

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

## Противооспенная вакцинация на модели мышей

С.Н. Щелкунов<sup>1, 2</sup>✉, А.А. Сергеев<sup>1</sup>, С.А. Пьянков<sup>1</sup>, К.А. Титова<sup>1</sup>, С.Н. Якубицкий<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

<sup>2</sup> Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

✉ snshchel@rambler.ru

**Аннотация.** Необычно широко распространившаяся в 2022 г. эпидемия оспы обезьян среди людей привела к заключению о необходимости противооспенной вакцинации пациентов из групп риска. При этом современные варианты противооспенной вакцины вводят либо внутримышечно, либо скарификацией кожи. Внутримышечное введение не обеспечивает активного иммунного ответа, так как ткани, в которые при этом вводится вакцина, являются иммунологически бедными. Кожа эволюционно развилась в иммунологически важный орган млекопитающих, поэтому введение вакцины в дерму кожи может обеспечивать надежный протективный иммунный ответ. Исторически первым способом иммунизации стал метод инокуляции вакцины в скарифицированную кожу (с/к). Однако этот метод не обеспечивает точного дозирования вакцины, для успешного выполнения процедуры нужно использовать вакцину в высокой концентрации. Альтернативой методу с/к может служить процедура внутрикожной (в/к) инъекции вакцины, особенно при использовании ее в низкой концентрации. Целью настоящей работы было сравнение способов внутрикожной противооспенной иммунизации на модели мышей с применением прототипных вакцин второго и четвертого поколений в низкой дозе 10<sup>4</sup> БОЕ. Эксперименты выполняли на мышах линии BALB/c, штаммы LIVP или LIVP-GFP вируса осповакцины (VACV) вводили в кожу хвоста с/к или в/к способами. Через 7, 14, 21, 28, 42 и 56 дней после вакцинации (дпв) у мышей проводили забор проб крови из ретроорбитального венозного синуса и получали сыворотки, в которых методом ИФА определяли титры VACV-специфичных IgM и IgG. Оба штамма VACV обуславливали более выраженную продукцию антител при в/к инъекции по сравнению со с/к инокуляцией. Для проверки уровня развившегося протективного иммунитета на 62-й дпв мышей интраназально инфицировали высоколетальной дозой вируса оспы коров. Полученные результаты показали, что в/к инъекция обеспечивает развитие протективного иммунитета у мышей в значительно большей степени, по сравнению с с/к инокуляцией обоих вариантов VACV.

Ключевые слова: оспа; оспа обезьян; вирус осповакцины; вакцинация; внутрикожная инъекция; скарификация кожи.

**Для цитирования:** Щелкунов С.Н., Сергеев А.А., Пьянков С.А., Титова К.А., Якубицкий С.Н. Противооспенная вакцинация на модели мышей. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(6):712-718. DOI 10.18699/VJGB-23-82

## Smallpox vaccination in a mouse model

S.N. Shchelkunov<sup>1, 2</sup>✉, A.A. Sergeev<sup>1</sup>, S.A. Pyankov<sup>1</sup>, K.A. Titova<sup>1</sup>, S.N. Yakubitskiy<sup>1</sup>

<sup>1</sup> State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia

<sup>2</sup> Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

✉ snshchel@rambler.ru

**Abstract.** The monkeypox epidemic, which became unusually widespread among humans in 2022, has brought awareness about the necessity of smallpox vaccination of patients in the risk groups. The modern smallpox variants are introduced either intramuscularly or by skin scarification. Intramuscular vaccination cannot elicit an active immune response, since tissues at the vaccination site are immunologically poor. Skin has evolved into an immunologically important organ in mammals; therefore, intradermal delivery of a vaccine can ensure reliable protective immunity. Historically, vaccine inoculation into scarified skin (the s.s. route) was the first immunization method. However, it does not allow accurate vaccine dosing, and high-dose vaccines need to be used to successfully complete this procedure. Intradermal (i.d.) vaccine injection, especially low-dose one, can be an alternative to the s.s. route. This study aimed to compare the s.s. and i.d. smallpox immunization routes in a mouse model when using prototypic second- and fourth-generation low-dose vaccines (10<sup>4</sup> pfu). Experiments were conducted using BALB/c mice; the LIVP or LIVP-GFP strains of the vaccinia virus (VACV) were administered into the tail skin via the s.s. or i.d. routes. After vaccination (7, 14, 21, 28, 42, and 56 days post inoculation (dpi)), blood samples were collected from the retro-orbital venous sinus; titers of VACV-specific IgM and IgG in the resulting sera were determined by ELISA. Both VACV strains caused more profound antibody production when injected via the i.d. route compared to s.s. inoculation. In order to assess the level of the elicited protective immunity, mice were intranasally infected with a highly lethal dose of the cowpox virus on 62 dpi. The results demonstrated that i.d. injection ensures a stronger protective immunity in mice compared to s.s. inoculation for both VACV variants.

Key words: smallpox; monkeypox; vaccinia virus; vaccination; intradermal injection; skin scarification.

**For citation:** Shchelkunov S.N., Sergeev A.A., Pyankov S.A., Titova K.A., Yakubitskiy S.N. Smallpox vaccination in a mouse model. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(6):712-718. DOI 10.18699/VJGB-23-82

## Введение

Оспа (от *лат. variola*) – особо опасное инфекционное заболевание, унесшее за предыдущие века жизни многих сотен миллионов людей. Смертность во время эпидемий оспы могла достигать 30–40 % среди заболевших. Инфекционным агентом этого заболевания является вирус натуральной оспы (*Variola virus*, VARV) (Fenner et al., 1988).

