

Е.В.Гаврилова, Р.А.Максютов, С.Н.Щелкунов

ОРТОПОКСВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ: ЭПИДЕМИОЛОГИЯ, КЛИНИКА, ДИАГНОСТИКА (ОБЗОР)

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово, Российская Федерация

Отсутствие у населения иммунитета против патогенных для человека ортопоксвирусных инфекций и участвовавшие случаи поражения человека данными вирусами требует разработки быстрых высокочувствительных методов видоспецифичной диагностики ортопоксвирусов. В обзоре представлена современная эпидемиологическая ситуация по ортопоксвирусным инфекциям человека. Освещены клинические аспекты течения заболеваний, вызванных вирусами натуральной оспы (ВНО), оспы обезьян, оспы коров и осповакцины. Представлен исторический обзор классических методов диагностики данных вирусов. Обобщены достижения в области современных молекулярно-диагностических методов, учитывающих как родоспецифичную, так и видоспецифичную детекцию агентов ортопоксвирусных инфекций человека. Показана актуальность такого типирования в плане возможного появления ВНО-подобного вируса в результате естественной эволюции существующих зоонозных ортопоксвирусов или применения вируса натуральной оспы в качестве агента биотерроризма.

Ключевые слова: вирус натуральной оспы, вирус оспы обезьян, вирус оспы коров, вирус осповакцины, мультиплексный ПЦР, ПЦР в реальном времени, видоспецифичная детекция.

E.V.Gavrilova, R.A.Maksyutov, S.N.Shchelkunov

Orthopoxvirus Infections: Epidemiology, Clinical Picture, and Diagnostics (Scientific Review)

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Kol'tovo, Russian Federation

Lack of immunity among the population against pathogenic orthopoxviruses and an increased number of these infections human cases testify to the need of development of the rapid high-sensitive methods for species-specific orthopoxvirus diagnostics. The review presents current epidemiological situation on human orthopoxvirus infections. Addressed are clinical aspects of the disease, caused by small pox virus (SPV), Monkeypox virus, cowpox virus, and vaccinia virus. Represented is a historical survey of the conventional methods for diagnostics of these particular viruses. Reconsidered are the benefits of researches into the sphere of state-of-the-art molecular-diagnostic techniques taking into view both genus-specific and species-specific detection of agents, causing orthopoxvirus infections in humans. Demonstrated is the urgency of new-generation typing in view of occurrence of a novel SPV-like virus emerged as a result of natural evolution of existing zoonotic orthopoxviruses or SPV application as a biological terroristic agent.

Key words: small pox virus, Monkeypox virus, cowpox virus, vaccinia virus, multiplex PCR, real-time PCR, species-specific detection.

Род *Orthopoxvirus* семейства *Poxviridae* широко известен двумя представителями – вирусом натуральной оспы (ВНО), возбудителем натуральной оспы, одного из наиболее опасных инфекционных заболеваний человека, и вирусом осповакцины (ВОВ), с помощью которого были проведены миллиарды вакцинаций людей и осуществлена всемирная победа над натуральной оспой. В состав рода также входят такие патогенные для человека зоонозные вирусы, как вирус оспы обезьян (ВОО) и вирус оспы коров (ВОК) [43].

В 1980 г. на 33-й Всемирной ассамблее здравоохранения было объявлено о глобальной ликвидации оспы и рекомендовано прекратить вакцинацию против данной инфекции. К настоящему времени население всех стран мира в возрасте до 35 лет не имеет иммунитета ни против оспы, ни против других ортопоксвирусных инфекций. А люди старшего возраста, ранее вакцинированные против оспы, имеют ослабленный иммунитет против данной группы вирусов [16, 36]. С каждым годом человечество становится все менее защищенным от ортопоксвирусных инфекций. Об этом свидетельствуют многочисленные сообщения о случаях поражения человека данными вирусами [3, 8, 10, 11, 18, 28, 33]. Обсуждаются воз-

можности появления ВНО-подобного вируса в результате естественной эволюции существующих зоонозных ортопоксвирусов [41] или применение ВНО в качестве агента биотерроризма [6]. Опыт кампании по ликвидации оспы показывает, что наличие эффективной системы наблюдения за случаями оспы и при поддержке соответствующей инфраструктуры быстрые и тщательные действия по сдерживанию распространения инфекции могут прервать цепь передачи и остановить вспышки оспы в течение относительно короткого времени. Поэтому своевременная и надежная оценка вида возбудителей является начальным и наиболее важным звеном в сложной цепи противоэпидемических и терапевтических мероприятий по борьбе с ортопоксвирусными инфекциями. Этим объясняется особый интерес в настоящее время к поиску быстрых, высокочувствительных и высокоспецифичных методов детекции и идентификации ортопоксвирусов, патогенных для человека.

