



ОСПА ПОД КОНТРОЛЕМ



За всю историю человечеству удалось искоренить лишь одну вирусную инфекцию, унесшую сотни миллионов жизней, – натуральную оспу. Это событие XX в. наглядно показало, на что способно международное сообщество, когда оно объединяет свои усилия для достижения благой цели. Примечательно, что компания по массовой вакцинации против оспы была инициирована СССР в годы глобального противостояния между блоками государств с разными социальными и экономическими системами, что не помешало ее успеху.

Но на этом борьба с оспой и оспоподобными заболеваниями не закончилась: чтобы получить возможность контролировать и защищаться от смертельного патогена, требовалось с помощью самых современных молекулярно-генетических методов изучить не только вирус натуральной оспы, но и его потенциально опасных «родственников»-ортопоксвирусов. Эта задача была решена путем международной, теперь уже научной кооперации, и одну из главных ролей в ней сыграли специалисты будущего ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор».

В то время среди сибирских ученых был популярен девиз «Впервые – в мире, второй раз – в Сибири». Автор и его коллеги смогли первыми в мире расшифровать полные геномы вируса натуральной оспы и возбудителей других ортопоксвирусных инфекций, полученных от больных людей. На основе полученных знаний были разработаны современные тест-системы для их быстрой диагностики и создана первая в мире профилактическая противооспенная вакцина нового поколения, которая уже используется на практике

Слева – больной натуральной оспой с характерными кожными проявлениями.

Фото из архива С. С. Маренниковой

Ключевые слова: натуральная оспа, вирус натуральной оспы, вирус оспы коров, вирус оспы обезьян, вирус осповакцины, ортопоксвирусы, секвенирование генома, вакцинация, ГНЦ ВБ «Вектор».

Key words: smallpox, variola virus, cowpox virus, monkeypox virus, vaccinia virus, orthopoxviruses, genome sequencing, vaccination, SRC VB VECTOR

Оспа (часто называемая *натуральной оспой*, чтобы отличить от ветрянки, *ветряной оспы*) относится к особо опасным инфекционным заболеваниям человека: во время эпидемий этой болезни умирали до 30–40 % заболевших, а среди выживших многие слепли. Уже в XX в., за неполные 80 лет (до момента завершения массовой вакцинации от оспы), от этой инфекции погибли не менее 300 млн человек!

В 1958 г. на XI сессии Всемирной ассамблеи здравоохранения делегация СССР инициировала начало кампании по полному искоренению оспы. Программа глобальной ликвидации этой болезни, работавшая под эгидой ВОЗ, успешно завершилась к 1978 г. благодаря массовой вакцинации и строгому противоэпидемическому надзору.

Так оспа, часто называемая бичом человечества, стала не только первой инфекцией, против которой изобрели вакцину, но и первой, которую человеку удалось победить. И это пока единственный пример глобальной ликвидации особо опасного инфекционного заболевания человека мировым сообществом.

Важность этого события обусловлена еще и тем, что, когда 8 мая 1980 г. на 33-й Всемирной ассамблее здравоохранения была торжественно провозглашена победа народов Земли над оспой, всем странам было настоятельно рекомендовано прекратить противооспенную вакцинацию. В результате за почти полвека, прошедшего с тех пор, огромная часть человечества (прежде всего возрастом до 45 лет) осталась без иммунной защиты не только от самой оспы, но и от других оспоподобных инфекций, возбудители которых пока «дремлют» в природе и в принципе способны инфицировать человека.

Может ли оспа вернуться?

Отличительная особенность *вируса натуральной оспы* – размножение исключительно в организме человека. Но имеются и другие, близкородственные ему: *вирусы оспы обезьян* и *оспы коров*, которые являются возбудителями так называемых *природно-очаговых инфекций*, а их «резервуарами», т.е. основной средой обитания и хозяевами, служат различные виды диких животных. От этих носителей, напрямую либо через домашних животных, вирусы оспы обезьян и коров могут передаваться человеку.

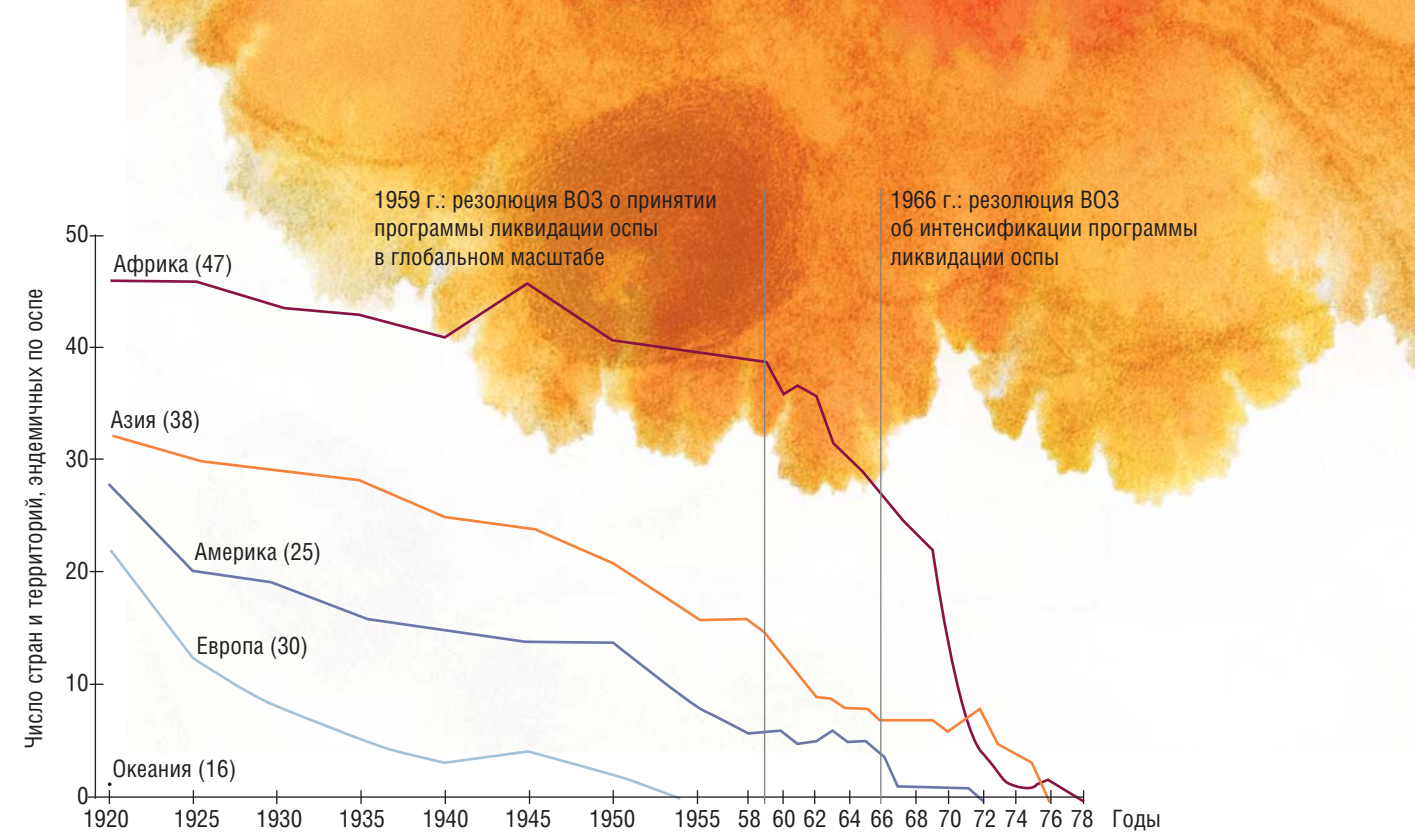
Наибольшую тревогу у специалистов всегда вызывал вирус оспы обезьян. При заражении человека он приводил к развитию инфекции с клиническими проявлениями, напоминающими натуральную оспу, летальность которой при вспышках в Центральной Африке достигала 10%. Однако до поры до времени эта инфекция обнаруживалась лишь в зоне тропических ливневых лесов Африки, к тому же от человека к человеку передавалась с очень низкой эффективностью.



