выращивании в неволе требуют создания специальных условий, что сложно обеспечить в условиях вирусологического эксперимента, да и стоимость этого вида животных достаточно высокая;

- суслики при инфицировании ВОО не проявляют основную клиническую картину оспоподобного заболевания, не являются лабораторными животными, живут в степных, лесостепных, лугостепных, лесотундровых ландшафтах и трудно приживаются в неволе (плохо размножаются) и поэтому для экспериментов должны, как правило, доставляться из естественной среды обитания;

- чернохвостые луговые собачки в отличие от сусликов, воспроизводят при инфицировании ВОО основную симптоматику оспоподобного заболевания, а также хорошо

приживаются в неволе, но имеют существенные недостатки, связанные с тем, что ареал их обитания ограничивается лишь Северной Америкой [13] и отсутствием возможности приобретения этого вида животных в специализированных питомниках нашей страны;

- низшие приматы при заражении проявляют основные клинические признаки оспоподобного заболевания, но являются очень дорогостоящими животными, применение которых в вирусологических экспериментах сопряжено с большой трудоемкостью.

В связи с этим целью настоящих исследований явился поиск доступного модельного вида животных для оспы обезьян, воспроизводящего оспоподобное заболевание, которое может быть использовано при оценке лечебно-профилактической активности разрабатываемых противооспенных препаратов.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все эксперименты с живым ВОО были проведены на базе ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (Россия) в максимально изолированной лаборатории (BSL-4 по зарубежной классификации) с использованием защитных пневмокостюмов.

2.1 Лабораторные животные

В исследованиях использовано 16 мышей аутбредной популяции ICR обоего пола, массой 9 - 11 г (8 - 15 сут) и 16 кроликов породы Шиншилла обоего пола, массой 1500 г (1,5 мес.), полученных из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»; 16 лабораторных свиней породы Сибирская мини-свинья обоего пола, массой 6000 ± 2000 г (2 мес.), полученных из питомника Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (г. Новосибирск); а также 16 степных сурков (*Marmota bobak*) обоего пола, массой 1230 ± 347 г (1,5 мес.) и 29 сурков той же породы обоего пола, массой 3000-4000 г (12 - 24 мес.), полученных из Пушкинского питомника Московской области.

Животных содержали при естественном освещении на стандартном рационе со свободным доступом к воде. Все манипуляции с животными, в том числе анестезию и эвтаназию, проводили в соответствии с действующими «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» [20], «Руководством по содержанию и использованию лабораторных животных» [22], а также в соответствии с протоколом № 1-01.2014, утвержденным биоэтическим комитетом ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» 28 января 2014 г.

2.2 Клеточная культура

В работе использовали перевиваемую культуру клеток Vero (клетки почки зеленой мартышки), полученную из коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Монослой клеток Vero выращивали в среде DMEM (ООО «БиолоТ», Россия) в присутствии 10 % эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота («HyClone», США) с добавлением пенициллина (100 МЕ/мл) и стрептомицина (100 мкг/мл). При культивирова-

нии вируса в качестве поддерживающей среды использовали ту же среду, но с использованием концентрации сыворотки 2 %.

2.3 Вирус и определение его концентрации

В работе использовали центр/афр штамм (Congo Basin MPXV) BOO V79-1-005, штамм ЛИВП вируса осповакцины, штамм Гришак вируса оспы коров и штамм К-1 вируса оспы мышей, полученные из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Штамм V79-1-005 BOO поступил в коллекцию ГНЦ ВБ «Вектор» из Центров по контролю и профилактике заболеваний (CDC, США) 15 сентября 1999 года. Полногеномный сиквенс этого штамма представлен в GenBank: HQ857562.1. Нарботку вирусов осуществляли в культуре клеток Vero с применением среды DMEM (ООО «БиолоТ», Россия). Используя данные штаммы, были приготовлены в среде культивирования клеток вирусосодержащие суспензии двух препаратов BOO и по одному препарату вирусов осповакцины, оспы коров и оспы мышей. Концентрацию вирусов в культуральной жидкости определяли методом негативных колоний путем титрования образцов на культуре клеток Vero, рассчитывали и выражали в десятичных логарифмах бляшкообразующих единиц в мл (lg БОЕ/мл) [5, 111]. Биологическая концентрация BOO в первом препарате составляла 6,7 (6,6...6,8) lg БОЕ/мл, а во втором – 7,1 (7,1...7,2) lg БОЕ/мл. Концентрации же вирусов осповакцины, оспы коров и оспы мышей в препаратах составляли от 5,6 до 6,7 lg БОЕ/мл. Первый препарат BOO использовали для инфицирования кроликов, мини-свиней и культур клеток, а второй – для инфицирования мышей и сурков. Препараты с вирусами осповакцины, оспы коров и оспы мышей использовали только для заражения культур клеток. Расфасованный по 1 мл в индивидуальные пробирки вирусосодержащий материал хранили при температуре минус 70 °С.

2.4 Интраназальное инфицирование кроликов и определение их чувствительности к вирусу

Заражение кроликов BOO осуществляли и/н после использования ветеринарного препарата для наркоза «Золетил», который вводили в/м в дозе 20 мкг/кг массы кролика.

Кроликам вводили вируссодержащую жидкость по 0,5 мл в каждую ноздрю (суммарно 1 мл) в дозах ВОО, равных: 0; 2; 4 lg БОЕ, используя по 4 животных на дозу. Эксперименты по и/н заражению кроликов были проведены с целью определения ИД₅₀ по наличию клинических признаков заболевания и ЛД₅₀ ВОО для кроликов. Эвтаназию кроликов по окончании эксперимента осуществляли посредством в/в введения препарата «Золетил» в летальной дозе (200 мкг).

2.5 Интраназальное инфицирование мини-свиней и определение их чувствительности к вирусу

Для наркотизации мини-свиней при и/н инфицировании ВОО использовали в/м введение ветеринарного препарата «Золетил» в дозе 20 мкг/кг массы мини-свиньи. При и/н заражении мини-свиньям вводили вируссодержащую жидкость по 0,5 мл в каждую ноздрю (суммарно 1 мл) в дозах ВОО, равных: -1; 1; 3; 5 lg БОЕ, используя по 4 животных на дозу. Заражение мини-свиней и/н способом было проведено с целью определения ИД₅₀ по наличию клинических признаков заболевания и ЛД₅₀ ВОО для мини-свиней. После окончания эксперимента мини-свиней эвтаназировали с помощью в/в введения препарата «Золетил» в летальной дозе (200 мкг).

2.6 Интраназальное инфицирование мышей и определение их чувствительности к вирусу

После ингаляционного наркоза диэтиловым эфиром аутбредным мышам ICR и/н вводили вируссодержащую жидкость в объеме 0,03 мл суммарно в обе ноздри, используя для заражения различные разведения вируссодержащей жидкости. При этом мышей заражали ВОО по 4 головы на каждую дозу (-1; 1; 3; 5; 5,5 lg БОЕ). Заражение мышей и/н способом было проведено с целью определения ИД₅₀ по наличию клинических признаков заболевания и ЛД₅₀ ВОО для мышей. ИД₅₀ рассчитывали в lg БОЕ/гол. по методу Спирмена-Кербера [5].

Заболевание, вызванное ВОО у мышей, регистрировали по следующим внешним клиническим признакам: гнойный конъюнктивит, блефарит, взъерошенность шерсти.

Эвтаназию мышей после окончания эксперимента осуществляли методом цервикальной дислокации.

2.7 Способы инфицирования сурков и определения их чувствительности к вирусу

До начала экспериментов было установлено, что в сыворотке крови сурков, полученных из Пушкинского питомника, отсутствовали антитела к ВОО в реакции нейтрализации, выполненной в соответствии с описанным методом [143].

В экспериментах с использованием сурков, инфицированных ВОО, осуществляли измерение ректальной температуры тела с помощью электронного термометра Thermal (HARTMAN, Германия). Среднее значение температуры тела у сурков до заражения ВОО было $36,5 \pm 0,4$ °C.

С целью изучения чувствительности к ВОО в проводимых нами экспериментах сурков инфицировали двумя способами: п/к, вводя по 1 мл вирусосодержащей жидкости в холку, или и/н, вводя по 0,5 мл вирусосодержащей жидкости в каждую ноздрю (суммарно 1 мл).

В экспериментах, связанных с п/к заражением сурков ВОО, использовали по 4 сурка на каждую дозу: 2,5; 4,1; 5,6; 7,1 lg БОЕ, оценивали чувствительность этих животных к патогену, уровень накопления патогена в органах и тканях отдельных животных, а также патоморфологическую картину заболевания.

Перед проведением и/н инфицирования животных наркотизировали в/м с помощью ветеринарного препарата для анестезии «Золетил» в дозе 25 мкг/кг. После этого осуществляли и/н заражение сурков ВОО в дозах - 1,8; 0,2; 2,2; 4,2; 5,0 lg БОЕ (по 4 сурка на каждую дозу), 6,6 lg БОЕ. (2 сурка) и 7,8 lg БОЕ (1 сурок).

Определение ИД₅₀ ВОО у сурков осуществляли по клиническим признакам заболевания. Кроме того, была сделана попытка определения ЛД₅₀ ВОО для этого вида животных. За инфицированными сурками наблюдали в течение 21 сут п.з., регистрировали количество животных с клиническими симптомами заболевания и количество павших животных. На основании этих показателей рассчитывали ИД₅₀ и ЛД₅₀ в lg БОЕ по методу Спирмена-Кербера [5].

Заболевание, вызванное ВОО у сурков, регистрировали по следующим внешним клиническим признакам: оспоподобная сыпь на коже и слизистых, гнойные выделения из носа, лимфаденит, нарушение координации, тремор конечностей, лихорадка, повышенная агрессивность, взъерошенность шерсти. Факт гибели сурков вследствие инфекции, вызванной ВОО, подтверждали путем определения наличия жизнеспособного вируса в гомогенатах различных органов и тканей этих животных. После окончания эксперимента выживших сурков эвтаназировали с помощью в/в введения препарата «Золетил» в летальной дозе (200 мкг).

2.8 Изучение накопления вируса в биоматериалах у сурков

При изучении накопления ВОО в организме у 5 из 16 погибших сурков после п/к заражения брали образцы следующих органов и тканей: носовая перегородка со слизистой, трахея, сердце, легкие, печень, поджелудочная железа, почки, селезенка, головной мозг, поднижнечелюстные лимфоузлы, паховые лимфоузлы, подмышечные лимфоузлы, брыжеечные лимфоузлы, яички, яичники и кусочки кожи с оспинами. Для патоморфологических исследований у этих животных и двух интактных осуществляли забор образцов тех же органов и тканей.

При изучении динамики накопления ВОО и патоморфологических изменений в органах и тканях и/н инфицированных сурков использовали дозу вируса 3,7 lg БОЕ.

Для изучения динамики накопления ВОО в биоматериалах (клетки крови, сыворотка крови, носовая перегородка со слизистой, головной мозг, трахея, бифуркационные лимфоузлы, легкие, печень, селезенка, поджелудочная железа, мезентериальные лимфоузлы, двенадцатиперстная кишка, почки, надпочечники и кожа), полученных от и/н инфицированных сурков, было взято по 1 животному на каждую временную точку: 2, 3, 5, 7, 9, 12 сут п.з. Для патоморфологических исследований у этих же животных и двух интактных осуществляли забор тех же образцов органов и тканей, включая дополнительно тимус.

При заборе крови из поверхностной вены голени животных наркотизировали в/м с помощью ветеринарного препарата для анестезии «Золетил» в дозе 25 мкг/кг. Из крови путем центрифугирования получали сыворотку и сгусток крови. При заборе органов и

тканей сурков подвергали эвтаназии, вводя в/в летальную дозу (200 мкг/гол.) того же анестетика.

Полученные образцы органов, тканей и сгустков крови замораживали, а потом готовили 5 %-е (по объему) гомогенаты путем растирания в ступке с речным песком и раствором Хенкса. Определение концентрации ВОО в 5 %-х гомогенатах производили стандартным методом с использованием культуры клеток Vero [143]. До титрования полученные гомогенаты от инфицированных сурков хранили при температуре минус 70 °С.

2.9 Вирусологический анализ проб

Концентрацию ВОО в использованных в работе образцах гомогенатов органов и тканей сурков определяли стандартным для поксвирусов методом негативных колоний на культуре клеток Vero [143]. Клетки выращивали в 24-луночных планшетах до формирования полного монослоя с посадочной концентрацией 100 тыс. кл./мл, по 1 мл в лунку, на вирусологической питательной среде RPMI-1640 (ООО «БиолоТ», Россия) с 10 % инаktivированной сыворотки плодов коров («HyClone», США) и антибиотиками (пенициллин 100 ед./мл, стрептомицин 100 мкг/мл, Россия) при 37 °С в атмосфере с 5 %-м CO₂. Готовили 10-кратные разведения образцов, содержащих ВОО, на поддерживающей среде (RPMI-1640 с 2 % сыворотки и антибиотиками). В лунку вносили по 0,2 мл соответствующего разведения, по 2 лунки на разведение. После окончания адсорбции вируса клетки инкубировали 6 суток при 37 °С и 5 % CO₂. По окончании срока культивирования монослой окрашивали раствором генцианового фиолетового и подсчитывали количество негативных колоний в лунках. Для подсчета использовали те разведения, при которых количество негативных колоний в лунках находится в пределах 10 – 100. Концентрацию вируса в гомогенатах органов и тканей выражали в десятичных логарифмах бляшкообразующих единиц в 1 мл (lg БОЕ/мл) или в натуральных числах. Минимальное количество вируса, которое могло быть выявлено в гомогенатах органов и тканях, а также в сыворотке крови при использованном нами методе титрования, составляло 0,4 lg БОЕ/мл.

2.10 Оценка остаточной инфекционности фрагментов органов от сурков, зараженных вирусом

Органы и ткани (фрагменты) от инфицированных ВОО сурков объемом не более 1 см³ при толщине фрагмента не более 0,5 см помещали в стерильную 50 мл полипропиленовую пробирку, содержащую 45 мл 8 %-го раствора параформальдегида, разведенного питательной средой DMEM в 2 раза. Фрагменты инкубировали в течение 9 - 10 сут при температуре 4-6 °С при полной замене через каждые 72 часа фиксирующего раствора свежим 8 %-м раствором параформальдегида, разведенного питательной средой DMEM в 2 раза, каждый раз заполняя пробирку полностью 4 %-м раствором параформальдегида. Для измерения остаточной инфекционности были выбраны органы, в которых содержалось максимальное количество вируса, отличающиеся между собой архитектурой ткани: легкие, головной мозг, почки, кусочек кожи с пустулой, трахея. Половину обеззараженного фрагмента органа промывали трижды 10 мл питательной средой DMEM, для удаления раствора параформальдегида. Затем готовили гомогенат органа, растирая кусочек органа в ступке с пестиком, с использованием стерильного речного песка. В ступку добавляли 4 мл питательной среды DMEM, содержащей 2 % эмбриональной сыворотки коров и готовили гомогенную смесь, которую в объеме 1,4 мл переносили в 1,5 мл пробирки. Пробирки центрифугировали на центрифуге Мини Спин Эппендорф при 2000 об./мин в течение 5 мин для удаления грубых частиц. Полученный после центрифугирования супернатант использовали для приготовления следующих разведений: 1:1 (без разведения), 1:10, 1:100 и 1:1000. По 0,2 мл полученных разведений вносили в лунки 24 луночных культуральных планшетов с конфлюэнтным монослоем культур клеток Vero (каждое разведение препарата вносили в две лунки). Планшеты инкубировали 1 ч при температуре +37 °С в атмосфере с 5 %-м CO₂ и 100 %-й относительной влажности. После проведения адсорбции в течение 1 часа разведения препаратов из планшетов удаляли и в лунки вносили по 1 мл поддерживающей среды: питательная среда DMEM с добавлением антибиотиков, содержащая 2 % эмбриональной сыворотки. Планшеты инкубировали в течение 6 сут. При температуре +37 °С в атмосфере с 5 %-м CO₂ и 100 %-й относительной влажности. Затем поддерживающую среду из планшетов удаляли, и монослой окрашивали красящим раствором, содержащим генциан-

фиолетовый. Количество негативных колоний в лунках планшетов подсчитывали визуально.

2.11 Патоморфологические исследования

Для светооптического исследования образцы органов фиксировали в 4 %-м растворе параформальдегида. Дальнейшая обработка материала проводилась по общепринятой методике: последовательное обезвоживание в спиртах возрастающей концентрации, пропитывание в смеси ксилол – парафин и заливка в парафиновые блоки. Парафиновые срезы толщиной 4 - 5 мкм готовили с помощью автоматического ротационного микротомы НМ-360 (Германия). Срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Светооптическое исследование и микрофотосъемка проводилась на микроскопе Imager Z1 (Zeiss, Gottingen, Германия), оснащенном камерой высокого разрешения HRc. При анализе снимков использовался программный пакет AxioVision Rel.4.8.2 (Carl Zeiss Micro Imaging GmbH, Jena, Германия).

Для электронно-микроскопического исследования образцы дофиксировали 1 %-м раствором осмиевой кислоты, обезвоживали по стандартной методике в растворах этилового спирта возрастающей концентрации и ацетоне, и заливали в смесь эпон-аралдит. Ультратонкие срезы готовили на микротоме Райхерт-Янг (Австрия), контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца. Срезы исследовали в электронном микроскопе JEM 1400 (Jeol Ltd., Токуо, Япония), фотосъемку проводили с помощью встроенной цифровой камеры Jeol и цифровой камеры бокового вывода Veleta (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Munster, Германия). Снимки обрабатывались и анализировались с помощью программного пакета iTEM (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Munster, Германия).

2.12 Химически синтезированные соединения

В работе была использована свежеприготовленная серия химического соединения, синтезированного в Новосибирском институте органической химии (НИОХ) им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения российской академии наук (СО РАН), ранее проявившего противовирусную активность в отношении ортопоксвирусов в опытах *in vitro*: 7-[N`-(4-Трифторметилбензоил)-гидразинокарбонил]-трицикло[3.2.2.0^{2,4}]нон-8-ен-

6-карбоновая кислота (ННОХ-14) [21], а также химическое соединение, синтезированное этой же организацией, ранее проявившее слабую противовирусную активность в отношении ортопоксвирусов в опытах *in vitro*: Гидрат N-{3,5-диоксо-4-азатетрацикло[5.3.2.0^{2,6}.0^{8,10}]додец-11-ен-4-ил}-2-гидроксибензамида (ННОХ-32).

В качестве положительного контроля использовали свежеприготовленную серию химического соединения с установленной противоопухолевой активностью 4-трифторметил-N-(3,3а,4,4а,5,5а,6,6а-октагидро-1,3-диоксо-4,6-етеноциклопроп[*f*]изоиндол-2(1H)-ил)-бензамид (ST-246), синтезированное для исследовательских целей в ННОХ им. Н.Н. Ворожцова СО РАН по описанной в патенте методике [64].

Все лабораторные образцы химических соединений были охарактеризованы и паспортизованы, их подлинность была подтверждена ИК спектроскопией, результатами элементного анализа и спектрами ЯМР.

2.13 Метод определения цитотоксичности и противовирусной активности химических препаратов

Для определения цитотоксичности и противовирусной активности препаратов нами была адаптирована методика с использованием 96-луночных планшетов [48]. Данный метод основан на определении способности соединений подавлять размножение вируса и/или его распространение от клетки к клетке. Антивирусная активность (протекция от вирус-индуцированной гибели клеток) может быть оценена по сохранению способности клеток фагоцитировать витальный краситель нейтральный красный. Учет результатов в этом случае может быть проведен с использованием стандартного планшетного спектрофотометра. Кроме того, в данном случае возможна автоматизированная обработка данных при подключении спектрофотометра к компьютеру и использовании соответствующей программы для автоматического расчета 50 %-й токсической (ТС₅₀) и ингибирующей (IC₅₀) эффективной концентрации препаратов. Кроме того, использование 96-луночных планшетов позволяет применять автоматические 8- и 12-канальные дозаторы, что существенно упрощает проведение экспериментов и позволяет их стандартизировать. Нами для учета результатов был использован планшетный спектрофотометр

Emax (Molecular Devices, США) и программа SoftMax 4.0 (Molecular Devices, США), которая автоматически рассчитывала 50 %-е TC_{50} и IC_{50} концентрации препаратов.

Для оценки противовирусной активности препаратов монослой культуры клеток Vero выращивали в лунках плоскодонных 96-луночных планшетов, а затем в культуральную среду добавляли серийные разведения исследуемых соединений и соответствующий вирус. После инкубирования в течение 2-5 суток, монослой клеток прокрашивали витальным красителем нейтральным красным в течение 2 часов. После удаления красителя и отмывки клеток в лунках от его не связавшейся фракции, добавляли лизирующий буфер. Количество красителя, адсорбированное живыми клетками монослоя, оценивали по оптической плотности (ОП), которую измеряли на спектрофотометре Emax при длине волны 490 нм. В качестве контролей использовали лунки планшета, в которые вирус не вносили (контроль токсичности), в который вносили вирус без соединений (контроль вируса) и лунки, в которые не вносили ни вирус, ни соединения (контроль культуры клеток). Аналогичным образом определяется токсическая активность соединений – по гибели клеток под воздействием препарата. Учет результатов проводили с использованием планшетного спектрофотометра Emax и программы SoftMax 4.0, которая автоматически рассчитывала TC_{50} и IC_{50} . По соотношению 50 %-й токсической и ингибирующей (TC_{50}/IC_{50}) концентраций определяется индекс селективности (IS). При проведении скрининга противовирусной активности препаратов использовали схему по три соединения на планшет и вирусы осповакцины, оспы коров, экстремелии, а также ВОО.

2.14 Оценка противовирусной активности химически синтезированных препаратов в отношении ортопоксвирусов в опытах *in vitro*

В работе были использованы новые серии двух препаратов: НИОХ-14 и ST-246, а также препарат НИОХ-32. Все лабораторные образцы химических соединений были охарактеризованы и паспортизованы. Для оценки эффективности каждого препарата использовали 8 трехкратных разведений. Исходная концентрация каждого препарата составляла 1, 10 или 100 мкг/мл в зависимости от показателей предварительного скрининга противовирусной активности и токсичности препарата.

При оценке противовирусной активности препаратов в лунки 96-луночных планшетов с монослоем клеток, содержащих по 100 мкл среды DMEM с 2 % эмбриональной сыворотки, сначала вносили по 50 мкл разведений препаратов, а потом вносили 50 мкл разведения штаммов ортопоксвирусов в дозе 1000 БОЕ/лунку. Оценку противовирусной активности проводили через 2-5 сут.

Через 2-5 сут инкубирования инфицированного ортопоксвирусами монослоя клеток с препаратами в культуральную среду вносили витальный краситель - нейтральный красный на 1,5 ч. После этого монослой промывали двукратно физраствором, вносили лизирующий буфер и через 30 мин на планшетном ридере Emax определяли оптическую плотность (ОП), которая является показателем количества не разрушенных под влиянием вируса клеток в монослое. По показателям ОП рассчитывали 50 % токсическую концентрацию (TC_{50} мкг/мл) и 50 % ингибирующую концентрацию (IC_{50} мкг/мл) при помощи компьютерной программы SoftMaxPro-4.0. На основании этих показателей рассчитывали терапевтический индекс (ТИ) (или индекс селективности - IS): $TI = TC_{50} \text{ мкг/мл} / IC_{50} \text{ мкг/мл}$.

2.15 Схема применения и критерий оценки эффективности химически синтезированных соединений на сурках, инфицированных вирусом

При изучении эффективности действия антиортопоксвирусных препаратов сурков и/н заражали ВОО в дозе 3,7 Ig БОЕ/гол. Химически синтезированные соединения НИОХ-14 и ST-246 вводили животным перорально, при этом животным после ручной фиксации (без анестезии) эти препараты вводили через угол ротового отверстия за большими коренными зубами в полость рта с помощью автоматической пипетки 5 мл суспензии того или иного препарата, приготовленного на основе раствора метилцеллюлозы (0,75 %) с твин-80 (1 %), в дозе 40 мг/кг массы сурка ежедневно однократно (за 1 сут до заражения ВОО и далее в течение 6 сут п.з.). При этом контрольной группе сурков по той же схеме и тем же способом вводили водный раствор, содержащий метилцеллюлозу и твин-80, который использовали для получения суспензии препаратов НИОХ-14 и ST-246.

В течение 21 сут п.з. ВОО в каждой группе сурков оценивали количество павших животных и количество животных, имеющих клинические признаки заболевания. На

основании полученных данных рассчитывали коэффициент защиты (КЗ) сурков при воздействии препарата: $KЗ = \text{процент инфицированных в контроле} - \text{процент инфицированных в опыте}$.