Традиционные диагностические методы

К традиционным методам экспресс-диагностики ортопоксвирусов относятся: электронная микроско-

пия (ЭМ) содержимого кожных поражений и мазков глотки; обнаружение ортопоксвирусного антигена в обработанных пробах с помощью соответствующей тест-системы иммуноферментного анализа (ИФА); выявление антител к ортопоксвирусам в сыворотке крови в соответствующей тест-системе ИФА. При необходимости установления диагноза в упрощенных (полевых) условиях, отсутствии соответствующих тест-систем ИФА и невозможности исследовать пробу с помощью электронной микроскопии, используют вспомогательные методы – метод флуоресцирующих антител, реакцию микропреципитации в агаре, реакцию торможения гемагглютинации [43].

Что касается электронной микроскопии, несмотря на высокую чувствительность и надежность метода, большинство исследователей отмечают ряд его недостатков. При использовании метода ЭМ отсутствует возможность проводить видовую дифференциацию ортопоксвирусов. Это относится и к серологическим методам, которые позволяют идентифицировать, как правило, только родовую принадлежность вирусов, и их чувствительность не всегда достаточна при анализе клинических образцов.

Выделение возбудителя на куриных эмбрионах или в культуре клеток проводят для подтверждения диагноза, а также всесторонней характеристики клинического образца. Необходимым этапом исследования является изоляция вируса. Время исследования с использованием как той, так и другой системы изоляции составляет от 3 до 6 сут, а предусмотренное при отрицательном результате проведение 2-го пассажа вдвое удлинняет этот срок. Следует особо отметить, что по современным правилам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) работа с живым ВНО разрешена лишь в двух лабораториях мира, аттестованных ВОЗ, – в Сотрудничающих центрах ВОЗ по оспе при ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (Кольцово, Новосибирская область, Россия) и Центрах по контролю и предотвращению заболеваний (Атланта, Джорджия, США).

Совершенствование средств и методов лабораторной диагностики ортопоксвирусных инфекций происходит на основе достижений в молекулярно-биологическом изучении вирусов группы оспы, среди основных тенденций этого процесса необходимо отметить комплекс диагностических методов, основанных на генетическом анализе ортопоксвирусных инфекций. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени, олигонуклеотидные микрочипы, мультиплексная ПЦР представляют собой последние диагностические разработки для клинической лаборатории.

Применение молекулярно-диагностических методов в видоспецифичной детекции ортопоксвирусов

Вирус оспы коров. Оспа коров у человека – зоонозное заболевание, основное количество случа-

ев которого регистрируется в странах Европы [46]. Природным резервуаром вируса оспы коров (ВОК) являются грызуны [22]. Передача вируса человеку происходит при прямом контакте с инфицированным животным, это могут быть как грызуны [12], так и животные, контактирующие с грызунами: кошки, собаки и другие. В большинстве случаев заболевание у человека протекает доброкачественно и характеризуется развитием местных поражений, чаще всего на кистях, предплечьях, лице и реже других частях тела. Течение инфекционного процесса сопровождается ухудшением самочувствия, повышением температуры. Иногда происходит генерализация процесса [12, 19, 46].

За последние годы в странах Европы отмечается увеличение числа зарегистрированных случаев заболевания людей оспой коров [46]. В декабре 2008–январе 2009 гг. во Франции и Германии наблюдалась беспрецедентная вспышка оспы коров у людей [8, 28], обусловленная передачей ВОК от инфицированных домашних крыс. Это указывает на необходимость специальных усилий по подготовке медицинского персонала, разработке современных средств быстрой диагностики этиологического агента данного заболевания, поиску противовирусных препаратов, специфичных против ортопоксвирусов.

На сегодняшний день для диагностики ВОК используют серологические [29] и биологические методы [5]. Видовую идентификацию ВОК можно осуществить с помощью метода ПЦР в реальном времени [17]. Метод, основанный на TaqMan ПЦР в реальном времени, впервые позволил специфически детектировать ВОК. Метод адаптирован к 3 различным диагностическим приборам (Real-Time PCR System 7500 (Applied Biosystems, USA), iQ 5 (BioRad, USA) и Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Australia). Для диагностики ВОК также используют секвенирование [9].

