

УДК 578.821.5:615.371

Сравнение кандидатных вакцин нового поколения против ортопоксвирусных инфекций человека

Р. А. Максюттов^{1*}, С. Н. Якубицкий¹, И. В. Колосова¹, С. Н. Щелкунов^{1,2*}¹Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, 630559, Кольцово, Новосибирская обл.²Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 10

*E-mail: maksrinat@yandex.ru; snshchel@rambler.ru

Поступила в редакцию 05.07.2016

Принята к печати 23.01.2017

РЕФЕРАТ Отсутствие у населения противооспенного иммунитета, участвовавшие случаи поражения человека ортопоксвирусами и увеличивающиеся риски применения вируса натуральной оспы (*variola virus*, VARV) в качестве агента биотерроризма требуют разработки современных безопасных вакцин против ортопоксвирусных инфекций. Ранее нами были получены поливалентная ДНК-вакцина на основе пяти антигенов VARV и аттенуированный вариант вируса осповакцины (*vaccinia virus*, VACV) с направленной делецией шести генов (VACΔ6). В независимых опытах показано, что трехкратная иммунизация ДНК-вакциной и двукратная иммунизация VACΔ6 обеспечивали защиту мышей от летальной дозы (10 LD₅₀) высокопатогенного для них вируса экстромелии (*ectromelia virus*, ECTV). Цель представленной работы состояла в сравнении противооспенного иммунитета, формируемого при различных схемах иммунизации ДНК-вакциной и VACΔ6. Установлено, что иммунизация мышей поливалентной ДНК-вакциной с последующим бустированием рекомбинантным вариантом VACΔ6 наравне с двукратной иммунизацией VACΔ6 индуцирует наработку VACV-нейтрализующих антител и обеспечивает защиту мышей от дозы 150 LD₅₀ ECTV. Предложенные схемы иммунизации могут быть использованы для разработки стратегии безопасной вакцинации против натуральной оспы и других ортопоксвирусных инфекций человека.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА вирус осповакцины, гены вирулентности, ДНК-вакцина, натуральная оспа, протективность.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ БОЕ – бляшкообразующая единица; VARV – *variola virus* (вирус натуральной оспы); VACV – *vaccinia virus* (вирус осповакцины); CPXV – *cowpox virus* (вирус коровьей оспы); MPXV – *monkeypox virus* (вирус оспы обезьян); ECTV – *ectromelia virus* (вирус экстромелии); LIVP – штамм Л-ИВП вируса осповакцины; ПЦР – полимеразная цепная реакция; LD₅₀ – 50% летальная доза.

ВВЕДЕНИЕ

Род *Orthopoxvirus* семейства Poxviridae включает такие патогенные для человека виды, как вирусы натуральной оспы (*variola virus*, VARV), оспы обезьян (*monkeypox virus*, MPXV), коровьей оспы (*cowpox virus*, CPXV) и осповакцины (*vaccinia virus*, VACV). Массовая вакцинация традиционной вакциной на основе VACV защищала не только от VARV, но и от близкородственных MPXV и CPXV [1]. После 1980 года в результате ликвидации оспы и повсеместного прекращения иммунизации против нее доля населения, чувствительного к VARV и другим патогенным для человека ортопоксвирусам, постоянно увеличивается. Об этом свидетельствуют участвовавшие многочисленные вспышки ортопокс-

вирусных инфекций среди людей, обусловленных такими вирусами, как MPXV, CPXV и VACV [2–6]. Кроме того, VARV рассматривают как возможный агент биотеррористических атак, которые могут иметь катастрофические последствия для всего населения Земли [6]. Отсутствие эффективных противовирусных препаратов и опасность использования классической живой вакцины на основе VACV из-за тяжелых поствакцинальных осложнений требуют разработки современных безопасных вакцин против ортопоксвирусных инфекций и схем их применения [7, 8].