Через 28 сут п.з. у всех выживших животных из опытных и контрольной групп в эксперименте по изучению эффективности действия лекарственных препаратов проводили определение титров антител к ВОО в сыворотке крови по описанной методике [143].

2.16 Определение титров антител к вирусу в сыворотке крови

Титры антител к ВОО в образцах сыворотки крови сурков оценивали в реакции нейтрализации (РН) по уменьшению количества негативных колоний в монослое клеток Vero [143]. Сыворотки крови перед постановкой РН инактивировали в течение 30 минут при 56 °С. Готовили пятикратные разведения образцов сыворотки (1:5, 1:25, 1:125 и т.д.) в поддерживающей среде культивирования клеток. В качестве тестового разведения ВОО использовали то разведение, которое в объеме 0,1 мл содержало 40 - 60 БОЕ. Разведения сыворотки и ВОО смешивали в равных объемах, инкубировали 1 час при температуре $37,0 \pm 0,5$ °С, вносили по 0,2 мл на монослой клеток Vero в 24-луночных планшетах, добавляли по 0,8 мл поддерживающей среды и культивировали в течение 5 сут в СО₂-инкубаторе. После окончания срока культивирования монослой окрашивали раствором генцианового фиолетового и подсчитывали количество негативных колоний в лунках. За титр антител к ВОО принимали максимальное разведение сыворотки, которое вызывало уменьшение количества БОЕ в монослое клеток Vero более чем на 50 % по сравнению с инфицированным контролем.

2.17 Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку и сравнение результатов осуществляли стандартными методами [5] с помощью пакета компьютерных программ «Statistica 6.0» (StatSoft Inc. 1984-2001) [31] с оценкой достоверности отличий при 5 %-м уровне значимости вероятности ошибки ($p \leq 0,05$) для 95 %-го доверительного уровня (I_{95}). Учитывая биномиальный характер распределения данных из эксперимента по оценки эффективности препа-

ратов, а также в связи с невозможностью подтверждения нормальности распределения экспериментальных данных, для статистического анализа различий между опытной и контрольной группами, принимая во внимание малую выборку ($n=4$ для каждой группы), использовали непараметрический метод - точный тест Фишера [5; 31]. Расчет проводили по следующей формуле (1):

$$p = \frac{\binom{a+b}{a} \binom{c+d}{c}}{\binom{n}{a+c}} = \frac{(a+b)!(c+d)!(a+c)!(b+d)!}{n!a!b!c!d!} \dots\dots(1),$$

где:

p – сумма членов гипергеометрического распределения;

a, b, c, d – наблюдаемые частоты событий (инфицирование/неинфицирование) в сравниваемых группах;

n – количество животных в двух сравниваемых группах;

$!$ – факториал числа.

Расчет ИД₅₀ производили на основании показателей количества инфицированных и погибших животных по методу Спирмена-Кербера [5]. Титры ВОО в органах сурков представлены как среднее значение (M) и 95 %-й доверительный интервал (I_{95}). Для сравнения титров ВОО в органах использовали U-критерий Манна-Уитни и t-критерий Стьюдента [5, 31].

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Экспериментальная оценка чувствительности мышей, сурков, кроликов и мини-свиней к вирусу оспы обезьян

На первом этапе был проведен эксперимент по изучению чувствительности сурков к ВОО. Основанием для включения в экспериментальные исследования сурков явилось то, что в России среди животных семейства беличьих, основные представители которого обладают высокой чувствительностью к ВОО [60, 86, 154], наиболее доступным для нас был именно этот вид животных, который (в отличие от сусликов и луговых собачек) выращивают в специализированных питомниках страны и в процессе этого подвергают ветеринарному контролю, включая тестирование на отсутствие патогенных микроорганизмов и гельминтов. Сурок является одним из самых крупных представителей данного семейства (длина тела сурка может достигать 70 см, а масса - 10 кг) и имеет физиологические показатели (температура тела, частота дыхательных сокращений и частота пульса), близкие к таковым у человека. В связи с тем, что в научной литературе нет информации, касающейся чувствительности сурков к ВОО, был использован инъекционный (п/к) способ заражения для получения общего представления об их восприимчивости к вирусу.

В результате проведенных исследований (таблица 3.1) все испытанные нами дозы патогена (не зависимо от их величины) приводили к появлению у сурков выраженных клинических симптомов заболевания (гипертермия тела, одно- или двусторонний подчелюстной лимфаденит, дискретная оспоподобная сыпь на коже по всей видимой части поверхности тела и слизистых оболочках, серозно-гнойные ринит, конъюнктивит и блефарит, нарушение координации, тремор конечностей, повышенная агрессивность, взъерошенность шерсти) через 7 - 9 сут п.з. (рисунок 3.1). Причем летальный исход у п/к инфицированных сурков был отмечен во всех случаях через 12 – 18 сут п.з. При этом максимальное число погибших животных независимо от их дозы инфицирования было зарегистрировано через 12 сут п.з.

Таблица 3.1 - Данные по чувствительности сурков к вирусу оспы обезьян (штамм V79-1-005) при подкожном (п/к) заражении различными дозами

№ п/п	Доза п/к за- ражения (в lg БОЕ)	Кол-во взя- тых в опыт животных	Кол-во животных с кли- ническими симптомами оспы обезьян / процент	Кол-во павших животных / процент
1	2,5	4	4 / 100	4 / 100
2	4,1	4	4 / 100	4 / 100
3	5,6	4	4 / 100	4 / 100
4	7,1	4	4 / 100	4 / 100



Рисунок 3.1 - Сурок с сыпью на коже лапки через 12 сут после подкожного заражения вирусом оспы обезьян (штамм V79-1-005) в дозе 5,5 lg БОЕ

Учитывая то обстоятельство, что даже испытанные нами самые низкие дозы ВОО вызывали клинические признаки заболевания и гибель у всех сурков при п/к заражении, можно сделать вывод, что величины ИД₅₀ и ЛД₅₀ вируса для этих животных при п/к инфицировании ниже 2,5 lg БОЕ, что свидетельствует о высокой чувствительности этих животных к ВОО.

Однако используемый нами метод заражения (п/к) в вышепредставленном эксперименте не имитирует основные механизмы передачи этой инфекции среди людей (аэрозольный и контактный), реализуемые, как правило, через респираторный тракт во время эпидемических вспышек оспы обезьян [50, 55, 126]. В связи с этим, были проведены исследования по и/н заражению сурков, которые показали, что при данном методе введения ВОО, также как и при п/к инфицировании, эти животные обладали высокой чувствительностью к данному вирусу (таблица 3.2). Дальнейшие эксперименты с использованием этого вида животных и ВОО проводили, применяя только и/н способ введения вируса, как один из вариантов, моделирующих естественный путь инфицирования через респираторный тракт.

Таблица 3.2 - Данные по чувствительности сурков к вирусу оспы обезьян (штамм V79-1-005) при интраназальном (и/н) заражении различными дозами

№ п/п	Доза и/н заражения (в lg БОЕ)	Кол-во взя- тых в опыт животных	Кол-во животных с кли- ническими симптомами оспы обезьян / процент	Кол-во павших жи- вотных / процент
1	-1,8	4	0 / 0	0 / 0
2	0,2	4	0 / 0	0 / 0
3	2,2	4	2 / 50	2 / 50
4	4,2	4	4 / 100	1 / 25
5	5,0	4	4 / 100	1 / 25
6	6,6	2	2 / 100	1 / 50
7	7,8	1	1 / 100	1 / 100

У и/н инфицированных сурков регистрировали целый ряд клинических проявлений, аналогичных описанным в эксперименте по п/к заражению этих животных, которые наблюдали через 7 – 9 сут п.з., а через 13–22 сут п.з. лишь 6 из 13 заболевших сурков погибло. У выживших животных клинические признаки заболевания исчезали через 12 – 18 сут после их появления, при этом на месте расположения оспоподобных сыпозных элементов были образованы рубцы. Следует отметить, что нам не удалось определить ЛД₅₀ ВОО для этих животных, из-за того, что процент летальности у них не зависел

от величины заражающей дозы (таблица 3.2). При этом процент инфицированности сурков, регистрируемый по наличию внешних клинических проявлений заболевания, имел зависимость «доза-эффект», что позволило нам определить ИД₅₀ ВОО у этих животных по фиксации наличия внешних клинических признаков заболевания (ИД₅₀), которая составила 2,2 lg БОЕ.

Первым клиническим признаком заболевания у сурков, вызванного и/н заражением ВОО, было появление достоверно высоких значений температуры тела (при норме $36,5 \pm 0,4$ °C): $38,0 - 40,0$ °C, которые держались в течение 2 - 6 сут, а за 2 - 6 сут до гибели животных она снижалась и за сут до смерти достигала 32°С. Почти одновременно с началом гипертермии у сурков были зарегистрированы одно- или двусторонние подчелюстные лимфадениты. Через 1 – 2 сут от начала гипертермии на теле сурков появилась дискретная оспоподобная сыпь (рисунок 3.2), которая имела различную локализацию и дискретный характер с постепенно сменяющимися форменными элементами: макула, папула, везикула, пустула.



Рисунок 3.2 - Сурок с сыпью на коже через 9 сут после интраназального заражения вирусом оспы обезьян (штамм V79-1-005) в дозе 2,2 lg БОЕ

Через 0 – 2 сут после появления на коже сурков сыпозных элементов у этих животных начинали регистрироваться и другие признаки заболевания: сыпь на слизистых

оболочках ротовой полости и ануса, серозно-гнойные ринит (рисунок 3.3), конъюнктивит и блефарит, нарушение координации, тремор конечностей, повышенная агрессивность и взъерошенность шерсти.



Рисунок 3.3 - Суток с гнойными выделениями из носовой полости через 10 сут после интраназального заражения вирусом оспы обезьян (штамм V79-1-005) в дозе 4,2 lg БОЕ

Кроме этого, и/н способу заражения подвергали и других животных: мыши популяции ICR, кролики и мини-свиньи. Применение аутбредных мышей популяции ICR и кроликов для оценки их чувствительности к ВОО было обосновано тем, что эти животные могли быть инфицированы этим патогеном и/н и другими методами с последующим проявлением некоторых клинических признаков заболевания вплоть до летального исхода [34, 42, 115]. При этом за счет использования неполовозрелых животных этих видов мы попытались смоделировать инфекционный процесс у подавляющего большинства людей детского возраста, оспа обезьян у которых обычно встречается чаще и протекает тяжелее, чем у взрослых людей [79, 103, 112]. Кроме того, аутбредные животные в большей степени, чем инбредные, отражают действительное физиологическое состояние человеческой популяции, которая не является инбредной (межсемейное, межнациональное и межрасовое скрещивание). А также известно, что цент/афр штаммы

ВОО более вирулентны, чем зап/афр штаммы этого патогена [46]. В связи с этим в экспериментах по изучению чувствительности аутбредных мышей и кроликов к ВОО мы взяли именно цент/афр штамм (V79-1-005A) в отличие от зап/афр штамма (COP-58), который был использован некоторыми авторами в экспериментах с этими видами животных [42, 88, 115]. Использование мини-свиней для этих исследований было обусловлено их выраженным сходством (по сравнению с другими видами лабораторных животных) с человеком по анатомии и физиологии сердечно-сосудистой и пищеварительной систем, строению кожи и картам генома клеток [29]. Результаты экспериментов по оценке чувствительности к ВОО подопытных животных при и/н способе заражения представлены в таблице 3.3.

Было отмечено, что и/н инфицирование ВОО не приводило к летальности среди мышей. Тем не менее, начиная с 7-х сут п.з. у них отмечали внешние клинические признаки заболевания (гнойный конъюнктивит, блефарит, взъерошенность шерсти), которые исчезали через 11 - 13 сут п.з. В связи с этим для мышей был определен показатель чувствительности к ВОО (таблица 3.1), который был рассчитан по фиксации наличия внешних клинических признаков заболевания у этих животных ($ID_{50}=4,8 \lg \text{ БОЕ}$ при и/н заражении). У остальных взятых в эксперимент животных (кроликов и мини-свиней) не было выявлено внешних клинических признаков заболевания и тем более летального эффекта при использованных дозах и/н заражения ВОО.

В научной литературе имеются данные об очень высокой чувствительности сусликов, (относящихся к тому же семейству беличьих, что и сурки) при п/к инфицировании цент/афр штаммом ВОО ($ID_{50} = 0,35 \text{ БОЕ}$) [38, 60, 85]. Однако в отличие от сурков у сусликов, и/н инфицированных ВОО в дозе $10^{5,1} \text{ БОЕ}$, наблюдалась существенно раньше и более скудная картина заболевания (анорексия и вялость через 4 - 5 сут п.з.) при отсутствии сыпозных проявлений. При этом летальный эффект у этих животных был отмечен в 100% случаев, тогда как у заболевших сурков после и/н инфицирования ВОО он был зарегистрирован в 25 – 50% случаев (в экспериментах с использованием двух и более животных на дозу вируса) и не зависел от дозы заражения. Кроме того, гибель и/н инфицированных сусликов наступала существенно раньше (через 8 - 9 сут п.з.), чем у сурков (через 13 – 22 сут п.з.).

Таблица 3.3 - Данные биологической активности штамма V79-1-005 вируса оспы обезьян (ВОО) при интраназальном (и/н) заражении различных видов животных

Наименование показателя	Значение показателей у и/н зараженных ВОО подопытных животных:			
	Мышь ICR	Кролик	Мини-свинья	Сурок
ИД ₅₀ * (в lg БОЕ), М (I ₉₅)	4,8 (4,2...5,4)	>4,0**	>5,0** *	2,2 (1,0...3,4)
Клинические признаки заболевания	Гнойный конъюнктивит, блефарит, взъерошенность шерсти	Отсутствуют	Отсутствуют	Гипертермия, подчелюстной лимфаденит, дискретная оспоподобная сыпь на коже по всей видимой части поверхности тела и слизистых оболочках, серозно-гнойные ринит, конъюнктивит и блефарит, нарушение координации, тремор конечностей, повышенная агрессивность, взъерошенность шерсти
<p>Примечания</p> <p>* Величина определена по внешним клиническим проявлениям заболевания</p> <p>** Величина ИД₅₀ превышает максимально используемую дозу заражения кроликов 4,0 lg БОЕ</p> <p>*** Величина ИД₅₀ превышает максимально используемую дозу заражения мини-свиней 5,0 lg БОЕ соответственно</p> <p>М – средняя 50%-я инфицирующая доза</p> <p>(I₉₅) - доверительный интервал для М с вероятностью 95%</p>				

Чувствительность же луговых собачек (семейство беличьих) к ВОО при и/н заражении была достаточно высокой [43, 72, 156], близкой к таковой у сурков, но существенно более низкой, чем у сусликов. Основываясь на экспериментальных данных [72], рассчитанная нами величина ИД₅₀ для луговых собачек составила около 2,9 lg БОЕ. Однако следует отметить, что при использовании (как в нашем случае с сурками) обычного и/н метода заражения около 10 % вирусосодержащего материала должно попасть в ре-

спираторный тракт, судя по результатам исследования на мышах [153]. Если же учесть только количество апплицированного в дыхательном тракте материала при и/н заражении сурков, то ИД₅₀ ВОО для них, определенная путем выявления клинических признаков оспоподобного заболевания, должна быть существенно ниже (например, на 1 lg БОЕ) и, таким образом, составит 1,2 (0,0...2,4) lg БОЕ, что свидетельствует о высокой чувствительности данного вида животных к этому вирусу, близкой к таковой, теоретически определенной для человека (п. 3.5.2).

В то же время более высокое значение ИД₅₀ ВОО у луговых собачек (около 2,9 lg БОЕ), чем у сурков, может быть объяснено как минимум двумя обстоятельствами: действительно более низкой чувствительностью к этому патогену луговых собачек по сравнению с сурками; более низкой чувствительностью клеток слизистой полости носа у этих видов животных по сравнению с первичными клетками-мишенями нижнего отдела респираторного тракта, так как использованный метод и/н инфицирования (аппликация на слизистую носа) луговых собачек [72] был менее эффективным, чем использованный нами метод и/н заражения с точки зрения количества проникшего в этот момент вируса в нижние отделы респираторного тракта. В пользу последнего обстоятельства свидетельствует тот факт, что накопление ВОО у сурков (п. 3.2) началось на много раньше в легких и трахее (через 5 сут п.з.), чем в носу (через 9 сут п.з.), несмотря на то, что инфекционный материал при проведении нами процедуры и/н инфицирования попадал в первую очередь на слизистую носа.

Клинические признаки заболевания у и/н инфицированных ВОО сурков в общем виде напоминали таковые у человека и луговых собачек. При этом процент летальности среди луговых собачек, как и сурков, не зависел от дозы ВОО и находился в диапазоне от 25 до 60%, выраженная же зависимость «доза-эффект» у этих видов животных наблюдалась при регистрации клинических проявлений заболевания. Тем не менее, исследователям [72] удалось, воспользовавшись лишь формулой Reed–Muench, определить ЛД₅₀ для луговых собачек, которая составила $5,9 \times 10^3$ БОЕ.

При п/к же инфицировании ВОО у заболевших сурков, как и у луговых собачек, наблюдали 100%-й летальный эффект. При этом локализация лимфаденита (одно- или двусторонний подчелюстной) у больных сурков была, вероятно, связана с местом п/к введения нами вируса (в холку).

Таким образом, в экспериментах *in vivo* и/н заражение аутбредных мышей только высокими дозами ВОО вызывало у них появление некоторой клинической картины заболевания (гнойный конъюнктивит и блефарит, взъерошенность шерсти), по регистрации которой и была определена величина ИД₅₀ у этих животных (4,8 lg БОЕ). При и/н инфицировании сурков ВОО было зафиксировано появление у них выраженной и обширной симптоматики (гипертермия тела, одно- или двусторонний подчелюстной лимфаденит, дискретная оспоподобная сыпь на коже по всей видимой части поверхности тела и слизистых оболочках, серозно-гнойные ринит, конъюнктивит и блефарит, нарушение координации, тремор конечностей, повышенная агрессивность, взъерошенность шерсти) через 7 – 9 сут п.з., которая исчезала у выживших животных через 19 – 25 сут п.з. При этом через 13 – 22 сут п.з. часть заболевших сурков (25 – 50%) погибла в экспериментах с использованием двух и более животных на заражающую дозу вируса независимо от ее величины, а процент инфицированности сурков, регистрируемый по наличию внешних клинических проявлений заболевания, имел четкую зависимость «доза-эффект». Величина ИД₅₀ для сурков при и/н заражении ВОО, определенная на основании данных по регистрации у них клинической картины заболевания, составила 2,2 (1,0...3,4) lg БОЕ. У заболевших сурков после п/к инфицирования вирусом в диапазоне доз от 2,6 до 7,1 lg БОЕ отмечена выраженная клиническая симптоматика, аналогичная той, которая наблюдалась у сурков при и/н заражении, и 100%-й летальный эффект через 12 – 18 сут п.з., а у взятых в эксперименты кроликов и мини-свиней при и/н заражении патогеном в испытанных дозах, в том числе и максимальных (4,0 и 5,0 lg БОЕ соответственно), не было обнаружено внешних клинических признаков заболевания и тем более летального эффекта.

Учитывая результаты, полученные по относительно высокой чувствительности сурков к ВОО *in vivo*, в дальнейшей экспериментальной работе, связанной с разработкой модельных видов животных для оспы обезьян, мы использовали именно сурков.

3.2 Распространение вируса оспы обезьян в организме сурков

Учитывая, что сурки по результатам регистрации клинической картины заболевания проявляли высокую чувствительность к ВОО при и/н заражении (п. 3.1), в дальнейшей работе мы использовали именно этот вид животных для изучения диссеминации

данного патогена в их организме после и/н инфицирования с целью сравнения с таковой у существующих модельных видов животных для оспы обезьян.

На первом этапе была изучена динамика накопления ВОО в органах, тканях и сыворотке крови сурков через 2, 3, 5, 7, 9 и 12 сут после и/н заражения дозой вируса 3,7 lg БОЕ, результаты этих экспериментов представлены в таблице 3.4.

Из данных таблицы 3.4 видно, что в ряде органов и тканей сурков наблюдалось явное размножение ВОО, что подтверждается следующими обстоятельствами:

- полным отсутствием вируса во всех исследованных органах и тканях, даже в респираторном тракте, на начальном этапе (через 2 и 3 сут) после и/н заражения сурков ВОО в дозе 3,7 lg БОЕ и появлением его в низких и высоких концентрациях в последующем (через 5, 7, 9 и 12 сут п.з.) в ряде органов и тканей этих животных;

- нарастанием концентрации вируса в некоторых органах сурков (в бифуркационных лимфоузлах через 5, 7 и 9 сут п.з. и в коже через 9 и 12 сут п.з.);

- существенным превышением (в 10 - 10000 раз) количества вируса в ряде органов сурков (трахея, легкие, нос, бифуркационные л/у, двенадцатиперстная кишка, кожа) через некоторые промежутки времени после их заражения (5, 7, 9 и 12 сут) такового, вводимого суркам при и/н заражении, если произвести пересчет зарегистрированной концентрации вируса в 5%-х гомогенатах органов животных на соответствующий орган.

Через 2 и 3 сут п.з. возбудитель заболевания не был обнаружен ни в одном из взятых биоматериалов от сурков. И только через 5 сут п.з. вирус впервые был зарегистрирован сразу в двух первичных органах-мишенях (трахея и легкие), а также в бифуркационных лимфоузлах. В этих органах вирус выявлялся в нашем эксперименте длительное время: с 5-х по 12-е сут п.з. В селезенке патоген был обнаружен только через 7 сут п.з. и то в низкой концентрации (1,3 lg БОЕ/мл), а в последующие сроки уже не выявлялся в этом органе. Через 9 сут п.з. ВОО был зарегистрирован не только в легких и трахее, но и в носовой перегородке со слизистой, головном мозге, двенадцатиперстной кишке, надпочечниках и коже. Причем через 12 сут п.з. в головном мозге и двенадцатиперстной кишке вирус перестал выявляться. В это же время мы наблюдали и существенное снижение концентрации патогена в носовой перегородке со слизистой, тогда как величина этого показателя в коже сурков, наоборот, достигла высокого уровня.

Таблица 3.4 - Динамика накопления штамма V79-1-005 вируса оспы обезьян (ВОО) в биоматериалах* от сурков, интраназально инфицированных дозой 3,7 lg БОЕ

Вид биоматериалов от сурков	Концентрация ВОО (lg БОЕ/мл, М (I ₉₅) для n=4) в биоматериале от сурков** через различное время (сут) после заражения:					
	2	3	5	7	9	12
Клетки крови	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4
Сыворотка	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4
Носовая перегородка со слизистой	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	6,7 (6,6...6,8)	2,6 (2,3...2,9)
Головной мозг	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	1,6 (1,0...2,2)	<0,4
Трахея	<0,4	<0,4	6,5 (6,2...6,8)	1,7 (1,6...1,8)	2,9 (2,8...3,0)	4,5 (4,4...4,6)
Бифуркационные лимфоузлы	<0,4	<0,4	2,0 (1,9...2,1)	3,1 (2,8...3,4)	3,9 (3,6...4,2)	2,5 (2,4...2,6)
Легкие	<0,4	<0,4	6,5 (6,2...6,8)	5,9 (5,6...6,2)	3,2 (2,9...3,5)	6,5 (6,4...6,6)
Печень	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4
Селезенка	<0,4	<0,4	<0,4	1,3 (1,2...1,4)	<0,4	<0,4
Поджелудочная железа	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4
Мезентериальные лимфоузлы	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4
Двенадцатиперстная кишка	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	3,8 (3,5...4,1)	<0,4
Почки	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4
Надпочечники	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	1,6 (1,3...1,9)	1,4 (0,8...2,0)
Кожа	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	3,0 (2,9...3,1)	6,6 (6,3...6,9)

Примечания

* Органы и ткани в составе 10%-х (по объему) гомогенатов, а также сыворотка крови

** Гомогенаты органов и тканей каждой временной точки получены от 1 животного

n – количество повторов титрования гомогенатов органов и тканей животных

М – средняя величина концентрации вируса, рассчитанная для каждого биоматериала по данным 4-кратного повторения титрования

(I₉₅) - 95% доверительный интервал для М с вероятностью 95%

<0,4 - величина ниже порога чувствительности (0,4 lg БОЕ/мл) использованного метода титрования

Органами и тканями максимального накопления ВОО являются легкие (через 5 и 12 сут п.з.), трахея (через 5 сут п.з.) и слизистая оболочка полости носа (через 9 сут п.з.) и кожа (через 12 сут п.з.). В то же время во все сроки исследования в клетках и сыворотке крови, печени, поджелудочной железе, мезентериальных лимфоузлах и почках ВОО вообще не удалось обнаружить при проведении использованного нами метода титрования. Дополнительно было проведено изучение показателей накопления ВОО в органах и тканях некоторых сурков, павших в эксперименте, связанном с п/к их заражением дозами вируса 7,1 lg БОЕ (три животных) и 5,6 lg БОЕ (два животных). Результаты этих экспериментов представлены в таблицах 3.5 и 3.6.