Передача VARV людям происходила в основном воздушно-капельным или аэрозольным путем при тесных контактах. Инкубационный период в течение одной или двух недель предшествовал резкому началу лихорадки, головной боли и болей в крестце, за которыми через несколько дней следовали высыпания на языке и слизистых оболочках рта и ротоглотки, на лице и руках появлялись макулопапулезные поражения (сыпь), распространяющиеся затем по всему телу и прогрессирующие в пустулы. К 10–13-му дню болезни пустулы достигали максимального размера, после чего они постепенно уплощались, подсыхали и превращались в корочки. К 30–40-му дню болезни корочки отпадали, оставляя красноватые пятна. В дальнейшем на некоторых участках, главным образом на лице, на месте этих пятен образовывались характерные западения кожи – оспенные рубцы (рябое лицо). Таким образом, людей, переболевших оспой, можно было фенотипически легко отличить от неподвергшихся данному заболеванию (Shchelkunov et al., 2005).

Оказалось, что переболевшие оспой люди при последующих эпидемиях данной инфекции были к ней невосприимчивы. Это, по-видимому, натолкнуло много столетий назад врачей в Индии и Китае на разработку процедуры, получившей в дальнейшем название «вариоляция» (*variolation* – от *variola inoculation*). Метод вариоляции состоял в том, что в надрезы кожи вносили (инокулировали) инфекционный материал, полученный после растирания корочек, взятых от больных оспой. Внутривожно зараженные люди, как правило, переносили оспу в более легкой форме по сравнению с естественной инфекцией. На месте инокуляции VARV в кожу по завершению инфекционного процесса формировался характерный рубец. После такой процедуры люди приобретали устойчивость к оспе. Однако от 0.5 до 2 % пациентов погибали от вариоляции, поэтому этот метод защиты от оспы не нашел широкого распространения (Fenner et al., 1988).

В XVIII в. в Англии появились наблюдения о наличии оспоподобного заболевания у крупного рогатого скота и лошадей, которое стали называть оспой коров. Клинически это заболевание характеризовалось кожными высыпаниями на теле животных, чаще всего на вымени и сосках. Кожные элементы претерпевали типичные стадии эволюции (папулы–везикулы–пустулы) с последующим образованием корочек и язв. Эта инфекция легко передавалась людям, контактировавшим с больными животными. В большинстве случаев оспа коров у человека протекала доброкачественно и характеризовалась развитием единичных местных поражений, чаще всего на кистях и предплечьях, в местах микротравм кожного покрова. По завершении инфекции на местах поражений кожи у людей формировались рубцы, напоминающие рубцы, образу-

ющиеся после вариоляции. Более того, люди, переболевшие оспой коров, не заболели во время эпидемий оспы.

Накопив такую информацию, английский медик Эд. Дженнер пришел к заключению, что можно осуществлять защиту людей от оспы, предварительно заразив их оспой коров. С 1796 г. он провел несколько экспериментальных заражений людей в надрезы кожи (скарификацией) инфекционным материалом из пустул от больных оспой коров с последующим через некоторое время заражением их оспой, используя процедуру вариоляции. Во всех случаях была продемонстрирована устойчивость привитых оспой коров пациентов к заражению оспой. Разработанную процедуру защиты от оспы Эд. Дженнер назвал вакцинацией (*vaccine inoculation/vaccination* – от *лат. vacca* – корова) (Fenner et al., 1988; Esparza et al., 2017).

Следует отметить, что царство вирусов было открыто лишь спустя столетие после появления метода вакцинации против оспы. И только недавно стало ясно, что используемые долгие годы для иммунизации разные штаммы вируса осповакцины (*Vaccinia virus*, VACV) наиболее близки по организации генома к вирусу оспы лошадей, а не к вирусу оспы коров (Tulman et al., 2006; Esparza et al., 2017).

В результате реализации Программы глобальной ликвидации оспы под эгидой Всемирной организации здравоохранения при использовании массовой противооспенной вакцинации и строгого эпидемиологического контроля к 1977 г. оспу удалось полностью искоренить (Fenner et al., 1988).

В большинстве случаев для противооспенной вакцинации применяли метод введения VACV скарификацией кожи (с/к). Данная процедура относительно проста в исполнении, но не обеспечивает точное дозирование вакцинного препарата и, как следствие, для надежности иммунизации необходимо применять вирусный препарат высокой концентрации (Fenner et al., 1988; Jacobs et al., 2009; Sanchez-Sampedro et al., 2015).

Современной альтернативой методу с/к может быть процедура внутривожной (в/к) инъекции вакцинного препарата. Этот подход обеспечивает точное дозирование вакцины и более высокую надежность иммунизации, что может позволить снизить дозу вводимой вакцины. А это важно, особенно в случае вакцинации больших групп людей.

Целью настоящей работы было осуществить сравнение эффективности процедур в/к и с/к при противооспенной вакцинации малой дозой VACV на модели мышей линии BALB/c. Для корректного сравнения при обеих процедурах вирус вводили в кожу одного и того же района хвоста мышей. В качестве объектов исследования использовали клоновый вариант штамма Л-ИВП (LIVP) и полученный на его основе рекомбинантный штамм LIVP-GFP (дефектный по вирусной тимидинкиназе), которые можно рассматривать как прототипные противооспенные вакцины второго и четвертого поколений соответственно.

## Материалы и методы

**Вирусы, культура клеток.** Использовали клон 14 штамма Л-ИВП (LIVP) VACV, полученный нами методом предельного разведения и трехкратным пересевом через бляшку под агарозным покрытием (Yakubitskiy et al., 2015), соз-

данный на его основе мутантный LIVP-GFP с инактивацией гена вирусной тимидинкиназы (Petrov et al., 2013), а также вирус оспы коров (*Cowpox virus*, CPXV) штамм GRI-90 (Shchelkunov et al., 1998). Вирусы выращивали и титровали на культуре клеток почки африканской зеленой маргьши линии CV-1 из коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

**Животные.** Исследовали мышей линии BALB/c, полученных из питомника ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Подопытных животных содержали на стандартном рационе с достаточным количеством воды согласно ветеринарному законодательству и в соответствии с требованиями по гуманному содержанию и использованию животных в экспериментальных исследованиях. Манипуляции на животных были проведены с одобрения комитета по биоэтике ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (Протокол № 02-06.2022 от 28.06.2022).

