
ОБЗОРЫ

© ЩЕЛКУНОВ С.Н., ЩЕЛКУНОВА Г.А., 2019

Щелкунов С.Н., Щелкунова Г.А.

Нужно быть готовыми к возврату оспы

ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

В обзоре представлен краткий анализ результатов исследований, выполненных за 40 лет после ликвидации оспы и посвящённых изучению геномной организации и эволюции вируса натуральной оспы, разработке современных методов диагностики, вакцинопрофилактики и химиотерапии оспы и других зоонозных ортопоксвирусных инфекций человека. В связи с тем, что вакцинация против оспы в ряде случаев приводила к тяжёлым побочным реакциям, Всемирная организация здравоохранения рекомендовала после 1980 г. прекратить её во всех странах. В результате этого решения человечество утратило иммунитет не только против оспы, но и против других зоонозных ортопоксвирусных инфекций человека. Участвовавшие в последние годы случаи инфицирования людей зоонозными ортопоксвирусами заставляют вернуться к рассмотрению вопроса о возможном возврате оспы в результате естественной эволюции этих вирусов. На основе анализа доступных архивных данных об эпидемиях оспы, истории древних цивилизаций, а также новейших данных об эволюционных взаимосвязях ортопоксвирусов авторами была сформулирована гипотеза о том, что оспа могла в прошлом неоднократно возникать в результате эволюционных изменений зоонозного вируса-прародителя и исчезать вследствие недостаточной численности населения разрозненных древних цивилизаций. Лишь исторически последняя пандемия оспы продолжалась длительное время и была ликвидирована в XX веке при объединении усилий медиков и учёных многих стран под эгидой Всемирной организации здравоохранения. Таким образом, принципиальных запретов на возможность повторного появления в будущем оспы или схожего заболевания человека в процессе естественной эволюции существующих в настоящее время зоонозных ортопоксвирусов нет. Поэтому необходимо разрабатывать и широко внедрять современные методы эффективной и быстрой видоспецифичной диагностики всех видов ортопоксвирусов, патогенных для человека, включая вирус натуральной оспы. Также важно разрабатывать новые безопасные методы профилактики и терапии ортопоксвирусных инфекций человека.

Ключевые слова: обзор; вирус натуральной оспы; ортопоксвирусы; эволюция; диагностика; вакцина; химиотерапия.

Для цитирования: Щелкунов С.Н., Щелкунова Г.А. Нужно быть готовыми к возврату оспы. *Вопросы вирусологии*. 2019; 64(5): 206-214. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-5-206-214>.

Информация об авторах:

Щелкунов С.Н., <https://orcid.org/0000-0002-6255-9745>Щелкунова Г.А., <https://orcid.org/0000-0003-0708-7826>

Для корреспонденции: Щелкунов Сергей Николаевич, д-р биол. наук, профессор, главный научный сотрудник отдела геномных исследований ФБУН ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область; <https://orcid.org/0000-0002-6255-9745>. E-mail: snschel@vector.nsc.ru

Shchelkunov S.N., Shchelkunova G.A.

We should be prepared to smallpox re-emergence

State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Koltsovo, Novosibirsk region, 630559, Russia

The review contains a brief analysis of the results of investigations conducted during 40 years after smallpox eradication and directed to study genomic organization and evolution of variola virus (VARV) and development of modern diagnostics, vaccines and chemotherapies of smallpox and other zoonotic orthopoxviral infections of humans. Taking into account that smallpox vaccination in several cases had adverse side effects, WHO recommended ceasing this vaccination after 1980 in all countries of the world. The result of this decision is that the mankind lost the collective immunity not only to smallpox, but also to other zoonotic orthopoxvirus infections. The ever more frequently recorded human cases of zoonotic orthopoxvirus infections force to renew consideration of the problem of possible smallpox reemergence resulting from natural evolution of these viruses. Analysis of the available archive data on smallpox epidemics, the history of ancient civilizations, and the newest data on the evolutionary relationship of orthopoxviruses has allowed us to hypothesize that VARV could have repeatedly reemerged via evolutionary changes in a zoonotic ancestor virus and then disappeared because of insufficient population size of isolated ancient civilizations. Only the historically last smallpox pandemic continued for a long time and was contained and stopped in the 20th century thanks to the joint efforts of medics and scientists from many countries under the aegis of WHO. Thus, there is no fundamental prohibition on potential reemergence of smallpox or a similar human disease in future in the course of natural evolution of the currently existing zoonotic orthopoxviruses. Correspondingly, it is of the utmost importance to develop and widely adopt state-of-the-art methods for efficient and rapid species-specific diagnosis of all orthopoxvirus species pathogenic for humans, VARV included. It is also most important to develop new safe methods for prevention and therapy of human orthopoxvirus infections.

Keywords: review; smallpox virus; orthopoxviruses; evolution; diagnostics; vaccine; chemotherapy.

For citation: Shchelkunov S.N., Shchelkunova G.A. We should be prepared to smallpox re-emergence. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2019; 64(5): 206-214. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-5-206-214>

For correspondence: Sergei N. Shchelkunov, Sc.D., professor, chief researcher of the department of genomic research, State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Koltsovo, Novosibirsk region, 630559, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-6255-9745>. E-mail: snshchel@vector.nsc.ru

Information about authors:

Shchelkunov S.N., <https://orcid.org/0000-0002-6255-9745>

Shchelkunova G.A. <https://orcid.org/0000-0003-0708-7826>

Acknowledgments. This work was supported by grant of Russian Science Foundation №19-14-00006.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 25 April 2019

Accepted 16 July 2019

Введение

На основании заключения Глобальной комиссии Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) по удостоверению ликвидации натуральной оспы (декабрь 1979 г.) на 33-й сессии Всемирной ассамблеи здравоохранения (ВАЗ) 8 мая 1980 г. было торжественно провозглашено, что все народы земли одержали победу над этой особо опасной инфекцией. С целью предотвратить случайное распространение возбудителя данной инфекции были предприняты мероприятия по сокращению числа лабораторий, сохраняющих вирус натуральной оспы (*Variola virus*, VARV). В 1975 г. в разных странах мира существовало 75 лабораторий, сохраняющих VARV, в 1981 г. их осталось четыре (США, СССР, Южная Африка, Англия), а в 1984 г. – две лаборатории, получившие статус Сотрудничающих центров ВОЗ по оспе и родственным инфекциям: НИИ вирусных препаратов (Москва, СССР) и Центры по контролю заболеваемости – CDC (Атланта, США) [1, 2].