Из данных таблиц 3.5 и 3.6 видно, что накопление ВОО наблюдается в той или иной степени практически во всех исследованных органах и тканях погибших сурков. Данный факт подтверждается тем, что величины концентраций вируса во многих органах и тканях этих животных существенно превышают использованные нами дозы их заражения при пересчете на грамм массы сурков (2,3 и 3,8 lg БОЕ/г). Причем наибольшие концентрации этого патогена были обнаружены в носовой перегородке со слизистой, трахее, легких, почках, паховых и подмышечных лимфоузлах, яичках или яичниках и в кусочках кожи с оспинами ($\geq 5,7$ lg БОЕ/мл). Средние значения этого показателя (от 4,0 до 5,7 lg БОЕ/мл) отмечались в ряде случаев у сурков в головном мозге, поджелудочной железе, поднижнечелюстных и брыжеечных лимфоузлах, а самые низкие были зарегистрированы у этих животных в сердце, печени и селезенке ($< 4,0$ lg БОЕ/мл).

В первом эксперименте с сурками мы применяли и/н способ инфицирования ВОО сурков, который связан с первичным попаданием инфекционного материала в респираторный тракт, как это обычно наблюдается во время эпидемических вспышек этого заболевания. При этом мы ожидали обнаружить первичное размножение ВОО во всех органах дыхательного тракта, однако данный возбудитель был зарегистрирован только в трахее и легких, а в слизистой оболочке полости носа не выявлялся на начальном этапе развития инфекции (таблица 3.4). Примечательно то, что через 5 сут п.з., то есть в то же время, что в легких и трахее, ВОО появляется в бифуркационных лимфоузлах.

Таблица 3.5 - Данные по накоплению штамма V79-1-005 вируса оспы обезьян (ВОО) в биоматериалах* от павших сурков после подкожного (п/к) заражения дозой 7,1 lg БОЕ

Вид биоматериалов от сурков	Концентрации вируса в lg БОЕ/мл (М (I ₉₅) для n=4) в биоматериалах от следующих сурков**:		
	№ 1	№ 2	№ 3
Головной мозг	5,1 (5,0...5,2)	4,8 (4,7...4,9)	3,7 (3,5...3,9)
Носовая перегородка со слизистой	>5,7	4,5 (4,4...4,6)	>5,7
Трахея и с участком ее бифуркации	>5,7	>5,7	4,8 (4,7...4,9)
Легкие	>5,7	4,9 (4,8...5,0)	4,1 (4,0...4,2)
Сердце	2,6 (1,9...3,3)	<0,4	1,0 (0,7...1,3)
Печень	2,6 (2,1...3,1)	<0,4	<0,4
Селезенка	<0,4	<0,4	2,0 (1,5...2,5)
Поджелудочная железа	4,8 (4,7...4,9)	<0,4	3,2 (2,8...3,6)
Почка	4,3 (4,1...4,5)	4,3 (4,2...4,4)	>5,7
Поднижнечелюстные лимфоузлы	4,2 (3,8...4,6)	<0,4	4,1 (3,8...4,4)
Подмышечные лимфоузлы	5,7 (5,6...5,8)	1,5 (1,2...1,8)	4,9 (4,7...5,1)
Паховые л/у	<0,4	4,9 (4,7...5,1)	>5,7
Брыжеечные лимфоузлы	<0,4	2,7 (2,4...3,0)	4,7 (4,6...4,8)
Яичко или яичник	<0,4	>5,7	>5,7
Кусочек кожи с оспинкой	>5,7	>5,7	>5,7
<p>Примечания</p> <p>* Органы и ткани в составе 10%-х (по объему) гомогенатов</p> <p>** Гомогенаты органов и тканей каждой временной точки получены от 1 животного</p> <p>n – количество повторов титрования гомогенатов органов и тканей животных</p> <p>М – средняя величина концентрации вируса, рассчитанная для каждого биоматериала по данным 4-кратного повторения титрования</p> <p>(I₉₅) - доверительный интервал для М с вероятностью 95%</p> <p><0,4 - величина ниже порога чувствительности (0,4 lg БОЕ/мл) использованного метода титрования</p> <p>>5,7 – в случаях, когда при титровании в максимально взятом нами разведении гомогената (1:1000) количество БОЕ в клеточном монослое превышало 50, использовали значение >5,7 lg БОЕ/мл</p>			

Таблица 3.6 - Данные по накоплению штамма V79-1-005 вируса оспы обезьян (ВОО) в биоматериалах* от павших сурков после подкожного (п/к) заражения дозой 5,6 lg БОЕ

Вид биоматериалов от сурков	Концентрации вируса в lg БОЕ/мл (М (I ₉₅) для n=4) в биоматериалах от следующих сурков**:	
	№ 5	№ 6
Головной мозг	1,5 (1,0...2,0)	<0,4
Носовая перегородка со слизистой	5,1 (4,7...5,5)	>5,7
Трахея и с участком ее бифуркации	3,2 (3,1...3,3)	5,0 (4,7...5,3)
Легкие	5,0 (4,7...5,3)	>5,7
Сердце	<0,4	1,5 (1,1...1,9)
Печень	<0,4	3,6 (3,1...4,1)
Селезенка	<0,4	<0,4
Поджелудочная железа	<0,4	2,6 (2,3...2,9)
Почка	<0,4	3,0 (2,9...3,1)
Поднижнечелюстные лимфоузлы	3,0 (2,8...3,2)	5,1 (4,8...5,4)
Подмышечные лимфоузлы	<0,4	<0,4
Паховые л/у	3,1 (2,6...3,6)	4,0 (3,7...4,3)
Брыжеечные лимфоузлы	<0,4	<0,4
Яичко или яичник	5,2 (4,7...5,7)	>5,7
Кусочек кожи с оспинкой	>5,7	>5,7
<p>Примечания</p> <p>* Органы и ткани в составе 10%-х (по объему) гомогенатов</p> <p>** Гомогенаты органов и тканей каждой временной точки получены от 1 животного</p> <p>n – количество повторов титрования гомогенатов органов и тканей животных</p> <p>М – средняя величина концентрации вируса, рассчитанная для каждого биоматериала по данным 4-кратного повторения титрования</p> <p>(I₉₅) - доверительный интервал для М с вероятностью 95%</p> <p><0,4 - величина ниже порога чувствительности (0,4 lg БОЕ/мл) использованного метода титрования</p> <p>>5,7 – в случаях, когда при титровании в максимально взятом нами разведении гомогената (1:1000) количество БОЕ в клеточном монослое превышало 50, использовали значение >5,7 lg БОЕ/мл</p>		

По-видимому, диссеминация ВОО в организме сурков сначала происходит по лимфогенному пути с вовлечением бифуркационных лимфоузлов, где осуществляется несколько циклов его размножения, а затем при поступлении лимфы в венозный кровоток – и по гематогенному пути распространения инфекции, тем более, что с помощью метода электронной микроскопии нам удалось зафиксировать признаки размножения патогена в эндотелиоцитах кровеносных капилляров (п. 3.4).

В первом эксперименте с сурками мы применяли и/н способ инфицирования ВОО сурков, который связан с первичным попаданием инфекционного материала в респираторный тракт, как это обычно наблюдается во время эпидемических вспышек этого заболевания. При этом мы ожидали обнаружить первичное размножение ВОО во всех органах дыхательного тракта, однако данный возбудитель был зарегистрирован только в трахее и легких, а в слизистой оболочке полости носа не выявлялся на начальном этапе развития инфекции (таблица 3.4). Примечательно то, что через 5 сут п.з., то есть в то же время, что в легких и трахее, ВОО появляется в бифуркационных лимфоузлах. По-видимому, диссеминация ВОО в организме сурков сначала происходит по лимфогенному пути с вовлечением бифуркационных лимфоузлов, где осуществляется несколько циклов его размножения, а затем при поступлении лимфы в венозный кровоток – и по гематогенному пути распространения инфекции, тем более, что с помощью метода электронной микроскопии нам удалось зафиксировать признаки размножения патогена в эндотелиоцитах кровеносных капилляров (п. 3.4). При этом нам не удалось обнаружить ВОО ни в сыворотке крови, ни в форменных ее элементах с помощью использованного метода титрования (минимальный предел обнаружения вируса - 0,4 lg БОЕ/мл). Эти обстоятельства указывают на возможное присутствие вируса в крови у сурков в предельно малом количестве, но видимо, достаточном для заражения вторичных органов-мишеней. Наличие вируса в минимальных концентрациях в крови подтверждается отсутствием одновременного инфицирования большинства вторичных органов, имеющих чувствительные клетки к этому патогену: так, у сурка, эвтаназированного через 7 сут п.з., вирус обнаруживался только в селезенке; у сурка, эвтаназированного через 9 сут п.з., вирус обнаруживался в головном мозге, двенадцатиперстной кишке, слизистой оболочке полости носа, надпочечниках и коже; а у сурка, эвтаназированного через 12 сут п.з., вирус обнаруживался в слизистой оболочке полости носа, надпочечниках и коже. Такая хаотичность инфицирования вторичных органов-мишеней свидетельствует о наличии эле-

мента случайности попадания в них патогена, что может быть обусловлено присутствием вируса в крови в предельно низкой концентрации или его распространением по разветвленной глубокой и поверхностной сети лимфатических сосудов из легких и трахеи в другие части организма, в том числе в кожу и слизистую оболочку носовой полости.

В образцах крови, взятых у луговых собачек, также относящихся к семейству беличьих, как сурки, через 3, 6, 9, 12, 15, 18 и 21 сут после и/н заражения штаммом МРХV-2003-358 бассейна реки Конго ВОО в дозе 4,5 lg БОЕ, выявляли ДНК вируса в низких концентрациях [43]. При этом накопление же жизнеспособного вируса в органах и тканях было изучено только у одной погибшей луговой собачки через 13 сут после и/н заражения этим штаммом. В сыворотке крови у данного животного был обнаружен вирус в высокой концентрации (> 6 lg БОЕ/мл), тогда как в других экспериментах [72] у луговой собачки, погибшей через 11 сут после и/н заражения относительно низкой дозой того же штамма ВОО (2,9 lg БОЕ или 1 ИД₅₀, рассчитанная нами), вирус в крови не удалось зарегистрировать. Кроме того, при увеличении дозы заражения (3,9 lg БОЕ или 10 ИД₅₀, рассчитанные нами) лишь у 50% погибших животных этого вида был обнаружен патоген в крови. В наших же экспериментах у заболевших сурков после и/н инфицирования ВОО в дозе 3,7 lg БОЕ не удалось зарегистрировать во всех случаях (в динамике инфекционного процесса) вирус в сыворотке и форменных элементах крови. Некоторое несоответствие наших данных, полученных на сурках, результатам исследований, выполненных на луговых собачках, вероятно, связано с различиями использованных в экспериментах штаммов вируса, инфицирующих доз и видов животных. Кроме того, в отличие от исследований, представленных в вышеупомянутых статьях [43; 72], в нашей работе изучение размножения ВОО в органах и тканях сурков осуществлялось не у погибших, а у эвтаназированных животных в разные сроки после их и/н инфицирования. В то же время как у луговых собачек, так и у сурков, павших после внутрикожного и п/к (соответственно) заражения ВОО, большие концентрации вируса обнаруживались во многих исследованных органах и тканях (таблицы 3.5 и 3.6).

Факт размножения вируса не только в органах дыхательной системы сурков, но и в других висцеральных органах после респираторного заражения ВОО согласуется с таковым у человека и модельных видов животных [14, 59, 60] и свидетельствует о генерализованном течении заболевания, в общем виде напоминающем и другие особо опасные

инфекции (Марбург, Эбола и венесуэльский энцефаломиелит лошадей), вызванные путем аэрозольного заражения экспериментальных животных [12, 27, 35].

К сожалению, в доступной литературе не представлено данных о накоплении ВОО в органах и тканях больного человека для того, чтобы сравнить их с результатами наших экспериментальных исследований, проведенных на сурках. Имеется лишь информация о количестве вирусных геномных копий (несколько миллионов) в кожных оспинах больных людей [79]. При этом сходное количество вирусных частиц в этой ткани было обнаружено и у сурков: 7,3 lg БОЕ (6,6 lg БОЕ/мл в 5 мл гомогената кожной оспины). Кроме того, если исходить из соображений, что у человека клиническая картина и патогенез оспы обезьян воспроизводят натуральную оспу с обычным клиническим типом [61], то у больных людей таким типом натуральной оспы практически не удавалось уловить виремию: крайне редко вирус выделяли из крови в продромальном периоде и в ранней стадии высыпания [1, 14, 133]. В экспериментах на сурках мы также не обнаруживали возбудителя заболевания в крови в выбранные сроки забора этой ткани (2, 3, 5, 7, 9 и 12 сут п.з.). Наличие ВНО в носоглотке и зеве у людей регистрировали не только с момента появления клинической симптоматики [15, 148, 162], но и во второй половине инкубационного периода заболевания [163], и в стадии реконвалесценции [135]. Аналогичные результаты по выделению вируса из слизистой носа (носовая перегородка со слизистой) были получены в экспериментах на и/н инфицированных сурках в период появления клинической симптоматики (таблица 3.4).

Таким образом, результаты исследований по изучению динамик накопления ВОО по органам и тканям сурков при заражении через респираторный тракт (и/н) дозой 3,7 lg БОЕ подтвердили совпадение в ряде случаев с некоторыми известными показателями инфекционного процесса у человека при оспе обезьян и натуральной оспе: генерализованная инфекция, накопление вируса в кожных оспинах (включая величину его концентрации), низкая вероятность выявления вируса в крови при титровании и накопление его в слизистой оболочке полости носа. При этом факт размножения вируса не только в органах дыхательной системы сурков, но и в других висцеральных органах согласуется с таковым у человека и некоторых модельных видов животных для оспы обезьян. Определены органы первичного размножения вируса: легкие с трахеей, а также основной механизм распространения патогена в организме этих животных, в том числе от первичных органов-мишеней: лимфогенный с его размножением в органах лимфатической си-

стемы. Показано, что органами максимального накопления патогена у сурков, и/н инфицированных вирусом, являются легкие с трахеей, нос (носовая перегородка со слизистой) и кожа, где в ряде случаев концентрация вируса превышала 6 lg БОЕ/мл, выраженное размножение вируса отмечено у инфицированных животных в двенадцатиперстной кишке и бифуркационных лимфоузлах, достигающее концентраций 3 - 4 lg БОЕ/мл. У павших сурков после п/к инфицирования вирусом в дозах 5,6 и 7,1 lg БОЕ накопление патогена в наиболее высоких концентрациях ($\geq 5,7$ lg БОЕ/мл) зарегистрировано в носу (носовая перегородка со слизистой), трахее, легких, почках, паховых и подмышечных лимфоузлах, яичках или яичниках и в кусочках кожи с оспинами, средние значения этого показателя (от 4,0 до 5,7 lg БОЕ/мл) отмечены в головном мозге, поджелудочной железе, поднижнечелюстных и брыжеечных лимфоузлах, а самые низкие величины концентраций БОО ($< 4,0$ lg БОЕ/мл) - в сердце, печени и селезенке.

3.3 Патоморфологические изменения у сурков, инфицированных вирусом оспы обезьян

Учитывая то обстоятельство, что у сурков при респираторном заражении БОО (штамм V79-1-005), также как и людей, наблюдается генерализованный инфекционный процесс, начинающийся с респираторного тракта с последующим подключением других висцеральных органов (п. 3.3), в дальнейшей работе мы провели изучение патоморфологических изменений в организме этого вида животных после и/н инфицирования данным возбудителем заболевания с целью выявления степени их сходства с таковыми у человека и существующих модельных видов животных.

Для осуществления патоморфологического изучения органов и тканей от инфицированных БОО сурков необходимо было провести процедуру выноса их фрагментов из заразной зоны ЛСК-4 (корпус №6) в чистую. В связи с этим нами была отработана методология приготовления таких фрагментов, описанная в пункте 2.8 и в разработанных нами в связи с этим методических указаний (МУ 1.3.3103-13) [17] и инструкции «по порядку подготовки, дезинфекции и выноса из заразной зоны ЛСК-4 (корпус 6) фрагментов органов и мазков органов, полученных от инфицированных вирусом оспы обезьян модельных животных, а также культур клеток», которая при исследовании на остаточ-

ную инфекционность обеспечивала гарантированную инактивацию ВОО в этих биоматериалах.

Используя переданные в чистую зону фрагменты органов и тканей от инфицированных ВОО сурков, было проведено их световое и электронно-микроскопическое изучение. При этом у данных животных было показано развитие патологических изменений во многих органах и тканях, начиная с 7-х сут после и/н заражения, а также у погибших сурков после п/к и и/н инфицирования. Эти изменения были связаны с тяжестью клинических проявлений и не коррелировали с дозой и/н инфицирования (2,2 и 7,8 lg БОЕ) и п/к (2,5; 4,1; 5,6 и 7,1 lg БОЕ). В отделах респираторной системы самым заметным было деструктивное изменение эпителиальной выстилки, связанное с активным размножением вируса в клетках и развитием процесса воспаления. Повреждения усиливались миграцией в эти области иммунокомпетентных клеток. Обращали на себя внимание полиморфные изменения эндотелия сосудов, включавшие апоптозные явления и некроз. Эндотелиальные клетки в состоянии апоптоза характеризовались резким уплотнением и распадом ядер (кариопикноз и кариорексис), а также редукцией цитоплазматических структур. Размеры митохондрий в сохраненных фрагментах цитоплазмы эндотелия часто были увеличены, однако сохранялись форма и параллельное расположение крист. Наиболее часто вирусные частицы определялись в цитоплазме эпителиоцитов, макрофагов, эндотелиоцитов, плазмоцитов. Примечательно, что вирусные частицы, находящиеся в пределах цитоплазмы одной клетки, отличались по степени морфологической зрелости, что свидетельствовало о репродукции вируса в пределах каждого из перечисленных клеточных типов (рисунки 3.4, 3.5, 3.6, 3.7). В цитоплазме эндотелиоцитов, находящихся в состоянии некроза, выявлялось большое количество вирусных частиц на различной стадии зрелости (рисунок 3.8). Кроме того, в альвеолярном просвете часто регистрировали плеоморфные вирусные частицы (рисунок 3.9).

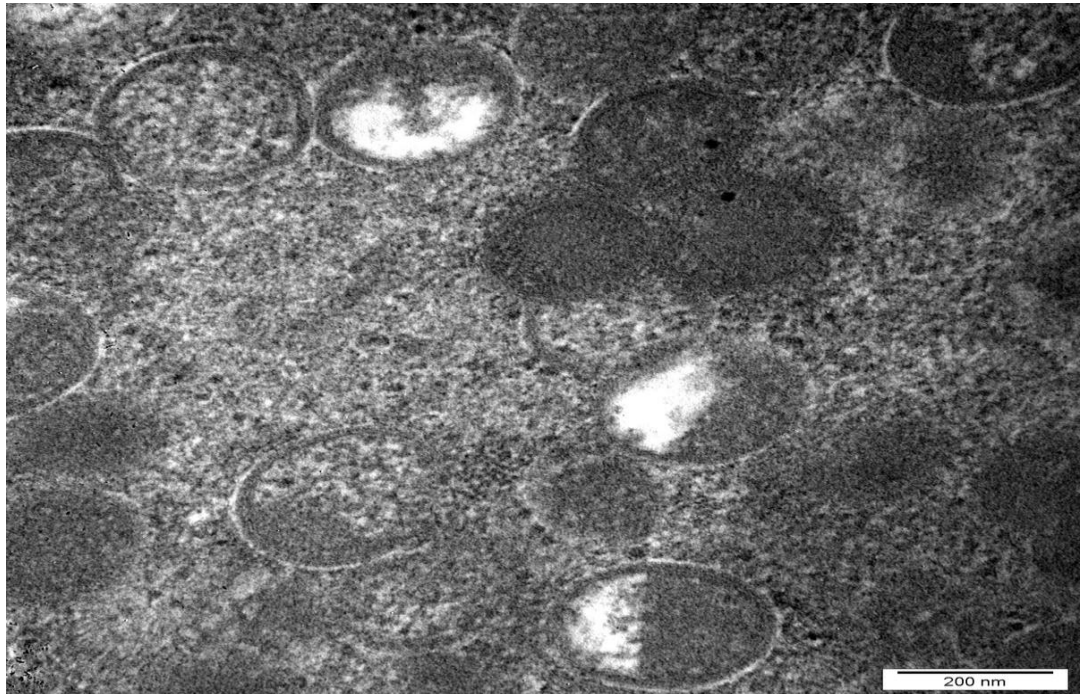


Рисунок 3.4 – Трансмиссионная электронная микроскопия, цитоплазма реснитчатого эпителиоцита трахеи с вироплазмой (вирусных частиц различной степени зрелости) у сурка через 7 сут после интраназального заражения дозой 3,7 lg БОЕ штамма V79-1-005 вируса оспы обезьян

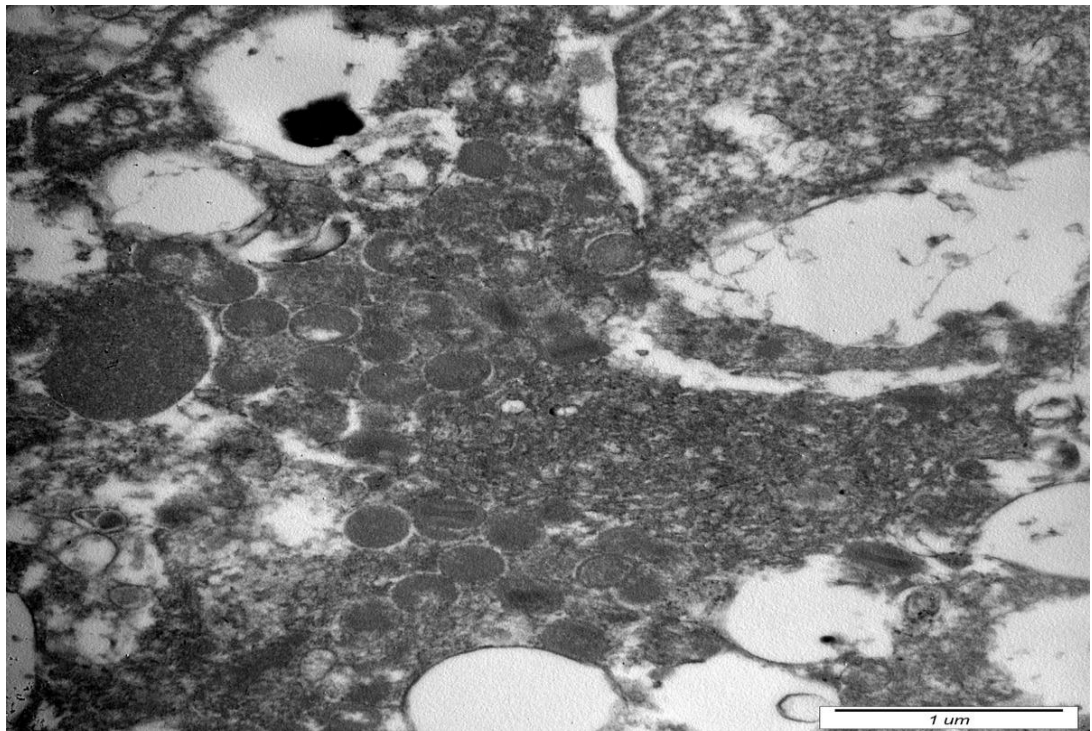


Рисунок 3.5 – Трансмиссионная электронная микроскопия, макрофаг с вирусными частицами в цитоплазме у сурка через 7 сут после интраназального заражения дозой 3,7 lg БОЕ штамма V79-1-005 вируса оспы обезьян