ЩЕЛКУНОВ Сергей Николаевич – доктор биологических наук, профессор, академик РАН, главный научный сотрудник ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора (научград Кольцово, Новосибирская обл.). Советник Всемирной организации здравоохранения по изучению вирусов натуральной оспы и оспы обезьян, заместитель руководителя Сотрудничающего центра ВОЗ по диагностике ортопоксвирусных инфекций и музея штаммов и ДНК вируса оспы. Лауреат премии Правительства РФ в области науки и техники (2005). Автор и соавтор более 270 статей, 7 монографий, учебника для вузов «Генетическая инженерия» и 17 патентов

Вирус натуральной оспы принадлежит к роду ортопоксвирусов (*Orthopoxvirus*) семейства поксвирусов (*Poxviridae*) – крупнейших и сложноорганизованных ДНК-содержащих вирусов млекопитающих со сложным репродуктивным циклом. На ранних этапах инфекции они синтезируют десятки различных белков, подавляющих активность ключевых белков-регуляторов врожденного и адаптивного иммунитета организма хозяина. В род ортопоксвирусов входят вирусы натуральной оспы, оспы крупного рогатого скота (коровьей оспы), оспы обезьян, а также типовой вирус рода – вирус осповакцины

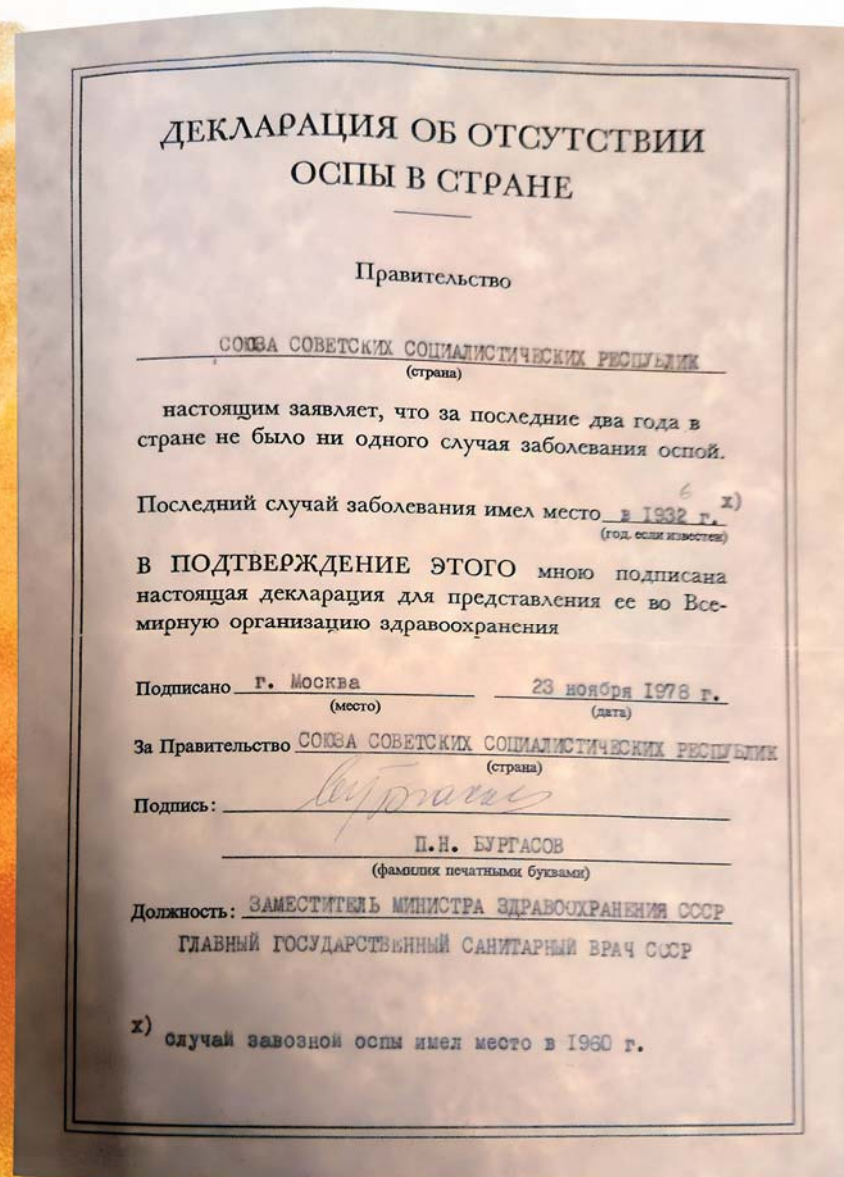
© С. Н. Щелкунов, 2024



Эпидемиологическая ситуация по натуральной оспе в 1920–1978 гг. на разных континентах, где заболевание сохранялось в эндемичном состоянии. Цифры в скобках – число стран и территорий, вовлеченных в исследование. По: (Fenner et al., 1988)

Вакцинация во время эпидемии оспы в Палестине. Фотоальбом, около 1922 г. Public Domain Mark/ Wellcome Collection





Последняя вспышка оспы в СССР случилась в Москве в 1960 г. – ее возбудитель был завезен в конце декабря 1959 г. из Индии. Всего заразились 46 человек, трое из которых скончались. Последний случай заболевания был зафиксирован 3 февраля 1960 г. С момента заноса инфекции до прекращения эпидемии прошло 44 дня, с начала мероприятий по ликвидации ЧП – 19 дней. Менее чем за две недели в январе 1960 г. в Москве и Московской области было провакцинировано свыше 8 млн человек, что стало беспрецедентной акцией как по масштабам, так и по срокам

Документ об отсутствии в СССР заболеваемости натуральной оспой из архива ВОЗ в Женеве. Фото автора