Наличие даже этих двух строго контролируемых ВОЗ хранилищ жизнеспособных штаммов VARV рассматривалось как источник возможной биологической опасности. В связи с этим в марте 1986 г. на 4-м заседании Специального комитета ВОЗ по ортопоксвирусным инфекциям (далее – Комитет ВОЗ) в Женеве было решено, что набора генов VARV, клонированных в неэкспрессионных сайтах бактериальных плазмид, достаточно для будущих исследований данного вируса. В связи с этим предложили получить клонотeki фрагментов ДНК VARV различного географического происхождения и разных подтипов (*major*, *minor*). Поскольку реализация решения об уничтожении всех штаммов VARV может привести к безвозвратному результату, члены Комитета ВОЗ провели консультации с 60 вирусологами, работающими в 21 стране. Только пять из них посчитали, что штаммы VARV нужно сохранять. Принимая всё это во внимание, Комитет ВОЗ заключил, что клонированные фрагменты ДНК VARV обеспечат достаточный референс-материал для решения любых проблем в будущем, включая возможные случаи натуральной оспы, и исследования, использующие культуры VARV, больше не понадобятся [3].

В декабре 1990 г. на 5-м заседании Комитета ВОЗ было принято решение о необходимости уничтожения коллекций штаммов VARV и их геномных ДНК. Для этого важно было обеспечить надёжную консервацию в биологически безопасной форме генетического материала разных изолятов VARV. С целью

сохранения информации об этом уникальном вирусе Комитет ВОЗ счёл необходимым предварительно провести исследование по секвенированию его генома. Были одобрены национальные программы расшифровки генома VARV, предложенные Россией (НИИ вирусных препаратов, Москва; НПО «Вектор», р.п. Кольцово, Новосибирская область) и США (CDC, Атланта, Джорджия; Институт геномных исследований, Гейтерсберг, Мэриленд), и учреждён Технический комитет ВОЗ по удостоверению полноты секвенирования генома VARV [4].

К середине 1992 г. российские учёные первыми завершили секвенирование генома высоковирулентного штамма VARV *major*, выделенного в Индии в 1967 г. во время вспышки инфекции с уровнем летальности 31% среди заболевших, и выполнили компьютерный анализ полученных данных [5]. Результаты этого исследования были доложены в сентябре 1992 г. на 9-й Международной конференции по поксвирусам и иридовирусам (Ле-Дьяблере, Швейцария) и Международном симпозиуме «100 лет вирусологии» (Санкт-Петербург, Россия) [6]. Спустя год американские исследователи завершили секвенирование полного генома другого высоковирулентного штамма – VARV *major* Bangladesh-1975, выделенного во время вспышки оспы с уровнем летальности 18,5% [7]. В совместном исследовании российские и американские учёные дополнительно выполнили секвенирование и анализ полного генома низковирулентного штамма VARV *minor* Garcia-1966 [8].

На 6-м заседании Комитета ВОЗ (9 сентября 1994 г., Женева, Швейцария) было решено хранить запасы ДНК вируса натуральной оспы в двух международных репозиториях: в НПО «Вектор», получившем к тому времени статус Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии (ГНЦ ВБ «Вектор», Россия), и в CDC (США) [9].

Учитывая потенциальную опасность работы с живым VARV в Москве, на основании совместного приказа Минздравмедпрома России, Миннауки России, Госкомсанэпиднадзора России и Российской академии медицинских наук 27 сентября 1994 г. состоялась передача коллекции штаммов VARV из НИИ вирусных препаратов в ГНЦ ВБ «Вектор». После инспекционной проверки в 1995 г. комиссией ВОЗ лаборатории наивысшей физической защиты, предназначенной для работы с VARV, ВОЗ официально зарегистрировала создание на базе ГНЦ ВБ «Вектор» Сотрудничающего центра ВОЗ по диагностике ортопоксвирусных ин-

фекций и музея штаммов и ДНК вируса оспы. Право на хранение коллекции штаммов VARV и геномной ДНК этого вируса на базе ГНЦ ВБ «Вектор» было признано резолюцией ВАЗ 49.10 и подтверждено последующими резолюциями ВАЗ 52.10, 55.15 и 60.1.

По мере вовлечения широкого круга учёных в обсуждение вопроса о необходимости уничтожения штаммов VARV, хранящихся в двух официальных коллекциях, контролируемых ВОЗ, становилось ясно, что не следует торопиться с принятием окончательного решения об уничтожении этого уникального вируса.

В 1999 г. был организован Консультативный комитет ВОЗ по исследованиям вируса натуральной оспы, который стал контролировать работы с VARV и ежегодно проводить совещания всех специалистов, вовлечённых в изучение этого вируса и разработку новейших методов диагностики, профилактики и терапии оспы и других ортопоксвирусных инфекций человека.

Сторонники концепции обязательного уничтожения двух официальных коллекций штаммов VARV исходили из того, что их ликвидация закроет вопрос о потенциальной опасности выхода данного вируса в окружающую среду. При этом предполагалось, что исследования по разработке методов диагностики, профилактики и лечения оспы после уничтожения коллекций следует прекратить. Слабость данной позиции состоит в том, что нет полной уверенности в отсутствии непреднамеренного или умышленного неофициального сохранения штаммов VARV в каких-либо странах. Например, в Национальных институтах здоровья (США) в 2014 г. в низкотемпературном холодильнике обнаружили забытые стеклянные ампулы, хранящиеся более 60 лет и содержащие живой VARV [10].

Феноменальные успехи синтетической биологии, в том числе выполненный недавно синтез геномной ДНК и оживление вируса оспы лошадей [11], близкородственного вирусу натуральной оспы, показывают, что VARV также может быть синтезирован *de novo*. Всё это обесмысливает предлагаемое уничтожение коллекций данного вируса и указывает на необходимость активизации исследований по разработке новейших методов диагностики, профилактики и терапии не только оспы, но и других ортопоксвирусных инфекций человека.

Ортопоксвирусные инфекции человека

В состав рода *Orthopoxvirus* семейства *Poxviridae* входят такие патогенные для человека виды, как вирус натуральной оспы (*Variola virus*, VARV) и родственные ему зоонозные вирусы оспы обезьян (*Monkeypox virus*, MPXV), оспы коров (*Cowpox virus*, CPXV), оспы верблюдов (*Camelpox virus*, CMLV) и вакцинация вирус (*Vaccinia virus*, VACV) [1, 2].

Чаще всего зоонозные ортопоксвирусы первоначально выделяют от животных, которые находятся в непосредственной близости к человеку (коровы, буйволы, верблюды, обезьяны и др.) и становятся проме-

жуточными хозяевами вируса. В связи с этим нередко название вида ортопоксвируса не связано с животным, являющимся природным резервуаром данного вируса.