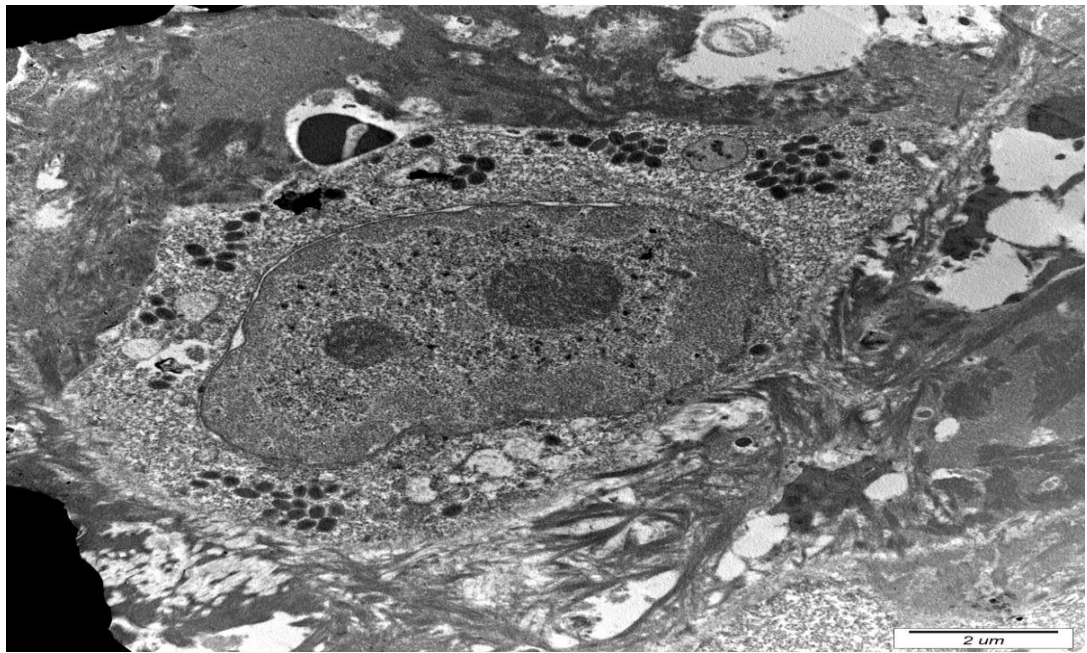


Рисунок 3.6 – Трансмиссионная электронная микроскопия, альвеолоцит, в цитоплазме которого групповые скопления вирусных частиц, перицеллюлярное скопление фибрина, у сурка через 9 сут после интраназального заражения дозой 3,7 lg БОЕ штамма V79-1-005 вируса оспы обезьян

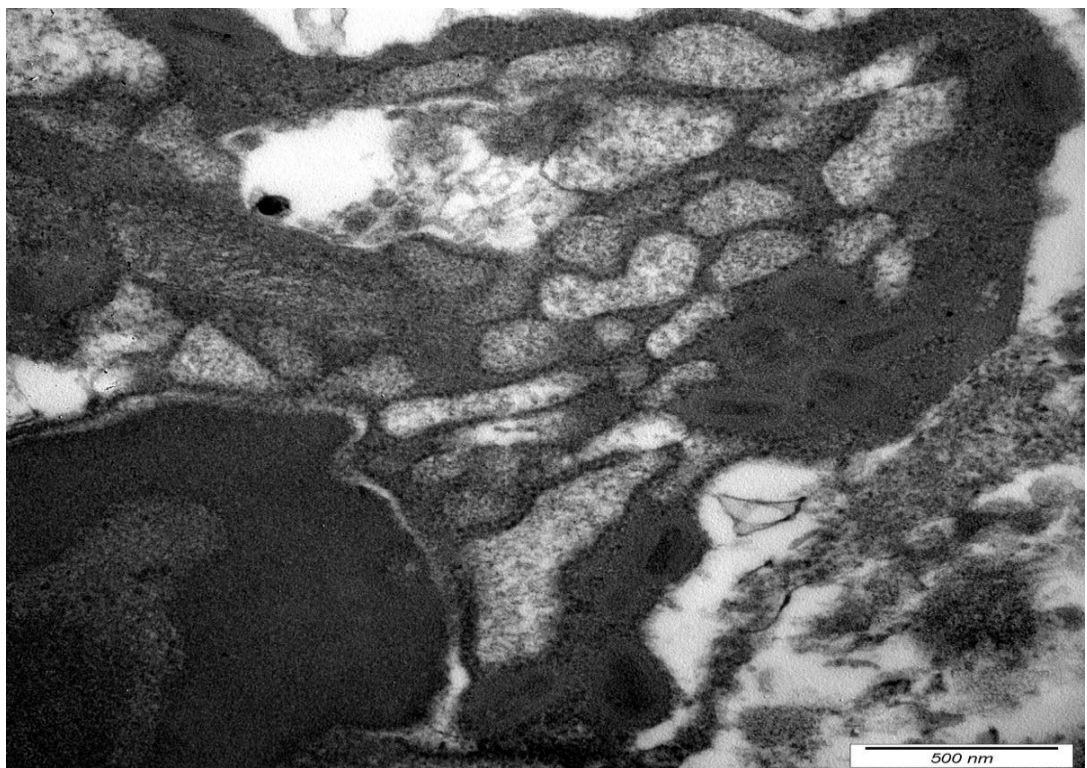


Рисунок 3.7 – Трансмиссионная электронная микроскопия, плазмоцит, содержащий формирующиеся вирионы, у сурка через 12 сут после интраназального заражения дозой 3,7 lg БОЕ штамма V79-1-005 вируса оспы обезьян

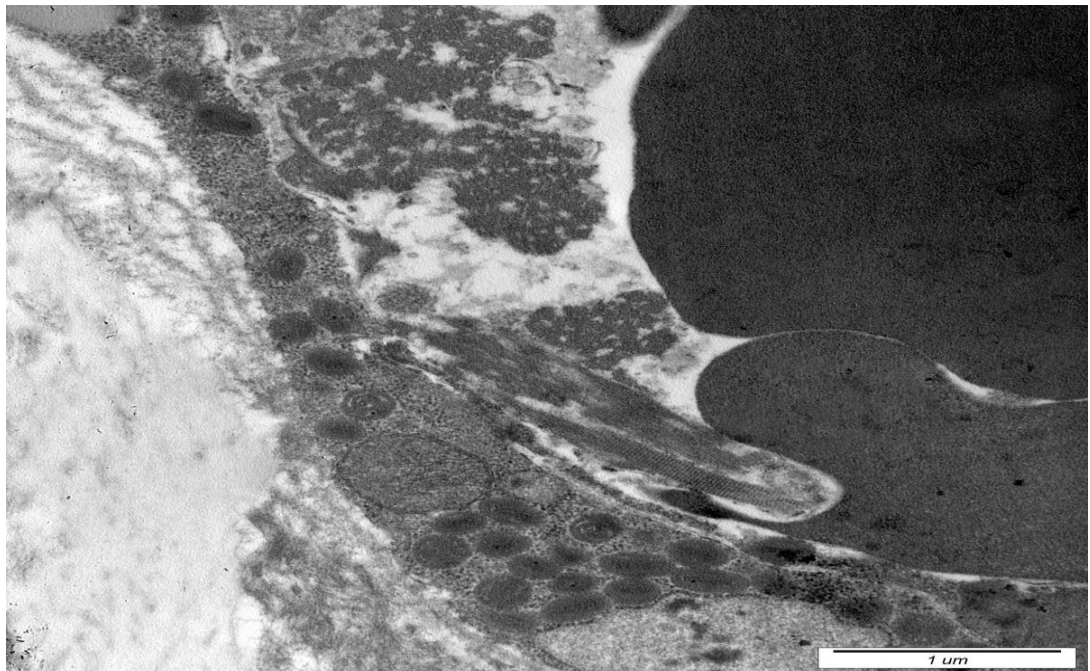


Рисунок 3.8 – Трансмиссионная электронная микроскопия, фрагмент стенки капилляра собственной пластинки слизистой оболочки трахеи: эритроцит и волокна фибрина в просвете капилляра, полиморфизм вирусных частиц, локализованных в цитоплазме эндотелиоцита, у сурка через 9 сут после интраназального заражения дозой 3,7 lg БОЕ штамма V79-1-005 вируса оспы обезьян

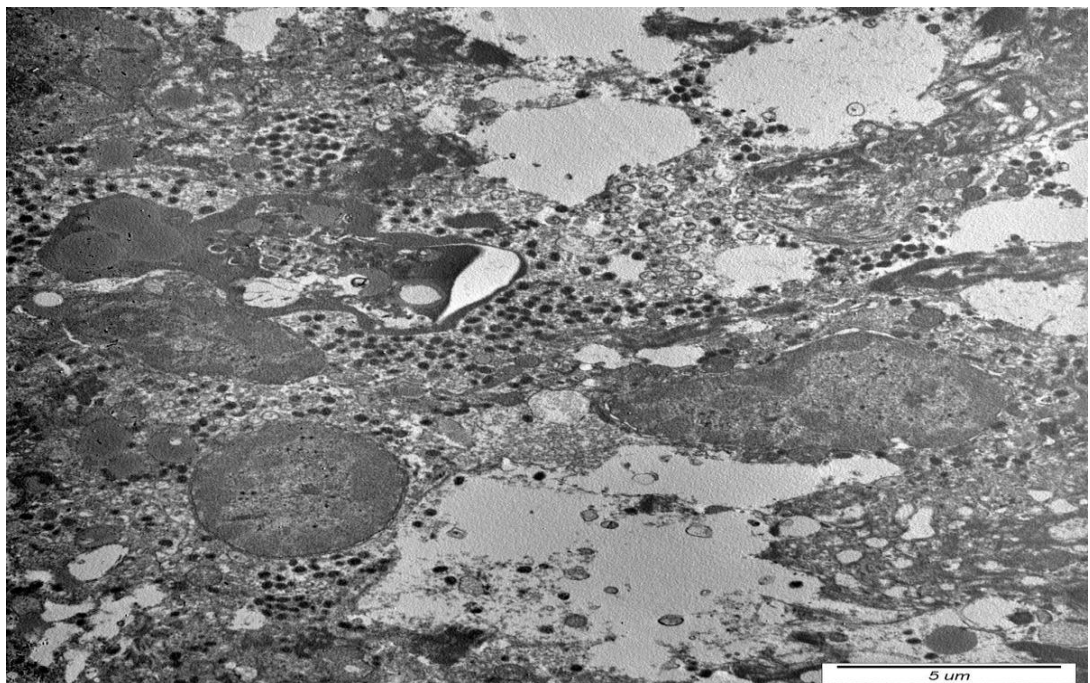


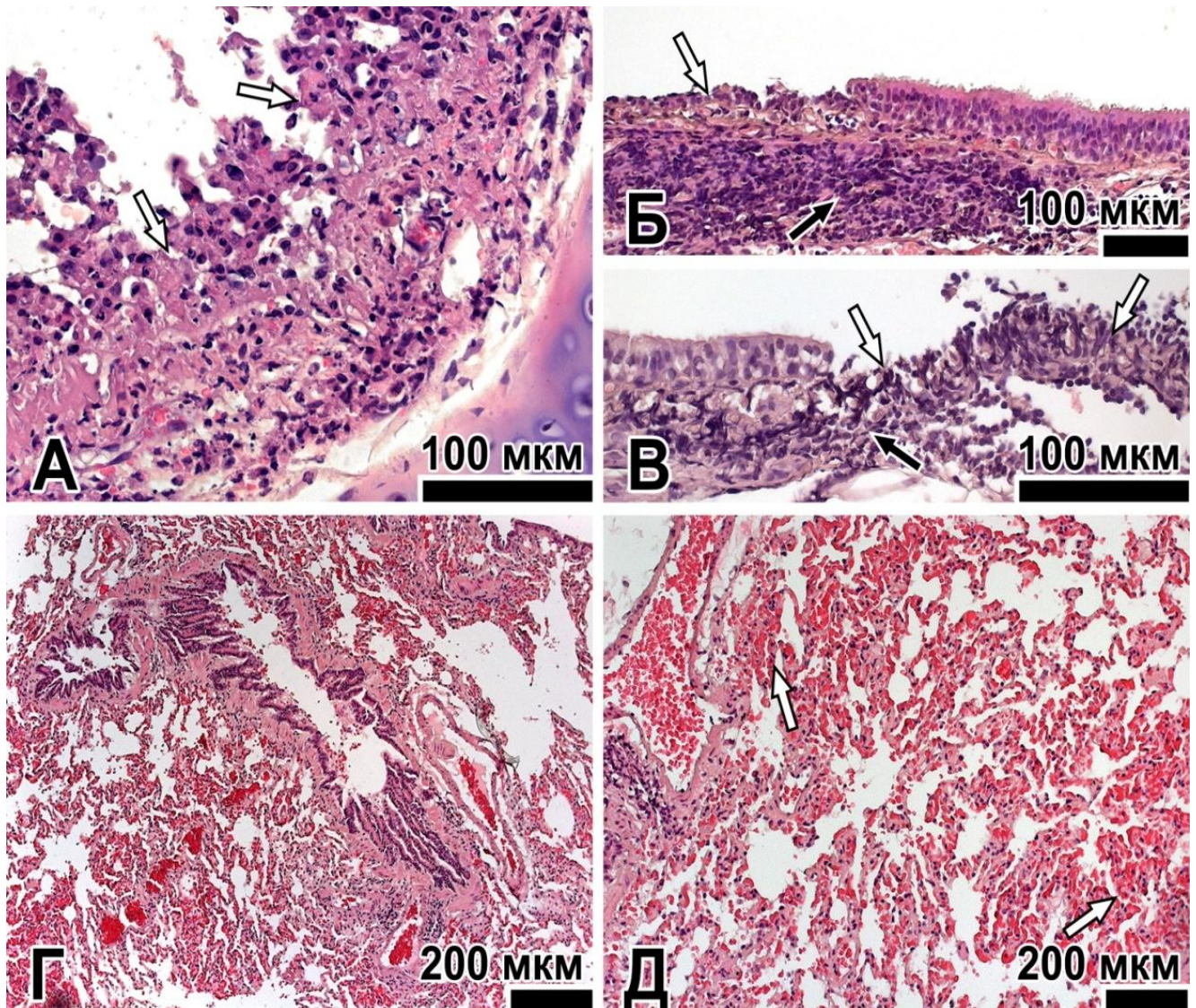
Рисунок 3.9 – Трансмиссионная электронная микроскопия, альвеолы в просвете, которых плеоморфные вирусные частицы, у сурка через 9 сут после интраназального заражения дозой 3,7 lg БОЕ штамма V79-1-005 вируса оспы обезьян

Кроме вышеперечисленных клеток-мишеней для ВОО, в организме инфицированных сурков размножение вируса было зарегистрировано и в других типах клеток (например, в фибробластах, ретикулярных и гладкомышечных клетках).

В слизистой оболочке носовой полости и трахеи инфицированных сурков отмечали выраженные очаги некроза (рисунки 3.10А,Б,В). Важным элементом в развитии патологического процесса при заражении сурков ВОО являлись нарушения микроциркуляции в виде развития стаза и сладжа эритроцитов в капиллярах, внутрисосудистого гемолиза эритроцитов, формирования тромбов. Все это позволяло предположить, что в развитии летального заболевания играет важную роль тромбогеморрагический синдром (рисунки 3.10Г,Д).

Одним из основных органов-мишеней при инфицировании ВОО являлась кожа, где наблюдалась интенсивная воспалительная реакция. Обильный полиморфноклеточный инфильтрат нередко захватывал всю глубину органа, и патологический процесс имел выраженную тенденцию к некротизации (рисунки 3.11А,Б).

В селезенке наиболее типичной находкой являлись гиперплазия фолликулов и локальные некрозы. Вместе с тем следует отметить, что наряду с гиперплазией фолликулов и очагами некрозов, у некоторых животных встречались обширные зоны, где фолликулы отсутствовали полностью (рисунок 3.12А). У всех и/н инфицированных сурков (начиная с 7-х сут п.з.) и погибших после п/к и и/н заражения наблюдалась в той или иной степени выраженная некротизация паренхимы тимуса (в одном случае тотальная) (рисунок 3.12Б) и лимфоузлов (рисунок 3.12В). При тотальном некрозе ткани тимуса визуальная идентификация структур паренхимы этого органа была в значительной степени затруднена и проводилась по остаточным профилям синусоидных сосудов и окружающих элементов ретикулярной стромы. В печени часто присутствовали очаги инфильтрации мононуклеарами. В почках на фоне умеренно выраженного отека интерстиции наблюдали крупные полиморфноклеточные инфильтраты, зачастую располагавшиеся под капсулой (рисунок 3.12Г).



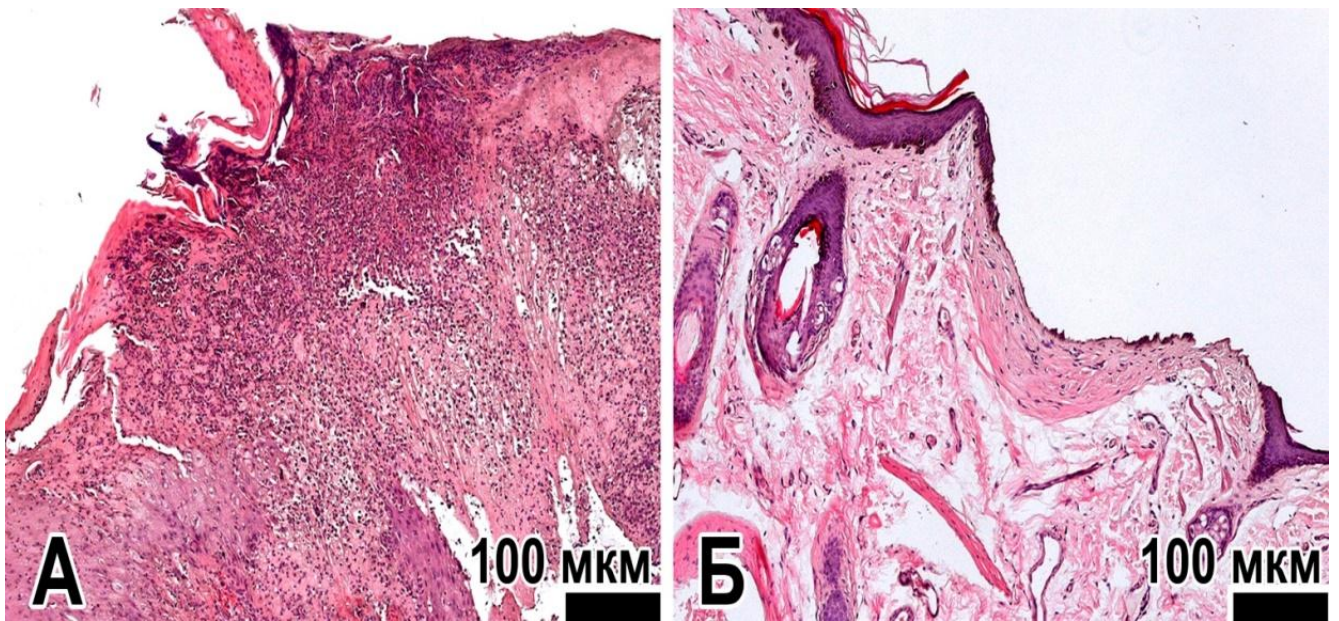
А - носовая полость с крупными очагами некроза слизистой оболочки, отмеченными белыми стрелками (бар – 100 мкм)

Б и В – трахея, в слизистой оболочке которой крупные очаги некроза, отмеченные белыми стрелками, а в подслизистом слое обильная инфильтрация гетерофилами, отмеченная черными стрелками (бар – 100 мкм)

Г – легкое с интенсивной гиперемией, тромбозом сосудов в сочетании с обширными зонами пониженной воздушности респираторной ткани: дистелектазами (бар – 200 мкм)

Д – легкое с множественными очагами лимфоидной инфильтрации, дилатацией и гиперемией сосудов (стрелки) (бар – 200 мкм)

Рисунок 3.10 - Гистологический препарат (окраска гематоксилином и эозином), органы дыхательного тракта сурков с изменениями через 9 сут после интраназального заражения дозой 3,7 lg БОЕ штамма V79-1-005 вируса оспы обезьян



А – кожа с очагом некротического воспаления, распространенным на всю ее глубину (бар – 100 мкм)

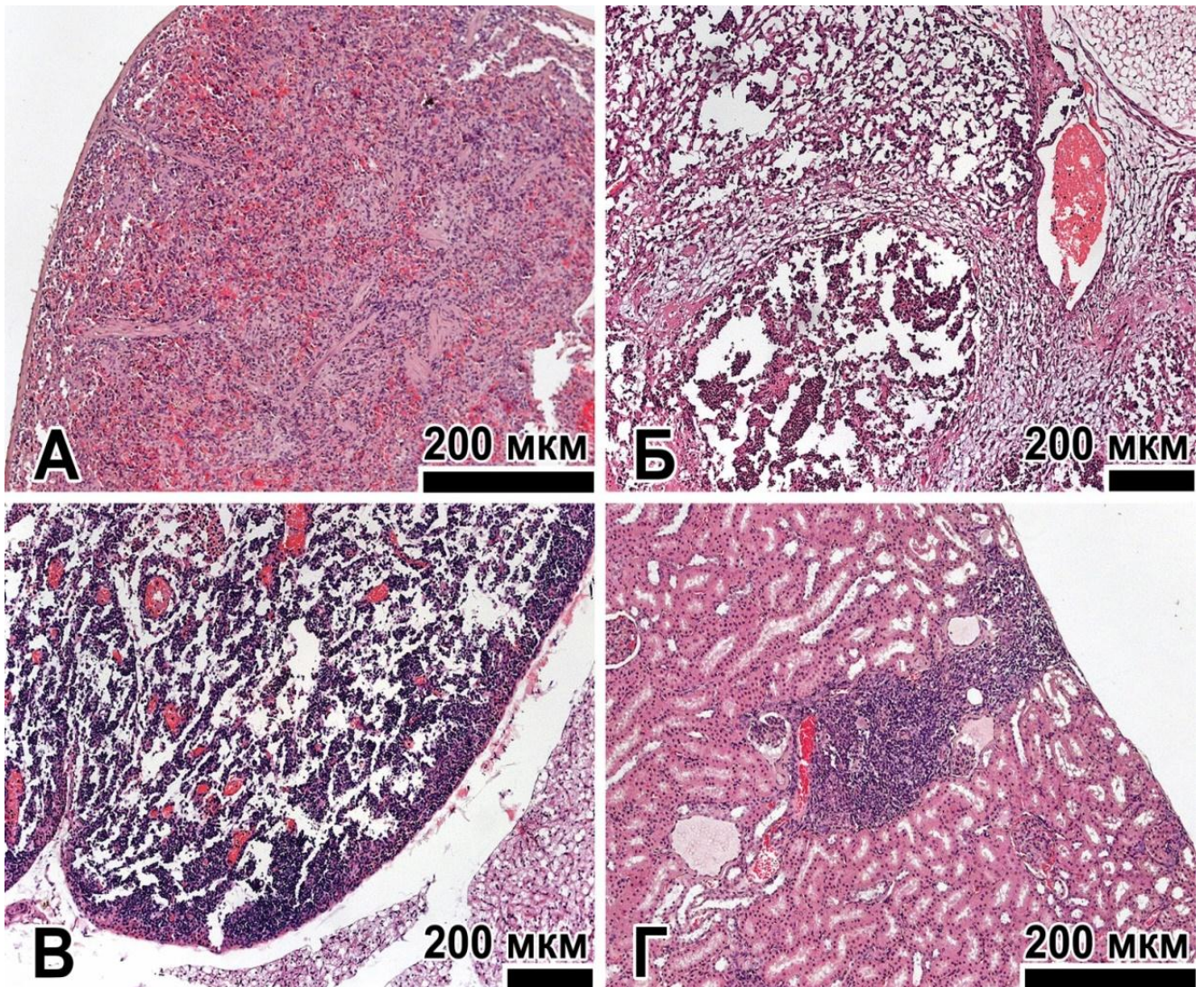
Б – дерма с утратой поверхностного эпителиального слоя и отеком (бар – 100 мкм)

Рисунок 3.11 - Гистологический препарат (окраска гематоксилином и эозином), кожа сурков с изменениями через 9 сут после интраназального заражения дозой 3,7 lg БОЕ штамма V79-1-005 вируса оспы обезьян

Патоморфологическое изучение других органов сурков показало наличие умеренно или слабо выраженных воспалительных изменений.

Проведенный сравнительный анализ данных литературы относительно патоморфологических изменений, носящих воспалительно-некротический характер, у различных видов модельных животных для оспы обезьян, респираторно зараженных этим этиологическим агентом [38, 84, 104], и результатов наших исследований на сурках свидетельствовал об их большом сходстве таких изменений в основном в органах дыхательного тракта и других висцеральных органах. По данным электронной микроскопии, отмечен факт присутствия и размножения ВОО у сурков в традиционных первичных клетках-мишенях для этого патогена (в клетках системы мононуклеарных фагоцитов и эпителиоцитах в органах респираторного тракта), а также в некоторых других типах клеток организма (эндотелиоцитах, плазмочитах, фибробластах, ретикулярных и гладкомышечных клетках) [40, 123, 152]. При этом морфологические характеристики репро-

дукции ВОО в чувствительных клетках этих животных соответствовали таковым для данного возбудителя заболевания, описанным в научной литературе.