Ранее нами на основе штамма LIVP VACV, используемого в Российской Федерации для вакцинации людей, создан рекомбинантный вариант

VACΔ6 с направленным нарушением шести генов, кодирующих гемагглютинин (*A56R*), гамма-интерферонсвязывающий белок (*B8R*), тимидинкиназу (*J2R*), комплементсвязывающий белок (*C3L*), Bcl2-подобный ингибитор апоптоза (*N1L*), и гена *A35R*, контролирующего презентацию антигенов главным комплексом гистосовместимости класса II (МНСII). Показано, что инактивация выбранных генов вирулентности не влияет на репродуктивные свойства VACV на культурах клеток млекопитающих. Штамм VACΔ6 характеризуется значительно меньшей реактогенностью и нейровирулентностью и большей иммуногенностью по сравнению с исходным штаммом LIVP. При двукратном подкожном введении мышам рекомбинантный вариант VACΔ6 индуцирует появление достоверно более высокого уровня вируснейтрализующих антител, чем родительский штамм LIVP, и обеспечивает полную защиту мышей от высокопатогенного для них вируса экстремелии (*ectromelia virus*, ECTV), что не наблюдали в данной модели при использовании принятого в качестве противооспенной вакцины штамма LIVP [9, 10].

Другим независимым подходом к вакцинопрофилактике оспы, реализованным нами ранее, стала разработка поливалентной ДНК-вакцины на основе смеси рекомбинантных плазмид, содержащих под контролем промотора цитомегаловируса гены пяти вирионных белков VARV – A30, F8, M1, входящих в состав поверхностной мембраны внутриклеточных вирионов, и A36 и B7, расположенных на оболочке внеклеточной формы вируса. При трехкратной внутрикожной иммунизации поливалентная ДНК-вакцина вызывала наработку вируснейтрализующих антител и обеспечивала полную защиту мышей от инфицирования ECTV в дозе 10 LD₅₀ [11–13].

Для повышения эффективности противооспенной вакцинации помимо разработки принципиально новых вакцинных препаратов перспективным представляется сочетание различных типов вакцин, которые смогут дополнять друг друга и вызывать широкий и устойчивый иммунитет [14]. Подобная стратегия гетерологичной вакцинации (*prime-boost*), в рамках которой для праймирования иммунной системы предлагается использовать субъединичную вакцину (ДНК-вакцину), а для последующей бустерной вакцинации – аттенуированный вариант VACV, считается перспективной.

В данной работе сравнивали противооспенный иммунитет, формируемый при двукратной иммунизации различными комбинациями поливалентной ДНК-вакцины и высокоаттенуированного штамма VACΔ6.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Бактерии, вирусы, культуры клеток

В работе использовали *Escherichia coli* XL2-blue, штамм VACΔ6 [10], штамм LIVP VACV (производный штамма *Lister*, полученный в Институте вирусных препаратов, Москва) и штамм K-1 ECTV из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», перевиваемую культуру клеток почки африканской зеленой мартышки 4647 [15] из коллекции клеточных культур ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», культивируемую на питательной среде ДМЕМ с добавлением 10% эмбриональной сыворотки коров.

Поливалентная ДНК-вакцина

Набор рекомбинантных плазмид на основе векторной плазмиды pсDNA3.1, несущей гены пяти антигенов VARV – A30, F8, M1 поверхностной мембраны внутриклеточных вирионов, A36 и B7 оболочки внеклеточной формы вируса под контролем промотора цитомегаловируса, был получен ранее [11–13]. Плазмидные ДНК нарабатывали в клетках *E. coli* в препаративном количестве и очищали с помощью набора EndoFree Plasmid Giga Kit (Qiagen, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Концентрацию плазмидной ДНК измеряли спектрофотометрически на приборе Ultrospec 3000 pro (GE Healthcare Life Sciences, США).