Этиологический агент оспы (VARV) способен инфицировать только человека, природный резервуар (другое чувствительное животное) данного вируса отсутствует. До момента ликвидации оспа была одним из самых опасных инфекционных заболеваний человека. Только в XX веке за неполные 80 лет, когда проводили массовую вакцинацию и вели интенсивную противозидемическую борьбу с натуральной оспой, от неё погибли не менее 400 млн человек [12]. По клиническим проявлениям выделяют два подтипа оспы: *variola major* – классический тип заболевания с уровнем летальности от 5 до 40% и *variola minor* – заболевание с лёгким течением и летальностью 0,1–2% [1].

Эпидемии *variola minor* в XX веке были характерны для Северной и Южной Америки, а также для Южной Африки [1]. Для них обнаружены географические вариации по уровню летальности. Во второй половине XX века наивысший уровень летальности отмечен для Индийского субконтинента и прилегающих районов (до 40%), в то время как в Индонезии, в Западной, Центральной и Восточной Африке он был существенно ниже (5–15%) [2]. Чем это обусловлено, до сих пор неясно.

Тяжесть заболевания зависит от возраста заражённых людей. В результате изучения вспышек *variola major* в XX веке обнаружено, что у не привитых против оспы детей до 5 лет и у взрослых старше 40 лет смертность может превышать 40–50%, в то время как у непривитых людей от 10 до 30 лет летальный исход существенно реже (5–15%) [13].

Натуральная оспа относится к высококонтагиозным болезням: по этому показателю она лишь несколько уступает кори и ветряной оспе. Входными воротами инфекции являются глотка или носоглотка и дыхательные пути. VARV может также попасть в организм через повреждённую кожу. Заразительность *variola major* (secondary attack rate) для восприимчивых лиц при тесном контакте в среднем превышала 58%. По материалам Программы ликвидации оспы установлено, что в среднем один больной заражал пять человек, хотя нередко эта цифра была значительно больше (до 20–35 человек) [1, 2].

MPXV вызывает инфекцию человека, по клиническим признакам напоминающую дискретную форму оспы, и в ряде случаев (до 10%) завершающуюся летальным исходом [1, 2]. Первый случай оспы обезьян у человека был идентифицирован в Заире (ныне Демократическая Республика Конго) в 1970 г. [14]. Проведённые в 1981–1986 гг. исследования позволили заключить, что оспа обезьян у людей – редкое спорадическое заболевание, возникающее при передаче MPXV от животного к человеку в зоне тропических ливневых лесов Центральной и Западной Африки. Природным резервуаром MPXV служат различные виды африканских животных, в основном грызуны.

При этом летальные случаи при заболевании людей оспой обезьян выявляли только в Центральной Африке [15]. В дальнейшем геномный анализ изолятов МРХV из разных регионов Африки позволил разделить МРХV на два подтипа: центрально- и западноафриканский [16]. При экспериментальном инфицировании чувствительных животных было показано, что центральноафриканский вариант МРХV обладает большей патогенностью по сравнению с западноафриканским [17].

В 2003 г. вспышка оспы обезьян среди людей была впервые зафиксирована вне Африканского континента. Возбудитель этой инфекции был завезён в США с большими грызунами, предназначенными для продажи в качестве домашних животных, из Ганы [18]. Доказано, что данную вспышку вызвал западноафриканский подтип МРХV. Именно этим можно объяснить отсутствие летальных исходов среди 72 заболевших.

В последнее время особое внимание привлекла вспышка оспы обезьян среди людей в Нигерии. С сентября 2017 г. по сентябрь 2018 г. выявлено 269 предположительных случаев оспы обезьян у людей, включая 115 лабораторно подтверждённых. Наибольшее число заболевших были в возрасте от 21 года до 40 лет. Сообщено о семи летальных исходах, при этом четыре пациента были ВИЧ-инфицированными [19]. Секвенированием вирусной ДНК подтверждено, что вспышку заболевания обуславливал МРХV западноафриканского подтипа. Это первые сообщения о смертельных исходах инфекции данного подтипа МРХV у людей.

Основным отличием оспы обезьян у человека от натуральной оспы является низкая эффективность передачи МРХV от человека к человеку, что до сих пор предотвращало переход локальных вспышек данного заболевания в эпидемии. Однако исследования последних лет указывают на увеличивающуюся трансмиссивность (эффективность передачи) МРХV в человеческой популяции. По данным ВОЗ, количество заболевших в результате передачи инфекции от человека к человеку на период окончания проекта по изучению оспы обезьян (1986 г.) составляло 29,6% общего числа зарегистрированных больных. Однако к 1997 г. это число достигло 73,0%. Возросло до восьми и число выявленных генераций в цепи передачи оспы обезьян от человека к человеку. Анализ имеющихся данных позволил заключить, что к 2010 г. (через 30 лет после прекращения противооспенной вакцинации) заболеваемость людей оспой обезьян в Демократической Республике Конго (Центральная Африка) возросла в 20 раз [20].

В последние годы также расширяется ареал распространения оспы обезьян среди людей в Африке. С 2010 по 2018 г., по данным ВОЗ, подтверждённые случаи оспы обезьян среди людей и животных зарегистрированы в Центральноафриканской Республике, Камеруне, Демократической Республике Конго, Либерии, Нигерии, Республике Конго и Сьерра-Леоне [21].

Важнейшим моментом вспышки оспы обезьян в Нигерии является то, что данная инфекция вышла за

пределы Африки: были зафиксированы два независимых случая заноса оспы обезьян в Великобританию и один в Израиль людьми, заразившимися при контакте с больными в Нигерии. Более того, один из пациентов в Великобритании заразил оспой обезьян медицинского работника [22].

Оспа коров у людей является спорадическим заболеванием, возникает при передаче СРХV от инфицированного животного (чаще всего домашнего) к человеку. СРХV относительно слабо патогенен для человека, но имеет очень широкий круг чувствительных животных. У людей с ослабленным иммунитетом инфицирование СРХV может завершиться летальным исходом [23]. Данное заболевание в основном выявляется в Европе, причём в последние годы зарегистрированы необычно большие вспышки этого заболевания у людей в Западной Европе. СРХV выявлен в организме грызунов и людей в разных географических районах России [2, 24].

В последние годы в Бразилии и Индии также значительно выросла заболеваемость сельскохозяйственных животных (коровы, лошади, буйволы) и людей ортопоксвирусной инфекцией, обусловленной зоонозным VACV (к этому виду относится и вирус оспы буйволов) [25, 26].