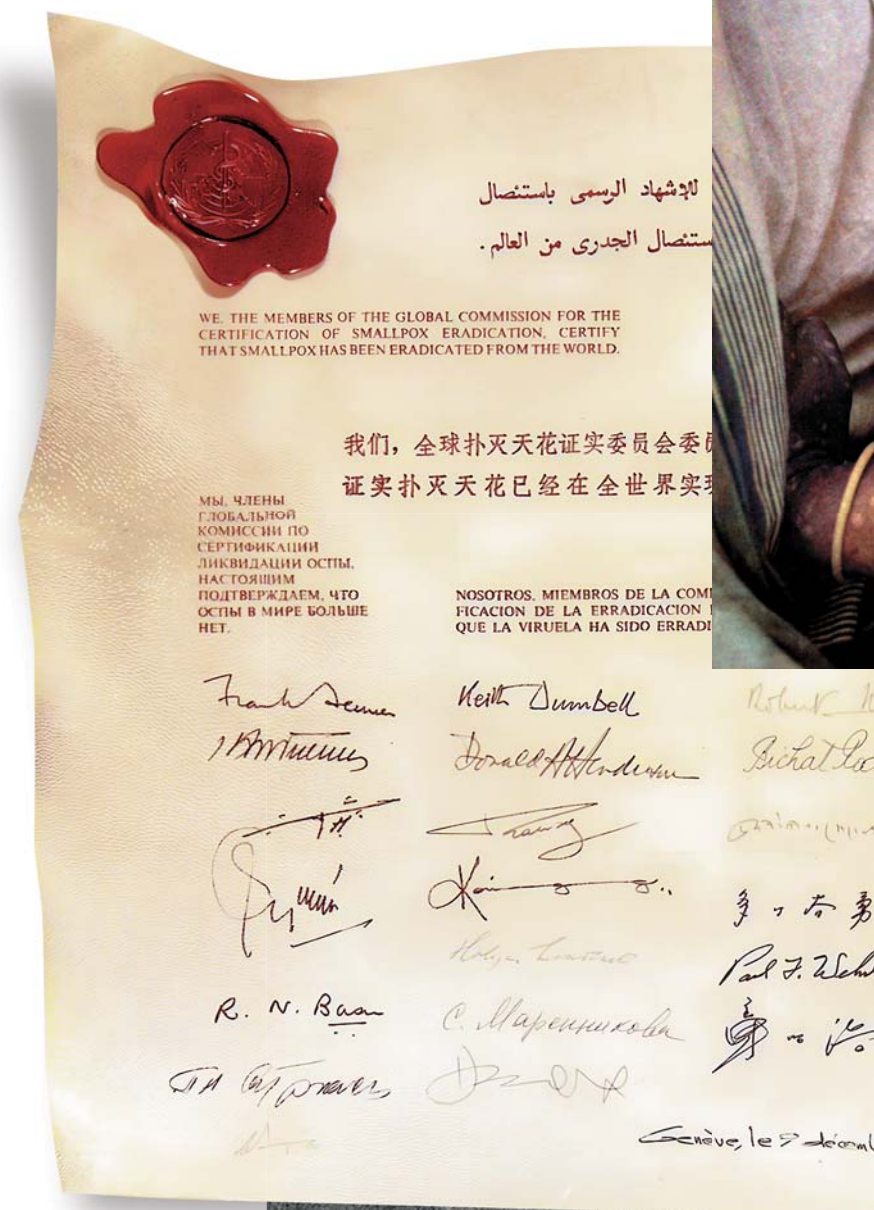
сократилось до четырех (в СССР, США, Англии и Южной Африке).

К 1984 г. в мире остались лишь две лаборатории, получившие статус Сотрудничающих центров ВОЗ по оспе и родственным инфекциям: в СССР на базе НИИ вирусных препаратов (Москва) и в США – при Центрах по контролю и предотвращению заболеваний (CDC, Атланта).

Однако наличие даже двух, строго контролируемых ВОЗ хранилищ жизнеспособных штаммов вируса натуральной оспы рассматривалось как возможная биологическая угроза. Поэтому в марте 1986 г. на совещании Специального комитета ВОЗ по ортопоксвирусным инфекциям было принято решение сохранить информацию о геноме данного вируса в биологически безопасной форме, для чего предполагалось клонировать фрагменты генома в составе бактериальных плазмид – небольших автономных кольцевых молекул ДНК, способных существовать вне клетки.

Коллекции же самого вируса планировалось в дальнейшем уничтожить.

Уничтожить и забыть. Казалось бы, чего проще? Но полной уверенности, что эта болезнь не вернется, не было. Оспа была ликвидирована до начала бурного развития молекулярной биологии и экспериментальной вирусологии, поэтому ее возбудитель, как и его близкие «родственники», были изучены очень плохо. Чтобы быть готовыми к возможному возврату этой особо опасной инфекции, требовалось выполнить большой комплекс научных исследований с привлечением самых новейших методов.



Эта трехлетняя девочка Рахима Бану с о. Бхола в Бангладеш считается последним в мире известным случаем так называемой большой оспы (*variola major*), смертность при которой достигает 5–40 % от числа заболевших. На ее теле видна характерная для этой болезни пятнисто-папулезная сыпь. 1975 г. Public Domain/ CDC/ World Health Organization; Stanley O. Foster

«Мы, члены глобальной комиссии по сертификации ликвидации оспы, подтверждаем, что оспы в мире больше нет». © CC BY-ND 2.0 / Pan American Health Organization

Все это вселяло надежду, что вирус оспы обезьян не выйдет за границы африканского континента. Но у эволюции свои закономерности, а с учетом того, что сообщение между разными странами и континентами со временем становится все более интенсивным, шансы на возникновение нового, легко передающегося от человека к человеку и более смертоносного вируса не равны нулю.

Возможность приоткрыть завесу над закономерностями эволюции ортопоксвирусов появилась благодаря успехам молекулярной биологии и созданию новых, молекулярно-генетических методов исследования. Стало ясно, что для контроля инфекционных заболеваний, вызываемых этими патогенами, следует разработать эффективные способы экспресс-диагностики и средства профилактики нового поколения.

Также было необходимо предотвратить случайную утечку вируса натуральной оспы из лабораторий, где хранились образцы. И если в 1975 г. в разных странах существовало 75 таких лабораторий, то к 1981 г. их число

В первую очередь нужно было обеспечить надежную и биологически безопасную консервацию генетического материала разных изолятов возбудителя натуральной оспы. Также комитет ВОЗ счел необходимым как можно быстрее осуществить расшифровку нуклеотидной последовательности (*секвенирование*) и анализ организации генома этого уникального вируса.

«Вектор»: от вируса осповакцины – к вирусу натуральной оспы

Во ВНИИ молекулярной биологии (базовый институт будущего Научно-производственного объединения, а затем Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор») первые исследования, связанные с молекулярно-биологическим изучением ортопоксвирусов, были начаты в первой половине 1980-х гг.

В те годы одной из задач сибирских вирусологов было получение *субъединичной белковой вакцины* против ортопоксвирусных инфекций. Такие вакцины, состоящие из смеси очищенных белков вирусных частиц,

Микрофотография частицы вируса оспы, полученная с помощью трансмиссионного электронного микроскопа. 1974 г.
© CC BY-SA 4.0 / Dr Graham Beards

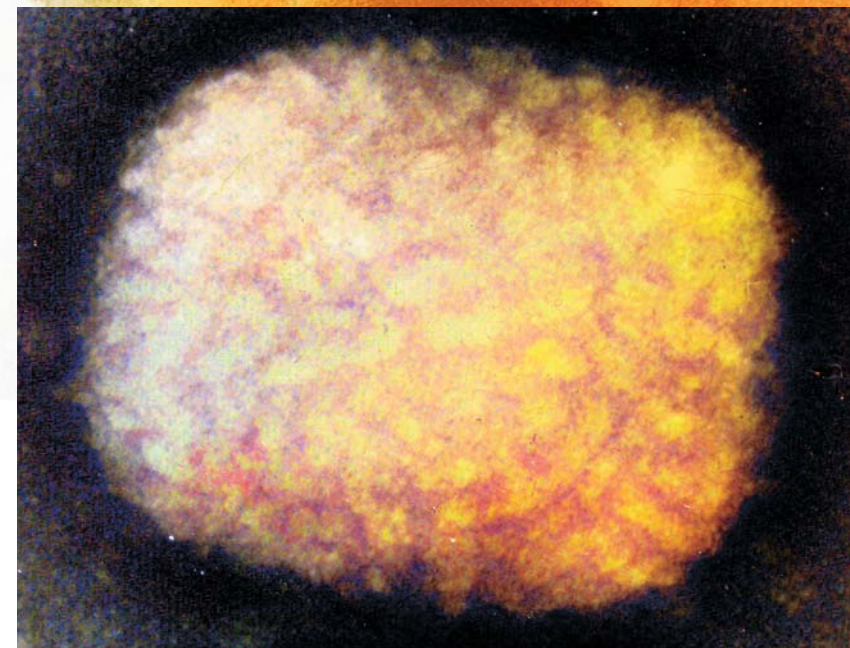
отличаются стабильностью и более безопасны, так как вызывают меньше нежелательных для организма побочных эффектов.