**Оценка патогенности штаммов VACV.** В исследованиях по изучению патогенности штаммов VACV LIVP и LIVP-GFP при интраназальном (и/н) заражении использовали 3-недельных мышей линии BALB/c массой 10–12 г (по 10 животных в группе). Мышам после ингаляционного наркоза диэтиловым эфиром вводили в полость носа в объеме 50 мкл вирусосодержащую жидкость в дозе  $10^7$  бляшкообразующих единиц (БОЕ), либо физиологический раствор (ф. р.). За животными наблюдали в течение 14 дней и регистрировали у них клинические проявления инфекции и гибель.

Использовали балльную оценку выявляемых симптомов заболевания: 0 – признаков заболевания нет, 1 – легкая взъерошенность шерсти, 2 – сильная взъерошенность шерсти, 3 – сильная взъерошенность шерсти, а также сутулая поза или конъюнктивит, 4 – затрудненное дыхание или отсутствие движения, 5 – гибель.

Мышей индивидуально взвешивали каждые два дня. Средние арифметические значения массы тел мышей для каждой группы на временную точку рассчитывали и выражали в процентах от начального веса. Показатель рассеивания данных относительно среднего значения представляли в виде стандартного отклонения и также выражали в процентах.

**Иммунизация мышей.** Иммунизацию самок мышей линии BALB/c возраста 6–7 недель (массой 16–19 г) осуществляли методом в/к или с/к, используя VACV LIVP или LIVP-GFP в дозе  $10^4$  БОЕ.

Для в/к инъекции или с/к инокуляции место введения (дорсальная сторона хвоста, около 1 см от основания) предварительно обрабатывали 70 % этиловым спиртом. При в/к инъекции вирусный материал ( $10^4$  БОЕ) или ф. р. (контрольная группа) в объеме 20 мкл вводили, как описано в работе (Shchelkunov et al., 2022). Для иммунизации методом с/к делали 10 надрезов кожи иглой 26G ( $0.45 \times 16$  мм), оставаясь в пределах поверхностного слоя эпидермиса. На поврежденный участок кожи немедленно наносили вирусный материал ( $10^4$  БОЕ) или ф. р. (контрольная группа) в объеме 5 мкл и давали ему впитаться в кожу.

Через 7, 14, 21, 28, 42 и 56-й день после вакцинации (дпв) вирусами LIVP или LIVP-GFP у мышей (по шесть

животных каждой группы) проводили забор проб крови из ретроорбитального венозного синуса, как описано в (Shchelkunov et al., 2022).

Из индивидуальных образцов крови мышей были получены препараты сывороток путем осаждения форменных элементов крови центрифугированием. Образцы сывороток крови мышей хранили при температуре  $-20$  °С.

**Иммуноферментный анализ индивидуальных сывороток крови** мышей выполняли, как описано в (Shchelkunov et al., 2020). В качестве антигена использовали очищенный препарат VACV LIVP. Вычисляли средние геометрические значения логарифмов обратного титра VACV-специфических IgM и IgG по экспериментальным группам и рассчитывали доверительные интервалы для уровня 95 % вероятности совпадения каждой выборки с генеральной совокупностью.

**Оценка уровня протективности у иммунизированных мышей.** На 62-й дпв группы иммунизированных вирусами LIVP или LIVP-GFP и контрольных животных заражали и/н CPXV GRI-90 в дозе 46 ЛД<sub>50</sub> ( $9.4 \times 10^5$  БОЕ/мышь). За животными наблюдали в течение 14 дней и регистрировали их гибель.

Получали данные для групп из шести животных, в/к или с/к иммунизированных VACV LIVP или LIVP-GFP, а также неиммунизированных групп мышей и неинфицированных (отрицательный контроль) или зараженных CPXV GRI-90 (положительный контроль).

**Статистический анализ данных.** Статистическую обработку и сравнение результатов проводили стандартными методами, используя пакет компьютерных программ Statistica 13.0 (StatSoft Inc. 1984–2001). Расчет 50 % летальной дозы (ЛД<sub>50</sub>) производили на основании количества погибших животных по методу Спирмена–Кербера (Sachs, 1972). Значение  $p$  менее 0.05 считали статистически значимым.