Наиболее запутанная ситуация сложилась с определением происхождения VACV. Данный вирус многие десятилетия использовался для вакцинации людей против натуральной оспы, и считалось, что этот вирус "*Variolae vaccinae*" (осповакцины) происходит от СРХV, введённого Э. Дженнером в 1796 г. в практику оспопрививания [1]. Лишь в XX веке выяснилось, что штаммы ортопоксвируса, используемого для противооспенной вакцинации, по свойствам существенно отличаются от природных изолятов СРХV, выделенных от коров, и других изученных к тому времени видов ортопоксвирусов [27]. Поэтому они были отнесены к отдельному виду *Vaccinia virus* [1, 2]. При этом утверждалось, что природный резервуар VACV неизвестен, и выдвигались многочисленные гипотезы о возникновении этого вируса в процессе пассажей вирусов-предшественников на коже животных при приготовлении препаратов противооспенной вакцины [1, 28]. Убеждённости в «искусственном» происхождении VACV оказалась настолько стойкой, что даже спустя годы после ликвидации оспы и прекращения противооспенной вакцинации людей выявление вспышек ортопоксвирусных инфекций среди крупного рогатого скота, обусловленных VACV-подобным вирусом, трактовалось как интродукция данного вируса домашним животным от вакцинированных людей [29]. Этому способствовала неизученность возможного распространения VACV в дикой природе.

Вопрос о происхождении VACV несколько прояснился после секвенирования полного генома вируса оспы лошадей (*Horsepox virus*, HSPV) [30], который оказался близкородственен изученным изолятам VACV. После этого обратили внимание на следующее: Э. Дженнер указывал, что для своей противооспенной вакцины часто использовал инфекционный материал,

взятый от лошадей и пассированный заражением коров [28]. На основании этого можно предположить, что VACV произошёл от зоонозного HSPV, который персистировал в природе параллельно с CPXV [31]. Судя по всему, в XIX веке для противооспенной вакцинации повсеместно применяли не CPXV, а изоляты HSPV, «потомки» которых спустя десятилетия были отнесены к отдельному виду *Vaccinia virus* [32]. Недавний филогенетический анализ полных геномов ортопоксвирусных изолятов, выделенных в Европе от животных и человека, показал, что на данном континенте в природе сосуществуют два глобально различаемых вида: CPXV-подобный и VACV-подобный [33].

CMLV по своим биологическим свойствам и данным филогенетического анализа полной последовательности вирусного генома наиболее близок к VARV по сравнению с другими видами ортопоксвирусов [34]. До последнего времени было общепризнано, что круг хозяев CMLV ограничен одним видом животных – верблюдами. Однако недавно в Индии и Судане были лабораторно подтверждены первые случаи заболевания оспой верблюдов и у людей [35].

Эволюция ортопоксвирусов

Наиболее прямым и эффективным методом изучения эволюции близкородственных вирусов являются их полногеномное секвенирование и компьютерный анализ полученных данных. Для установления эволюционных взаимосвязей разных видов патогенных для человека ортопоксвирусов сотрудники ГНЦ ВБ «Вектор» первыми в мире расшифровали геномные ДНК вирусов CPXV [36] и MPXV [37], выделенных от больных людей. Выполненный анализ полных геномов VARV, MPXV, CPXV и VACV позволил обнаружить, что ДНК CPXV не только самая протяжённая среди изученных ортопоксвирусов, но и содержит все генетические элементы, характерные для других видов ортопоксвирусов. VARV, MPXV и VACV могут рассматриваться как варианты CPXV со специфичными для каждого вида делециями, перестройками и точечными мутациями в геноме. В связи с этим нами сделан вывод о том, что CPXV-подобный вирус был прародителем всех современных видов ортопоксвирусов, патогенных для человека [36, 38].

Накопленные данные позволили впервые провести сравнительный анализ стратегии геномов всех видов ортопоксвирусов, патогенных для человека, выполнить первые филогенетические исследования данной группы вирусов и выявить их эволюционные взаимосвязи. Нами впервые было обнаружено, что западноафриканские и южноамериканские штаммы VARV формируют отдельный подтип (кладу), демонстрирующий существенные отличия в организации генома от всех других изученных географических вариантов VARV [39]. При этом принципиально, что внутри выявленного подтипа западноафриканские и южноамериканские штаммы VARV образуют две чётко различающиеся филогенетические подгруппы (субклады), что свидетельствует об их независимой эволюции.

Основываясь на результатах этого анализа и архивных данных о неоднократных заносах оспы из Западной Африки в Южную Америку в XVI–XVIII веках при перевозке рабов, нами впервые была выполнена количественная оценка скорости эволюции поксвирусов [40]. В дальнейшем секвенирование полных геномов большого набора штаммов VARV, выделенных в разные годы и в различных географических регионах, а также протяжённых сегментов генома дополнительных штаммов VARV, позволило уточнить датирование ключевых событий в эволюции этого вируса [41].

На основе анализа доступных архивных данных об эпидемиях оспы, об истории древних цивилизаций и новейших данных об эволюционных взаимосвязях ортопоксвирусов была сформулирована гипотеза о том, что оспа могла в прошлом неоднократно возникать в результате эволюционных изменений зоонозного вируса-прародителя и исчезать вследствие недостаточной численности населения разрозненных древних цивилизаций [42]. Лишь исторически последняя пандемия оспы продолжалась длительное время и была ликвидирована в XX веке при объединении усилий медиков и учёных многих стран под эгидой ВОЗ. Принципиальных запретов на возможность повторного появления в будущем оспы или схожего заболевания человека в процессе естественной эволюции существующих в настоящее время зоонозных ортопоксвирусов нет.

Видоспецифичная ДНК-диагностика

Несмотря на то, что ортопоксвирусные инфекции имеют характерные внешние проявления – кожные поражения, опыт показывает, что клиническая диагностика зачастую оказывается ошибочной [2].

Разработка метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) привела к созданию современных методов детекции и идентификации следовых количеств микроорганизмов в анализируемых образцах с высокой специфичностью и в короткое время. При этом не требуется манипуляций с живыми особо опасными инфекционными агентами, к которым относятся VARV и MPXV.

В случае патогенных для человека ортопоксвирусов наибольший интерес представляют тест-системы, обеспечивающие возможность родоспецифичной идентификации ДНК анализируемого вируса с одновременной её видоспецифичной дифференциацией. Сотрудники ГНЦ ВБ «Вектор» первыми разработали такие тест-системы на основе классической мультиплексной ПЦР [43], а также мультиплексной ПЦР в режиме реального времени [44] и зарегистрировали их в качестве медицинских изделий.

С помощью олигонуклеотидных микрочипов также удаётся обнаруживать следовые количества исследуемого материала в образце. Одним из важных преимуществ олигонуклеотидных микрочипов над другими видами диагностики на основе ПЦР является возможность проводить анализ по множеству генетических локусов одновременно, что значительно повышает надёжность метода. Для надёжной видоспецифичной

детекции ортопоксвирусов были разработаны различные варианты диагностических олигонуклеотидных микрочипов [45, 46].