Для приготовления вакцин против оспы с давних пор используется так называемый *вирус осповакцины*, чье происхождение точно неизвестно. В состав частицы этого вируса (*вириона*) входит около сотни разных белков. Поэтому создать вакцину, содержащую не живые вирусы, а их иммунологически активные белки, было очень непросто, учитывая, что в то время было неизвестно, какие гены их кодируют.

Сотрудники вирусологического отдела наработывали образцы очищенного вируса осповакцины в препаративных количествах, а затем в отделе белка вирионы «разбирали» на отдельные белки и пытались создать из их различных комбинаций вакцинные препараты. Такой «классический» подход был очень трудоемок и малоэффективен. Однако в ходе этих работ удалось получить препараты антител против ряда индивидуальных вирионных белков – с помощью таких антител можно картировать соответствующие гены в вирусном геноме.

Примерно в то же время в отделе, руководителем которого я был, начались работы по клонированию фрагментов генома вируса осповакцины в составе бактериальных плазмид и картированию на них генов, кодирующих отдельные вирусные белки. Эти гены были затем секвенированы, и с помощью компьютерного анализа полученных данных была определена аминокислотная последовательность самих белков.

Когда в 1990 г. «Вектор» посетила профессор С. С. Маренникова,



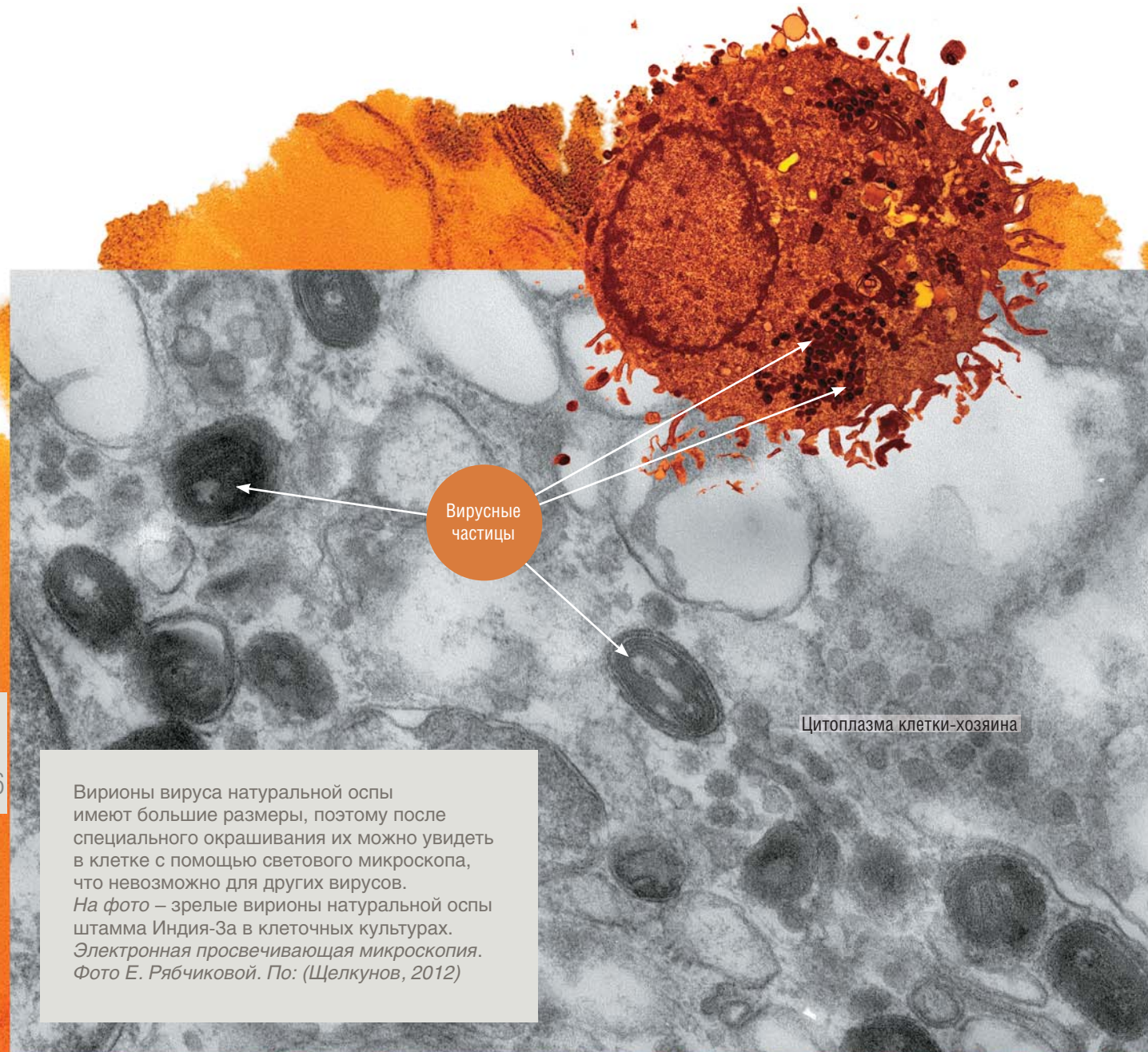
руководитель Сотрудничающего центра ВОЗ по оспе и родственным инфекциям в Москве, выяснилось, что московские коллеги располагают различными штаммами вируса осповакцины и уникальной коллекцией изолятов вируса оспы коров. Первым результатом этой встречи стала договоренность о сотрудничестве по изучению организации генома этих вирусов.

Второй результат касался более амбициозного проекта. В декабре 1990 г. на заседании Специального комитета ВОЗ по ортопоксвирусным инфекциям планировалось обсудить программу секвенирования генома вируса оспы. Московская лаборатория располагала одной из двух официальных коллекций штаммов вируса натуральной оспы в мире. У нас же имелся опыт получения бактериальных плазмид, содержащих фрагменты ортопоксвирусного генома, а также была группа исследователей, владеющих методами секвенирования ДНК. Звезды сошлись, и в результате родилась «Национальная программа по консервации генетического материала отечественной коллекции штаммов вируса натуральной оспы», которая и была представлена и одобрена на заседании Специального комитета ВОЗ.

На том же заседании была одобрена национальная программа исследования генома высоковирулентного штамма Бангладеш-1975 вируса натуральной оспы, предложенная США, и учрежден Технический комитет ВОЗ по оценке результатов всех работ по секвенированию.