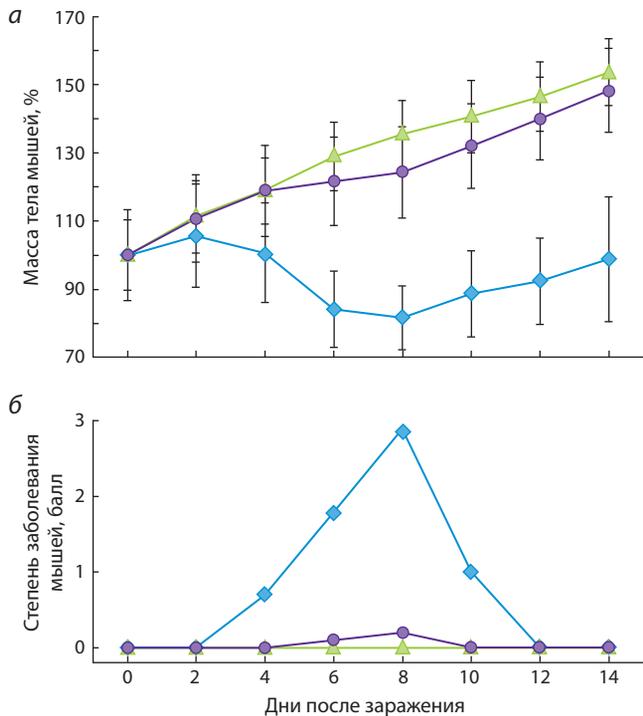
## Результаты

### Сравнение патогенных свойств штаммов LIVP и LIVP-GFP

#### при интраназальном заражении мышей

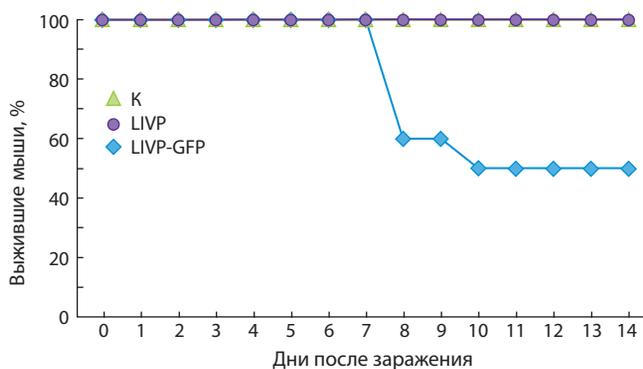
При изучении патогенности штаммов VACV LIVP и LIVP-GFP в настоящей работе использовали 3-недельных мышей линии BALB/c. Осуществляли и/н заражение мышей вирусами в дозе  $10^7$  БОЕ. Для VACV LIVP выраженные клинические проявления инфекции наблюдали начиная с 4-го дня с максимумом на 8-й день, выздоровление наступало после 10-го дня (рис. 1, б). Заболевание сопровождалось существенным снижением массы тела мышей (см. рис. 1, а).

Вирус LIVP-GFP, дефектный по гену тимидинкиназы, в тех же условиях на 6–8-й дни после заражения мышей вызывал минимальные клинические проявления инфекции (см. рис. 1, б) и незначительное снижение массы тела инфицированных животных по сравнению с контрольными (см. рис. 1, а). Интраназальное заражение мышей штаммом LIVP при этом приводило к гибели 50 % животных, а после заражения штаммом LIVP-GFP все животные выжили (рис. 2).



**Рис. 1.** Динамика изменения массы тела мышей (а) и клинических проявлений инфекции (б) после интраназального заражения вирусом LIVP (голубой) или LIVP-GFP (фиолетовый) в дозе  $10^7$  БОЕ.

Приведены средние данные для групп из 10 животных, зараженных соответствующими вирусами, а также контрольной группы (зеленый цвет).



**Рис. 2.** Динамика гибели мышей, интраназально зараженных вирусами LIVP (голубой) или LIVP-GFP (фиолетовый) в дозе  $10^7$  БОЕ. Контрольная группа – неинфицированные животные (зеленый цвет).

Полученные результаты указывают на значительную аттенуацию VACV LIVP при инактивации у него гена тимидинкиназы, которая произошла при получении рекомбинантного штамма LIVP-GFP.

### Сравнение динамик развития гуморального иммунного ответа на вакцинацию мышей вирусами LIVP и LIVP-GFP

Взрослых мышей линии BALB/c возраста 6–7 недель вакцинировали методом в/к инъекции или с/к инокуляции, используя VACV LIVP или LIVP-GFP в низкой дозе ( $10^4$  БОЕ).

При в/к инъекции вируса LIVP выраженную продукцию VACV-специфичных IgM наблюдали уже на 7-й дпв и максимум их уровня достигал к 21-му дпв, а к 28-му дпв и в последующие дни титр IgM падал до уровня отрицательного контроля. Поэтому на рис. 3 результаты тестирования IgM сывороток мышей представлены только для 7, 14, 21 и 28-го дня после вакцинации. Иммунизация мышей вирусом LIVP методом с/к инокуляции приводила к более поздней и менее выраженной продукции IgM (см. рис. 3, а).

Как при в/к, так и при с/к вакцинации мышей вирусом LIVP-GFP в дозе  $10^4$  БОЕ наблюдали лишь минимальную продукцию IgM без достоверных отличий от уровня этого класса антител в контрольных сыворотках крови неиммунизированных животных (см. рис. 3, б).

VACV-специфичные иммуноглобулины IgG продуцировались в значительно больших титрах по сравнению с IgM (см. рис. 3 и 4). После в/к вакцинации вирусом LIVP существенная продукция IgG выявлялась уже на 7-й дпв и достигала максимума на 21-й дпв, сохраняясь практически на том же уровне до 28-го дня после вакцинации. Затем наблюдалось постепенное снижение уровня VACV-специфичных IgG к 42- и 56-му дпв (рис. 4, а). При с/к инокуляции мышей вирусом LIVP синтез специфичных IgG происходил с запозданием и меньшей интенсивностью по сравнению с в/к иммунизацией (см. рис. 4, а).

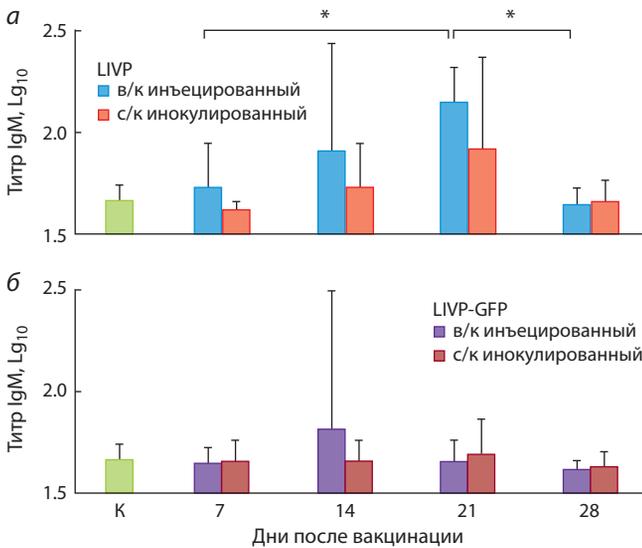
При в/к иммунизации мышей вирусом LIVP-GFP уровень продукции IgG был значительно ниже по сравнению с LIVP вакцинацией, и максимум продукции этих антител приходился на 28-й дпв (см. рис. 4, б). Введение вируса LIVP-GFP методом с/к обуславливало меньшую продукцию анализируемых IgG (см. рис. 4).