Бурное развитие технологий секвенирования на сегодняшний день позволяет в короткие сроки получать информацию о полной нуклеотидной последовательности генома объекта исследования, поэтому всё чаще данные о выявленных случаях необычных ортопоксвирусных инфекций сопровождаются полногеномными последовательностями выделенных вирусных изолятов. Результаты этих исследований свидетельствуют о необходимости дальнейшего совершенствования лабораторной диагностики ортопоксвирусных инфекций и эпидемиологического надзора.

Вакцинопрофилактика

Самым надёжным способом профилактики любого вирусного заболевания является искусственное инфицирование человека или животных низковирулентным вариантом этого вирусного агента или близкородственным слабопатогенным вирусом. Исторически первым примером такой защиты от инфекционного заболевания стало использование прививок против натуральной оспы – самого смертоносного эпидемиологически опасного для человека вирусного заболевания. Наряду с натуральной оспой с давних пор наблюдались схожие оспоподобные заболевания у домашних животных – коров, лошадей, буйволов. Накапливалась информация о том, что некоторые люди, контактировавшие с больными домашними животными, в относительно лёгкой форме переносили заболевание с образованием кожных поражений и становились после этого невосприимчивыми к летальной инфекции во время эпидемий натуральной оспы. На основании этих наблюдений в 1796 г. английский медик Э. Дженнер впервые предложил метод защиты от натуральной оспы прививкой людям инфекционного начала из пустул больных коров или лошадей. Используемый для иммунизации препарат был назван «вакцина» (*vaccine* от лат. *vaccina* – корова), а данный метод защиты от оспы получил название «вакцинация» (*vaccination*) [1, 12]. Термин «вакцинация» затем стали использовать в приложении к иммунизации против любых других инфекций.

Следует отметить, что царство вирусов было открыто лишь спустя столетие после введения в практику вакцинации против оспы. Ортопоксвирусы антигенно и иммунологически близки друг другу и дают перекрёстные серологические реакции и иммунную защиту. Именно это обеспечило надёжный способ защиты от натуральной оспы прививкой человеку вируса оспы коров или вируса оспы лошадей, которые в дальнейшем были повсеместно замещены на VACV, дающий менее выраженные побочные реакции при вакцинации. Данная вакцина оказалась настолько эффективной, что при её использовании для массовой вакцинации людей и строгом эпидемиологическом надзоре под эгидой ВОЗ натуральную оспу удалось ликвидировать. Это первый в истории человечества и пока единственный пример искоренения особо опас-

ного вирусного инфекционного заболевания человека [1, 2].

Прекращение вакцинации против натуральной оспы после 1980 г. привело к тому, что огромная часть населения земли в настоящее время не имеет иммунитета не только против натуральной оспы, но и против любых других зоонозных ортопоксвирусных инфекций. Это создает новую ситуацию с возможностью циркуляции зоонозных ортопоксвирусов в человеческой популяции и, как следствие, может приводить к изменению экологии и круга чувствительных хозяев для разных видов ортопоксвирусов.

Особую тревогу вызывает оспа обезьян у людей. В условиях длительного отсутствия вакцинации населения и значительно более частого инфицирования людей MPXV в результате естественной эволюции может приобрести свойства высокой частоты передачи от человека к человеку, характерные для VARV. Если это произойдет, то человечество встанет перед гораздо более сложной проблемой по сравнению с искоренением натуральной оспы. В первую очередь это обусловлено тем, что MPXV в отличие VARV имеет природный резервуар в виде многочисленных африканских грызунов.

Чтобы предотвратить развитие небольших вспышек в эпидемии и тем самым уменьшить риск возникновения в результате естественной эволюции высокопатогенного для человека ортопоксвируса, усилия исследователей должны быть направлены на создание безопасных живых вакцин новых поколений на основе VACV [31, 42]. Вакцины на основе VACV не имеют выраженной видоспецифичности в отношении ортопоксвирусов, патогенных для человека. Поэтому они могут быть применены при вспышках, обусловленных любым видом ортопоксвирусов, для иммунизации как человека, так и животных.

Живая противооспенная вакцина первого поколения представляла собой препарат VACV, полученный размножением вируса на коже телят или других животных. Её использование для массовой вакцинации в настоящее время недопустимо из-за относительно большого числа возможных тяжёлых осложнений [1], что обусловлено возросшим в последние годы количеством людей с иммунодефицитами.

В современных условиях вакцинные штаммы VACV продуцируют на культурах клеток млекопитающих, и такие препараты относят к противооспенным вакцинам второго поколения [47]. Несмотря на то, что вакцины на культуре клеток производят в соответствии с современными стандартами, противооспенные вакцины первого и второго поколений могут вызывать серьёзные побочные реакции и поэтому имеют ограниченное применение.

Аттенуированные противооспенные вакцины третьего поколения создают в процессе множественных пассажей определённого штамма VACV в культуре клеток гетерологичного хозяина. Например, самая изученная противооспенная вакцина третьего поколения MVA получена в результате большого числа пассажей штамма VACV Ankara на культуре кури-

ных фибробластов. В геноме штамма MVA возникли множественные мутации и протяжённые делеции относительно ДНК исходного штамма VACV. MVA характеризуется неспособностью реплицироваться в большинстве клеток млекопитающих, включая клетки человека [48].

К настоящему времени противооспенная вакцина на основе штамма MVA (Imvanex/Imvamune) прошла многочисленные клинические испытания, включая пациентов с atopическим дерматитом и ВИЧ-инфицированных [49]. Imvanex/Imvamune лицензирована в странах Европы, в Канаде и США и предназначена для первичной вакцинации пациентов с противопоказаниями к противооспенным вакцинам первого и второго поколений.

Противооспенная вакцина третьего поколения LC16m8, лицензированная в Японии, была получена на основе VACV штамма *Lister* путём множественных пассажей на первичной культуре клеток почки кролика при пониженной температуре (30 °C). Клинические исследования VACV LC18m8 показали значительное снижение побочных эффектов по сравнению с традиционной вакциной на основе штамма *Lister*. Атенуация вакцинного штамма главным образом объясняется мутацией в гене B5R, который кодирует белок внеклеточного вириона. В экспериментах на различных животных моделях показана протективная эффективность LC16m8, сравнимая с родительским штаммом *Lister* [50].

Новый подход к получению аттенуированных противооспенных вакцин четвёртого поколения состоит во введении методами генетической инженерии направленных делеций/инсерций, нарушающих гены, контролирующие защитные реакции организма против вирусной инфекции. Наиболее подробно изученный вариант такого VACV представляет собой штамм NYVAC: в составе его генома делетирован блок из 12 генов и дополнительно нарушено 6 индивидуальных генов. Оказалось, что NYVAC индуцирует у человека значительно более низкий противооспенный иммунитет по сравнению с классической вакциной [51].