А – селезенка с гипоплазией фолликулов (бар – 200 мкм)

Б - тимус с некрозом всей паренхимы (бар – 200 мкм)

В - лимфатический узел с выраженной гиперплазией и некрозом (бар – 200 мкм)

Г – почка с очагом полиморфноклеточной инфильтрации и некрозом под капсулой (бар – 200 мкм)

Рисунок 3.12 - Гистологический препарат (окраска гематоксилином и эозином), внутренние органы сурков с изменениями через 9 суток после интраназального заражения дозой 3,7 lg БОЕ штамма V79-1-005 вируса оспы обезьян

Таким образом, у и/н или п/к зараженных сурков различными дозами ВОО (от 2,6 до 7,8 lg БОЕ) наиболее выраженные патоморфологические изменения сосредоточены

не только в респираторном тракте, но и в других органах (кожа, селезенка, лимфоузлы, тимус и др.), коррелируя (независимо от дозы заражения) со степенью тяжести у них клинических проявлений. Как и у некоторых других известных модельных видов животных к данному патогену, у сурков отмечены сходные гистологические изменения воспалительного и некротического характера в органах и тканях. У сурков, инфицированных вирусом, зарегистрирован факт присутствия и размножения вируса в традиционных первичных клетках-мишенях для этого патогена (в клетках системы мононуклеарных фагоцитов и эпителиоцитах в органах респираторного тракта), а также в некоторых других типах клеток (эндотелиоцитах, плазмócитах, фибробластах, ретикулярных и гладкомышечных клетках). Показано, что морфологические характеристики репродукции патогена в чувствительных клетках этих животных соответствовали таковым для этого возбудителя заболевания, описанным в научной литературе.

3.4 Оценка эффективности противооспенных препаратов на сурках

Ранее (п. 3.2 – 3.4) была приведена экспериментальная информация, свидетельствующая о потенциальной возможности использования сурков для оценки эффективности препаратов против оспы обезьян. В этой связи с целью проверки адекватности результатов применения такой модели были проведены соответствующие исследования по изучению противовирусной активности разрабатываемого в России препарата НИОХ-14 в сравнении с американским ST-246, ранее уже продемонстрировавшим соответствующий защитный эффект.

Несмотря на то, что ранее рядом ученых [6, 7, 9] была экспериментально доказана противооспенная активность препаратов НИОХ-14 и ST-246, необходимо было перед проведением экспериментов на сурках убедиться в присутствии данного противовирусного эффекта у полученных из НИОХ им. Н.Н. Ворожцова СО РАН свежеприготовленных серий этих препаратов, которые предполагалось использовать в наших исследованиях.

На первом этапе в опытах *in vitro* с использованием вирусов осповакцины, оспы коров и оспы мышей были проведены эксперименты по сравнительной оценке противовирусной активности двух взятых на исследования серий химических соединений

ННОХ-14 и ST-246, а также препарата ННОХ-32, ранее показавшего слабый противовирусный эффект. Результаты этих опытов представлены в таблицах 3.8, 3.9 и 3.10.

Было показано (таблицы 3.8, 3.9 и 3.10), что свежеприготовленные серии препаратов ННОХ-14 и ST-246 (как и предыдущие) обладали высокой активностью в отношении вирусов осповакцины, оспы коров и оспы мышей в культуре клеток Vero, судя по показателям ТІ (IS), которая существенно превышала таковую у ННОХ-32. Далее подобного рода исследования с теми же сериями химически синтезированных соединений были проведены в опытах *in vitro* с целевым высокопатогенным ортопоксвирусом: ВОО. Результаты этого изучения представлены в таблице 3.11.

Было обнаружено (таблица 3.11), что исследованные соединения ННОХ-14 и ST-246 проявляли практически такую же эффективность в отношении ВОО, которая была ранее выявлена в экспериментах с вирусами осповакцины, оспы коров и оспы мышей (таблицы 3.8, 3.9 и 3.10), и сходную с таковой, полученной при аналогичном исследовании с предыдущими сериями этих препаратов. При этом по своей противовирусной активности данные химические соединения значительно превосходили таковую у ННОХ-32.

Таблица 3.8 - Показатели тестирования противовирусной активности препаратов в опытах *in vitro* в отношении штамма К-1 вируса оспы мышей

Шифр препарата	ТС ₅₀ (мкг/мл)	ІС ₅₀ (мкг/мл)	ТІ (IS) (ТС ₅₀ /ІС ₅₀)
ННОХ-14	>100	0,011	>9100
ST-246	>100	0,003	>33400
ННОХ-32	>100	0,054	>1900
Примечания ТС ₅₀ - токсическая концентрация препарата ІС ₅₀ - ингибирующая концентрация препарата ТІ (IS) – терапевтический индекс (индекс селективности) препарата, приведено максимальное значение ТІ			

Таблица 3.9 - Показатели тестирования противовирусной активности препаратов в опытах in vitro в отношении штамма ЛИВП вируса осповакцины

Шифр препарата	ТС ₅₀ (мкг/мл)	IC ₅₀ (мкг/мл)	TI (IS) (ТС ₅₀ /IC ₅₀)
ННОХ-14	>100	0,001	>100000
ST-246	>100	0,001	>100000
ННОХ-32	>100	0,004	>25000
Примечания ТС ₅₀ - токсическая концентрация препарата IC ₅₀ - ингибирующая концентрация препарата TI (IS) – терапевтический индекс (индекс селективности) препарата, приведено максимальное значение TI			

Таблица 3.10 - Показатели тестирования противовирусной активности препаратов в опытах in vitro в отношении штамма Гришак вируса оспы коров

Шифр препарата	ТС ₅₀ (мкг/мл)	IC ₅₀ (мкг/мл)	TI (IS) (ТС ₅₀ /IC ₅₀)
ННОХ-14	>100	0,051	>2000
ST-246	>100	0,002	>50000
ННОХ-32	>100	0,015	>6700
Примечания ТС ₅₀ - токсическая концентрация препарата IC ₅₀ - ингибирующая концентрация препарата TI (IS) – терапевтический индекс (индекс селективности) препарата, приведено максимальное значение TI			

Таблица 3.11 - Показатели тестирования противовирусной активности препаратов в опытах *in vitro* в отношении штамма V79-1-005 вируса оспы обезьян

Шифр препарата	ТС ₅₀ , мкг/мл	IC ₅₀ , мкг/мл	TI (IS) (ТС ₅₀ /IC ₅₀)
ННОХ-14	>100	0,013	>7700
ST-246	>100	0,001	>100000
ННОХ-32	>100	0,153	>650
Примечания ТС ₅₀ - токсическая концентрация препарата IC ₅₀ - ингибирующая концентрация препарата TI (IS) – терапевтический индекс (индекс селективности) препарата, приведено максимальное значение TI			

Наличие выраженного противовирусного эффекта у исследованных серий препаратов ННОХ-14 и ST-246 в опытах *in vitro* с использованием вирусов осповакцины, оспы коров, оспы мышей и ВОО позволило нам провести изучение показателей их лечебно-профилактического действия в экспериментах на сурках, и/н инфицированных ВОО. Результаты таких исследований представлены в таблице 3.12.

Из данных, приведенных в таблице 3.12, видно, что все сурки в контрольной группе заболели, при этом у животных отмечали появление клинической симптоматики (одно- или двусторонний подчелюстной лимфаденит, оспоподобная сыпь на коже по всей видимой части поверхности тела и слизистых оболочках, серозно-гнойные ринит, конъюнктивит и блефарит, нарушение координации, тремор конечностей, повышенная агрессивность, взъерошенность шерсти) через 9 - 12 сут п.з. В то же время у сурков опытных групп, обработанных препаратами ННОХ-14 и ST-246, не было зарегистрировано каких-либо признаков заболевания в течение всего срока наблюдения после и/н заражения ВОО. Это убедительно свидетельствует о наличии значимого лечебно-профилактического эффекта у испытанных нами препаратов. При этом использование ННОХ-14 и ST-246 в одинаковых дозах на сурках, зараженных ВОО, не выявило существенных различий между этими препаратами по эффективности противовирусного действия.

Таблица 3.12 – Лечебно-профилактическая активность препаратов при оспе обезьян у сурков после интраназального заражения штаммом V79-1-005 вируса оспы обезьян (ВОО) в дозе 3,7 lg БОЕ

Наименование показателя	Значения показателей для сурков, обработанных препаратами перорально ежедневно однократно за 1 сут до и в течение 6 сут после заражения:		
	НИОХ-14	ST-246	Плацебо*
Суточная доза вводимых препаратов (мг/кг массы сурков)	40	40	*
Количество животных в каждой группе (n)	4	4	4
Количество и доля (%) заболевших сурков	0 (0)**	0 (0)**	4 (100)
Процент защиты от инфицирования (заболевания)***	100	100	Н.о.
Количество погибших сурков	0	0	2
<p>Примечания</p> <p>* Суркам контрольной группы вводили раствор метилцеллюлозы с твином–80, который использовали для получения суспензии препаратов НИОХ-14 и ST-246</p> <p>** Достоверное отличие от контроля по критерию точному тесту Фишера ($p \leq 0,05$), $n_{\text{опыт}} + n_{\text{контроль}} = 8$</p> <p>*** Величина разницы между % не заболевших животных в опыте и контроле</p> <p>Н.о. - величина не определяется</p>			

Через 28 сут п.з. у всех сурков как опытных групп, так и выживших животных контрольной группы были обнаружены достаточно высокие титры антител к ВОО в реакции нейтрализации (таблица 3.13). Интересно отметить, что титры противооспенных антител у выживших сурков п.з. ВОО и проведенных лечебно-профилактических мероприятий с помощью химически синтезированных соединений имели достаточно высокие значения. Это обстоятельство, вероятно, объясняется тем, что механизм противовирусного действия ST-246 и его аналога (НИОХ-14) связан лишь с ингибированием формирования различных оболочечных форм вируса (экстрацеллюлярного, интрацеллю-

лярного и клеточно-ассоциированного), приводящее к резкому ограничению их распространения в организме сурков, в том числе из первичных органов-мишеней к вторичным [39, 68, 90]. Тогда как вирус в другой форме: безоболочечной (интрацеллюлярный зрелый), находящийся в инфицированных первичных клетках-мишенях респираторного тракта сурков, тоже может осуществлять (но ограничено) инфицирование рядом находящихся клеток [116, 144, 165], что, скорее всего, и обеспечивало формирование относительно высокого уровня антигенной вирусной нагрузки в организме этих животных, приводящее к существенному росту гуморального иммунитета, приближающемуся к таковому у контрольной группы выживших сурков после и/н инфицирования ВОО.

Таблица 3.13 – Титры антител у выживших сурков после и/н инфицирования штаммом V79-1-005 вируса оспы обезьян (ВОО) в дозе 3,7 lg БОЕ и последующей обработки лечебно-профилактическими препаратами

Номер сурка	Вид препарата	Обратные значения титров противооспенных антител у сурков по временным точкам:	
		до заражения	через 28 сут после заражения
1	ННОХ-14	< 5	25
2	ННОХ-14	< 5	125
3	ННОХ-14	< 5	125
4	ННОХ-14	< 5	625
5	ST-246	< 5	125
6	ST-246	< 5	125
7	ST-246	< 5	625
8	ST-246	< 5	625
9	*	< 5	625
10	*	< 5	3125
<p>Примечания</p> <p>* Суркам контрольной группы вводили раствор метилцеллюлозы с твином–80, который использовали для получения суспензии препаратов ННОХ и ST-246</p> <p>< 5 - величина ниже порога чувствительности (5) использованного метода титрования</p>			

Эксперименты по оценке эффективности противооспенного действия ST-246 и НИОХ-14 ранее проводили мы и многие исследователи [9, 37, 142] с использованием различных видов ортопоксвирусов, культур клеток и соответствующих существующих модельных видов животных, и результаты таких исследований коррелировали с нашими данными, полученными на сурках с использованием ВОО. Это обстоятельство свидетельствует о реальной возможности использования в дальнейшем для этой цели разработанного нами модельного вида животных для оспы обезьян.

Таким образом, при изучении лечебно-профилактической активности разрабатываемых противооспенных препаратов (на примере двух химически синтезированных соединений: ST-246 и НИОХ-14) на сурках с применением ВОО подтверждено наличие ранее отмеченного нами и многими исследователями (эксперименты с использованием различных видов ортопоксвирусов, культур клеток и соответствующих известных модельных видов животных) противовирусного эффекта, что свидетельствует об адекватности используемого нами для этой цели модельного вида животных.

3.5 Оценка возможности использования степного сурка в качестве модельного вида животных для оспы обезьян на основе полученных теоретических и экспериментальных данных

3.5.1 Стратегия выбора вида животных, моделирующего оспу обезьян у человека, для оценки эффективности противовирусных препаратов

Для оценки эффективности лечебно-профилактического действия разрабатываемых противовирусных препаратов на этапах научно-исследовательской работы и доклинических исследований крайне важно иметь не менее двух видов животных, моделирующих соответствующее инфекционное заболевание у человека. Это необходимо для того, чтобы убедительно обосновать перед российским национальным органом контроля (НЦ ЭСМП), а также перед FDA и EMA необходимость проведения в дальнейшем клинических испытаний препаратов с возможностью определения их специфической активности. В случае если отсутствует возможность оценки специфической активности разрабатываемых препаратов на добровольцах, например, для уже не существующих в мире заболеваний (натуральная оспа), орфанных или особо опасных инфекций (оспа обезьян),

ян - ОО, Марбург, Эбола и др.), то всегда для принятия решения о регистрации того или иного противовирусного препарата тот или иной орган контроля берет за основу результаты оценки эффективности лечебно-профилактического действия препарата на модельных видах животных, полученные в рамках научно-исследовательской работы и доклинических исследований.

Учитывая то обстоятельство, что существующие и разрабатываемые противовирусные препараты в подавляющем большинстве случаев сориентированы на прямое или опосредованное воздействия на патоген, направленные на снижение его концентрации в организме зараженного человека, основной путь поиска модельного вида животных должен быть основан на максимально правдоподобном воспроизведении соответствующего инфекционного процесса у людей с момента заражения до момента завершения заболевания (выздоровление или летальный исход). Однако найти модельный вид животных, доподлинно удовлетворяющий данному глобальному требованию, практически невозможно. С целью систематизации и минимизации требований, предъявляемых к модельному виду животных, который предполагается использовать для оценки эффективности разрабатываемых лечебно-профилактических препаратов против инфекционных заболеваний, необходимо сконцентрировать свое внимание на патогене (на борьбу с которым направлено основное действие исследуемого лекарственного средства), а точнее на диссеминации патогена в чувствительном макроорганизме. При этом важно иметь в виду, что дозы заражения вирусом модельного вида животных, как правило, не должны превышать 100 ИД₅₀ (ЛД₅₀), что чаще всего является реальным максимумом, происходящим обычно при реализации аэрозольного механизма передачи инфекции во время вспышек заболеваний среди людей. На этом основании при проведении доклинических исследований разрабатываемых лечебно-профилактических препаратов обычно используются дозы заражения подопытных животных в диапазоне от 10 до 100 ИД₅₀ или ЛД₅₀ [30].

Говоря о подавляющем большинстве общих вирусных заболеваний, имеющих проявления генерализации, необходимо отметить 3 основных этапа распространения патогена в чувствительном макроорганизме:

- 1-й этап, связанный с размножением вируса в первичных органах-мишенях входных ворот инфекции (респираторный тракт, желудочно-кишечный тракт, кожные покровы и слизистые);

- 2-й этап, связанный с доставкой вируса с помощью той или иной системы (лимфатическая, кровеносная и нервная) от первичных органов-мишеней к вторичным, при этом возбудитель заболевания может перемещаться как пассивно, так и активно, размножаясь, например, в форменных элементах крови и лимфы, эндотелии сосудов, клетках лимфоузлов и нервных клетках;

- 3-й этап, связанный с размножением вируса во вторичных органах-мишенях.

В связи с этим профилактическое применение противовирусных средств (до заражения чувствительного макроорганизма), как правило, направлено на предотвращение взаимодействия патогена с чувствительными клетками первичных органов-мишеней или начала развития инфекционного процесса в них (если говорить о препаратах, обладающих непрямым противовирусным действием). Тогда как экстренно-профилактическое применение препаратов (в ближайшее время п.з. чувствительного макроорганизма) сопряжено с эффектом блокирования начавшегося инфекционного процесса в первичных органах-мишенях. Использование препаратов по схеме лечения (в ближайшее время после появления первых признаков заболевания) сориентировано на борьбу с патогеном на всех его этапах распространения по макроорганизму. Основываясь на такой информации и регулярно получаемых данных от врачей-инфекционистов, более выраженный противовирусный эффект чаще всего отмечается при профилактическом, а также экстренно-профилактическом введении препаратов по сравнению с лечебным. Определяющим в такой реализации противовирусного эффекта является масштаб развития инфекционного процесса в чувствительном макроорганизме к моменту начала применения лекарственных препаратов:

- через некоторое время после профилактического введения препаратов, когда уже иммунная система подготовлена или необходимая концентрация действующего вещества в организме уже достигнута, патоген проникает во входные ворота инфекции и, возможно, в чувствительные клетки первичных органов-мишеней и начинает первый цикл генерации вирусных частиц (количество патогена при этом в организме человека минимально и ограничено первичными органами-мишенями);

- к моменту экстренно-профилактического введения препаратов патоген, ранее проникнув во входные ворота инфекции, начинает первый цикл размножения в первичных органах-мишенях (количество патогена при этом в организме человека минимально и ограничено, в основном, первичными органами-мишенями);

- к моменту лечебного введения препаратов патоген уже размножился в первичных и вторичных органах-мишенях, и, возможно, в чувствительных клетках той или иной системы его распространения (лимфатическая, кровеносная и нервная), количество патогена при этом в организме человека достигает максимальных величин и сосредоточено на всех трех этапах его распространения.

В связи с этим с целью систематизации и минимизации требований к модельным видам животных, необходимым для использования в экспериментах по изучению профилактической (экстренно-профилактической) эффективности препаратов, были отобраны следующие наиболее важные критерии, по которым должны быть получены сходные между исследуемым видом животных и человеком показатели инфицирования патогеном:

1) по возможности заражения через основные входные ворота соответствующей инфекции человека (респираторный тракт или желудочно-кишечный тракт, или кожные покровы, или слизистые);

2) по величине ИД₅₀;

3) по виду основных первичных органов-мишеней;

4) по типам основных клеток-мишеней в главных первичных органах-мишенях;

5) по наличию п.з. патогеном (10 – 100 ИД₅₀) максимального уровня его накопления в первичном органе-мишене контрольной группы животных, превышающего 3 lg у.е./мл (при максимальном пороговом значении чувствительности метода титрования 1 lg у.е./мл, при обычно встречающемся стандартном отклонении 0,5, а также при дельте не менее 4σ между значениями порога чувствительности метода титрования и показателя накопления вируса в исследуемом органе в контроле; интервал 4σ включает в себя при нормальном распределении 99,99% всех значений титров вируса [5]).

Каждый из этих критериев имеет важное значение для выбора адекватного вида модельного животного, который мог бы быть использован для корректной оценки профилактической (экстренно-профилактической) активности противовирусных препаратов:

- введение первого критерия обусловлено необходимостью создания условия для инициации инфекционного процесса во входных воротах инфекции;

- введение второго критерия обусловлено необходимостью формирования адекватных количественных схем использования лекарственных средств, направленных на

нейтрализацию известной дозы патогена, с целью предотвращения взаимодействия вируса во входных воротах инфекции с чувствительными клетками первичных органов-мишеней;

- введение третьего критерия сориентировано на возможность максимально эффективной доставки лекарственных средств в конкретные органы-мишени;

- введение четвертого критерия сориентировано на возможность максимально эффективной доставки лекарственных средств к конкретным основным чувствительным к патогену клеткам первичных органов-мишеней;

- введение пятого критерия связано с возможностью использования метода оценки эффективности профилактического (экстренно-профилактического) действия лекарственных средств по результатам выявления патогена в первичных органах-мишенях.

Для оценки же лечебной эффективности исследуемых препаратов на модельных видах животных были отобраны следующие наиболее важные критерии, по которым должны быть получены сходные между исследуемым видом животных и человеком показатели инфицирования патогеном:

- 1) по виду основной системы (лимфатическая, кровеносная и нервная) доставки патогена к вторичным органам-мишеням;

- 2) по механизму (пассивный - без размножения в системе доставки патогена, активный – с размножением) распространения патогена к вторичным органам-мишеням;

- 3) по наличию п.з. патогеном ($10 - 100 \text{ ИД}_{50}$) максимального уровня его накопления в основных системах его доставки к вторичным органам-мишеням, превышающего $3 \lg \text{ у.е./мл}$.

- 4) по виду основных вторичных органов-мишеней;

- 5) по типам основных клеток-мишеней в главных вторичных органах-мишенях;

- 6) по наличию п.з. патогеном ($10 - 100 \text{ ИД}_{50}$) максимального уровня его накопления в основных вторичных органах-мишенях, превышающего $3 \lg \text{ у.е./мл}$;

- 7) по основным клиническим проявлениям заболевания, включая, возможно, гибель;

Каждый из этих критериев имеет важное значение для выбора адекватного вида модельного животного, который мог бы быть использован для корректной оценки терапевтической активности противовирусных препаратов:

- введение первого критерия направлено на возможность максимально эффективной доставки лекарственных средств в конкретные основные системы доставки патогена к вторичным органам-мишеням;

- введение второго критерия, особенно в случае активного распространения патогена к вторичным органам-мишеням, направлено на возможность максимально эффективной доставки лекарственных средств в конкретные основные клетки-мишени соответствующей системы доставки патогена;

- введение третьего критерия связано с возможностью использования метода оценки эффективности лечебного действия лекарственных средств по результатам выявления патогена в основной системе его доставки к вторичным органам-мишеням;

- введение четвертого критерия сориентировано на возможность максимально эффективной доставки лекарственных средств в конкретные основные вторичные органы-мишени;

- введение пятого критерия сориентировано на возможность максимально эффективной доставки лекарственных средств в конкретные основные клетки-мишени в главных вторичных органах-мишенях;

- введение шестого критерия связано с возможностью использования метода оценки эффективности лечебного действия лекарственных средств по результатам выявления патогена в основных вторичных органах-мишенях;

- введение седьмого критерия связано с возможностью использования метода оценки эффективности лечебного действия лекарственных средств по результатам исчезновения или смягчения основных клинических проявлений заболевания, включая снижение показателя летальности.

В данном контексте, если говорить об универсальном модельном виде животных, который мог бы быть использован не только для изучения эффективности профилактического (экстренно-профилактического) действия исследуемых препаратов, но и лечебного, то оптимальнее всего было бы подобрать такой вид подопытного животного, который имел бы близкие с человеком показатели инфицирования патогеном, определенные по всем вышеперечисленным критериям (суммарно 12). Кроме того, исходя из реальной возможности использования в вирусологических экспериментах тех или иных видов модельных животных, важно, чтобы не только их стоимость, но и трудоемкость выполнения с ними исследований были максимально низкими.

Таким образом, с целью систематизации и минимизации требований к модельным видам животных, необходимым для использования в экспериментах по изучению профилактической (экстренно-профилактической) и лечебной эффективности препаратов, была разработана стратегия выбора таких видов животных на основе отобранных нами только наиболее важных критериев, по которым должны быть получены сходные между исследуемым видом животных и человеком показатели инфицирования патогеном.

Базируясь на данной стратегии, было определено дальнейшее направление наших исследований, сориентированное на оценку показателей инфицирования исследованных нами сурков с ВОО в сравнении с таковыми у людей (п. 3.5.3), теоретически оценив чувствительность человека к этому патогену (п. 3.5.2).

3.5.2 Теоретическая оценка чувствительности человека к вирусу

В доступной научной литературе нет информации относительно количественной оценки степени чувствительности человека к ВОО. Однако проведенный информационный анализ, касающийся вызывающих эпидемии вирусных заболеваний (натуральная оспа, грипп, аденовирусная и риновирусная инфекции и др.), для которых основные механизмы передачи инфекции напоминают таковые у оспы обезьян (аэрозольный и контактный) и реализуются в основном через респираторный тракт, свидетельствует о том, что чувствительность невакцинированных людей к этим патогенам достаточно высокая и не превышает 10 вирусных частиц [18, 77, 94]. В то же время сам факт наличия или периодического возникновения эпидемических вспышек оспы обезьян на Земном шаре (Африка и Северная Америка) может также говорить о существующей достаточно высокой восприимчивости человека к возбудителю данного заболевания, близкой к таковой при других респираторных инфекциях: до 10 вирусных частиц. Данный показатель может быть определен и другим путем. При этом для теоретической оценки степени чувствительности человека к ВОО важно качественно и количественно изучить в сравнении с родственным ВНО, по которому имеется информация о чувствительности человека (до 10 вирусных частиц), три основных составляющих элемента эпидемического процесса, вызываемого данными возбудителями заболеваний: источник инфекции, механизм передачи вируса, восприимчивость населения.