### Проверка защиты иммунизированных мышей от летальной ортопоксвирусной инфекции

Для оценки того, как используемые штаммы VACV, а также в/к и с/к способы вакцинации влияют на формирование протективного иммунитета у мышей против повторной ортопоксвирусной инфекции, на 62-й дпв группы иммунизированных вирусами LIVP или LIVP-GFP и контрольных (неиммунизированных) животных и/н заражали CPXV GRI-90 в дозе 46 ЛД<sub>50</sub>. Результаты этих экспериментов, представленные на рис. 5, показывают, что полная защита была только в группе мышей, в/к иммунизированных вирусом LIVP. В группе мышей, вакцинированных этим же вирусом, при использовании с/к метода 83 % животных после заражения CPXV-GRI погибли (см. рис. 5, а).

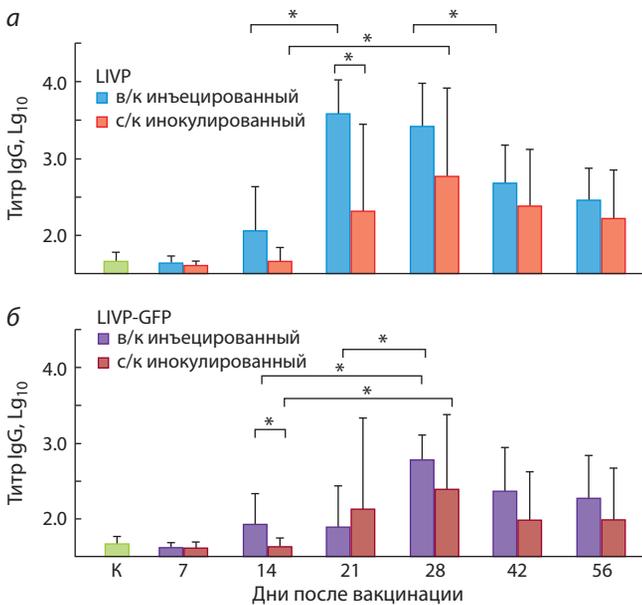
Внутрикожная инъекция вируса LIVP-GFP обеспечила в тех же условиях повторной инфекции CPXV-GRI защиту 80 % мышей, а все животные, с/к инокулированные LIVP-GFP, погибли (см. рис. 5, а). Уровень защиты мышей от летальной инфекции CPXV коррелировал со степенью клинических проявлений этой инфекции (см. рис. 5, б).

Таким образом, при малой дозе VACV ( $10^4$  БОЕ), использованной в данной работе для иммунизации мышей, в/к инъекция демонстрирует явное преимущество перед с/к инокуляцией в формировании протективного иммунитета против гетерологичной ортопоксвирусной инфекции (оспы коров).



**Рис. 3.** Титры VACV-специфических IgM в сыворотках крови мышей, иммунизированных вирусами LVP (а) или LVP-GFP (б). К – сыворотки крови мышей, которым вводили физраствор.

\* Статистически достоверные различия с  $p < 0.05$ .



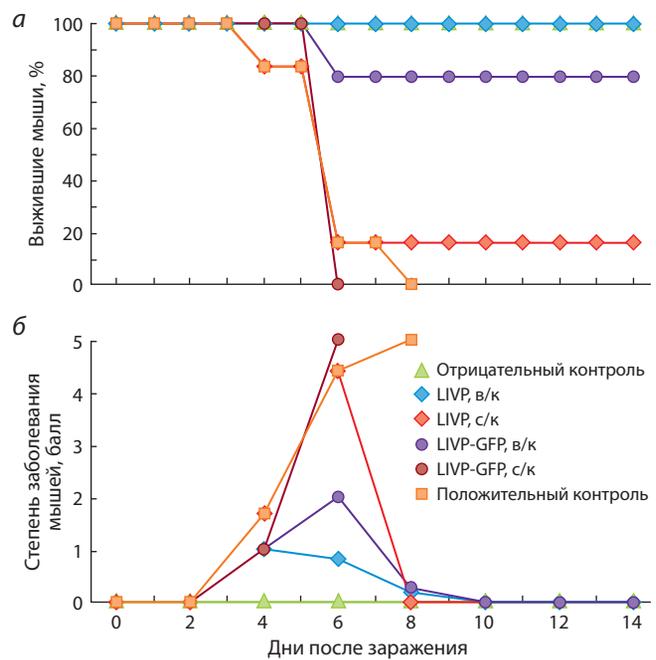
**Рис. 4.** Титры VACV-специфических IgG в сыворотках мышей, иммунизированных вирусами LVP (а) или LVP-GFP (б). К – сыворотки крови мышей, которым вводили физраствор.

\* Статистически достоверные различия с  $p < 0.05$ .

## Обсуждение

Масштабная эпидемия оспы обезьян среди людей, распространившаяся в 2022 г. по всем континентам (Nagarajan et al., 2022; Shchelkunova, Shchelkunov, 2023), поставила на повестку дня вопрос о массовой вакцинации против этой инфекции в группах риска. Важной при этом оказалась необходимость выбора типа вакцины, а также наиболее оптимального способа введения противооспенной вакцины.

Живая противооспенная вакцина первого поколения представляет собой препарат VACV, полученный размно-



**Рис. 5.** Динамика гибели (а) и клинических проявлений инфекции у мышей (б), иммунизированных вирусами LVP или LVP-GFP в дозе  $10^4$  БОЕ, после их интраназального заражения CPXV GRI-90 в дозе  $46 LD_{50}$  на 62-й день после вакцинации.

Приведены средние данные для групп из шести животных, иммунизированных соответствующими вирусами, а также неиммунизированных групп и неинфицированных (отрицательный контроль) или зараженных CPXV GRI-90 (положительный контроль).