Наработка и очистка вирусов

Монослой клеток линии 4647, выращенный на культуральных матрасах с ростовой поверхностью 175 см² (объем 650 мл), инфицировали VACV (штамм VACΔ6 или LIVP) с множественностью заражения 1 БОЕ/кл. Вирус инкубировали на среде ДМЕМ с 2% эмбриональной сыворотки коров в течение 48 ч при температуре 37°C до полного цитопатического действия, затем получали криолизат (три цикла замораживания-оттаивания) инфицированных клеток, обрабатывали его на ультразвуковом дезинтеграторе типа MSE 500 мощностью 22 кГц 2–3 раза по 10–15 с. От клеточного дебриса освобождались низкоскоростным центрифугированием (10 мин при 4000 g). Супернатант центрифугировали в течение 1.5 ч при 30000 g. Осадок вируса ресуспендировали в 4 мл физиологического раствора. Инфекционный титр вируса определяли безагарозным методом бляшек в монослой клеток 4647.

Изучение иммуногенности и протективности

В работе использовали мышей линии Balb/c (самки, вес 14–16 г, возраст 5–6 недель) из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Мышей объединяли в группы по 10 особей. Мышей иммунизировали

поливалентной ДНК-вакциной внутривенно и подкожно смесью плазмид pcDNA-A30, pcDNA-A36, pcDNA-M1, pcDNA-F8 и pcDNA-B7 (по 50 мкг каждой плазмиды, суммарная доза 250 мкг/100 мкл на мышь). Иммунизацию проводили подкожно штаммами VACΔ6 или LIVP в количестве 10⁷ БОЕ/100 мкл на мышь. Мышам контрольной группы вводили равный объем физиологического раствора, на котором готовили разведения вируса. Иммунизацию проводили дважды с интервалом 21 сут согласно табл. 1.

Через 19 сут после второй иммунизации у предварительно наркотизированных мышей отбирали пробы крови из ретробульбарного венозного сплетения, инкубировали их при 4°C в течение 24 ч для формирования фибринового сгустка, центрифугировали в течение 10 мин при 5000 g. Объединяли препараты сывороток одной группы и прогревали при 56°C в течение 30 мин. Титр VACV-нейтрализующих антител определяли на культуре клеток 4647 согласно [16], используя последовательные пятикратные разведения сывороток, которые смешивали с VACV штамм LIVP в рабочем разведении 50 БОЕ/лунку. Эффективность нейтрализации рассчитывали относительно числа бляшек в лунках без сывороток как -lg от наибольшего разведения сыворотки, при котором достигается 50% нейтрализация VACV.

Через 21 сут после второй иммунизации животных в состоянии легкого эфирного наркоза подвергли интраназальной инокуляции высокопатогенным для мышей ECTV в дозе 150 LD₅₀/20 мкл на мышь согласно [17]. Наблюдение вели в течение 14 сут, учитывали количество выживших и погибших мышей.

Анализ данных

Статистическую значимость экспериментальных данных оценивали по *t*-критерию Стьюдента с использованием программы Origin Professional 8.1.10.86. Различия считали статистически значимыми при *P* < 0.05 [18].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сконструированные ранее плазмиды pcDNA-A30, pcDNA-A36, pcDNA-M1, pcDNA-F8 и pcDNA-B7 нарабатывали в клетках *E. coli* в препаративном количестве и очищали с помощью EndoFree Plasmid Giga Kit (Qiagen, США) согласно инструкции производителя с последующим подтверждением правильности вставок рестрикционным анализом с использованием эндонуклеаз *Asu*NHI и *Hind*III (рис. 1) и секвенирования.

Штаммы VACΔ6 и LIVP вируса осповакцины нарабатывали на культуре клеток 4647, рекомендованной для производства противооспенной вакцины [15], очищали по описанной выше методике, подлинность