В ГНЦ ВБ «Вектор» последовательным введением направленных делеций/вставок в 6 индивидуальных генов штамма LIVP был получен высокоаттенуированный вариант VACdelta6 [52], который в настоящее время после цикла доклинических исследований проходит клинические испытания в качестве кандидатной противооспенной вакцины четвёртого поколения. Данная вакцина может быть использована и в комбинации с противооспенной ДНК-вакциной, созданной нами ранее [53, 54].

Химиотерапия

Важное значение для лечения ортопоксвирусных инфекций человека могут представлять химиотерапевтические препараты, поиск которых за последние 20 лет увенчался определённым успехом. Первоначальный скрининг ингибиторов размножения ортопоксвирусов обычно проводят на культурах клеток. Поскольку адекватная животная модель натуральной

оспы отсутствует, тестирование потенциальных противооспенных лекарственных препаратов приходится выполнять на суррогатных животных моделях оспенной инфекции [55]. Показавшие *in vitro* высокую противовирусную активность соединения обычно изучают на таких животных моделях, как интраназальное или аэрозольное инфицирование мышей вирусом CPXV или обезьян вирусом MPXV. В последние годы активно использовали также кроликов, инфицированных вирусом оспы кроликов (входит в состав вида VACV), и луговых собачек или степных сурков, инфицированных вирусом MPXV [56]. При этом ни одна из суррогатных животных моделей ортопоксвирусной инфекции не соответствует полностью оспенной инфекции у человека. Поэтому предполагаемые противооспенные химиопрепараты изучают параллельно на разных животных моделях.

Ингибитор вирусной ДНК-полимеразы нуклеотидный аналог цидофовир (Cidofovir), разрешённый для клинического применения при цитомегаловирусном ретините, оказался эффективным антиортопоксвирусным соединением [55]. На разных животных моделях цидофовир также зарекомендовал себя как эффективный терапевтический препарат против ортопоксвирусных инфекций. Однако его существенными недостатками стали плохая водорастворимость и необходимость внутривенного введения. Поэтому был синтезирован липидный конъюгат цидофовира, который получил название CMX001 (Brincidofovir). Этот препарат широкого спектра антивирусного действия можно применять в таблетированной форме, и он обладает выраженной антиортопоксвирусной активностью [57].

Наибольший интерес в качестве противооспенного препарата представляет соединение ST-246, блокирующее последнюю стадию сборки покрытых оболочкой вирионов и предотвращающее выход вируса из инфицированной клетки [55]. ST-246 был идентифицирован в результате скрининга на противовирусную активность в культуре клеток библиотеки препаратов, состоящей из более 350 тыс. уникальных химических соединений. ST-246 показал низкую токсичность и высокую противовирусную эффективность при инфицировании мышей вирусами экстремелии (оспы мышей), VACV или CPXV, кроликов – вирусом оспы кроликов, луговых собачек – вирусом MPXV, обезьян – вирусами MPXV или VARV [58, 59]. Аналог ST-246, получивший название НИОХ-14, также показал высокую активность при терапии ортопоксвирусных инфекций на различных животных моделях [60].

Учитывая то, что при массовом применении противовирусных препаратов возникают устойчивые к их действию варианты вируса, необходимо продолжать поиск новых химиопрепаратов с разными молекулярными мишенями воздействия на VARV и другие патогенные для человека ортопоксвирусы.

Заключение

Прекращение 40 лет назад противооспенной вакцинации и в связи с этим утрата человечеством коллективного иммунитета не только против натуральной

оспы, но и против других ортопоксвирусных инфекций создают условия для распространения зоонозных ортопоксвирусов среди людей, а это может способствовать естественной селекции высокопатогенных для человека и эпидемически опасных вирусных вариантов. В связи с этим в последние годы усилия ВОЗ направлены на разработку и испытание на базе двух Сотрудничающих центров ВОЗ по оспе (Россия, США) современных методов экспресс-идентификации ортопоксвирусов, создание безопасных противооспепных вакцин новых поколений и химиопрепаратов, направленных против VARV и других ортопоксвирусов, патогенных для человека [56].

Диагностические методы необходимо ориентировать на быструю идентификацию не только VARV, но и МРХV, СРХV, VACV и CMLV. Принимая во внимание возросшее в последние годы число вспышек ортопоксвирусных инфекций животных и людей и их потенциальную опасность, важно обеспечить постоянный мониторинг этих инфекций во всех частях света, что позволит предотвратить развитие небольших вспышек в эпидемии и тем самым уменьшит риск возникновения высококонтагиозного и патогенного для человека ортопоксвируса.