жением вируса на коже телят или других животных. Недавние исследования показали, что такие вакцины состоят из смеси разных вариантов VACV (Osborne et al., 2007; Qin et al., 2011).

В современных условиях вакцинные штаммы VACV, полученные выделением клоновых вариантов из вакцин первого поколения, продуцируют на культурах клеток млекопитающих, и такие препараты относят к противооспенным вакцинам второго поколения (Sanchez-Sampedro et al., 2015). Использование противооспенных вакцин первого и второго поколений для массовой вакцинации в настоящее время ограничено из-за относительно большого числа возможных тяжелых осложнений (Fenner et al., 1988; Sanchez-Sampedro et al., 2015), что обусловлено возросшим в последние годы количеством людей с иммунодефицитами (включая ВИЧ-инфекцию).

Аттенуированные (со сниженной патогенностью) противооспенные вакцины третьего поколения создают в процессе множественных пассажей определенного штамма VACV в культуре клеток гетерологичного хозяина. При этом возникают варианты VACV со спонтанными делециями и мутациями в вирусном геноме (Jacobs et al., 2009; Olson, Shchelkunov, 2017; Albarnaz et al., 2018).

Новый подход к получению противооспенных вакцин четвертого поколения состоит во введении методами генетической инженерии направленных делеций/инсерций, нарушающих выбранные вирусные гены и приводящих к аттенуации VACV (Yakubitskiy et al., 2015; Li et al., 2017; Щелкунов и др., 2022).

В России для противооспенной иммунизации используется Вакцина оспенная живая первого поколения на основе штамма Л-ИВП VACV. Штамм Л-ИВП получен путем накожных пассажей на кроликах и телятах вакцины, приготовленной из штамма Lister и предоставленной институтом Листера (Элстри, Англия). Препарат этой вакцины представляет собой вирус, выращенный на скарифицированной коже телят (Перекрест и др., 2013). Пациентам эту вакцину вводят с/к инокуляцией.

Из штамма Л-ИВП нами был получен и охарактеризован клоновый вариант LIVP (Yakubitskiy et al., 2015), который может рассматриваться как прототип противооспенной вакцины второго поколения. Созданный на его основе рекомбинантный штамм LIVP-GFP, у которого инактивирован ген тимидинкиназы (Petrov et al., 2013), представляет собой прототипный вариант противооспенной вакцины четвертого поколения.

На первом этапе настоящего исследования сравнили свойства патогенности штаммов LIVP и LIVP-GFP. Чувствительность мышей к ортопоксвирусам существенно зависит от их возраста (Shchelkunov et al., 2005), поэтому использовали молодых (возраст 3 недели) мышей линии BALB/c. Животных и/н инфицировали вирусами, поскольку данный способ имитирует естественный путь заражения и обуславливает наибольшую чувствительность мышей к этой инфекции (Hughes et al., 2020; Щелкунов и др., 2021).

Оказалось, что при и/н заражении молодых мышей в дозе  $10^7$  БОЕ штамм LIVP индуцировал развитие клинически выраженной инфекции (см. рис. 1) с гибелью 50 % животных (см. рис. 2). В то же время штамм LIVP-GFP обуславливал у мышей появление лишь слабых признаков заболевания (см. рис. 1) с последующим их полным выздоровлением (см. рис. 2). Таким образом, инактивация гена тимидинкиназы у LIVP-GFP привела к его значительной аттенуации по сравнению с родительским штаммом LIVP, что соответствует результатам, полученным на других штаммах VACV (Taylor et al., 1991; Jacobs et al., 2009).

Ранее в разных работах было показано, что с/к иммунизация вакцинами второго и четвертого поколения на основе VACV обеспечивала полную защиту мышей от повторной летальной ортопоксвирусной инфекции при введении этих вакцин в дозах не менее  $10^5$ – $10^6$  БОЕ (Melamed et al., 2007; Jacobs et al., 2009; Shchelkunov et al., 2022).

В данной работе нами изучена возможность снижения дозы прототипных противооспенных вакцин до  $10^4$  БОЕ при иммунизации мышей с/к инокуляцией или в/к инъекцией. Для корректного сравнения с/к и в/к введение VACV осуществляли в один и тот же район кожи хвоста мышей.

При изучении иммуногенности VACV LIVP и LIVP-GFP использовали взрослых мышей (возраст 6–7 недель) со сформированной иммунной системой. Известно, что наибольший вклад в развитие адаптивного иммунного ответа на VACV вакцинацию имеет антительный ответ (Velyakov et al., 2003; Moss, 2011). Поэтому изучили динамику синтеза VACV-специфичных IgM и IgG после в/к или с/к вакцинации мышей штаммами LIVP или LIVP-GFP. Результаты этих экспериментов показали (см. рис. 3 и 4), что оба штамма VACV обуславливают более выраженную продукцию антител при в/к инъекции по сравнению с с/к

инокуляцией. При этом статистически значимая разница результатов между сравниваемыми группами была выявлена только для значений IgG на 21-й дпв в случае LIVP (см. рис. 4, а), и на 14-й дпв в случае LIVP-GFP (см. рис. 4, б). Для значений IgM статистически значимую разницу результатов не наблюдали (см. рис. 3).

Для проверки уровня протективного иммунитета, развившегося у мышей в ответ на иммунизацию их вирусом LIVP или LIVP-GFP с/к или в/к методами, использовали и/н инфицирование этих животных высоколетальной дозой CPXV. Такой подход считается наиболее адекватным для оценки эффективности VACV вакцинации на модели мышей (Ferrier-Rembert et al., 2007; Melamed et al., 2007). Полученные результаты (см. рис. 5) показали, что в/к инъекция обеспечивает развитие протективного иммунитета у мышей в значительно большей степени, по сравнению с с/к инокуляцией VACV. Только штамм LIVP при в/к иммунизации в низкой дозе обеспечивал полную защиту мышей от летальной инфекции CPXV. Аттенуированный штамм LIVP-GFP в тех же условиях уже не формировал достаточно надежный протективный иммунитет. Инокуляция вакцины в скарифицированную кожу VACV LIVP или LIVP-GFP при выбранной низкой дозе не обеспечивала защиты животных от повторной инфекции CPXV (см. рис. 5).