Сибиряки – первые на финише

Так перед нами впервые встала задача секвенирования полного вирусного генома размером около 200 тыс. пар нуклеотидов. В то время это была достаточно сложная проблема, так как расшифровка нуклеотидных последовательностей у нас осуществлялась вручную, преимущественно *методом Максама – Гилберта*. Этот метод, основанный на химической дегградации ДНК, требовал применения радиоактивных изотопов в качестве меток, при этом обладал относительно низкой производительностью: за один эксперимент можно было секвенировать последовательность длиной не более 500 нуклеотидов.



Вирионы вируса натуральной оспы имеют большие размеры, поэтому после специального окрашивания их можно увидеть в клетке с помощью светового микроскопа, что невозможно для других вирусов.

На фото – зрелые вирионы натуральной оспы штамма Индия-3а в клеточных культурах. Электронная просвечивающая микроскопия. Фото Е. Рябчиковой. По: (Щелкунов, 2012)

Цитоплазма клетки-хозяина

Вирусные частицы



Геном вируса натуральной оспы представляет собой линейную двухцепочечную молекулу ДНК, содержащую 187 тыс. пар нуклеотидов, с ковалентно-замкнутыми шпильчатыми структурами на обоих концах. В геноме около 200 генов – огромное число по сравнению с большинством вирусов других семейств. Эти гены кодируют множество структурных вирионных белков, а также ферментов, необходимых для размножения вируса в клетке-хозяине

Тем не менее благодаря напряженной работе всех участников программы к лету 1992 г. секвенирование генома высоковирулентного штамма вируса натуральной оспы Индия-1967 из московской коллекции было завершено.

Результаты этой работы были впервые представлены в сентябре того же года на Международной конференции по поксвирусам и иридовирусам в Швейцарии, а затем на Международной конференции «100 лет вирусологии» в Ленинграде. Доклад о достижениях сибирских вирусологов произвел большое впечатление на одного из организаторов ленинградской конференции, руководителя отделения вирусных и риккетсиозных заболеваний CDC д-ра Брайана Махи, который фактически возглавлял американскую программу секвенирования генома вируса натуральной оспы. В результате после обсуждения появилась идея организовать совместный, русско-американский проект по секвенированию ДНК еще одного штамма вируса натуральной оспы – слабо-вирулентного Гарсия-1966, выделенного американцами от больного в Бразилии.

Участники Первого совещания Технического комитета ВОЗ по анализу нуклеотидной последовательности генома вируса натуральной оспы (автор – третий слева в верхнем ряду). 11 декабря 1992 г. CDC, Атланта, США. Фото из архива автора

Когда в декабре 1992 г. в Атланте состоялось первое совещание Технического комитета ВОЗ по анализу нуклеотидной последовательности генома вируса натуральной оспы, то оказалось, что российская группа единственная завершила секвенирование всей кодирующей последовательности ДНК своего штамма.

На заседании Комитет дал рекомендацию дополнительно секвенировать весь геном штамма Гарсия-1966, особо отметив необходимость изыскать возможности финансирования этой работы. В результате НПО «Вектор» был выделен грант ВОЗ на секвенирование 2/3 вирусного генома, а остальную часть работы должны были выполнить американцы. Это был первый международный грант в нашем объединении, и он был очень важен, так как финансовое состояние российской науки в тот период было, без преувеличения, плачевным.

Свою часть работы по совместному проекту мы выполнили к началу 1994 г. К этому времени наши американские коллеги закончили секвенирование своего штамма Бангладеш-1975, а в 1995 г. – и оставшейся части генома Гарсия-1966. Таким образом, была завершена «расшифровка» полного генома двух высоковирулентных и одного слабовирулентного штаммов вируса натуральной оспы.



На основе анализа центрального консервативного района генома размером 101 тыс. пар нуклеотидов удалось построить родословное древо вируса натуральной оспы и других ортопоксвирусов и оценить времена расхождения этих видов.
По: (Бабкин, Щелкунов, 2008)

Микрофотография частиц поксвирусов, полученная в Центре комплексных исследований Национального института аллергии и инфекционных заболеваний (Форт-Детрик, США). Сканирующая электронная микроскопия.
© CC BY 2.0 /NIAID

В 1994 г. был проведен и совместный детальный анализ данных секвенирования исследованных штаммов. По результатам этой работы было опубликовано несколько статей в ведущих международных научных журналах, на которых, вероятно, «Вектор» был впервые указан в его новом статусе государственного научного центра.

Из-за потенциальной опасности работы с живым патогеном в Москве в конце сентября 1994 г. коллекция штаммов вируса натуральной оспы была передана в ГНЦ ВБ «Вектор». В июне 1997 г. после инспекционной проверки ВОЗ официально зарегистрировала создание на базе «Вектора» Сотрудничающего центра ВОЗ по диагностике ортопоксвирусных инфекций и музея штаммов и ДНК вируса оспы.





Генное досье на патогены

Помимо вируса натуральной оспы, передача которого в природе была полностью прервана к 1978 г., существуют, как уже упоминалось, зоонозные ортопоксвирусные инфекции. Тот же вирус оспы коров спорадически вызывает инфекцию у людей, хотя обычно не приводящую к летальному исходу. А более опасный вирус оспы обезьян, по мнению некоторых специалистов, мог быть эволюционным предшественником вируса оспы человека.

Ответ на вопрос, в каких эволюционных взаимосвязях находятся разные виды патогенных для человека ортопоксвирусов, могла дать только расшифровка их геномов. Поэтому по своей инициативе мы начали работу по изучению генной структуры штамма GRI-90 вируса оспы коров, выделенного московскими учеными от ребенка, заразившегося от больного кролика.

Это исследование, поддержанное уже отечественными грантами, было завершено в 1997 г. – нам удалось расшифровать последовательность длинных концевых районов вирусной ДНК, которые и определяли все видоспецифичные свойства этого вируса.

Так наша группа оказалась первой в мире, которой удалось выявить основные отличия генома вируса оспы коров от других его «родственников». На основе полученных данных были предсказаны функции ряда генов, которые отсутствовали у других видов ортопоксвирусов. Также было сделано заключение, что вирус оспы коров имеет наиболее полный геном в своем роду и может претендовать на роль «прародителя» вируса

Участники Второго совещания Технического комитета ВОЗ по анализу нуклеотидной последовательности генома вируса натуральной оспы: Б. Мосс, С. Щелкунов и Дж. Эспозито. 28 января 1994 г. ВОЗ, Женева, Швейцария. Фото из архива автора

натуральной оспы и других возбудителей оспоподобных инфекций человека (Маренникова, Щелкунов, 1998).

В декабре 1996 г. в Санкт-Петербурге прошло рабочее совещание «Возникающие и возвращающиеся инфекционные заболевания», главной целью которого было согласовать позиции российских ученых и их потенциальных коллабораторов из Национальных институтов здравоохранения США (NIH) для подготовки заявок совместных проектов на конкурс, организуемый Американским фондом гражданских исследований и развития (CRDF). На этом совещании нам удалось договориться с д-ром Бернардом Моссом, признанным лидером в изучении ортопоксвирусов, и его коллегой из CDC Джозефом Эспозито начать совместную работу по секвенированию генома штамма Заир-96-I-16 вируса оспы обезьян. Этот вирус был выделен от человека в Заире (ныне ДР Конго) в 1996 г., когда там случилась необычно крупная вспышка болезни среди людей. В связи с чем с новой силой встал вопрос о том, может ли вирус оспы обезьян в ходе своей эволюции адаптироваться к человеку и приблизиться к вирусу натуральной оспы по патогенности и эффективности распространения среди людей.