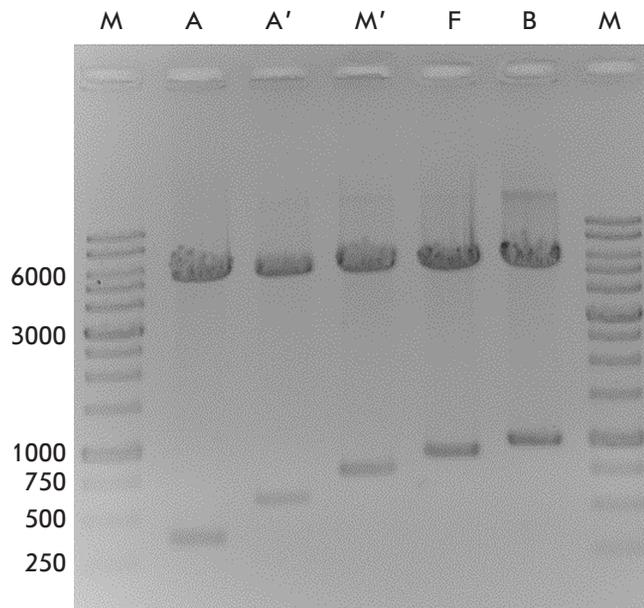


Рис. 1. Электрофоретическое разделение в 1.2% агарозном геле продуктов расщепления рекомбинантных плазмид эндонуклеазами рестрикции *Asu*NHI и *Hind*III. А – pcDNA-A30; А' – pcDNA-A36; М' – pcDNA-M1; F – pcDNA-F8; В – pcDNA-B7 соответственно. М – ДНК-маркер, п.н.

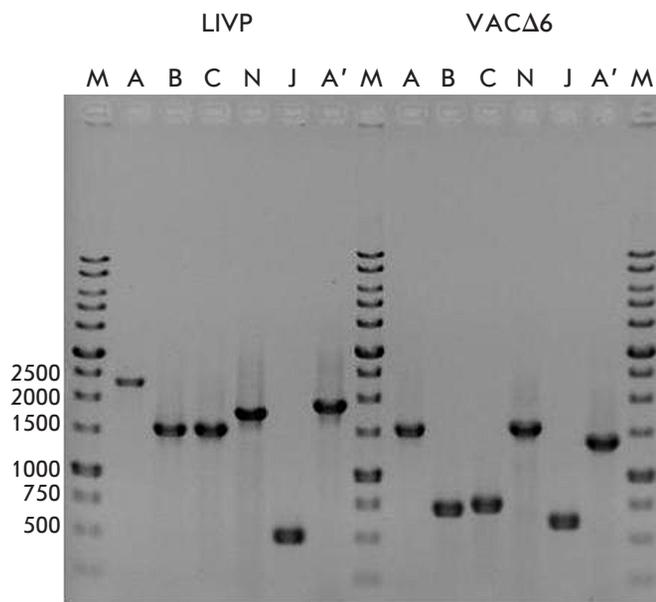


Рис. 2. Электрофоретический анализ в 1.2% агарозном геле фрагментов ДНК исходного родительского клона штамма LIVP VACV и рекомбинантного штамма с делециями шести генов – VACΔ6, полученных с помощью ПЦР с праймерами на гены *A56R* (А); *B8R* (В); *C3L* (С); *N1L* (N); *J2R* (J); *A35R* (А'). М – маркеры длины фрагментов ДНК, п.н.

Таблица 1. Схема проверки иммуногенности и протективности вакцинных препаратов на животных

Группа	Препарат, доза на животное		Проверка протективности, 42 сут
	1-я иммунизация, 1 сут	2-я иммунизация, 21 сут	
DNA&DNA	ДНК-вакцина 250 мкг	ДНК-вакцина 250 мкг	Штамм К-1 ECTV, 150 LD ₅₀
DNA&VACΔ6	ДНК-вакцина 250 мкг	Штамм VACΔ6 10 ⁷ БОЕ	Штамм К-1 ECTV, 150 LD ₅₀
VACΔ6&VACΔ6	Штамм VACΔ6 10 ⁷ БОЕ	Штамм VACΔ6 10 ⁷ БОЕ	Штамм К-1 ECTV, 150 LD ₅₀
LIVP&LIVP	Штамм LIVP VACV 10 ⁷ БОЕ	Штамм LIVP VACV 10 ⁷ БОЕ	Штамм К-1 ECTV, 150 LD ₅₀
К-	Физраствор	Физраствор	Штамм К-1 ECTV, 150 LD ₅₀