Вирус осповакцины. Вирус осповакцины (ВОВ) является прототипным видом рода Orthopoxvirus. Он наиболее хорошо изучен среди всех представителей этого рода. Свое название получил от variola vaccinae (от латинского слова vacca – корова) [43]. Споры о природном резервуаре ВОВ до сих пор продолжают. По последним данным вспышек заболевания людей, обусловленных ВОВ-подобным вирусом в Индии и Бразилии, природным резервуаром этого вируса являются грызуны, которые могут быть вовлечены в его распространение и трансмиссию в природе [23]. Передача вируса человеку происходит при прямом контакте с инфицированным животным. В большинстве случаев образуются характерные высыпания, чаще локализованные на руках, иногда на ногах и лице. Заболевание у человека протекает доброкачественно, в некоторых случаях у больных отмечаются такие симптомы, как повышенная температура, головные боли, редко лимфаденопатия [45]. В настоящее время зарегистрированы несколько сообщений о вспышках заболеваний людей, вызван-

ных зоонозными ВОВ-подобными вирусами [3, 18] в разных странах. Так как грызуны ассоциированы с трансмиссией ВОВ в природе, необходим контроль распространения заболевания человека, обусловленного этим вирусом. Одним из способов эпидемиологического надзора является лабораторная диагностика. Наравне с классическими методами [47], в настоящее время разработаны специфические методы для идентификации ВОВ на основе LightCycler ПЦР в реальном времени и с применением ДНК-интеркалирующих красителей [31, 45].

Вирус оспы обезьян. Оспа обезьян – зоонозная инфекция, циркулирующая среди различных видов дикоживущих грызунов и приматов, обитающих преимущественно в зоне влажных тропических лесов Центральной и Западной Африки. Инфекционным агентом является вирус оспы обезьян (ВОО). К настоящему времени имеются свидетельства, подтверждающие, что несколько видов млекопитающих играют важную роль в циркуляции ВОО и являются источником первичного заражения вследствие прямого контакта с ними человека [35]. Источником заражения оспой обезьян может явиться и больной этой инфекцией человек [43].

С момента открытия оспы обезьян у человека случаи этого заболевания у людей регулярно регистрировали в Африке [7, 11, 26]. В 2003 г. вспышка оспы обезьян у людей была впервые зафиксирована вне африканского континента – в США [10]. Данная инфекция была завезена в США с больными животными из Западной Африки, используемыми в качестве домашних питомцев. Клинические признаки оспы обезьян у людей сходны с таковыми натуральной оспы, преобладавшей на Африканском континенте: головная боль, слабость, боли в мышцах, характерная сыпь. Инкубационный период длится 10–14 дней. Отличительной особенностью от натуральной оспы являются лимфадениты, которые наблюдаются у более 85 % заболевших. Летальность при оспе обезьян у людей, установленная по результатам изучения 300 случаев в ходе специального проекта ВОЗ (1981–1986), составила 9,8 % [43].

ВОО, являясь зоонозом, широко представлен в природе, что является угрозой для человека во время вероятного контакта с африканскими животными. Смертельные случаи от заболевания оспой обезьян были зарегистрированы в странах Центральной Африки [7, 43]. Ранее считалось, что оспа обезьян с гораздо меньшей эффективностью передается от человека к человеку, чем натуральная оспа. Однако постепенное накопление данных приводит к необходимости пересмотреть представления об оспе обезьян как о малокоонтагиозной инфекции человека. Так, во время вспышки оспы обезьян в провинции Восточный Касаи количество заболевших в результате передачи инфекции от человека к человеку составило 73 % [20]. При этом число генераций в цепи передачи инфекций от человека к человеку достигало 8. Основной особенностью вспышки оспы обезьян в

Конго в 2003 г. также являлась передача инфекции от человека к человеку, с наличием, как предполагают, 7 генераций [26, 27]. Все это говорит об обострении эпидемической ситуации по оспе обезьян не только для стран Африки, но и, как показала вспышка оспы обезьян в США в 2003 г., для всего мира.

Для диагностики ВОО используют классические методы [43]. Для специфической диагностики ВОО D.A.Kulesh и соавт. [25] предложили метод на основе ПЦР в реальном времени (TaqMan с малобороздочным ДНК-лигандом, на основе последовательности генов F3L и N3R), который был испытан на образцах, полученных от 52 грызунов во время вспышки оспы обезьян в США в 2003 г. M.Saijo и соавт. [38] для обнаружения ДНК ВОО предложили альтернативный метод LightCycler ПЦР на основе последовательности гена A26L. Для обоих методов показана 100 % специфичность.