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Fenner F., Henderson D.A., Arita I., Jezek Z., Ladnyi I.D. *Smallpox and Its Eradication*. Geneva: World Health Organization; 1988.
- Shchelkunov S.N., Marennikova S.S., Moyer R.W. *Orthopoxviruses Pathogenic for Humans*. New York: Springer; 2005.
- Report of the Fourth Meeting of the Committee on Orthopoxvirus Infections (SE/86.163). Geneva; 1986.
- Report of the Ad Hoc Committee on Orthopoxvirus Infections (CDS/SME/91.1). Geneva; 1990.
- Shchelkunov S.N., Resenchuk S.M., Totmenin A.V., Blinov V.M., Marennikova S.S., Sandakhchiev L.S. Comparison of the genetic maps of variola and vaccinia viruses. *FEBS Lett.* 1993; 327(3): 321-4. Doi: [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)81013-p](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)81013-p)
- Shchelkunov S.N., Blinov V.M., Totmenin A.V., Chizhikov V.E., Olenina L.V., Gutorov V.V., et al. Sequencing of the variola virus genome. In: Mahy B.W.J., Lvov D.K., eds. *Concepts in Virology: From Ivanovsky to the Present*. Chur, Switzerland: Harwood Academic Publishers; 1993: 93-105.
- Shchelkunov S.N., Massung R.F., Esposito J.J. Comparison of the genome DNA sequences of Bangladesh-1975 and India-1967 variola viruses. *Virus Res.* 1995; 36(1): 107-18. Doi: [https://doi.org/10.1016/0168-1702\(94\)00113-q](https://doi.org/10.1016/0168-1702(94)00113-q)
- Shchelkunov S.N., Totmenin A.V., Loparev V.N., Safronov P.F., Gutorov V.V., Chizhikov V.E., et al. Alastrim smallpox variola minor virus genome DNA sequences. *Virology.* 2000; 266(2): 361-86. Doi: <https://doi.org/10.1006/viro.1999.0086>
- Report of the Meeting of the Ad Hoc Committee on Orthopoxvirus Infections (WHO/CDS/BVI/94.3). Geneva; 1994.
- WHO Advisory Committee on Variola Virus Research. Report of the Sixteenth Meeting (WHO/HSE/PED/CED/2015.2). Geneva; 2014.
- Noyce R.S., Lederman S., Evans D.H. Construction of an infectious horsepox virus vaccine from chemically synthesized DNA fragments. *PLoS One.* 2018; 13(1): e0188453. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188453>
- Albarnaz J.D., Torres A.A., Smith G.L. Modulating vaccinia virus immunomodulators to improve immunological memory. *Viruses.* 2018; 10(3): 101. Doi: <https://doi.org/10.3390/v10030101>
- Baxby D., Hanna W. Studies in smallpox and vaccination. 1913. *Rev. Med. Virol.* 2002; 12(4): 201-9. Doi: <https://doi.org/10.1002/rmv.361>
- Ladnyj I.D., Ziegler P., Kima E.A. A human infection caused by monkeypox virus in Basankusu territory, Democratic Republic of the Congo. *Bull. World Health Organ.* 1972; 46(5): 593-7.
- Ježek Z., Fenner F. Human monkeypox. In: *Monographs in Virology. Volume 17*. Basel, Switzerland: Karger; 1988: 1-140.
- Likos A.M., Sammons S.A., Olson V.A., Frace A.M., Li Y., Olsen-Rasmussen M., et al. A tale of two clades: monkeypox viruses. *J. Gen. Virol.* 2005; 86(Pt. 10): 2661-72. Doi: <https://doi.org/10.1099/vir.0.81215-0>
- Hutson C.L., Carroll D.S., Gallardo-Romero N., Drew C., Zaki S.R., Nagy T., et al. Comparison of monkeypox virus clade kinetics and pathology within the prairie dog animal model using a serial sacrifice study design. *Biomed Res. Int.* 2015; 2015: 965710. Doi: <https://doi.org/10.1155/2015/965710>
- Reed K.D., Melski J.W., Graham M.B., Regnery R.L., Sotir M.J., Wegner M.V., et al. The detection of monkeypox in humans in the Western Hemisphere. *N. Engl. J. Med.* 2004; 350(4): 342-50. Doi: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa032299>
- Kabuga A.I., El Zowalaty M.E. A review of the monkeypox virus and a recent outbreak of skin rash disease in Nigeria. *J. Med. Virol.* 2019; 91(4): 533-40. Doi: <https://doi.org/10.1002/jmv.25348>
- Rimoin A.W., Mulembakani P.M., Johnston S.C., Lloyd Smith J.O., Kisalu N.K., Kinkela T.L., et al. Major increase in human monkeypox incidence 30 years after smallpox vaccination campaigns cease in the Democratic Republic of Congo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010; 107(37): 16262-7. Doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.1005769107>
- Reynolds M.G., Doty J.B., McCollum A.M., Olson V.A., Nakazawa Y. Monkeypox re-emergence in Africa: a call to expand the concept and practice of One Health. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 2019; 17(2): 129-39. Doi: <https://doi.org/10.1080/14787210.2019.1567330>
- Erez N., Achdout H., Milrot E., Schwartz Y., Wiener-Well Y., Paran N., et al. Diagnosis of imported monkeypox, Israel, 2018. *Emerg. Infect. Dis.* 2019; 25(5): 980-3. Doi: <https://doi.org/10.3201/eid2505.190076>
- Fassbender P., Zange S., Ibrahim S., Zoeller G., Herbstreit F., Meyer H. Generalized cowpox virus infection in a patient with HIV, Germany, 2012. *Emerg. Infect. Dis.* 2016; 22(3): 553-5. Doi: <https://doi.org/10.3201/eid2203.151158>
- Popova A.Y., Maksyutov R.A., Taranov O.S., Tregubchak T.V., Zaikovskaya A.V., Sergeev A.A., et al. Cowpox in a human, Russia, 2015. *Epidemiol. Infect.* 2017; 145(4): 755-9. Doi: <https://doi.org/10.1017/S0950268816002922>
- Venkatesan G., Balamurugan V., Prabhu M., Yogisharadhya R., Bora D.P., Gandhale P.N., et al. Emerging and re-emerging zoonotic buffalopox infection: a severe outbreak in Kolhapur (Maharashtra), India. *Vet. Ital.* 2010; 46(4): 439-48.
- Peres M.G., Bacchiega T.S., Appolinario C.M., Vicente A.F., Mioni M.S.R., Ribeiro B.L.D., et al. Vaccinia virus in blood samples of humans, domestic and wild mammals in Brazil. *Viruses.* 2018; 10(1): E42. Doi: <https://doi.org/10.3390/v10010042>
- Downie A.W. The immunological relationship of the virus of spontaneous cowpox to vaccinia virus. *Br. J. Exp. Pathol.* 1939; 20(2): 158-76.
- Baxby D. The origins of vaccinia virus. *J. Infect. Dis.* 1977; 136(3): 453-5. Doi: <https://doi.org/10.1093/infdis/136.3.453>
- Damaso C.R., Esposito J.J., Condit R.C., Moussatché N. An emergent poxvirus from humans and cattle in Rio de Janeiro State: Cantagalo virus may derive from Brazilian smallpox vaccine. *Virology.* 2000; 277(2): 439-49. Doi: <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0603>
- Tulman E.R., Delhon G., Afonso C.L., Lu Z., Zsak L., Sandybaev N.T., et al. Genome of horsepox virus. *J. Virol.* 2006; 80(18): 9244-58. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.00945-06>
- Shchelkunov S.N. An increasing danger of zoonotic orthopoxvirus infections. *PLoS Pathog.* 2013; 9(12): e1003756. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003756>
- Schrack L., Tausch S.H., Dabrowski P.W., Damaso C.R., Esparza J., Nitsche A. An early american smallpox vaccine based on horse-