Таблица 2. ПЦР-анализ для определения подлинности рекомбинантного варианта VACV

Ген	Праймер, нуклеотидная последовательность (5' → 3')	Штамм LIVP, п.н.	Штамм VACΔ6, п.н.
A56R	GTGGTATGGGACACCACAAATCCAA ATTAACATTCCTAGAATTAATCCCGCTC	2366	1425
B8R	TCACAAATATGATGGTGATGAGCGA CGTGATATACCCTAGCCATAGGCAT	1555	737
C3L	TCGCGCTTTACATTCTCGAATCT TGTTTCGTGTGTTCTTGCGGTGA	1542	751
N1L	GGGTTGGATCCTTTACACATAGATCTACTACAGGCGGAACA GGGAAAGCTTAATTTGTGAAGATGCCATGTACTACGCT	1784	1431
J2R	ATATGTTCTTCATGCCTAAACGA ATGAAGGAGCAAAAGGTTGTAAC	512	617
A35R	ACGACGGATGCTGAAGCGTGTTATA AAACGATGTTACCAATCGTTTGCTAGGT	1880	1360

штаммов подтверждали с помощью ПЦР-анализа по локусам шести инактивированных генов (табл. 2, рис. 2).

Иммуногенность различных комбинаций (табл. 1) поливалентной ДНК-вакцины и высокоаттенуированного штамма VACΔ6 при двукратной иммунизации оценивали по уровню индуцируемых вируснейтрализующих антител в сыворотках крови мышей, полученных через 21 сут после второй иммунизации. Как видно из данных, приведенных на рис. 3, комбинация вакцинных препаратов DNA&VACΔ6 вызывает наработку VACV-нейтрализующих антител, уровень которых сопоставим с уровнем антител, индуцируемых двукратной вакцинацией родительским штаммом LIVP. При этом двукратная иммунизация штаммом VACΔ6 индуцировала значимо более высокий уровень вируснейтрализующих антител, что согласуется с полученными нами ранее данными [10].

Трехкратная иммунизация поливалентной ДНК-вакциной или двукратная иммунизация штаммом VACΔ6 обеспечивают, как показано нами ранее,

100% защиту мышей при последующем инфицировании ECTV в дозе 10 LD₅₀/мышь [10, 12]. Поэтому с целью выявления различий между эффективностью использованных схем иммунизации была выбрана принципиально большая разрешающая доза ECTV – 150 LD₅₀/мышь. В результате для трех исследуемых групп выявили частичный защитный эффект при двукратной иммунизации: DNA&VACΔ6, LIVP&LIVP и VACΔ6&VACΔ6 (рис. 4).

Максимальную выживаемость наблюдали в группе лабораторных животных VACΔ6&VACΔ6, двукратно вакцинированных штаммом VACΔ6, и в группе DNA&VACΔ6, в которой праймирование иммунной системы проводили поливалентной ДНК-вакциной, а для последующей бустерной вакцинации использовали аттенуированный вариант VACΔ6. В контрольной группе на 8-е сут, а в группе DNA&DNA на 9-е сут после заражения вирусом экстремелии наблюдали гибель всех животных. Отсутствие полной защиты может объясняться использованием слишком высокой дозы гетерологичного для VACV вируса экстремелии.