Самый очевидный способ получить ответ на этот вопрос – секвенировать геном патогена и сравнить его

Вид патогена	Штамм	Число потенциальных генов	Организация	Год секвенирования
Вирус осповакцины	Copenhagen	198	Virogenetics, США	1990
Вирус натуральной оспы	India-1967	199	ГНЦ ВБ «Вектор», РФ	1992
Вирус натуральной оспы	Bangladesh-1975	196	CDC, США	1993
Вирус натуральной оспы	Garcia-1966	206	ГНЦ ВБ «Вектор», РФ, CDC, США	1995
Вирус оспы коров	GRI-90	212	ГНЦ ВБ «Вектор», РФ	1997
Вирус осповакцины	Ankara	157	Biomedical Research Center, Австрия	1998
Вирус оспы обезьян	Zaire-96-I-16	191	ГНЦ ВБ «Вектор», РФ	2001

с уже изученными геномами вируса натуральной оспы. Поскольку объем финансирования был ограничен, в рамках двухлетнего проекта CRDF было решено секвенировать только левую половину вирусного генома.

К счастью, в конце 1996 г. наш центр посетила делегация Национальной академии наук США, которая предложила рассмотреть небольшие по времени и объему финансирования проекты по сотрудничеству с американскими учеными с перспективой финансирования через Международный научно-технический центр. И наш проект по секвенированию и анализу теперь уже правой половины генома вируса оспы обезьян, совместно с Дж. Эспозито и Питером Джарлингом (Форт-Детрик), был поддержан.

Так в августе 1997 г. стартовал проект МНТЦ/ NAS «Геном вируса оспы обезьян», а спустя два месяца – и проект CRDF/NIH «Секвенирование и анализ генома вируса оспы обезьян, патогенного для человека». К 2001 г. полный геном штамма Заир-96-I-16 был расшифрован. Углубленный компьютерный анализ показал, что вирус оспы обезьян не способен преобразоваться в вирус натуральной оспы, хотя вполне может стать более патогенным для людей.

Мультидиагностика: четыре в одном

Благодаря всем этим работам «Вектор» стал держателем единственной в мире базы данных по нуклеотидным последовательностям ДНК разных видов ортопоксвирусов, патогенных для человека. А многолетний опыт сравнительного анализа организации как вирусных геномов, так и отдельных генов позволил формулировать качественно новые задачи для дальнейших научных

Первые секвенированные геномы ортопоксвирусов





поисков и реализации практических задач по диагностике ортопоксвирусов и вакцинопрофилактике вызываемых ими инфекций (Shchelkunov *et al.*, 2005).

И одна из таких задач – быстрое и точное определение возбудителя при первых случаях локальной вспышки инфекции, что крайне важно, так как дает возможность своевременно принять меры по предотвращению ее перехода в эпидемию. Опыт показывает, что, хотя ортопоксвирусные инфекции имеют характерные внешние проявления в виде поражений кожи, клиническая диагностика на их основе зачастую может быть ошибочной.

Разработка метода *полимеразной цепной реакции* (ПЦР), позволяющего обнаружить патоген даже при его следовых количествах в образце, привела к созданию современных методов детекции и идентификации микроорганизмов с высокой специфичностью и за короткое время. Важно, что при этом не нужно проводить манипуляции с живыми особо опасными инфекционными агентами, к которым относятся патогенные ортопоксвирусы.

Для ПЦР-идентификации таких вирусов наибольший интерес представляют тест-системы, обеспечивающие возможность одновременно определять не только родовую, но и видовую принадлежность патогена. Обладая информацией о полных геномах всех опасных для человека ортопоксвирусов, мы смогли выявить видоспецифичные различия между ними и первыми в мире создать тест-системы на основе так называемой *мультиплексной ПЦР*. Такой анализ позволяет в одной пробе одновременно идентифицировать вирусы натуральной оспы, оспы обезьян, оспы коров и осповакцины (Гаврилова и др., 2003; Shchelkunov *et al.*, 2011). Эти тест-системы были зарегистрированы в России для медицинского использования.

Благодаря бурному развитию технологий секвенирования нового поколения сегодня у нас есть возможность в короткие сроки получать информацию о полной нуклеотидной последовательности генома исследуемого объекта. Поэтому все чаще научные сообщения о новых случаях ортопоксвирусных инфекций сопровождаются и данными полногеномной «расшифровки» выделенных вирусных изолятов. Результаты этих исследований свидетельствуют о необходимости дальнейшего совершенствования лабораторной диагностики этих опасных инфекций и строгого эпидемиологического надзора.

Иммунные «доспехи» четвертого поколения

Самым надежным способом профилактики любого вирусного заболевания до сих пор считается инфицирование человека или животного малозаразным вариантом возбудителя либо малопатогенным близкородственным вирусом. И прививки против оспы стали первым историческим примером такой защиты от инфекционного заболевания. Нужно отметить, что само царство вирусов было открыто лишь столетие спустя после введения в практику противооспенной вакцинации.

Разные виды ортопоксвирусов антигенно и иммунологически близки друг другу, демонстрируют перекрестные *серологические реакции* (взаимодействие между антигеном и соответствующим ему специфическим антителом) и, как следствие, иммунную защиту. Именно эти свойства легли в основу надежного способа предохранения человека от заболевания натуральной оспой с помощью прививки сначала вирусами оспы коров и оспы лошадей, а в дальнейшем – вирусом осповакцины, который обладает высокой иммуногенностью и при этом дает менее выраженные побочные реакции при вакцинации.

Но все же в редких случаях вакцинация вирусом осповакцины приводила к тяжелым последствиям для здоровья, вплоть до летального исхода. Поэтому после



В период массовой вакцинации против оспы широко использовался инжекторный пистолет, с помощью которого можно было безопасно вакцинировать около тысячи человек в час.
© CC BY-ND 2.0 /Pan American Health Organization

глобальной ликвидации оспы в 1980 г. противооспенная вакцинация населения была прекращена. В результате зоонозные ортопоксвирусы получили возможность циркулировать в человеческой популяции, а это может повлиять на их экологию и круг потенциальных хозяев.

Так, в условиях длительного отсутствия вакцинации населения и значительно более частого инфицирования людей вирус оспы обезьян может приобрести свойства, характерные для вируса натуральной оспы. И если это произойдет, то человечество встанет перед проблемой гораздо более серьезной, чем искоренение натуральной оспы, в первую очередь из-за того, что у этого патогена имеется природный резервуар в виде многочисленных африканских грызунов (Shchelkunova, Shchelkunov, 2023).

Чтобы предотвратить развитие вспышек инфекции в распространенные эпидемии и тем самым уменьшить риск возникновения высокопатогенного для человека ортопоксвируса, нужно создавать безопасные живые вакцины новых поколений на основе вируса осповакцины. Такие вакцины не имеют выраженной

видоспецифичности и могут применяться для иммунизации человека и животных при вспышках, обусловленных любым видом ортопоксвирусов.

Живая противооспенная вакцина *первого поколения* представляла собой препарат вируса осповакцины, полученный размножением вируса на коже телят или других животных. Использование ее для массовой вакцинации в настоящее время ограничено из-за роста числа людей с иммунодефицитами (ВИЧ-инфицированные, пациенты после трансплантации и др.), что увеличивает риск тяжелых осложнений.