Из данных научной литературы хорошо известно, что основными источниками оспы обезьян среди людей являются инфицированные ВОО некоторые виды животных (обезьяны, гамбийские крысы, белки и др.) и человек, причем выделение вируса из макроорганизма в основном происходило из сыпозных элементов (везикулы, пустулы и корочки, где количество патогена достигает 1 – 100 миллионов [33, 57, 79]) кожных покровов и слизистых оболочек, в том числе респираторного тракта и ротовой полости. Что касается ВНО, то источником вызываемого им заболевания является инфицированный человек, причем в основном выделение вируса во внешнюю среду происходило также из сыпозных элементов кожных покровов и слизистых оболочек респираторного тракта и ротовой полости. Причем количественное содержание патогена в этих образованиях приближалось к таковому при оспе обезьян с учетом длительности и условий хранения до момента титрования [4, 73, 118, 164]. В то же время подавляющее большинство ученых отмечает существенно более мягкое течение оспы обезьян у человека по сравнению с натуральной оспой: как правило, менее ярко выражена респираторная симптоматика, практически не встречается плоский и геморрагический типы заболевания, реже наблюдается сливная форма сыпи и др. [10, 155, 158]. При этом как при натуральной оспе, так при оспе обезьян редко встречались бессимптомные (инаппарантные) формы заболеваний [137]. Клиническая картина оспы обезьян представлена достаточно подробно во многих фундаментальных научных публикациях [14, 107, 137]. В связи с этим и для удобства представления информации по чувствительности экспериментальных животных к этому патогену приведем лишь краткие сведения по основным этапам клинического течения этого заболевания у не вакцинированных против НО людей, летальность при котором достигает 17%.

Инкубационный период при оспе обезьян (от момента заражения до начала лихорадки) обычно составляет 7 – 21 сут [102]. После чего наступает продромальная стадия заболевания (до появления основной оспенной сыпи), которая длится от 2 до 4 дней, при этом происходит подъем температуры тела и появляются слабость, головные боли, иногда боли в горле и кашель. Особенностью клинического течения оспы обезьян, отличающие ее от натуральной оспы, являются лимфадениты, которые наблюдаются у 86,4% заболевших и появляются одновременно с лихорадкой (за 1 – 2 дня до высыпания). Место их локализации варьирует (подчелюстные, шейные, подмышечные, паховые), причем иногда они односторонние, а иногда двусторонние, но чаще всего (в 63,9% случаев)

развивается генерализованная лимфаденопатия. Через 2 - 4 дня болезни появляется сыпь, которая локализуется на всем теле с преимущественным поражением лица и конечностей. По плотности сыпозных элементов на поверхности тела больных людей различают 3 основные клинические формы оспы обезьян: дискретная (около 60%), полусливная (около 30%) и сливная (около 10%) [14; 137]. Элементы сыпи мономорфны и претерпевают те же стадии развития (папула – везикула – пустула – корки). Оспа обезьян у людей (с момента появления клинических признаков) обычно длится 2 - 4 недели.

Возвращаясь к вопросу о восприимчивости человека к ВОО, общепризнанным является тот факт, что передача инфекции, вызванной ВОО, от животного человеку и от человека человеку происходит в основном с помощью контактного механизма (прямой и непрямой) и аэрозольного (воздушно-капельный и воздушно-пылевой). Причем контактный механизм передачи этой инфекции был чаще всего реализован путем потирания носа и глаз руками, загрязненными инфицированными экскрементами больного человека или животных [50, 55, 126], то есть по существу входными воротами инфекции в этом случае был также респираторный тракт (верхний его отдел), как и при осуществлении аэрозольного механизма передачи инфекции.

Необходимо также отметить, что при натуральной оспе распространение инфекции среди людей осуществляется теми же способами, что и при оспе обезьян. Однако основной акцент ученые все же делают на аэрозольный механизм передачи ВНО, частота встречаемости которого была существенно выше во время эпидемий натуральной оспы, чем при эпидемических вспышках оспы обезьян [14, 137], вероятно, за счет более выраженной респираторной симптоматики и картины сыпозных проявлений, если предположить, что оба вируса, являясь близкородственными, обладают сходной устойчивостью во внешней среде.

Величина контагиозности для человека инфекции, вызванной ВОО, крайне не высокая и не превышает 10 %, ориентируясь на информацию, имеющуюся по людям ранее невакцинированным против натуральной оспы [52, 95, 103], по сравнению с таковой при натуральной оспе - 58%: от 37 до 88% [80, 96, 124].

Обобщая вышеприведенную литературную информацию, касающуюся основных качественных и количественных составляющих элементов эпидемических процессов при оспе обезьян и натуральной оспе, не считая контагиозности, можно сделать следующие утверждения:

1) об основном сходстве механизмов передачи инфекции во время эпидемических вспышек оспы обезьян и натуральной оспы, связанных с заражением людей через респираторный тракт;

2) о близкой устойчивости к факторам внешней среды ВОО и ВНО, относящихся к одному роду *Orthopoxviridae*;

3) о более тяжелом течении натуральной оспы, чем оспы обезьян;

4) о редкой частоте встречаемости бессимптомных форм заболеваний как при оспе обезьян, так и при натуральной оспе;

5) о сходстве концентраций генетического материала и вируса в оспинах (основной источник распространения ВОО и ВНО между людьми) при оспе обезьян и натуральной оспе.

Наличие большого сходства вышеизложенных показателей эпидемических процессов при оспе обезьян и натуральной оспе позволяет провести оценку степени чувствительности человека к ВОО другим путем. Если не принимать во внимание факт существующих различий по степени тяжести течения заболеваний у человека, вызываемых этими патогенами, то ВОО и ВНО различаются только по величинам контагиозности для людей (около 10 и 58% соответственно). При этом более низкая контагиозность ВОО для человека вероятнее всего связана с меньшей его чувствительностью к этому вирусу по сравнению с таковой для ВНО. Зная теоретически определенную по данным литературы величину ID_{50} ВНО для человека (1...10 БОЕ) [18] и исходя из условий построения стандартной кривой доза-эффект, можно считать, что ID_{50} ВОО для человека должна быть примерно в 10 раз выше (10...100 БОЕ), чем ВНО. Если же учесть факт существующих различий по степени тяжести течения заболеваний у человека, вызываемых этими патогенами, то, беря во внимание данные о величинах контагиозности для людей ВНО и ВОО, реальная ID_{50} ВОО для человека должна близка к таковой ВНО (1...10 БОЕ).

Полученная теоретическим путем информация о величине ID_{50} для человека при инфицировании ВОО в определенной степени подтверждается результатами экспериментов на модельных для оспы обезьян низших приматах (*M. cynomolgus*), адекватно воспроизводящих признаки заболевания человека:

- при аэрозольном заражении дозами 90 и 50000 БОЕ штаммом ZAI-V79 (центральноафриканский) ВОО 2 из 3 и 3 из 3 животных заболело соответственно [161];

- при в/м заражении даже западноафриканским штаммом ВОО ИД₅₀ для этого вида животных составила 1,5 lg БОЕ [146].

Таким образом, сделав сравнительный качественный и количественный анализ основных этапов эпидемического процесса при оспе обезьян, натуральной оспе и других респираторных инфекциях, теоретически оценена вероятная степень чувствительности человека к ВОО, величина которой составила в обобщенном виде ≤ 1 lg БОЕ.

3.5.3 Сравнение показателей инфицирования вирусом сурков и человека или известных модельных видов животных для оспы обезьян

В п. 3.5.1 была представлена разработанная нами общая стратегия выбора вида животных, моделирующего вирусные инфекции у человека, для оценки эффективности противовирусных препаратов. В рамках данной стратегии были разработаны критерии, сориентированные на показатели инфицирования изучаемого макроорганизма соответствующим патогеном, по которым должны оцениваться животное и человек с точки зрения их сходства. С целью реализации этой стратегии применительно к ВОО, нами были проведены соответствующие экспериментальные исследования с использованием четырех видов подопытных животных (мышей ICR, сурков, кроликов и мини-свиней), результаты которых описаны в данном разделе. При этом после проведения экспериментов по определению чувствительности таких видов животных к высоко вирулентному для человека центр/афр штамму V79-1-005 ВОО был выбран один вид (сурок), который обладал относительно высокой восприимчивостью *in vivo* к этому патогену, близкой к таковой у человека, полученной теоретическим путем (п. 3.5.2). В связи с чем, в дальнейших исследованиях, связанных с разработкой модельных видов животных для ВОО, мы использовали именно сурков. При этом была определена динамика накопления вируса по органам, тканям и сывороткам крови и/н зараженных сурков дозой и выявлены первичные и вторичные органы и клетки-мишени для ВОО. Результаты таких исследований в обобщенном виде представлены в разработанных нами патогенетической схеме заболевания у этого вида животных (рисунок 3.13).

Обращает на себя внимание тот факт, что экспериментальные данные, на базе которых были построены схемы, во многом совпадают с таковыми, описанными в научной литературе для человека и существующих модельных видов животных для оспы обезьян.

ян. Причем у сурков после и/н заражения этиологическим агентом в дозе наблюдалась генерализованная инфекция, начинающаяся с респираторного тракта с последующим подключением других висцеральных органов. Эти животные после и/н инфицирования вирусом даже в низких дозах проявляли широкий спектр клинических признаков заболевания, близких к таковым у человека. При этом наблюдалось также выраженное сходство патоморфологических изменений во многих органах и тканях у этих животных, людей, умерших от оспы обезьян, и известных модельных видов животных, инфицированных ВОО. Кроме того, если провести сравнение основных действующих механизмов диссеминации вируса от первичных органов-мишеней к вторичным в организме респираторно инфицированных мышей и человека (известных модельных видов животных), то они аналогичны (лимфогенный с размножением вируса в лимфоузлах и форменных элементах лимфы - макрофагах и кратковременной виремией). В этой смысле все показатели инфицирования сурков ВОО в рамках разработанных нами критериев, направленных на поиск модельных видов животных с целью использования для оценки как профилактической (экстренно-профилактической), так и лечебной эффективности препаратов против оспы обезьян, соответствуют таковым у человека и известных модельных видов животных (таблица 3.7). Учитывая данное обстоятельство, нами были проведены исследования с использованием именно сурков с целью оценки лечебно-профилактической эффективности препаратов НИОХ-14, ST-246 (п. 3.4), ранее проявивших противооспенную активность в экспериментах *in vitro* и *in vivo* с различными ортопоксвирусами. При этом были получены результаты, которые свидетельствовали об адекватности взятых нами для этой цели животных.

Время с момента заражения (сут)	Динамика распространения ВОО в организме сурков (органы и ткани с максимальным значением концентрации вируса, lg БОЕ/мл)	Тип продуцирующих ВОО клеток	Вид патоморфологических изменений в органах и тканях	Клиническая картина заболевания
0	Входные ворота инфекции - респираторный тракт (3,7*)	Н.п.	Н.п.	Н.п.
	Первичные органы-мишени с апплицированным вирусом: легкие и нос (2,7**)	Макрофаги и эпителиоциты респираторного тракта	Н.п.	Н.п.
5	Первичные органы-мишени: легкие (6,5) с трахеей (6,5), а также бифуркационные лимфоузлы (2,0)	Макрофаги и эпителиоциты респираторного тракта	Н.п.	Н.п.
	Лимфатическая система (бифуркационные лимфоузлы - 2,0 – 3,9), доставляющая вирус и через кровь к вторичным органам-мишеням	Эндотелиоциты, плазмocyты, ретикулярные клетки		
7	Легкие (5,9) с трахеей (1,7), бифуркационные лимфоузлы (3,1), селезенка (1,3)	Макрофаги, эпителиоциты, эндотелиоциты, плазмocyты, фибробласты, ретикулярные и гладкомышечные клетки	Начало воспалительно-некротических изменений в органах дыхания, коже, селезенке, лимфоузлах, тимусе и др.	Гипертермия тела (38,0 – 40,0°C), подчелюстной лимфаденит

Время с момента заражения (сут)	Динамика распространения ВОО в организме сурков (органы и ткани с максимальным значением концентрации вируса, lg БОЕ/мл)	Тип продуцирующих ВОО клеток	Вид патоморфологических изменений в органах и тканях	Клиническая картина заболевания
9	Нос – носовая перегородка со слизистой (6,7), бифуркационные лимфоузлы (3,9), двенадцатиперстная кишка (3,8), легкие (3,2) с трахеей (3,2), кожа (3,0), головной мозг (1,6), надпочечники (1,6)	Те же клетки	Те же изменения что и через 7 сут после заражения, но более выраженные.	Гипертермия тела, подчелюстной лимфаденит, дискретная оспоподобная сыпь на коже и слизистых оболочках, серозно-гнойные ринит, конъюнктивит и блефарит, нарушение координации, тремор конечностей, повышенная агрессивность, взъерошенность шерсти
12	Кожа (6,6), легкие (6,5) с трахеей (4,5), нос – носовая перегородка со слизистой (2,6), бифуркационные лимфоузлы (2,5), надпочечники (1,4)	Те же клетки	Те же изменения, что и через 9 сут после заражения, но более выраженные для погибающих сурков.	Та же клиническая картина, но более выраженная для погибающих сурков, при этом на смену гипертермии их тела приходит гипотермия (до 32 ⁰ С)

* Величина соответствует вводимой и/н дозе ВОО: 3,7 lg БОЕ

** Величина рассчитана путем экстраполяции данных, полученных на мышах, в отношении апплицированного ВОО (до 10%) в легких сразу после и/н заражения

Н.п. – показатель не проявился на данную временную точку

Рисунок 3.13 - Патогенетическая схема заболевания у сурков, интраназально (и/н) инфицированных центральноафриканским штаммом V79-1-005 вируса оспы обезьян (ВОО) дозой 3,7 lg БОЕ

Таблица 3.7 - Результаты соответствия показателей инфицирования сурков вирусом оспы обезьян (ВОО), сориентированных на респираторное заражение, таковым у человека

№ п/п	Наименование критериев	Показатель по критериям:		Наличие соответ- ствия
		у человека	у сурка	
1	Возможность инфицирования через основные входные ворота инфекции: респираторный тракт	Реализуется во время эпидемических вспышек***	Реализуется экспериментально	Есть
2	Величина 50%-й инфицирующей дозы	0 - 1 lg БОЕ*	2,2 (1,0...3,4) lg БОЕ	Есть****
3	Вид основных первичных органов-мишеней	Легкие (возможно и нос)**	Легкие	Есть
4	Тип основных клеток-мишеней в первичных главных органах-мишенях	Макрофаги и эпителиоциты респираторного тракта**	Макрофаги и эпителиоциты респираторного тракта	Есть
5	Наличие после респираторного заражения вирусом (10 – 100 ИД ₅₀) максимального уровня его накопления в первичных органах-мишенях, превышающего 3 lg БОЕ/мл	Имеется в легких**	Имеется в легких	Есть
6	Вид основной системы доставки вируса к вторичным органам-мишеням	Лимфатическая**	Лимфатическая	Есть

№ п/ п	Наименование критериев	Показатель по критериям:		Наличие соответ- ствия
		у человека	у сурка	
7	Механизм доставки вируса к вторичным органам-мишеням	Активный с размножением в лимфоузлах и форменных элементах лимфы (макрофагах)**	Активный с размножением в лимфоузлах и форменных элементах лимфы (макрофагах)	Есть
8	Наличие после заражения вирусом (10 – 100 ИД ₅₀) максимального уровня его накопления в основных системах его доставки к вторичным органам-мишеням, превышающего 3 lg БОЕ/мл	Есть в лимфоузлах**	Есть в лимфоузлах	Есть
9	Вид основных вторичных органов-мишеней	Кожа, лимфоузлы, селезенка**	Кожа, лимфоузлы	Есть
10	Тип основных клеток-мишеней в главных вторичных органах-мишенях	Макрофаги, эпителиоциты, эндотелиоциты, фибробласты, ретикулярные, гладкомышечные клетки **	Макрофаги, эпителиоциты, эндотелиоциты, плазмоциты, фибробласты, ретикулярные, гладкомышечные клетки	Есть
11	Наличие после заражения вирусом (10 – 100 ИД ₅₀) максимального уровня его накопления в основных вторичных органах-мишенях, превышающего 3 lg БОЕ/мл	Есть в коже, лимфоузлах**	Есть в коже, лимфоузлах	Есть

№ п/п	Наименование критериев	Показатель по критериям:		Наличие соответ- ствия
		у человека	у сурка	
12	Основные клинические проявления заболевания, включая гибель	Гипертермия тела, лимфаденит, оспоподобная сыпь на коже и слизистых, летальность - до 17%***	Гипертермия тела, лимфаденит, оспоподобная сыпь на коже и слизистых, летальность – 25 - 50%	Есть
<p>Примечания</p> <p>* Величина получена путем теоретических исследований (п. 3.5.2)</p> <p>** Обобщенная информация из литературных источников по известным модельным видам животных к ВОО в отношении вида первичных и вторичных органов и клеток-мишеней [60, 104, 152] и в отношении наличия после заражения вирусом (10 – 100 ИД₅₀) максимального уровня его накопления в этих органах, превышающего 3 lg БОЕ/мл [59, 72, 84], так как подобные сведения, касающиеся людей, в доступной научной литературе отсутствуют</p> <p>*** Обобщенная информация из литературных источников по заболеванию у людей [50, 55, 126]</p> <p>**** Если учесть то обстоятельство, что при использованном нами методе и/н инфицирования животных доля аплицируемого вируса в легких составляет 10% (например у мышей [153])</p>				

Таким образом, на основе данных изучения диссеминации ВОО в организме сурков, клинической картины инфекции и патоморфологических изменений в органах и тканях разработана патогенетическая схема течения заболевания у этого вида животных, и/н инфицированного патогеном в дозе 3,7 lg БОЕ. Отмечено сходство показателей инфицирования сурков и человека (известных модельных видов животных) ВОО на всех этапах инфекционного процесса, свидетельствующее о потенциальной возможности применения сурков для определения как профилактической (экстренно-

профилактической), так и лечебной эффективности препаратов против оспы обезьян. В экспериментах, успешно выполненных в данном направлении с использованием сурков, показана возможность применения этого вида животных в качестве модельного.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С целью систематизации и минимизации требований к модельным видам животных, необходимым для использования в экспериментах по изучению профилактической (экстренно-профилактической) и лечебной эффективности препаратов, была разработана стратегия выбора таких видов животных на основе отобранных нами только наиболее важных критериев, по которым должны быть получены сходные между исследуемым видом животных и человеком показатели инфицирования патогеном (п. 3.1). Базируясь на данной стратегии, было определено дальнейшее направление наших исследований, сориентированное на оценку показателей инфицирования некоторых выбранных нами видов подопытных животных ВОО в сравнении с таковыми у человека.

К настоящему времени многие исследователи успешно провели поиск пяти видов модельных животных для оспы обезьян: иммунодефицитных мышей (CAST/EiJ и C57BL/6 stat1^{-/-}) [36, 37, 63], сусликов (ground squirrel, *Spermophilus tridecemlineatus*) [60, 78, 85], чернохвостых луговых собачек (black-tailed prairie dog, *Cynomys ludovicianus*) [43, 72, 86], сонь Келлена (African dormouse, *Graphiurus kelleni*) [83] и низших приматов (*Macaca fascicularis* и *mulatta*) [37, 127, 152]. Однако все эти виды модельных животных имеют те или иные существенные недостатки с точки зрения возможности их выращивания в неволе, ограниченности ареала обитания, дороговизны, удобства и адекватности их применения.

В этой связи в данной диссертации приведены экспериментальные данные, которые были ранее нами опубликованы [8, 11, 24, 28, 33, 70, 153, 159], нацеленные на подбор приемлемых для нас видов животных, моделирующих оспу обезьян у человека на всех его этапах инфекционного процесса, включая клиническую картину заболевания, для испытания эффективности разрабатываемых противовирусных препаратов при разных схемах применения: профилактической (экстренно-профилактической) и лечебной. Обобщенный результат всего спектра наших исследований с использованием этих животных отражен в полученном нами патенте [23].

В разделе 3 были представлены результаты исследований, непосредственно относящиеся к использованию сурков для данной цели, которые убедительно продемонстрировали реальную возможность их применения с ВОО при лечебно-профилактическом изучении активности разрабатываемых и существующих противооспенных препаратов.

Говоря о сурках, как о предлагаемой нами модели для оспы обезьян, важно отметить, что данные животные (в отличие от луговых собачек, используемых в экспериментах после вылавливания из дикой природы: ареал их обитания ограничен лишь Северной Америкой [13]) могут выращиваться в специализированных питомниках, например России, и подвергаться ветеринарному контролю, включая тестирование на отсутствие патогенных микроорганизмов и гельминтов, а также могут быть взяты из дикой природы с широким ареалом их распространенности (Америка, Европа и Азия) [25].

Таким образом, этот вид животных, как и луговые собачки, и обезьяны, при респираторном инфицировании ВОО воспроизводит не только первое звено инфекционного процесса у человека или признанных модельных видов животных (размножение вируса в первичных органах-мишенях для вируса), но и второе, и третье (активная доставка вируса основным лимфогенным путем от первичных органов-мишеней к вторичным и размножение вируса во вторичных органах-мишенях), а также внешние клинические признаки оспоподобного заболевания и может быть использовано как для оценки профилактической (экстренно-профилактической) эффективности противооспенных препаратов, так и лечебной (терапевтической).

По результатам проведенных исследований были сделаны следующие выводы.

1 При интраназальном инфицировании сурки проявляли высокую чувствительность к вирусу оспы обезьян с появлением выраженной и обширной симптоматики оспоподобного заболевания: гипертермия тела, подчелюстной лимфаденит, дискретная оспоподобная сыпь на коже и слизистых оболочках, серозно-гнойные ринит, конъюнктивит и блефарит. При этом заражение вирусом в дозах от 3,7 lg БОЕ и выше приводило в 100% случаев к заболеванию сурков через 7 - 9 суток после инфицирования, а доля заболевших животных зависела от величины дозы заражения (0,2; 2,2 и 3,7 lg БОЕ). Вместе с тем, процент летальности заболевших животных не зависел от величины заражающей дозы.

2 Подкожное инфицирование сурков вирусом оспы обезьян в дозах от 2,5 до 7,1 lg БОЕ приводило к гибели 100 % животных при выраженных клинических симптомах заболевания, аналогичным тем, которые наблюдались у этого вида животных при интраназальном заражении.

3 У сурков, интраназально инфицированных вирусом оспы обезьян в дозе 3,7 lg БОЕ, органами первичного размножения вируса являлись легкие, трахея и бифуркации

онные лимфоузлы. Установлено, что распространение патогена в организме этих животных от первичных органов-мишеней к вторичным происходит по лимфогенному пути с его размножением в органах лимфатической системы. При этом максимальное накопление патогена наблюдалось в легких, трахее, слизистой носовой перегородки и коже, где в разные сроки после заражения концентрация вируса превышала $6 \lg$ БОЕ/мл гомогената тканей органа.

4 У сурков, погибших после подкожного инфицирования вирусом оспы обезьян в дозах 5,6 и 7,1 \lg БОЕ, накопление патогена в наиболее высоких концентрациях ($\geq 5,7 \lg$ БОЕ/мл) зарегистрировано в носу, трахее, легких, почках, паховых и подмышечных лимфоузлах, яичках или яичниках и в кусочках кожи с оспинами; средние значения этого показателя (от 4,0 до 5,7 \lg БОЕ/мл) отмечены в головном мозге, поджелудочной железе, поднижнечелюстных и брыжеечных лимфоузлах, а самые низкие величины концентраций вируса ($< 4,0 \lg$ БОЕ/мл) - в сердце, печени и селезенке.

5 У сурков, интраназально инфицированных вирусом оспы обезьян, зарегистрирован факт его присутствия и размножения в традиционных для ортопоксвирусов первичных клетках-мишенях для этого патогена (в клетках системы мононуклеарных фагоцитов и эпителиоцитах в органах респираторного тракта), а также в некоторых других типах клеток (эндотелиоцитах, плазмоцитах, фибробластах, ретикулярных и гладкомышечных клетках).

6 У всех сурков, подкожно и интраназально зараженных вирусом оспы обезьян в дозах от 2,5 до 7,1 \lg БОЕ и 2,2 до 7,8 \lg БОЕ соответственно, наблюдались выраженные патоморфологические изменения воспалительно-некротического характера в органах респираторного тракта, коже, селезенке, лимфоузлах, тимусе и почках.