## Заключение

На основании полученных результатов можно заключить, что в/к инъекция обоих изученных вариантов VACV обеспечивает индукцию существенно большего протективного иммунитета у мышей, по сравнению с с/к инокуляцией этих вирусов в той же дозе. Следует отметить, что в/к иммунизация, кроме более точного дозирования вакцины, по сравнению с с/к процедурой, приводит к гораздо меньшему повреждению кожи и тем самым значительно снижает развитие воспалительной реакции, препятствующей эффективной репликации VACV, и уменьшает вероятность бактериальных инфекций в зоне введения вакцины (Shmeleva et al., 2022). При применении для противооспенной иммунизации аттенуированной вакцины четвертого поколения со сниженной «удельной» иммуногенностью нужно использовать VACV в большей дозе по сравнению с вакциной второго поколения.

## Список литературы / References

- Перекрест В.В., Мовсесянц А.А., Мухачева А.В., Шевцов В.А., Шведов Д.В., Борисевич И.В. Препараты для специфической профилактики натуральной оспы, зарегистрированные в Российской Федерации. *Биопрепараты*. 2013;2:4-13.  
[Perekrest V.V., Movsesyants A.A., Mukhacheva A.V., Shevtsov V.A., Shvedov D.V., Borisevich I.V. Preparations for the specific prophylaxis of smallpox approved in the Russian Federation. *Boipreparaty = Biopreparation (Biopharmaceuticals)*. 2013;2:4-13. (in Russian)]
- Щелкунов С.Н., Сергеев А.А., Кабанов А.С., Якубицкий С.Н., Бауэр Т.В., Пьянков С.А. Патогенность и иммуногенность вариантов вируса осповакцины при разных способах их введения мышам. *Инфекция и иммунитет*. 2021;11(2):357-364. DOI 10.15789/2220-7619-PAI-1375.  
[Shchelkunov S.N., Sergeev A.A., Kabanov A.S., Yakubitskiy S.N., Bauer T.V., Pyankov S.A. Route-coupled pathogenicity and immunogenicity of vaccinia virus variant inoculated mice. *Infektsiya*