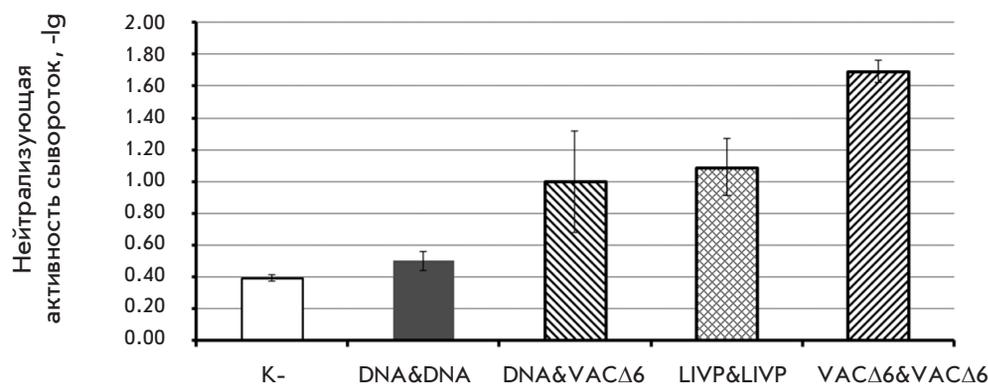


Рис. 3. VACV-нейтрализующая активность сывороток, полученных после двукратной иммунизации ДНК-вакциной, штаммами VACΔ6 и LIVP VACV

ОБСУЖДЕНИЕ

Первым способом защиты людей от опустошительных эпидемий натуральной оспы была вариоляция, т.е. внутрикожное внесение инфекционного материала от больных оспой здоровым людям. Индуцированное таким образом заболевание имело короткий инкубационный период и протекало в относительно легкой форме по сравнению с обычной респираторной передачей вируса от человека к человеку. Смертность при вариоляции составляла 0.5–2% вместо 20–30%, наблюдавшихся во время эпидемий натуральной оспы [19]. Открытие возможности вакцинации людей путем инокуляции вируса оспы коров, а затем вируса осповакцины, привело к значительному снижению риска тяжелых побочных реакций. Во второй половине XX века при использовании для иммунизации VACV смертность составляла 1–25 человек на 1 млн вакцинированных [20]. В группу риска при такой вакцинации попадают прежде всего люди с иммунодефицитом, такие, как пациенты, перенесшие трансплантацию, ВИЧ-инфицированные, лица, принимающие иммунодепрессанты и др. В связи с этим активно разрабатывали модифицированные вакцины на основе VACV с улучшенными характеристиками безопасности, например, в России в конце XX века получили живую вакцину на основе рекомбинантного штамма LIVP VACV, которая была испытана на людях [21].

На сегодняшний день массовая вакцинация от натуральной оспы не проводится, однако, есть ряд категорий людей, которые имеют риск инфицирования натуральной оспой или другими патогенными ортопоксвирусами ввиду особенностей своей работы. Эти категории входят в группу риска, они проходят вакцинацию от оспы в обязательном порядке. В первую очередь, это касается работников, осуществляющих эпидемиологический надзор; медицинский персонал инфекционных отделений больниц; сотрудников вирусологических лабораторий, в которых проводятся

работы с ортопоксвирусами. В случае вспышки натуральной оспы (например, в результате биотеррористической атаки) необходимо будет вакцинировать всех жителей данного региона. Классическая противооспенная вакцина первого поколения на основе штамма LIVP, которая в настоящее время используется для вакцинации, имеет значительное количество противопоказаний и может приводить к различным по своей тяжести осложнениям. Стоит отметить определенную сложность демонстрации формируемого защитного иммунитета против оспы при вакцинации новыми профилактическими препаратами – натуральная оспа была ликвидирована, поэтому в отсутствие эпидемий невозможно протестировать эффективность этих вакцин в отношении естественного заболевания.

Ранее нами были реализованы два независимых подхода к разработке безопасных вакцин против ортопоксвирусных инфекций человека. Был создан высокоаттенуированный вариант вируса осповакцины VACΔ6 с направленным последовательным нарушением шести генов и поливалентная ДНК-вакцина на основе пяти антигенов вируса натуральной оспы. В независимых экспериментах показано, что трехкратная иммунизация ДНК-вакциной и двукратная иммунизация VACΔ6 обеспечивали защиту мышей против летальной дозы (10 LD₅₀) высокопатогенного для них вируса экстремелии [10, 12].