7 При пероральном введении химически синтезированных соединений НИОХ-14 и ST-246, обладающих антиортопоксвирусной активностью, суркам, интраназально инфицированным вирусом оспы обезьян в дозе 3,7 \lg БОЕ, не было зарегистрировано каких-либо внешних клинических признаков оспоподобного заболевания в течение всего срока наблюдения, что подтверждает возможность использования сурков в качестве лабораторной модели оспы обезьян для тестирования лечебно-профилактической эффективности противооспенных препаратов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

БОЕ	- бляшкообразующая единица
В/бр	- внутрибрюшинно
В/в	- внутривенно
ВНО	- вирус натуральной оспы
В/м	- внутримышечно
ГНЦ ВБ «Вектор»	- Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
Зап/афр	- западноафриканский
ИД ₅₀	- 50%-я инфицирующая доза
И/н	- интраназально
ЛД ₅₀	- 50%-я летальная доза
НИОХ	- Новосибирский институт органической химии
НЦ ЭСМП	- Научный центр экспертизы средств медицинского применения
П.з.	- после заражения
П/к	- подкожно
СО РАН	- Сибирское отделение российской академии наук
У.е.	- условная единица
ФБУН	- Федеральное бюджетное учреждение науки
Центр/афр	- центральноафриканский
CDC	- Центры по контролю и профилактике заболеваний
ЕМА	- Европейское агентство по контролю лекарственных средств
FDA	- Управление по лекарственным препаратам и продовольственным продуктам США
I ₉₅	- доверительный интервал для М с вероятностью 95%
Lg	- десятичный логарифм
М	- средняя величина
N	- количество животных
P	- вероятность ошибки, уровень значимости
Vero	- перевиваемая культура клеток почки зеленой мартышки

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Бургасов, П.Н. Натуральная оспа/ П.Н. Бургасов, Г.П. Николаевский. - М.: Медицина, 1972. - 208 с.
- 2 Вирус оспы обезьян – возбудитель оспоподобного заболевания человека/ С.С. Маренникова, Э.М. Шелухина, Н.Н. Мальцева, И.Д. Ладный// Вопр. Вирусол. – 1971. – №4. – С. 463-469.
- 3 Возможный механизм сохранения некоторых ортопоксвирусов в природе/ Э.М. Шелухина, Л.С. Шенкман, Э.Э. Розина, С.С. Маренникова// Вопр. вирусол. – 1979. - №4. – С. 368-372.
- 4 Выживаемость вируса натуральной оспы в корочках от больных/ Е.Ф. Беланов, А.А. Гуськов, Е.Б. Сокунова [и др.]// Докл. РАН. – 1997. - №354. – С. 832-834.
- 5 Закс Л. Статистическое оценивание/ Л. Закс. - М.: Статистика, 1976. – 598 с.
- 6 Изучение противовирусной активности химически синтезированных соединений в отношении ортопоксвирусов в экспериментах *in vitro*/ А.С. Кабанов, А.А. Сергеев, Л.Е. Булычев [и др.]// Пробл. особо опасных инфекций. – 2013. - №2. – С. 54-59.
- 7 Изучение противовирусной активности химически синтезированных соединений в отношении ортопоксвирусов в экспериментах *in vitro* и *in vivo*/ А.С. Кабанов, Л.Н. Шишкина, А.А. Сергеев [и др.]// Материалы научно-практической конференции “Диагностика и профилактика инфекционных болезней”, Новосибирск, 26 – 28 сент. 2013. - Изд-во «Ареал», 2013. – С.184-186.
- 8 Изучение чувствительности животных и первичных культур клеток мишеней к особо опасным ортопоксвирусам/ А.А. Сергеев, А.С. Кабанов, Л.Е. Булычев [и др.]// Диагностика и профилактика инфекционных болезней: Материалы научно-практической конференции “Диагностика и профилактика инфекционных болезней”, Новосибирск, 26 – 28 сент. 2013. - Изд-во «Ареал», 2013. – С. 23-25.
- 9 Изучение эффективности химических синтезированных соединений против ортопоксвирусов/ Л.Е. Булычев, А.А. Сергеев, А.С. Кабанов [и др.]// Дальневост. журнал инфек. пат. – 2012. - №20. – С. 102-105.
- 10 Инфекционные болезни и эпидемиология: Учебник/ В.И. Покровский, С.Г. Пак, Н.И. Брико, Б.К. Данилкин. - 2-е изд. - М.: Геотар-Мед, 2004.

- 11 Использование мыши в качестве модельного животного для оценки эффективности лечебно-профилактического действия препаратов против оспы обезьян/ А.А. Сергеев, А.С.Кабанов, Л.Е. Булычев [и др.]// Пробл. особо опасных инфекций. – 2013. - №2. – С. 60-65.
- 12 Клинико-вирусологические характеристики заболевания морских свинок, аэрогенно инфицированных вирусом Марбург/ М.Ю. Луб, А.Н. Сергеев, О.В. Пьянков [и др.]// Вопр. Вирусол. – 1995. - №3. – С. 119-121.
- 13 Луговые собачки [Электронный ресурс]/ Википедия. Свободная энциклопедия. – Режим доступа: https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9B%D1%83%D0%B3%D0%BE%D0%B2%D1%8B%D0%B5_%D1%81%D0%BE%D0%B1%D0%B0%D1%87%D0%BA%D0%B8.
- 14 Маренникова, С.С. Патогенные для человека ортопоксвирусы/ С.С. Маренникова, С.Н. Щелкунов. - М.: КМК Scientific Press Ltd., 1998. - 386 с.
- 15 Методы лабораторной диагностики оспы и их сравнительная оценка по материалам вспышки 1960 года. Натуральная оспа/ С.С. Маренникова, Э.М. Акатова, Э.Б. Гурвич [и др.]; под ред. С.С. Маренниковой. – М.: 1961. - 63-79.
- 16 Огарков, В.И. Аэрогенная инфекция/ В.И. Огарков, К.Г. Гапачко. - М.: Медицина, 1975. - 232 с.
- 17 Организация работы лабораторий, использующих методы электронной и атомно-силовой микроскопии при исследовании культур микроорганизмов I-IV групп патогенности: МУ 1.3.3103-13: утв. Глав. гос. сан. врачом России 16.08.2013. – Бюл. норм. и метод. документов Госсанэпиднадзора. - 2014. - №4. - Система ГАРАНТ: <http://base.garant.ru/70585158/#ixzz3L0vBHjmT>.
- 18 Основы техники безопасности в микробиологических и вирусологических лабораториях/ С.Г. Дроздов, Н.С. Гарин, Л.С. Джиндоян, В.М. Тарасенко. – М.: Медицина, 1987. - 256 с.
- 19 Оспа обезьян: особенности распространения после отмены обязательного оспопрививания/ С.В. Борисевич, С.С. Маренникова, А.А. Махлай [и др.]// ЖМЭИ. - 2012. - № 2. – С. 69-73.
- 20 Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных: введ. в действие с 12.08.1977 приказом Министерства здравоохранения СССР № 755.

21 Производные трицикло[3.2.2.0^{2,4}]нон-8-ен-6,7-дикарбоновой кислоты высокоэффективно ингибируют репликацию различных видов ортопоксвирусов/ Б.А. Селиванов, Е.Ф. Беланов, Н.И. Бормотов [и др.]// Доклады Академии наук. – 2011. - №441(3). – С. 414-418.

22 Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. - Перевод с английского. - Washington, D.C.: National Academy Press, 1996. – 138 с.

23 Способ оценки противооспенной активности лечебно-профилактических препаратов: пат. 2526504 Рос. Федерация: МКП C12N 7/00 A61K 35/76 A61K 39/275 A61P 31/20/ Сергеев А.А., Кабанов А.С., Булычев Л.Е. [и др.]; заявитель и патентообладатель Гос. научн. центр вирусол. и биотехнол. «Вектор». - № 2013113847/10; заявл. 27.03.13; опубл. 20.08.14, Бюл. №23. – 2 с: ил.

24 Сурок как модельное животное для оспы обезьян с целью оценки эффективности противооспенных препаратов/ А.А. Сергеев, К.А.Титова, А.С. Кабанов [и др.]// 1-я международная конференция молодых ученых: Сборник тезисов Новосиб. Гос. Ун-та, Новосибирск, 1-5 окт. 2014. - РИЦ НГУ, 2014. – С. 73-77.

25 Сурки [Электронный ресурс]/ Википедия. Свободная энциклопедия. – Режим доступа: <https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A1%D1%83%D1%80%D0%BA%D0%B8>.

26 Сурки [Электронный ресурс]/ Энциклопедия животных. - Режим доступа: <http://www.animalsglobe.ru/surki/>.

27 Течение инфекции у морских свинок, аэрогенно зараженных вирусом вентроуэльского энцефаломиелита лошадей/ Л.Е. Булычев, А.Н. Сергеев, А.Б. Рыжиков [и др.]// Вопр. вирусол. – 1995. - №3. – С. 122-124.

28 Течение заболевания у сурков при интраназальном заражении вирусом оспы обезьян/ А.А. Сергеев, А.С. Кабанов, Л.Е. Булычев [и др.]// Вопр. вирусол. – 2015. - №6. – С. 37-41.

29 Тихонов, В.Н. Лабораторные мини-свиньи: генетика и медико-биологическое использование/ В.Н. Тихонов. - Новосибирск: изд-во СО РАН, 2010. - 304 с.

30 Хабриев, Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ/ Р.У. Хабриев. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. – 832 с.

- 31 Халафян, А.А. Statistica 6. Статистический анализ данных/ Халафян, А.А. - 2-е изд. - М.: ООО «Бином-Пресс», 2010.
- 32 Ходакевич, Л.Н. Экологические и эпидемиологические аспекты оспы обезьян: дис. ... д-ра мед. наук: 03.00.06/ Ходакевич Лев Николаевич. – М., 1990. – 320 с.
- 33 Чувствительность различных видов животных к вирусу оспы обезьян/ А.А. Сергеев, Л.Е. Булычев, О.В. Пьянков [и др.]// Пробл. особо опасных инф. – 2012. - №1(111). – С. 88-92.
- 34 Шелухина, Э.М. Биология и экология ортопоксиров, патогенных для человека: дис. ... д-ра. мед. наук: 03.00.06/ Шелухина Эльвира Матвеевна. - М; 1980. – 230 с.
- 35 Экспериментальная лихорадка Эбола у макак резусов/ О.В. Пьянков А.Н. Сергеев, О.Г. Пьянкова, А.А. Чепурнов// Вопр. вирусол. – 1995. - №3. – С. 113-115.
- 36 Americo, J.L. Identification of wild-derived inbred mouse strains highly susceptible to monkeypox virus infection for use as small animal models/ J.L. Americo, B. Moss, P.L. Earl// J. Virol. – 2010. – Vol. 84(16). – P. 8172–8180.
- 37 A mouse model of lethal infection for evaluating prophylactics and therapeutics against monkeypox virus/ J. Stabenow, R.M. Buller, J. Schriewer [et al.]// J. Virol. – 2010. – Vol. 84(8). – P. 3909-3920.
- 38 Animal models of Orthopoxvirus infection/ J.L. Chapman, D.K. Nichols, M.J. Martinez, J.W. Raymond// Vet. Path. – 2010. – Vol. 47(5). – P. 852-870.
- 39 An orally bioavailable antipoxvirus compound (ST-246) inhibits extracellular virus formation and protects mice from lethal orthopoxvirus challenge/ G. Yang, D.C. Pevear, M.H. Davies [et al.]// J. Virol. – 2005. – Vol. 79(20). – P. 13139-13149.
- 40 A novel respiratory model of infection with monkeypox virus in cynomolgus macaques/ A.J. Goff, J. Chapman, C. Foster [et al.]// J. Virol. – 2011. – Vol. 85(10). – P. 4898-4909.
- 41 Antiviral treatment is more effective than smallpox vaccination upon lethal monkeypox virus infection/ K.J. Stittelaar, J. Neyts, L. Naesens [et al.]// Nature. – 2006. – Vol. 439. – P. 745–748.
- 42 A pox-like disease in cynomolgus monkeys/ P. von Magnus, E.K. Andresen, K.B. Petersen, A. Birch-Andersen// Acta Path. Microbiol. Scand. – 1959. – Vol. 46. – P. 156-176.

- 43 A prairie dog animal model of systemic orthopoxvirus disease using West African and Congo Basin strains of monkeypox virus/ C.L. Hutson, V.A. Olson, D.S. Carroll [et al.]// J. Gen. Virol. – 2009. – Vol. 90. – P. 323-333.
- 44 A protein-based smallpox vaccine protects non-human primates from a lethal monkeypox virus challenge/ G.W. Buchman, M.E. Cohen, Y. Xiao [et al.]// Vaccine. – 2010. – Vol. 28. – P. 6627–6636.
- 45 Assessment of the protective effect of Imvamune and Acam2000 vaccines against aerosolized monkeypox virus in *Cynomolgus* macaques/ G.J. Hatch, V.A. Graham, K.R. Bewley [et al.]// J. Virol. – 2013. – Vol. 87(14). – P. 7805–7815.
- 46 A tale of two clades: monkeypox viruses/ A.M. Likos, S.A. Sammons, V.A. Olson [et al.]// J. Gen. Virol. – 2005. – Vol. 86. – P. 2661–2672.
- 47 Attenuated NYCBH vaccinia virus deleted for the E3L gene confers partial protection against lethal monkeypox virus disease in *cynomolgus* macaques/ K.L. Denzler, T. Babas, A. Rippeon [et al.]// Vaccine. – 2011. – Vol. 29. – P. 9684–9690.
- 48 Baker, R.O. Potential antiviral therapeutics for smallpox, monkeypox and other orthopoxvirus infections/ R.O. Baker, M. Bray, J.W. Huggins// Antiviral Res. – 2003. – Vol. 57(1-2). – P. 13-23.
- 49 Bayer-Garner, I.B. Monkeypox virus: histologic, immunohistochemical and electron-microscopic findings/ I.B. Bayer-Garner// J. Cut. Pathol. – 2005. – Vol. 32. – P. 28-34.
- 50 Bernard, S.M. Qualitative assessment of risk for monkeypox associated with domestic trade in certain animal species, United States/ S.M. Bernard, S.A. Anderson// Emerg. Infect. Dis. – 2006. – Vol. 12(12). – P. 1827-1833.
- 51 Bras, G. The morbid anatomy of smallpox/ G. Bras// Docum. Med. Geogr. Trop. – 1952. – Vol. 4. – P. 303-351.
- 52 Breman, J. Monkeypox: an emerging infection for humans?/ J. Breman. - In: Emerging infections 4. - eds W. Scheld, W. Craig, J. Hughes. - Washington, DC: ASM Press, 2000. – P. 45–67.
- 53 Cidofovir and (S)-9-[3-hydroxy-(2-phosphonomethoxy)propyl]adenine are highly effective inhibitors of vaccinia virus DNA polymerase when incorporated into the template strand/ W.C. Magee, K.A. Aldern, K.Y. Hostetler, D.H. Evans// Antimicrob. Agents Chemother. – 2008. – Vol. 52. – P. 586–597.

- 54 Clinical characteristics of human monkeypox, and risk factors for severe disease/ G.D. Huhn, A.M. Bauer, K. Yorita [et al.]// Clin. Infect. Dis. – 2005. – Vol. 41. – P. 1742-1751.
- 55 Clinical manifestations of human monkeypox influenced by route of infection/ M.G. Reynolds, K.L. Yorita, M.J. Kuehnert [et al.]// J. Infect. Dis. – 2006. – Vol. 194. – P. 773-780.
- 56 Clonal vaccinia virus grown in cell culture fully protects monkeys from lethal monkeypox challenge/ K.A. Marriott, C.V. Parkinson, S.I. Morefield [et al.]// Vaccine. – 2008. – Vol. 26(4). – P. 581-588.
- 57 Coadministration of cidofovir and smallpox vaccine reduced vaccination side effects but interfered with vaccine-elicited immune responses and immunity to monkeypox/ H. Wei, D. Huang, J. Fortman [et al.]// J. Virol. – 2009. – Vol. 83(2). – P. 1115–1125.
- 58 Cohen, J. Is an old virus up to new tricks?/ J. Cohen// Science. – 1997.- Vol. 277. – P. 312–313.
- 59 Comparative analysis of monkeypox virus infection of cynomolgus macaques by the intravenous or intrabronchial inoculation Route/ R.F. Johnson, J.Dyall, D.R. Ragland [et al.]// J. Virol. – 2011. – Vol. 85(5). – P. 2112–2125.
- 60 Comparative pathology of North American and central African strains of monkeypox virus in a ground squirrel model of the disease/ E. Sbrana, S.Y. Xiao, P.C. Newman, R.B. Tesh// Am. J. Trop. Med. Hygiene. - 2007. – Vol. 76(1). – P. 155-164.
- 61 Comparative pathology of smallpox and monkeypox in man and macaques/ J.A. Cann, P.B. Jahrling, L.E. Hensley, V. Wahl-Jensen// J. Comp. Path. – 2013. – Vol. 148. – P. 6-21.
- 62 Comparison of monkeypox viruses pathogenesis in mice by in vivo imaging/ J.E. Osorio, K.P. Iams, C.U. Meteyer, T.E. Rocke// PLoS ONE. – 2009. – Vol. 4(8). - e6592.
- 63 Comparison of West African and Congo Basin monkeypox viruses in BALB/c and C57BL/6 mice/ C.L. Hutson, J.A. Abel, D.S. Carroll [et al.]// PLoS ONE. - 2010. – Vol. 5(1). - e8912.
- 64 Compounds, compositions and methods for treatment and prevention of orthopox-virus infections and associated diseases/ R. Jordan, T.R. Bailey, S.R. Rippin. - Patent WO 2004/112718 A3; 2005. International Patent Classification C07D 209/56.

- 65 Councilman, W.T. The pathological anatomy and histology of variola/ W.T. Councilman, G.B. Magrath, W.R. Brinckerhoff// J. Med. Res. – 1904. – Vol. 11. – P. 12-135.
- 66 Deletion of the monkeypox virus inhibitor of complement enzymes locus impacts the adaptive immune response to monkeypox virus in a nonhuman primate model of infection/ R.D. Estep, I. Messaoudi, M.A. O'Connor [et al.]// J. Virol. – 2011. – Vol. 85(18). – P. 9527–9542.
- 67 Detection and identification of variola virus in fixed human tissue after prolonged archival storage. Laboratory investigation/ R.J. Schoepp, M.D. Morin, M.J. Martinez [et al.]// J. Tech. Meth. Pathol. – 2004. – Vol. 84(1). – P. 41-48.
- 68 Development of ST-246 for treatment of poxvirus infections/ R. Jordan, J.M. Leeds, S. Tyavanagimatt, D.E. Hruby// Viruses. – 2010. – Vol. 2. – P. 2409-2435.
- 69 Di Giulio, D.B. Human monkeypox: an emerging zoonosis/ D.B. Di Giulio, P.B. Eckburg// Lancet Infect. Dis. – 2004. – Vol. 4. – P. 15–25.
- 70 Discovery of new antivirals for smallpox treatment and prevention / Development of therapeutic anti-smallpox antibodies / Assessment of the neutralizing activity of vaccine blood sera using live variola virus// WHO Advisory Committee on Variola Virus Research Report of the Fourteenth Meeting, Geneva, 16–17 October 2012, - WHO, 2012. – P. 8.
- 71 DNA/MVA HIV-1/AIDS vaccine elicits long-lived vaccinia virus-specific immunity and confers protection against a lethal monkeypox challenge/ P. Nigam, P.L. Earl, J.L. Americo [et al.]// Virology. – 2007. – Vol. 366. – P. 73–83.
- 72 Dosage comparison of Congo Basin and West African strains of monkeypox virus using a prairie dog animal model of systemic orthopoxvirus disease/ C.L. Hutson, D.S. Carroll, J. Self [et al.]// Virology. - 2010. – Vol. 402. – P. 72–82.
- 73 Downie, A.W. Survival of variola virus in dried exudate and crusts from smallpox patients/ A.W. Downie, K.R. Dumbell// Lancet. - 1947. – Vol. 1. – P. 550-553.
- 74 Earl, P.L. Lethal monkeypox virus infection of CAST/EiJ mice is associated with a deficient gamma interferon response/ P.L. Earl, J.L. Americo, B. Moss// J. Virol. – 2012. – Vol. 86(17). – P. 9105-9112.
- 75 Ecological niche and geographic distribution of human monkeypox in Africa/ R.S. Levine, A.T. Peterson, K.L. Yorita [et al.]// PLoS ONE. – 2007. – Vol. 2(1). - e176. doi:10.1371/journal.pone.0000176.

- 76 Effective antiviral treatment of systemic orthopoxvirus disease: ST-246 treatment of prairie dogs infected with monkeypox virus/ S.K. Smith, J. Self, S. Weiss [et al.]// J. Virol. – 2011. – Vol. 85(17). – P. 9176-9187.
- 77 Effect of route of inoculation on experimental respiratory viral disease in volunteers and evidence for airborne transmission/ R.B. Couch, T.R. Cate, R.G. Douglas [et al.]// Bacteriological Reviews. – 1966. – Vol. 30(3). – P. 517-529.
- 78 Efficacy of the antipoxvirus compound ST-246 for treatment of severe Orthopoxvirus infection/ E. Sbrana, R. Jordan, D.E. Hruby [et al.]// Am. J. Trop. Med. Hyg. - 2007. – Vol. 76(4). – P. 768–773.
- 79 Endemic human monkeypox, Democratic Republic of Congo, 2001–2004/ A.W. Rimoin, N. Kisalu, B. Kebela-Ilunga [et al.]// Emerg. Infect. Dis. - 2007. – Vol. 13(6). – P. 934-937.
- 80 Endemic smallpox in rural East Pakistan. H. Intravillage transmission and infectiousness/ D.B. Thomas, I. Arita, W.M. McCormack [et al.]// Am. J. Epidemiol. – 1971. – Vol. 93. – P. 373-383.
- 81 Establishment of the black-tailed prairie dog (*Cynomys ludovicianus*) as a novel animal model for comparing smallpox vaccines administered preexposure in both high- and low-dose monkeypox virus challenges/ M.S. Keckler, D.S. Carroll, N.F. Gallardo-Romero [et al.]// J. Virol. – 2011. – Vol. 85(15). – P. 7683–7698.
- 82 Evaluation of the efficacy of modified vaccinia Ankara (MVA)/Imvamune against aerosolized rabbitpox virus in a rabbit model/ N.L. Garza, J.M. Hatkin, V. Livingston [et al.]// Vaccine. – 2009. – Vol. 27. – P. 5496–5504.
- 83 Experimental infection of an African dormouse (*Graphiurus kelleni*) with monkeypox virus/ D.A. Schultz, J.E. Sagartz, D.L. Huso, R.M. Buller// Virology. – 2009. – Vol. 383. – P. 86-92.
- 84 Experimental infection of *Cynomolgus* macaques (*Macaca fascicularis*) with aerosolized monkeypox virus/ A. Nalca, V.A. Livingston, N.L. Garza [et al.]// PLoS ONE. – 2010. – Vol. 5(9). - e12880.
- 85 Experimental infection of ground squirrels (*Spermophilus tridecemlineatus*) with monkeypox virus/ R.B. Tesh, D.M. Watts, E. Sbrana [et al.]// Emerg. Infect. Dis. – 2004. – Vol. 10. – P. 1563-7.