- i Immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*. 2021; 11(2):357-364. DOI 10.15789/2220-7619-PAI-1375. (in Russian)]
- Щелкунов С.Н., Якубитский С.Н., Нестеров А.Е., Колосова И.В., Сергеев А.А., Зайковская А.В., Кабанов А.С., Нечаева Е.А., Богрянцева М.П., Усова С.В., Куцерубова Н.С., Трегубчак Т.В., Гаврилова Е.В., Максюттов Р.А. Доклинические исследования специфической активности живой культуральной вакцины VACΔ6 против оспы и других ортопоксвирусных инфекций. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2022;21(6):34-47. DOI 10.31631/2073-346-2022-21-6-34-47.
- [Shchelkunov S.N., Yakubitskiy S.N., Nesterov A.E., Kolosova I.V., Sergeev A.A., Zaykovskaya A.V., Kabanov A.S., Nechaeva E.A., Bogryantseva M.P., Usova S.V., Kutserubova N.S., Tregubchak T.V., Gavrilo E.V., Maksyutov R.A. Preclinical studies of the specific activity of the live culture vaccine VACΔ6 against smallpox and other orthopoxvirus infections. *Epidemiologiya i Vaktsinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2022;21(6):34-47. DOI 10.31631/2073-346-2022-21-6-34-47. (in Russian)]
- Albarnaz J.D., Torres A.A., Smith G.L. Modulating vaccinia virus immunomodulators to improve immunological memory. *Viruses*. 2018; 10(3):101. DOI 10.3390/v10030101.
- Belyakov I.M., Earl P., Dzutsev A., Kuznetsov V.A., Lemon M., Wyatt L.S., Snyder J.T., Ahlers J.D., Franchini G., Moss B., Berzofsky J.A. Shared models of protection against poxvirus infection by attenuated and conventional smallpox vaccine viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003;100(16):9458-9463. DOI 10.1073/pnas.1233578100.
- Esparza J., Schrick L., Damaso C.R., Nitsche A. Equination (inoculation of horsepox): An early alternative to vaccination (inoculation of cowpox) and the potential role of horsepox virus in the origin of the smallpox vaccine. *Vaccine*. 2017;35(52):7222-7230. DOI 10.1016/j.vaccine.2017.11.003.
- Fenner F., Henderson D.A., Arita I., Jezek Z., Ladnyi I.D. Smallpox and its Eradication. Geneva: World Health Organization, 1988.
- Ferrier-Rembert A., Drillien R., Tournier J.-N., Garin D., Crance J.-M. Intranasal cowpox virus infection of the mouse as a model for pre-clinical evaluation of smallpox vaccines. *Vaccine*. 2007;25(25): 4809-4817. DOI 10.1016/j.vaccine.2007.04.011.
- Harapan H., Ophinni Y., Megawati D., Frediansyah A., Mamada S.S., Salampe M., Bin Emran T., Winardi W., Fathima R., Sirinam S., Sittikul P., Stoian A.M., Nainu F., Sallam M. Monkeypox: A comprehensive review. *Viruses*. 2022;14(10):2155. DOI 10.3390/v14102155.
- Hughes L.J., Townsend M.B., Gallardo-Romero N., Hutson C.L., Patel N., Dotty J.B., Salzer J.S., Damon I.K., Carroll D.S., Satheshkumar P.S., Karem K.L. Magnitude and diversity of immune response to vaccinia virus is dependent on route of administration. *Virology*. 2020;544:55-63. DOI 10.1016/j.viro.2020.02.001.
- Jacobs B.L., Langland J.O., Kibler K.V., Denzler K.L., White S.D., Holechek S.A., Wong S., Huynh T., Baskin C.R. Vaccinia virus vaccines: past, present and future. *Antiviral Res*. 2009;84(1):1-13. DOI 10.1016/j.antiviral.2009.06.006.
- Li Y., Zhu Y., Chen S., Li W., Yin X., Li S., Xiao P., Han J., Li X., Sun L., Jin N. Generation of an attenuated Tiantan vaccinia virus strain by deletion of multiple genes. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 2017;7:462. DOI 10.3389/fcimb.2017.00462.
- Melamed S., Paran N., Katz L., Ben-Nathan D., Israely T., Schneider P., Levin R., Lustig S. Tail scarification with vaccinia virus Lister as a model for evaluation of smallpox vaccine potency in mice. *Vaccine*. 2007;25(45):7743-7753. DOI 10.1016/j.vaccine.2007.09.023.
- Moss B. Smallpox vaccines: targets of protective immunity. *Immunol. Rev*. 2011;239(1):8-26. DOI 10.1111/j.1600-065X.2010.00975.x.
- Olson V.A., Shchelkunov S.N. Are we prepared in case of a possible smallpox-like disease emergence? *Viruses*. 2017;9(9):242. DOI 10.3390/v9090242.
- Osborne J.D., da Silva M., Frace A.M., Sammons S.A., Olsen-Rasmussen M., Upton C., Buller R.M., Chen N., Feng Z., Roper R.L., Liu J., Pougatcheva S., Chen W., Wohlhueter R.M., Esposito J.J. Genomic differences of *Vaccinia virus* clones from Dryvax smallpox vaccine: The Dryvax-like ACAM2000 and the mouse neurovirulent Clone-3. *Vaccine*. 2007;25(52):8807-8832. DOI 10.1016/j.vaccine.2007.10.040.
- Petrov I.S., Goncharova E.P., Pozdnyakov S.G., Shchelkunov S.N., Zenkova M.A., Vlasov V.V., Kolosova I.V. Antitumor effect of the LIVP-GFP recombinant vaccinia virus. *Dokl. Biol. Sci*. 2013; 451(1):248-252. DOI 10.1134/S0012496613040133.
- Qin L., Upton C., Hazes B., Evans D.H. Genomic analysis of the *Vaccinia virus* strain variants found in Dryvax vaccine. *J. Virol*. 2011; 85(24):13049-13060. DOI 10.1128/JVI.05779-11.
- Sachs L. Statistische Auswertungsmethoden. Heidelberg (Germany): Springer, 1972.
- Sanchez-Sampedro L., Perdiguero B., Mejias-Perez E., Garcia-Arriaza J., Di Pilato M., Esteban M. The evolution of poxvirus vaccines. *Viruses*. 2015;7(4):1726-1803. DOI 10.3390/v7041726.
- Shchelkunov S.N., Safronov P.F., Totmenin A.V., Petrov N.A., Ryzankina O.I., Gutorov V.V., Kotwal G.J. 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):432-460. DOI 10.1006/viro.1998.9039.
- Shchelkunov S.N., Marennikova S.S., Moyer R.W. Orthopoxviruses Pathogenic for Humans. New York: Springer, 2005.
- Shchelkunov S.N., Yakubitskiy S.N., Sergeev A.A., Kabanov A.S., Bauer T.V., Bulichev L.E., Pyankov S.A. Effect of the route of administration of the vaccinia virus strain LIVP to mice on its virulence and immunogenicity. *Viruses*. 2020;12(8):795. DOI 10.3390/v12080795.
- Shchelkunov S.N., Sergeev A.A., Titova K.A., Pyankov S.A., Starostina E.V., Borgoyakova M.B., Kisakova L.A., Kisakov D.N., Karpenko L.I., Yakubitskiy S.N. Comparison of the effectiveness of transepidermal and intradermal immunization of mice with the vaccinia virus. *Acta Naturae*. 2022;14(4):111-118. DOI 10.32607/actanaturae.11857.
- Shchelkunova G.A., Shchelkunov S.N. Smallpox, monkeypox and other human orthopoxvirus infections. *Viruses*. 2023;15(1):103. DOI 10.3390/v15010103.
- Shmeleva E.V., Gomez de Agüero M., Wagner J., Enright A.J., Macpherson A.J., Ferguson B.J., Smith G.L. Smallpox vaccination induces a substantial increase in commensal skin bacteria that promote pathology and influence the host response. *PLoS Pathog*. 2022; 18(4):e1009854. DOI 10.1371/journal.ppat.1009854.
- Taylor G., Stott E.J., Wertz G., Ball A. Comparison of the virulence of wild-type thymidine kinase (tk)-deficient and tk+ phenotypes of vaccinia virus recombinants after intranasal inoculation of mice. *J. Gen. Virol*. 1991;72(Pt. 1):125-130. DOI 10.1099/0022-1317-72-1-125.
- Tulman E.R., Delhon G., Afonso C.L., Lu Z., Zsak L., Sandybaev N.T., Kerembekova U.Z., Zaitsev V.L., Kutish G.F., Rock D.L. Genome of horsepox virus. *J. Virol*. 2006;80(18):9244-9258. DOI 10.1128/JVI.00945-06.
- Yakubitskiy S.N., Kolosova I.V., Maksyutov R.A., Shchelkunov S.N. Attenuation of vaccinia virus. *Acta Naturae*. 2015;7(4):113-121. DOI 10.32607/20758251-2015-7-4-113-121.

#### ORCID ID

S.N. Shchelkunov orcid.org/0000-0002-6255-9745  
A.A. Sergeev orcid.org/0000-0001-8355-5551

S.A. Pyankov orcid.org/0000-0002-6593-6614  
S.N. Yakubitskiy orcid.org/0000-0002-0496-390X

**Благодарности.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-14-00006-П).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 30.01.2023. После доработки 27.05.2023. Принята к публикации 29.05.2023.