В данной работе сравнили иммунный ответ, который развивается против ортопоксвирусов, при различных схемах иммунизации ДНК-вакциной и VACΔ6. Один из шести генов, удаленных в рекомбинантном варианте VACΔ6, – ген A35R, продукт которого снижает презентацию антигенов главным комплексом гистосовместимости класса II. Поэтому закономерно, что штамм VACΔ6 индуцирует более высокий, чем родительский клон LIVP, уровень VACV-нейтрализующих антител и более эффективно защищает животных от заражения ECTV в дозе

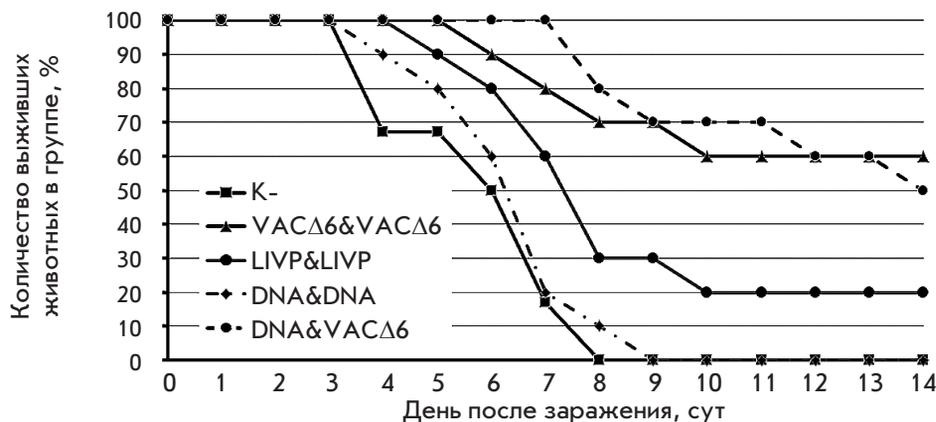


Рис. 4. Динамика гибели мышей, иммунизированных ДНК-вакциной, штаммами VACΔ6 и LIVP VACV, после заражения ECTV в дозе 150 LD₅₀ на мышшь

150 LD₅₀. Комбинированная иммунизация ДНК-вакциной и рекомбинантным вариантом VACΔ6 приводила к меньшему уровню вируснейтрализующих антител, чем двукратная иммунизация VACΔ6, однако обеспечивала такой же уровень протективности. Последнее, по-видимому, может объясняться индукцией ДНК-вакциной в большей степени клеточного звена иммунного ответа при первичной иммунизации, также необходимого для эффективной элиминации ортопоксвирусов из организма [22, 23].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе для повышения эффективности противооспенной вакцинации применили стратегию гетерологичной вакцинации, в рамках которой для праймирования иммунной системы использовали поливалентную ДНК-вакцину на основе пяти генов VARV, а для последующей бустерной вакцинации – аттенуированный вариант VACΔ6. Уровень индуцируемой при этом протективности был таким же, как в варианте с двукратной иммунизацией штаммом VACΔ6 и превосходил уровень, обусловленный двукратной иммунизацией штаммом LIVP