- pox. *N. Engl. J. Med.* 2017; 377(15): 1491-2. Doi: <https://doi.org/10.1056/NEJMc1707600>
33. Carroll D.S., Emerson G.L., Li Y., Sammons S., Olson V., Frace M., et al. Chasing Jenner's vaccine: revisiting cowpox virus classification. *PLoS One.* 2011; 6(8): e23086. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023086>
 34. Gubser C., Smith G.L. The sequence of camelpox virus shows it is most closely related to variola virus, the cause of smallpox. *J. Gen. Virol.* 2002; 83(Pt. 4): 855-72. Doi: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-4-855>
 35. Khalafalla A.I., Abdelazim F. Human and dromedary camel infection with camelpox virus in Eastern Sudan. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2017; 17(4): 281-4. Doi: <https://doi.org/10.1089/vbz.2016.2070>
 36. Shchelkunov S.N., Safronov P.F., Totmenin A.V., Petrov N.A., Ryazankina O.I., Gutorov V.V., et al. The genomic sequence analysis of the left and right species-specific terminal region of a cowpox virus strain reveals unique sequences and a cluster of intact ORFs for immunomodulatory and host range proteins. *Virology.* 1998; 243(2): 432-60. Doi: <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9039>
 37. Shchelkunov S.N., Totmenin A.V., Babkin I.V., Safronov P.F., Ryazankina O.I., Petrov N.A., et al. Human monkeypox and smallpox viruses: genomic comparison. *FEBS Lett.* 2001; 509(1): 66-70. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)03144-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)03144-1)
 38. Shchelkunov S.N. Orthopoxvirus genes that mediate disease virulence and host tropism. *Adv. Virol.* 2012; 2012: 524743. Doi: <https://doi.org/10.1155/2012/524743>
 39. Babkina I.N., Babkin I.V., Le U., Ropp S., Kline R., Damon I., et al. Phylogenetic comparison of the genomes of different strains of variola virus. *Dokl. Biochem. Biophys.* 2004; 398: 316-9.
 40. Babkin I.V., Shchelkunov S.N. The time scale in poxvirus evolution. *Mol. Biol.* 2006; 40(1): 16-9.
 41. Shchelkunov S.N. How long ago did smallpox virus emerge? *Arch. Virol.* 2009; 154(12): 1865-71. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00705-009-0536-0>
 42. Shchelkunov S.N. Emergence and reemergence of smallpox: the need in development of a new generation smallpox vaccine. *Vaccine.* 2011; 29(Suppl. 4): D49-53. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.05.037>
 43. Shchelkunov S.N., Gavrilova E.V., Babkin I.V. Multiplex PCR detection and species differentiation of orthopoxviruses pathogenic to humans. *Mol. Cell. Probes.* 2005; 19(1): 1-8. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2004.07.004>
 44. Shchelkunov S.N., Shcherbakov D.N., Maksyutov R.A., Gavrilova E.V. Species-specific identification of variola, monkeypox, cowpox, and vaccinia viruses by multiplex real-time PCR assay. *J. Virol. Methods.* 2011; 175(2): 163-9. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.05.002>
 45. Lapa S., Mikheev M., Shchelkunov S., Mikhailovich V., Sobolev A., Blinov V., et al. Species-level identification of orthopoxviruses with an oligonucleotide microchip. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(3): 753-7. Doi: <https://doi.org/10.1128/jcm.40.3.753-757.2002>
 46. Ryabinin V.A., Shundrin L.A., Kostina E.B., Laassri M., Chizhikov V., Shchelkunov S.N., et al. Microarray assay for detection and discrimination of *Orthopoxvirus* species. *J. Med. Virol.* 2006; 78(10): 1325-40. Doi: <https://doi.org/10.1002/jmv.20698>
 47. Sánchez-Sampedro L., Perdiguero B., Mejías-Pérez E., García-Arriaza J., Di Pilato M., Esteban M. The evolution of poxvirus vaccines. *Viruses.* 2015; 7(4): 1726-803. Doi: <https://doi.org/10.3390/v7041726>
 48. Volz A., Sutter G. Modified vaccinia virus Ankara: History, value in basic research, and current perspectives for vaccine development. *Adv. Virus Res.* 2017; 97: 187-243. Doi: <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2016.07.001>
 49. Overton E.T., Stapleton J., Frank I., Hassler S., Goepfert P.A., Barker D., et al. Safety and immunogenicity of Modified Vaccinia Ankara-Bavarian Nordic smallpox vaccine in vaccinia-naïve and experienced human immunodeficiency virus-infected individuals: An Open-label, controlled clinical phase II trial. *Open Forum Infect. Dis.* 2015; 2(2): ofv040. Doi: <https://doi.org/10.1093/ofid/ofv040>
 50. Eto A., Saito T., Yokote H., Kurane I., Kanatani Y. Recent advances in the study of live attenuated cell-cultured smallpox vaccine LC16m8. *Vaccine.* 2015; 33(45): 6106-11. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.07.111>
 51. Midgley C.M., Putz M.M., Weber J.N., Smith G.L. Vaccinia virus strain NYVAC induces substantially lower and qualitatively different human antibody responses compared with strains Lister and Dryvax. *J. Gen. Virol.* 2008; 89(Pt. 12): 2992-7. Doi: <https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/004440-0>
 52. Yakubitskiy S.N., Kolosova I.V., Maksyutov R.A., Shchelkunov S.N. Highly immunogenic variant of attenuated vaccinia virus. *Dokl. Biochem. Biophys.* 2016; 466: 35-8. Doi: <https://doi.org/10.1134/S1607672916010105>
 53. Maksyutov R.A., Gavrilova E.V., Kochneva G.V., Shchelkunov S.N. Immunogenicity and protective efficacy of a polyvalent DNA vaccine against human orthopoxvirus infections based on smallpox virus genes. *J. Vaccines.* 2013; 2013: 618324.
 54. Maksyutov R.A., Yakubitskiy S.N., Kolosova I.V., Shchelkunov S.N. Comparing new-generation candidate vaccines against human orthopoxvirus infections. *Acta Naturae.* 2017; 9(2): 88-93.
 55. Smeets D.F. Progress in the discovery of compounds inhibiting orthopoxviruses in animal models. *Antivir. Chem. Chemother.* 2008; 19(3): 115-24. Doi: <https://doi.org/10.1177/095632020801900302>
 56. Olson V.A., Shchelkunov S.N. Are we prepared in case of a possible smallpox-like disease emergence? *Viruses.* 2017; 9(9): 242. Doi: <https://doi.org/10.3390/v9090242>
 57. Zaitseva M., McCullough K.T., Cruz S., Thomas A., Diaz C.G., Keilholz L., et al. Postchallenge administration of brincidofovir protects healthy and immune-deficient mice reconstituted with limited numbers of T cells from lethal challenge with IHD-J-Luc vaccinia virus. *J. Virol.* 2015; 89(6): 3295-307. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.03340-14>
 58. Smith S.K., Self J., Weiss S., Carroll D., Braden Z., Regnery R.L., et al. Effective antiviral treatment of systemic orthopoxvirus disease: ST-246 treatment of prairie dogs infected with monkeypox virus. *J. Virol.* 2011; 85(17): 9176-87. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.02173-10>
 59. Mucker E.M., Goff A.J., Shamblin J.D., Grosenbach D.W., Damon I.K., Mehal J.M., et al. Efficacy of tecovirimat (ST-246) in nonhuman primates infected with variola virus (smallpox). *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013; 57(12): 6246-53. Doi: <https://doi.org/10.1128/AAC.00977-13>
 60. Mazurkov O.Y., Kabanov A.S., Shishkina L.N., Sergeev A.A., Skarnovich M.O., Bormotov N.I., et al. New effective chemically synthesized anti-smallpox compound NIOCH-14. *J. Gen. Virol.* 2016; 97(5): 1229-39. Doi: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000422>

Поступила 25.04.19

Принята в печать 16.07.19