В наши дни вакцинные штаммы осповакцины получают на культурах клеток млекопитающих – такие препараты относят к противооспенным вакцинам *второго поколения*. Наиболее изученной и массовой является ACAM2000, лицензированная для использования в США в 2007 г. Однако и противооспенные вакцины второго поколения могут вызывать серьезные побочные реакции и имеют ограниченное применение.

Ослабленные (*аттенуированные*) противооспенные вакцины *третьего поколения* создаются в процессе

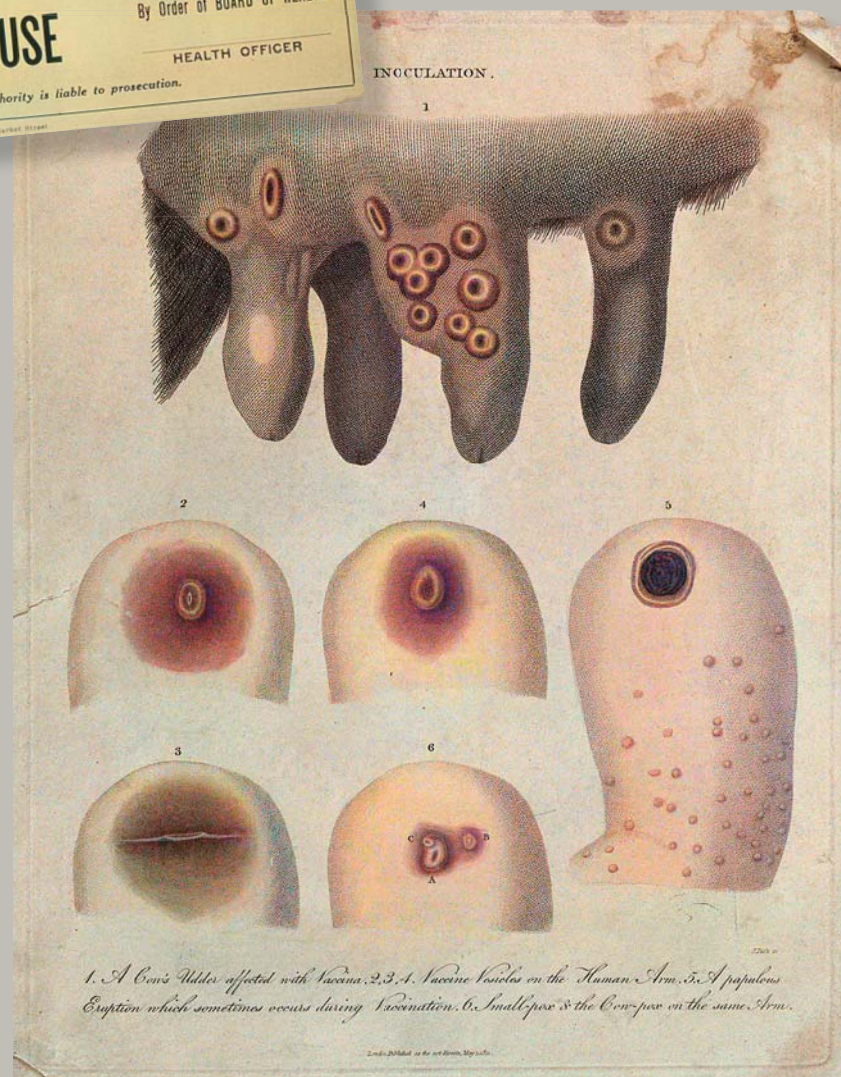


ОТ ВАРИОЛЯЦИИ – К ВАКЦИНАЦИИ

Человек, переболевший оспой, легко идентифицируется по характерным рубцам (так называемое *рябое лицо*). Давно было замечено, что такие люди оказываются невосприимчивы к этому заболеванию во время последующих эпидемий. По-видимому, именно подобные наблюдения легли в основу издавна практикуемой в Индии и Китае процедуры, когда здоровым людям в надрезы на коже (обычно на руке) втирали материал из кожных поражений больных оспой. В месте введения у переболевшего образовывался характерный рубец, и такой человек становился устойчив к оспе либо переносил ее в более легкой форме.

Этот способ защиты от оспы был назван *вариоляцией* (от лат. *variola* – оспа). Однако он не получил широкого распространения, поскольку смертность при такой процедуре достигала 0,5–2%. Правда, на фоне эпидемий оспы с летальностью 30–40% это был приемлемый результат.

Революцию в защите от оспы совершил в XVIII в. молодой британский врач Эдвард Дженнер. В то время в сельской Англии крупный рогатый скот и лошади довольно часто заболевали болезнью, сопровождавшейся высыпаниями на слизистых и вымени, – ее называли «оспа коров». Люди, контактировавшие с больными животными, заражались через ссадины и микротрещины на руках, но переносили болезнь относительно легко. В местах проникновения инфекционного агента на коже формировался рубец, похожий на шрам



после вариоляции. Более того, люди с подобными рубцами также не заболевали во время эпидемий натуральной оспы. Обобщив эти наблюдения, Дженнер провел несколько экспериментов на людях, вводя им в надрезы на коже рук содержимое пустул от больных оспой коров. После выздоровления и формирования кожного рубца Дженнер проводил вариоляцию, т.е. заражал испытуемых натуральной оспой, чтобы доказать, что они стали невосприимчивы к инфекции.

На цветной гравюре показаны характерные кожные высыпания при ортопоксвирусных инфекциях. Вверху – коровье вымя с гнойничками, типичными при заражении вирусом коровьей оспы. Внизу – плечо руки человека с оспинами коровьей и натуральной оспы. 1811 г. Гравюра Дж. Пасса. Public Domain Mark/ Wellcome Collection

Первая прививка вирусом коровьей оспы, взятым от больного человека, была сделана 14 мая 1796 г. восьмилетнему Д. Фиппсу, в результате чего мальчик приобрел устойчивость к заражению натуральной оспой. Впоследствии благодарный Дженнер построил Фиппсу дом и даже сам сажал розы в его саду. Материал для прививок Дженнер назвал на латыни *variola vaccinae* (в прямом переводе на русский – оспа коров), а такой способ защиты от оспы – *vaccine inoculation*, который в последующем стали именовать коротко *vaccination* (вакцинация). В 1881 г. на Международном медицинском конгрессе в Лондоне известный французский микробиолог Луи Пастер предложил применять этот термин для всех процедур иммунизации против любых инфекционных агентов.

В XX в. вирус, используемый для противооспенной вакцинации, по ряду характеристик уже отличавшийся от вируса оспы коров (*Cowpox virus*), был отнесен к отдельному виду *Vaccinia virus* (в русскоязычной литературе – вирус осповакцины)

Бесплатная вакцинация против оспы в большом фойе ежедневной парижской газеты *Le Petit Journal*. 1905 г. Франция.

© CC BY-ND 2.0 LME Press



множественных последовательных культивирований определенного штамма на клетках животных, к примеру курицы или кролика. Самая изученная вакцина третьего поколения MVA была получена с помощью 572 пересевов штамма Ankara BOV в культуре куриных *фибробластов* (клеток соединительной ткани). В результате в геноме штамма MVA появились множественные мутации и протяженные *делеции* (потери участков ДНК), которых не было у исходного штамма. При этом вирус утратил способность размножаться в большинстве клеток млекопитающих, включая клетки человека.