- 86 Experimental infection of prairie dogs (*Cynomys ludovicianus*) with monkeypox virus/ S.Y. Xiao, E. Sbrana, D.M. Watts [et al.]// *Emerg. Infect. Dis.* – 2005. – Vol. 11. – P. 539–545.
- 87 Extensive lesions of monkeypox in a prairie dog (*Cynomys* sp.)/ I.M. Langohr, G.W. Stevenson, H.L. Thacker, R.L. Regnery// *Vet. Pathol.* – 2004. – Vol. 41. – P. 702–707.
- 88 Gispén, R. Histopathological and virological studies on monkeypox/ R. Gispén, J.D. Verlinde, P. Zwart// *Arch. Ges. Virusforsch.* – 1967. – Bd. 21. – S. 205–216.
- 89 Gispén, R. Relevance of some poxvirus infections in monkeys to smallpox eradication/ R. Gispén// *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* – 1975. – Vol. 69. – P. 299–302.
- 90 Grosenbach, D.W. Development of the small-molecule antiviral ST-246® as a smallpox therapeutic/ D.W. Grosenbach, R. Jordan, D.E. Hruby// *Future Virol.* – 2011. – Vol. 6(5). – P. 653–671.
- 91 Haemorrhagic smallpox I. Preliminary haematological studies/ J.F. Roberts, G. Coffee, S.M. Creel [et al.]// *Bull. WHO.* – 1965. – Vol. 33. – P. 607–613.
- 92 Hahon, N. Air-borne infectivity of the variolavaccinia group of poxviruses for the cynomolgus monkey, *Macaca irus*/ N. Hahon, M.H. McGavran// *J. Infect. Dis.* – 1961. – Vol. 109. – P. 294–298.
- 93 Hooper, J.W. Four-gene-combination DNA vaccine protects mice against a lethal vaccinia virus challenge and elicits appropriate antibody responses in nonhuman primates/ J.W. Hooper, D.M. Custer, E. Thompson// *Virology.* – 2003. – Vol. 306(1). – P. 181–195.
- 94 Human influenza resulting from aerosol inhalation/ R.H. Alford, J.A. Kasel, P.J. Gerone, V. Knight// *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* – 1966. – Vol. 122. – P. 800–804.
- 95 Human monkeypox, 1970–79/ J.G. Breman, Kalisa-Ruti, M.V. Steniowski [et al.]// *Bull. WHO.* – 1980. – Vol. 58(2). – P. 165–182.
- 96 Human monkeypox: an emerging zoonotic disease/ S. Parker, A. Nuara, R.M. Buller, D.A. Schultz// *Future Microbiol.* – 2007. – Vol. 2. – P. 17–34.
- 97 Human monkeypox: a newly emerged orthopoxvirus zoonosis in the tropical rain forests of Africa/ I. Arita, Z. Jezek, L. Khodakevich, K. Ruti// *Am. J. Trop. Med. Hyg.* – 1985. – Vol. 34. – P. 781–789.
- 98 Human monkeypox: a study of 2,510 contacts of 214 patients/ Z. Jezek, S.S. Marennikova, M. Mutumbo [et al.]// *J. Infect. Dis.* – 1986. – Vol. 154(4). – P. 551–555.

- 99 Human monkeypox: clinical features of 282 patients/ Z. Jezek, M. Szczeniowski, K.M. Paluku, M. Mutombo// J. Infect. Dis. – 1987. – Vol. 156. – P. 293–298.
- 100 Human monkeypox infection: a family cluster in the midwestern United States/ J.J. Sejvar, Y. Chowdary, M. Schomogyi [et al.]// J. Infect. Dis. – 2004. – Vol. 190. – P. 1833–1840.
- 101 Human monkeypox in Kasai Oriental, Democratic Republic of the Congo (former Zaire): preliminary report of October 1997 investigation. - Wkly Epidemiol. Rec. – 1997. – 72. – Vol. 369–372.
- 102 Human monkeypox Kasai Oriental, Zair (1996 - 1997). - Wkly Epidemiol. Rec. – 1997. – Vol. 72(15). – P. 101-104.
- 103 Human monkeypox: secondary attack rates/ Z. Jezek, B. Grab, M.V. Szczeniowski [et al.]// Bull. WHO. – 1988. – Vol. 66 (4). – P. 465-470.
- 104 Hutson, C.L. Monkeypox virus infections in small animal models for evaluation of anti-poxvirus agents/ C.L. Hutson, I.K. Damon// Viruses. - 2010. – Vol. 2. – P. 2763-2776.
- 105 Ikeda, K. The blood in purpuric smallpox. Clinical review of forty-eight cases// K. Ikeda // J. Am. Med. Assoc. – 1925. – Vol. 84. – P. 1807-1813.
- 106 Inhalational monkeypox virus infection in cynomolgus macaques/ R.E. Barnewall, D.A. Fisher, A.B. Robertson [et al.]// Front. Cell. Infect. Microbiol. – 2012. – Vol. 2. – 117.
- 107 Jezek, Z. Human monkeypox. Monographs in virology/ Z. Jezek, F. Fenner: ed. J.L. Melnick - Basel-Munchen-Paris-London-New York-New Delhi-Singapore-Tokyo-Sydney: Karger, 1988. - 140 p.
- 108 Lc16m8, a highly attenuated vaccinia virus vaccine lacking expression of the membrane protein b5r, protects monkeys from monkeypox/ M. Saijo, Y. Ami, Y. Suzuki [et al.]// J. Virol. – 2006. – Vol. 80. – P. 5179–5188.
- 109 Lillie, R.D. Smallpox and vaccinia. The pathologic histology/ R.D. Lillie// Arch. Pathol. – 1930. – Vol. 10. – P. 241-291.
- 110 Magee, W.C. Mechanism of inhibition of vaccinia virus DNA polymerase by cidofovir diphosphate/ W.C. Magee, K.Y. Hostetler, D.H. Evans// Antimicrob. Agents Chemother. – 2005. – Vol. 49. – P. 3153–3162.
- 111 Mahy, B.W.J. Virology methods manual/ B.W.J. Mahy, H.O. Kangro; edited by: B.W.J. Mahy, H.O. Kangro. – London: Academic Press, 1996. - 374 p.

112 Major increase in human monkeypox incidence 30 years after smallpox vaccination campaigns cease in the Democratic Republic of Congo/ A.W. Rimoin, P.M. Mulembakani, S.C. Johnston [et al.]// *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2010. – Vol. 107(31). – P. 16262-16267.

113 Marennikova, S.S. Experimental infection of squirrels *Sciurus vulgaris* by monkeypox virus/ S.S. Marennikova, E.M. Shelukhina, O.A. Zhukova// *Acta Virol.* – 1989. – Vol. 33. – P. 399.

114 Marennikova, S.S. Orthopoxviruses pathogenic for humans/ S.S. Marennikova, S.N. Shchelkunov. – NY: Springer New York, 2005. – 375 p.

115 Marennikova, S.S. Susceptibility of some rodent species to monkeypox virus, and course of the infection/ S.S. Marennikova, E.M. Seluhina// *Bull. WHO.* – 1976. – Vol. 53. – P. 13-20.

116 McIntosh, A.A. Vaccinia virus glycoprotein A34R is required for infectivity of extracellular enveloped virus/ A.A. McIntosh, G.L. Smith// *J. Virol.* – 1996. – Vol. 70. – P. 272–281.

117 Milhaud, C. Analyse d'un cas de variole du singe (monkeypox) chez le chimpanzee (*Pan troglodytes*)/ C. Milhaud, M. Klein, J. Virat// *Exp. Anim.* – 1969. – Vol. 2. – P. 121-135.

118 Mitra, A.C. Virus content of smallpox scabs/ A.C. Mitra, J.K. Sarkar, M.K. Mukherjee// *Bull. WHO.* – 1974. – Vol. 51. – P. 106-107.

119 Modified vaccinia virus Ankara protects macaques against respiratory challenge with monkeypox virus/ K.J. Stittelaar, G. van Amerongen, I. Kondova [et al.]// *J. Virol.* – 2005. – Vol. 79 – P. 7845–7851.

120 Molecular smallpox vaccine delivered by alphavirus replicons elicits protective immunity in mice and non-human primates/ J.W. Hooper, A.M. Ferro, J.W. Golden [et al.]// *Vaccine.* – 2010. – Vol. 28. – P. 494–511.

121 Monkey Pox. I. Clinical, virologic and immunologic studies/ H.A. Wenner, F.D. Macasaet, P.S. Kamitsuka, P. Kidd// *Am. J. Epidemiol.* – 1968. – Vol. 87. – P. 551-566.

122 Monkeypox disease in irradiated cynomolgus monkeys/ S.J. McConnell, Y.F. Herman, D.E. Mattson, L. Erickson// *Nature.* – 1962. – Vol. 195. – P. 1128-1129.

123 Monkeypox transmission and pathogenesis in prairie dogs/ J. Guarner, B.J. Johnson, C.D. Paddock [et al.]// *Emerg. Infect. Dis.* – 2004. – Vol. 10(3). – P. 426-431.

- 124 Mukherjee, M.K. Pattern of intrafamilial transmission of smallpox in Calcutta, India/ M.K. Mukherjee, J.K. Sarkar, A.C. Mitra// Bull. WHO. – 1974. – Vol. 51. – P. 219-225.
- 125 Nonhuman primates are protected from smallpox virus or monkeypox virus challenges by the antiviral drug ST-246/ J. Huggins, A. Goff, L. Hensley [et al.]// Antimicrob. Agents Chemother. – 2009. – Vol. 53(6). – P. 2620–2625.
- 126 Occupational risks during a monkeypox outbreak, Wisconsin, 2003/ D.R. Croft, M.J. Sotir, C.J. Williams [et al.]// Emerg. Infect. Dis. – 2007. – Vol. 13(8). – P. 1150-1157.
- 127 Parker, S. Therapeutic and prophylactic drugs to treat orthopoxvirus infections/ S. Parker, L. Handley, R.M. Buller// Future Virol. – 2008. – Vol. 3. – P. 595–612.
- 128 Pathogenesis of fulminant monkeypox with bacterial sepsis after experimental infection with West African monkeypox virus in a cynomolgus monkey/ N. Nagata, M. Saijo, M. Kataoka [et al.]// Int. J. Clin. Exp. Pathol. – 2014. – Vol. 7(7). P. 4359-4370.
- 129 Peters, J.C. A monkeypox enzooty in the “Blijdorp” Zoo/ J.C. Peters// Tijdschr. Diergeneeskd. – 1966. – Bd. 91. – S. 387-391.
- 130 Postexposure immunization with modified vaccinia virus Ankara or conventional Lister vaccine provides solid protection in a murine model of human smallpox/ N. Paran, Y. Suezter, S. Lustig [et al.]// J. Infect. Dis. – 2009. – Vol. 199(1). – P. 39-48.
- 131 Poxvirus antigen staining of immune cells as a biomarker to predict disease outcome in monkeypox and cowpox virus infection in non-human primates/ H. Song, K. Janosko, R.F. Johnson [et al.]// PloS ONE. – 2013. – Vol. 8(4). - e60533.
- 132 Prier, J.E. A pox disease of monkeys/ J.E. Prier, R.M. Sauer// Ann. N.Y. Acad. Sci. 1960. – Vol. 85. – P. 951-959.
- 133 Rao, A.R. Smallpox/ A.R. Rao. - Bombay: The Kothari Book Depot, 1972. - 220 p.
- 134 Rapid protection in a monkeypox model by a single injection of a replication-deficient vaccinia virus/ P.L. Earl, J.L. Americo, L.S. Wyatt [et al.]// Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2008. – Vol. 105. – P. 10889–10894.
- 135 Results of a virological study of smallpox convalescents and contacts/ E.M. Shelukhina, S.S. Marennikova, N.N. Maltseva [et al.]// J. Hyg. Epidemiol., Microbiol., Immunol. – 1973 – Vol. 17. – P. 266-271.

- 136 Side-by-side comparison of gene-based smallpox vaccine with MVA in nonhuman primates/ J.W. Golden, M. Josleyn, E.M. Mucker [et al.]// PLoS ONE. – 2012. – Vol. 7(7). – e42353.
- 137 Smallpox and its eradication/ F. Fenner, D.A. Henderson, I. Arita [et al.] - Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1988. - 1460 p.
- 138 Smallpox DNA vaccine protects nonhuman primates against lethal monkeypox/ J.W. Hooper, E. Thompson, C. Wilhelmsen [et al.]// J. Virol. – 2004. – Vol. 78. – P. 4433–4443.
- 139 Smallpox vaccine does not protect macaques with AIDS from a lethal monkeypox virus challenge/ Y. Edghill-Smith, M. Bray, C.A. Whitehouse [et al.]// J. Infect. Dis. - 2005. – Vol. 191(3). – P. 372-381.
- 140 Smallpox vaccine-induced antibodies are necessary and sufficient for protection against monkeypox virus/ Y. Edghill-Smith, H. Golding, J. Manischewitz [et al.]// Nat. Med. - 2005. – Vol. 11(7). – P. 740-747.
- 141 Smallpox vaccine with integrated IL-15 demonstrates enhanced in vivo viral clearance in immunodeficient mice and confers long-term protection against a lethal monkeypox challenge in cynomolgus monkeys/ R.J. Zielinski, J.V. Smedley, P.Y. Perera [et al.]// Vaccine. – 2010. – Vol. 28. – P. 7081–7091.
- 142 ST-246 antiviral efficacy in a nonhuman primate monkeypox model: determination of the minimal effective dose and human dose justification/ R. Jordan, A. Goff, A. Frimm [et al.]// Antimicrob. Agents Chemother. – 2009. – Vol. 53(5). – P. 1817–1822.
- 143 Standardization of a neutralizing anti-vaccinia antibodies titration method: an essential step for titration of vaccinia immunoglobulins and smallpox vaccines evaluation/ I. Leparac-Goffart, B. Poirier, D. Garin [et al.]// J. Clin. Virol. – 2005. – Vol. 32. – P. 47-52.
- 144 Stern, R.J. Attenuation of B5R mutants of rabbitpox virus in vivo is related to impaired growth and not an enhanced host inflammatory response/ R.J. Stern, J.P. Thompson, R.W. Moyer// Virology. – 1997. – Vol. 233. – P. 118–129.
- 145 Studies on a pox disease of mankeys. II. Isolation of the etiological agent/ J.E. Prier, R.M. Sauer, R.G. Malsberger, J.M. Sillaman// Amer. J. Vet. Res. - 1960. - Vol. 21. - P. 381-384.

146 Studies on the pathogenesis of monkey pox: II. Dose-response and virus dispersion/ H.A. Wenner, C.T. Cho, C.R. Bolano, P.S. Kamitsuka// Arch. Gesamte Virusforsch. – 1969. – Bd. 27. – S. 166–178.

147 Studies on the pathogenesis of monkey pox: 3. Histopathological lesions and sites of immunofluorescence/ H.A. Wenner, C.R. Bolano, C.T. Cho, P.S. Kamitsuka// Arch. Gesamte Virusforsch. – 1969. – Bd. 27. – S. 179–197.

148 Studies on the virus content of mouth washing in the acute phase of smallpox/ A.W. Downie, L. St. Vincent, G. Meicklejohn [et al.]// Bull. WHO. – 1961. – Vol. 25. – P. 49–53.

149 Subunit recombinant vaccine protects against monkeypox/ J.M. Heraud, Y. Edghill-Smith, V. Ayala [et al.]// J. Immunol. – 2006. – Vol. 177(4). – P. 2552–2564.

150 The detection of monkeypox in humans in the Western Hemisphere/ K.D. Reed, J.W. Melski, M.B. Graham [et al.]// N. Engl. J. Med. – 2004. Vol. 350. P. 342–350.

151 The histopathology and electron microscopy of a human monkeypox lesion/ M.J. Stagles, A.A. Watson, J.F. Boyd [et al.]// Transcr. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. – 1985. – Vol. 79. P. 192–202.

152 The pathology of experimental aerosolized monkeypox virus infection in cynomolgus monkeys (*macaca fascicularis*)/ G. Zaucha, P. Jahrling, T. Geisbert [et al.]// Lab. Invest. – 2001. – Vol. 81. – P. 1581–1600.

153 The possibility of using the ICR mouse as an animal model to assess anti-monkeypox drug efficacy/ A.A. Sergeev, A.S. Kabanov, L.E. Bulychev [et al.]// Transbound. Emerg. Dis. - 2015, doi: 10.1111/tbed.12323.

154 The role of squirrels in sustaining monkeypox virus transmission/ L. Khodakevich, M. Szczeniowski, M.D. Manbu [et al.]// Trop. Geogr. Med. – 1987. – Vol. 39. – P. 115–122.

155 Transmission of monkeypox among persons exposed to infected prairie dogs in Indiana in 2003/ J.C. Kile, A.T. Fleischauer, B. Beard [et al.]// Arch. Pediatr. Adolesc. Med. – 2005. – Vol. 159. – P. 1022–1025.

156 Transmissibility of the monkeypox virus clades via respiratory transmission: investigation using the prairie dog-monkeypox virus challenge system/ C.L. Hutson, N. Gallardo-Romero, D.S. Carroll [et al.]// PloS ONE. – 2013. – Vol. 8(2). - e55488.

157 Treatment of variola major with adenine arabinoside/ J.P. Koplan, K.A. Monsur, S.O. Foster [et al.]// J. Infect. Dis. – 1975. – Vol. 131. – P. 34–39.

158 Update: multistate outbreak of monkeypox—Illinois, Indiana, Kansas, Missouri, Ohio, and Wisconsin, 2003. - *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* – 2003. – Vol. 52. – P. 616–618.

159 Using the ground squirrel (*Marmota bobak*) as an animal model to assess monkeypox drug efficacy/ A.A. Sergeev, A.S. Kabanov, L.E. Bulychev [et al.]// *Transbound. Emerg. Dis.* - 2015. - doi: 10.1111/tbed.12364.

160 Virulence and pathophysiology of the Congo Basin and West African strains of monkeypox virus in non-human primates/ M. Saijo, Y. Ami, Y. Suzaki [et al.]// *J. Gen. Virol.* – 2009. – Vol. 90. – P. 2266–2271.

161 Virulence differences between monkeypox virus isolates from West Africa and the Congo Basin// N. Chen, G. Li, M.K. Liszewski [et al.]// *J. Virol.* – 2005. – Vol. 340. – P. 46–63.

162 Virus excretion in smallpox. I. Excretion in the throat, urine and conjunctive of patients/ J.K. Sarkar, A.C. Mitra, M.K. Mukherjee [et al.]// *Bull. WHO.* - 1973. – Vol. 48. – P. 517-522.

163 Virus excretion in smallpox. 2. Excretion in the throats of household contacts/ J.K. Sarkar, A.C. Mitra, M.K. Mukherjee, S.K. De// *Bull. WHO.* - 1973. – Vol. 48. – P. 523-527.

164 Wolff, H.L. The survival of smallpox virus (*variola minor*) in natural circumstances/ H.L. Wolff, J.J. Croon// *Bull. WHO.* – 1968. – Vol. 38. – P. 492-493.

165 Zhang, W.H. Vaccinia virus F12L protein is required for actin tail formation, normal plaque size, and virulence/ W.H. Zhang, D. Wilcock, G.L. Smith// *J. Virol.* – 2000. – Vol. 74. – P. 11654–11662.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

- Таблица 1.1 Внешние клинические признаки заболевания, включая его исход, у некоторых видов подопытных животных при различных способах заражения вирусом оспы обезьян (ВОО)
- Таблица 1.2 Накопление вируса оспы обезьян (ВОО) в органах, тканях и биологических жидкостях различных видов животных, инфицированных вирусом оспы обезьян (ВОО) разными способами и дозами
- Таблица 1.3 Накопление вируса в органах, тканях и биологических жидкостях различных видов животных, погибших после инфицирования вирусом оспы обезьян (ВОО) разными способами и дозами
- Таблица 1.4 Спектр патоморфологических изменений в органах и тканях людей, умерших от обычных и геморрагических типов натуральной оспы, по данным [61]
- Таблица 1.5 Спектр патоморфологических изменений в органах и тканях людей, умерших от натуральной оспы, клинические типы которой не указаны, по данным [61]
- Таблица 1.6 Эффективность различных лечебно-профилактических препаратов в экспериментах на модельных видах животных с использованием вируса оспы обезьян (ВОО)
- Таблица 3.1 Данные по чувствительности сурков к вирусу оспы обезьян (штамм V79-1-005) при подкожном (п/к) заражении различными дозами
- Таблица 3.2 Данные по чувствительности сурков к вирусу оспы обезьян (штамм V79-1-005) при интраназальном (и/н) заражении различными дозами
- Таблица 3.3 Данные биологической активности штамма V79-1-005 вируса оспы обезьян (ВОО) при интраназальном (и/н) заражении различных видов животных
- Таблица 3.4 Динамика накопления штамма V79-1-005 вируса оспы обезьян (ВОО) в биоматериалах* от сурков, интраназально инфицированных дозой 3,7 lg БОЕ
- Таблица 3.5 Данные по накоплению штамма V79-1-005 вируса оспы обезьян (ВОО) в биоматериалах* от павших сурков после подкожного (п/к)

заражения дозой 7,1 lg БОЕ

- Таблица 3.6 Данные по накоплению штамма V79-1-005 вируса оспы обезьян (ВОО) в биоматериалах* от павших сурков после подкожного (п/к) заражения дозой 5,6 lg БОЕ
- Таблица 3.7 Результаты соответствия показателей инфицирования сурков вирусом оспы обезьян (ВОО), сориентированных на респираторное заражение, таковым у человека
- Таблица 3.8 Показатели тестирования противовирусной активности препаратов в опытах *in vitro* в отношении штамма К-1 вируса оспы мышей
- Таблица 3.9 Показатели тестирования противовирусной активности препаратов в опытах *in vitro* в отношении штамма ЛИВП вируса осповакцины
- Таблица 3.10 Показатели тестирования противовирусной активности препаратов в опытах *in vitro* в отношении штамма Гришак вируса оспы коров
- Таблица 3.11 Показатели тестирования противовирусной активности препаратов в опытах *in vitro* в отношении штамма V79-1-005 вируса оспы обезьян
- Таблица 3.12 Лечебно-профилактическая активность препаратов при оспе обезьян у сурков после интраназального заражения штаммом V79-1-005 вируса оспы обезьян (ВОО) в дозе 3,7 lg БОЕ
- Таблица 3.13 Титры антител у выживших сурков после и/н инфицирования штаммом V79-1-005 вируса оспы обезьян (ВОО) в дозе 3,7 lg БОЕ и последующей обработки лечебно-профилактическими препаратами
- Рисунок 3.1 Сурок с сыпью на коже лапки через 12 сут после подкожного заражения вирусом оспы обезьян (штамм V79-1-005) в дозе 5,5 lg БОЕ
- Рисунок 3.2 Сурок с сыпью на коже через 9 сут после интраназального заражения вирусом оспы обезьян (штамм V79-1-005) в дозе 2,2 lg БОЕ
- Рисунок 3.3 Сурок с гнойными выделениями из носовой полости через 10 сут после интраназального заражения вирусом оспы обезьян (штамм V79-1-005) в дозе 4,2 lg БОЕ
- Рисунок 3.4 Трансмиссионная электронная микроскопия, цитоплазма реснитчатого эпителиоцита трахеи с вироплазмой (вирусных частиц различной

степени зрелости) у сурка через 7 сут после интраназального заражения дозой 3,7 lg БОЕ штамма V79-1-005 вируса оспы обезьян

- Рисунок 3.5 Трансмиссионная электронная микроскопия, макрофаг с вирусными частицами в цитоплазме у сурка через 7 сут после интраназального заражения дозой 3,7 lg БОЕ штамма V79-1-005 вируса оспы обезьян
- Рисунок 3.6 Трансмиссионная электронная микроскопия, альвеолоцит, в цитоплазме которого групповые скопления вирусных частиц, перицеллюлярное скопление фибрина, у сурка через 9 сут после интраназального заражения дозой 3,7 lg БОЕ штамма V79-1-005 вируса оспы обезьян
- Рисунок 3.7 Трансмиссионная электронная микроскопия, плазмоцит, содержащий формирующиеся вирионы, у сурка через 12 сут после интраназального заражения дозой 3,7 lg БОЕ штамма V79-1-005 вируса оспы обезьян
- Рисунок 3.8 Трансмиссионная электронная микроскопия, фрагмент стенки капилляра собственной пластинки слизистой оболочки трахеи: эритроцит и волокна фибрина в просвете капилляра, полиморфизм вирусных частиц, локализованных в цитоплазме эндотелиоцита, у сурка через 9 сут после интраназального заражения дозой 3,7 lg БОЕ штамма V79-1-005 вируса оспы обезьян
- Рисунок 3.9 Трансмиссионная электронная микроскопия, альвеолы в просвете, которых плеоморфные вирусные частицы, у сурка через 9 сут после интраназального заражения дозой 3,7 lg БОЕ штамма V79-1-005 вируса оспы обезьян
- Рисунок 3.10 Гистологический препарат (окраска гематоксилином и эозином), органы дыхательного тракта сурков с изменениями через 9 сут после интраназального заражения дозой 3,7 lg БОЕ штамма V79-1-005 вируса оспы обезьян
- Рисунок 3.11 Гистологический препарат (окраска гематоксилином и эозином), кожа сурков с изменениями через 9 сут после интраназального заражения дозой 3,7 lg БОЕ штамма V79-1-005 вируса оспы обезьян
- Рисунок 3.12 Гистологический препарат (окраска гематоксилином и эозином),

внутренние органы сурков с изменениями через 9 суток после интраназального заражения дозой $3,7 \lg$ БОЕ штамма V79-1-005 вируса оспы обезьян

Рисунок 3.13 Патогенетическая схема заболевания у сурков, интраназально (и/н) инфицированных центральноафриканским штаммом V79-1-005 вируса оспы обезьян (ВОО) дозой $3,7 \lg$ БОЕ