VACV, используемым в Российской Федерации для вакцинации людей. Предложенные схемы иммунизации могут быть использованы для разработки стратегии безопасной вакцинации против натуральной оспы и других ортопоксвирусных инфекций человека. Вариант ДНК-вакцинации с последующей вакцинацией живым аттенуированным вирусом VACΔ6 может рассматриваться как предпочтительный в плане безопасности. Следует отметить, что схема двукратной вакцинации не является оптимальной при проведении экстренной профилактики натуральной оспы, в этом случае предпочтительно однократное введение классической противооспенной вакцины на основе VACV штамм LIVP. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности (2009–2014 годы)», Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 15-04-01326а), Российского научного фонда (проект № 16-15-10101) и бюджетного проекта ИЦиГ СО РАН № 0324-2015-0004.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Маренникова С.С., Щелкунов С.Н. Патогенные для человека ортопоксвирусы. М.: KMK Scientific Press Ltd., 1998. 386 с.
2. Stephenson J. // J. Am. Med. Assoc. 2003. V. 290. P. 23–24.
3. Lewis-Jones S. // Curr. Opin. Infect. Dis. 2004. V. 17. P. 81–89.
4. Campe H., Zimmermann P., Glos K., Bayer M., Bergemann H., Dreweck C., Graf P., Weber B.K., Meyer H., Büttner M., et al. // Emerg. Infect. Dis. 2009. V. 15. P. 777–780.
5. Ninove L., Domart Y., Vervel C., Voinot C., Salez N., Raoult D., Meyer H., Capek I., Zandotti C., Charrel R.N. // Emerg. Infect. Dis. 2009. V. 15. P. 781–784.
6. Shchelkunov S.N. // PLoS Pathogens. 2013. V. 9. e1003756.
7. Shchelkunov S.N. // Vaccine. 2011. V. 29. Suppl. 4. P. D49–D53.
8. Breman J.G., Henderson D.A. // N. Engl. J. Med. 2002. V. 346. P. 1300–1308.

9. Yakubitsky S.N., Kolosova I.V., Maksyutov R.A., Shchelkunov S.N. // Acta Naturae. 2015. V. 7. № 4. P. 113–121.
10. Якубицкий С.Н., Колосова И.В., Максютов Р.А., Щелкунов С.Н. // Докл. Акад. наук. 2016. Т. 466. № 2. С. 241–244.
11. Максютов Р.А., Щелкунов С.Н. // Рос. иммунол. журн. 2010. Т. 4. № 1. С. 25–32.
12. Maksyutov R.A., Gavrilova E.V., Kochneva G.V., Shchelkunov S.N. // J. of Vaccines. 2013. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/618324>.
13. Максютов Р.А., Щелкунов С.Н. // Мол. генет. микробиол. вирусол. 2011. № 2. С. 30–34.
14. Radosevic K., Rodriguez A., Lemckert A., Goudsmit J. // Expert Rev. Vaccines. 2009. V. 8. P. 577–592.
15. Скарнович М.О., Радаева И.Ф., Вдовиченко Г.В., Нечаева Е.А., Сергеев А.А., Петрищенко В.А., Плясунов И.В., Шиш-

- кина Л.Н., Терновой В.А., Сметаникова М.А. и др. // *Вопр. вирусол.* 2007. Т. 52. С. 37–40.
16. Leparac-Goffart I, Poirier B, Garin D, Tissier M.-H, Fuchs F, Crance J.-M. // *J. Clin. Virol.* 2005. V. 32. P. 47–52.
17. Martinez M.J, Bray M.P, Huggins J.W. // *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2000. V. 124. P. 362–377.
18. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. *Статистические методы в микробиологических исследованиях.* Л.: Гос. изд. мед. лит., 1962. 186 с.
19. Fenner F, Henderson D.A., Arita I, Jezek Z., Ladnyi I.D. *Smallpox and Its Eradication.* Geneva: World Health Organization, 1988. 1460 p.
20. Gurvich E.B. // *Vaccine.* 1992. V. 10. № 2. P. 96–97.
21. Чернос В.И., Челябинов Н.В., Антонова Т.П., Рахилина Л.Е., Унанов С.С., Альтштейн А.Д., Захарова Л.А., Фодор И.И., Бендукидзе К.А., Комаров Ф.И. и др. // *Вопр. вирусол.* 1990. № 2. С. 132–135.
22. Kennedy J.S., Frey S.E., Yan L., Rothman A.L., Cruz J., Newman F.K., Orphin L., Belshe R.B., Ennis F.A. // *J. Infect. Dis.* 2004. V. 190. № 7. P. 1286–1294.
23. Ennis F.A., Cruz J., Demkowicz W.E., Rothman A.L., McClain D.J. // *J. Infect. Dis.* 2002. V. 185. № 11. P. 1657–1659.