Вакцина на основе штамма MVA-BN, производимая компанией *Bavarian Nordic* (Дания), прошла многочисленные клинические испытания, в том числе и на пациентах с атопическим дерматитом и ВИЧ-инфицированных, и была лицензирована в странах Евросоюза, Канаде и США. Первоначально эта вакцина была одобрена для иммунизации против натуральной оспы, а впоследствии и против оспы обезьян. Ее используют для первичной вакцинации пациентов с противопоказаниями к противооспенным вакцинам первого и второго поколений. Основной недостаток вакцины – относительно низкая иммуногенность, из-за чего ее приходится вводить в высокой концентрации и как минимум двукратно.

Новый подход к получению аттенуированных противооспепных вакцин состоит в использовании генно-инженерных методов для создания направленных делеций и *инсерций* (вставок), нарушающих гены, контролирующие защитные реакции организма против вирусной инфекции, но не затрагивающих гены, продукты которых важны для размножения вируса в организме человека. Однако первый хорошо изученный вариант такого вируса осповакцины – штамм NYVAC – обеспечивал значительно более низкий противооспенный иммунитет в сравнении с классической вакциной и не нашел практического применения.

В рамках федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации» мы начали в 2009 г.



Для определения концентрации (титра) вируса осповакцины в вакцинном препарате, получаемом после размножения в культуре клеток почки африканской зеленой марышки, его последовательно разбавляют в десять раз, каждый раз нанося определенный объем раствора на монослой клеток в ячейках планшета. Планшеты помещают в термостат-инкубатор. Через 48 часов в местах ячеек, где размножается вирус, образуются так называемые бляшки, которые окрашивают и затем подсчитывают. Справа – результаты титрования вируса осповакцины в двух повторах.

Фото из архива ГНЦ ВБ «Вектор»



Препарат противооспенной вакцины нарабатывают в культуре клеток на современном оборудовании, фасуют в ампулы и лиофильно высушивают. Внизу – участок по получению вакцины в препаративных количествах.

Фото из архива ГНЦ ВБ «Вектор»



Сергей и Галина Щелкуновы в доме-музее Э. Дженнера в г. Беркли (Великобритания). Сентябрь 2004 г.
Фото из архива автора





Созданная сибирскими вирусологами живая вакцина «ОртопоксВак» против ортопоксвирусных инфекций, включая натуральную оспу, была лицензирована в России в 2022 г. Фото из архива ГНЦ ВБ «Вектор»

работу по созданию безопасной *реплицирующейся* (размножающейся в тканях человека локально в месте введения) вакцины четвертого поколения против оспы и других ортопоксвирусных инфекций (Якубицкий и др., 2015).

В результате последовательного введения направленных делеций/инсерций в 6 генов штамма ЛИВП вируса осповакцины, который служит основой отечественной противооспенной вакцины первого поколения, был получен штамм VACdelta6 – высокоиммуногенный, но со значительно сниженной *реактогенностью*, т.е. способностью вызывать побочные реакции.

Вакцина на основе этого штамма, названная «ОртопоксВак», прошла полные циклы доклинических исследований и клинических испытаний на добровольцах. Она показала себя не менее эффективной, чем отечественная вакцина первого поколения, и при этом вызывала гораздо меньше

нежелательных последствий для организма вакцинированных.

Живая культуральная вакцина «ОртопоксВак» была лицензирована в России в ноябре 2022 г. Она стала первой в мире противооспенной вакциной четвертого поколения, которая была одобрена для медицинского применения – иммунизации против оспы и других опасных ортопоксвирусных инфекций.



Таким образом, именно специалисты «Вектора» первыми расшифровали полные геномы вирусов натуральной оспы, оспы обезьян и оспы коров, выделенных от больных людей. Результаты исследований организации генома ортопоксвирусов, начатых около 40 лет назад, позволили разработать методы мультиплексной ПЦР-идентификации этих вирусов, что привело к созданию первых сертифицированных для медицинской практики диагностических тест-систем. Более десяти лет понадобилось, чтобы создать на основе вируса осповакцины первую генно-инженерную живую вакцину четвертого поколения, которая не менее эффективна, чем «коровья» вакцина доктора Дженнера, но несравнимо безопаснее.

Что касается вопроса о возможности возвращения оспы, то даже в настоящее время ответить на него не так просто. Потенциальная опасность ее «возрождения» сохраняется, так как и сейчас на больших территориях Евразии, Центральной Африки и Южной Америки имеются природные очаги с патогенными для человека ортопоксвирусами, и иногда там происходят вспышки инфекции, в которые вовлечены тысячи животных и сотни людей.

Большую тревогу вызывает оспа обезьян, особенно после эпидемии этого заболевания у людей в 2022–2023 гг., затронувшей многие страны на всех континентах. В августе 2024 г. ВОЗ признала текущую вспышку этой болезни в Африке «чрезвычайной ситуацией международного значения в области общественного здравоохранения». И по мере роста подобных вспышек какой-то из зоонозных ортопоксвирусов теоретически сможет полностью адаптироваться к организму человека.

Поэтому контроль всех локальных вспышек ортопоксвирусных инфекций людей должен вестись с помощью современных методов видоспецифичной экспресс-диагностики, а для предотвращения их перехода в эпидемии нужно использовать карантинные мероприятия и вакцинацию. Если нам всем, и в первую очередь медицинским службам, хватит мудрости и организованности, оспа не вернется.

Участники 21-го совещания Консультативного комитета ВОЗ по изучению вируса натуральной оспы. ВОЗ. 31 октября 2019 г. Женева, Швейцария. Фото из архива автора

С.Н. Щелкунов в доме Э. Дженнера – создателя первой вакцины против натуральной оспы. Великобритания. 2004 г. Фото из архива автора



Литература

Гаврилова Е.В., Бабкин И.В., Щелкунов С.Н. Мультиплексный ПЦР-анализ для видоспецифичной экспресс-идентификации ортопоксвирусов // Молекуляр. генетика, микробиол. и вирусол. 2003. № 1. С. 45–52.

Маренникова С.С., Щелкунов С.Н. Патогенные для человека ортопоксвирусы. М.: Т-во науч. изд. КМК, 1998. 386 с.

Рязанкина О.И., Щелкунов С.Н. Картирование генов вируса осповакцины // Молекуляр. биология. 1993. Т. 27, вып. 2. С. 245–265.

Щелкунов С.Н. Ортопоксвирусный геном // Молекуляр. биология. 1996. Т. 30, вып. 1. С. 5–32.

Щелкунов С.Н. Оспа – дамоклов меч цивилизаций // НАУКА из первых рук. 2012. № 6 (48). С. 96–109.

Якубицкий С.Н., Колосова И.В., Максютков Р.А. и др. Амтенуация вируса осповакцины // Acta Naturae. Т. 7, № 4 (27). С. 125–134.

Shchelkunov S. N., Marennikova S. S., Moyer R. W. Orthopoxviruses Pathogenic for Humans. Berlin, Heidelberg, N. Y.: Springer, 2005. 425 p.

Shchelkunova G. A., Shchelkunov S. N. Smallpox, monkeypox and other human orthopoxvirus infections // Viruses. 2023. V. 15. P. 103.

Shchelkunov S. N., Shcherbakov D. N., Maksyutov R. A. et al. Species-specific identification of variola, monkeypox, cowpox, and vaccinia viruses by multiplex real-time PCR assay // J. Virol. Meth. 2011. V. 175. P. 163–169.