Вирус натуральной оспы. Вирус натуральной оспы (ВНО) является строгим антропонозом. По общепринятой классификации штаммы ВНО разделяют на два эпидемиологических типа: вирусы большой оспы (*variola major*) с летальностью во время вспышки заболевания натуральной оспы от 5 до 40 % и вирусы малой оспы (*variola minor*) с меньшей летальностью. Малую оспу в Южной Америке принято называть *alastrim* в отличие от Африки, где за ней сохранилось наименование *variola minor* [43].

Клинические проявления большой оспы многообразны. Всего различают пять клинических форм натуральной оспы: дискретная, сливная, геморрагическая, вариолоид и натуральная оспа без сыпи [2]. Такое разнообразие форм течения натуральной оспы, полагают, связано с состоянием иммунитета человека в момент заражения. Инкубационный период у большинства больных равен 7–9 дням. Далее наступает продромальный период (до появления температуры), который, как правило, сохраняется 1–3 дня и сопровождается головной болью, слабостью, бессонницей, тошнотой, болями в мышцах и суставах. Далее следует лихорадочный период. На 3–4-е сутки от начала лихорадки появляются папулезные высыпания (истинная сыпь – основное клиническое проявление оспы), которые проходят стадию папулы, везикулы, пустулы и стадию образования корок.

Оспа относится к высококоонтагиозным болезням. Для *variola major* инфекционность в среднем составляла для восприимчивых лиц при тесном контакте 58,4 % [43]. По материалам программы ликвидации оспы установлено, что в среднем один больной заражал пять человек, хотя нередко эта цифра могла быть значительно больше. Вакцинация против оспы резко снижает восприимчивость к инфекции. В этом случае заразительность уменьшается до 3,8 %.

Клиническая диагностика оспы при типичных формах: дискретной, сливной, геморрагической с наличием сыпи ставится при динамическом наблюдении за больным и процессе развития сыпи. Крайне затруднен диагноз при вариолоиде и оспе без сыпи [2].

Ранее, вариолоид часто принимался за ветряную оспу, aspe vulgaris, импетиго, и другие инфекционные заболевания. К этому добавляется и то обстоятельство, что современное поколение врачей-инфекционистов не встречалось с оспой и знает о ней лишь из учебников и руководств. Все это может привести к тому, что в результате неправильно установленного первоначального диагноза своевременно не будет принят необходимый комплекс противоэпидемических мероприятий, и инфекция начнет свободно распространяться. В связи с этим особое значение приобретают методы лабораторной диагностики, позволяющие дать быстрый ответ вне зависимости от клинического опыта врача.

Широкое развитие лабораторных методов обнаружения ВНО обусловлено программой по глобальной ликвидации натуральной оспы, а в последние годы – опасностью биотеррористических атак с использованием ВНО. На современном этапе проводят вирусоскопическое (ЭМ), вирусологическое, серологическое (микропреципитация в агаре, ИФА)

[43] и молекулярно-диагностическое исследование биологических образцов. Среди молекулярно-диагностических следует отметить высокочувствительные методы, основанные на ПЦР в реальном времени, которые в настоящее время получили широкое развитие. Опубликованные данные о новых разработанных методах идентификации ВНО на основе ПЦР в реальном времени обобщены в таблице.

Диагностика ортопоксвирусных инфекций человека на основе мультиплексного ПЦР

Факт наличия четырех видов патогенных для человека ортопоксвирусов (ВНО, ВОО, ВОК, ВОВ), имеющих различную патогенность и эпидемиологическую значимость, указывает на целесообразность применения методов, позволяющих одновременно обнаружить и охарактеризовать видовую принадлежность вируса. Описанные выше методы позволяют детектировать и дифференцировать только один из патогенных для человека ортопоксвирусов. Проблема

Генодиагностика ВНО при использовании ПЦР в реальном времени

Метод	Ген-мишень*	Чувствительность/ Специфичность	Примечание	Ссылки
TaqMan	A56R	96,1–99,5 %/ 95,7–98,3 %	Позволяет детектировать ДНК ВНО. Специфичность и чувствительность были проанализированы на ДНК 73 изолятов различных вирусов, в том числе 48 различных изолятов ВНО	[20]
TaqMan MGB	A56R	96 %/98 %	Позволяет детектировать ДНК всех ортопоксвирусов и одновременно дифференцировать ДНК ВНО за счет одновременного использования двух специфичных флуоресцентных проб. Метод адаптирован с использованием лиофилизованных реагентов смеси	[4]
TaqMan MGB	A56R	75,0–93,8 %/ 100 %	Позволяет детектировать ДНК ВНО. Специфичность и чувствительность были проанализированы на ДНК панелей: USAMRIID и CDC blind panel	[23]
LightCycler	A56R	N/A / N/A	Позволяет детектировать и дифференцировать ДНК ортопоксвирусов. Недостаток – разработанные флуоресцентные пробы к ВНО имеют идентичную нуклеотидную последовательность с ДНК некоторых штаммов ВОК, что может привести к ошибочному выявлению вирусного агента	[32]
LightCycler	A56R	N/A/ N/A	Позволяет детектировать ДНК всех ортопоксвирусов и одновременно дифференцировать ДНК ВНО по уникальной температуре плавления (Tm, 62,45 °С) относительно других ортопоксвирусов (Tm, 56,24–56,72 °С). Недостаток – разработанные флуоресцентные пробы к ВНО имеют идентичную нуклеотидную последовательность с ДНК некоторых штаммов ВОК и ВОВr, что может привести к ошибочному выявлению вирусного агента. Также отсутствие апробации методики на полноразмерной ДНК вируса натуральной оспы	[13]
LightCycler	A56R	N/A / N/A	Позволяет детектировать ДНК всех ортопоксвирусов и одновременно дифференцировать ДНК ВНО по уникальной температуре плавления (Tm, 56 °С) относительно других ортопоксвирусов (Tm, 58–59 °С). Недостаток – отсутствие апробации методики на полноразмерной ДНК вируса натуральной оспы	[33]
TaqMan	A27L	N/A /100 %	Позволяет детектировать ДНК всех ортопоксвирусов и одновременно дифференцировать ДНК ВНО за счет одновременного использования двух специфичных флуоресцентных проб. Специфичность была проанализирована на ДНК 85 штаммов различных ортопоксвирусов. Метод адаптирован к 4-м различным диагностическим приборам	[38]
LightCycler	A27L	N/A /100 %	Позволяет детектировать ДНК всех ортопоксвирусов и одновременно дифференцировать ДНК ВНО по уникальной температуре плавления (Tm, 55,9–57,8 °С) относительно других ортопоксвирусов (Tm, 61,3–65,0 °С). Были проанализированы 120 штаммов различных ортопоксвирусов, включая 46 штаммов вируса натуральной оспы. Специфичность определена на 31500 образцов крови здоровых доноров. На основе метода разработан коммерческий набор RealArt Orthorox LC PCR kit (Artus GmbH) для лабораторных исследований	[31, 39]
TaqMan	C22L/B28R	N/A / N/A	Позволяет детектировать ДНК всех ортопоксвирусов и одновременно дифференцировать ДНК ВНО	[14]
LightCycler	1. D7R 2. A8L 3. A13L	N/A / N/A	Позволяет детектировать ДНК всех ортопоксвирусов и одновременно дифференцировать ДНК ВНО по уникальной температуре плавления (Tm, 62–64 °С) относительно других ортопоксвирусов (Tm, 44–59 °С). В основе метода лежит одновременное использование набора флуоресцентных проб, рассчитанных к трем районам ДНК ВНО, что позволяет избежать ложноположительных результатов на ДНК ВНО	[29]

*ОПТ ВОВ штамм Copenhagen; N/A – не определена.

одновременной видовой идентификации решается посредством таких диагностических подходов, как гибридизация молекул ДНК на олигонуклеотидных микрочипах, применение мультиплексного формата классической ПЦР или ПЦР в реальном времени.

Один из последних разработанных методов на основе олигонуклеотидных микрочипов позволяет одновременно детектировать и идентифицировать ДНК шести видов ортопоксвирусов (ВНО, ВОО, ВОК, ВОВ, ВОВр и ВЭ). В данной работе [37] были рассчитаны олигонуклеотидные зонды к генам С23L/В29R и В19R ортопоксвирусов для видоспецифичной диагностики, а также для увеличения специфичности метода к генам ОРТ31 вируса ветряной оспы, US4 и US5 вирусов простого герпеса 1-го и 2-го типов, соответственно. В других работах также были предложены способы, позволяющие детектировать и дифференцировать ДНК ортопоксвирусов, патогенных для человека с помощью олигонуклеотидных микрочипов с высокой чувствительностью и специфичностью [15]. Однако к настоящему моменту нет ни одного коммерчески доступного диагностического набора для обнаружения ДНК ортопоксвирусов на основе методики микрочипов.

Мультиплексная полимеразная цепная реакция – вариант ПЦР, в которой в реакционной смеси одновременно присутствует смесь нескольких пар праймеров, специфичных в отношении разных генетических локусов, что позволяет проводить одновременную амплификацию соответствующих участков ДНК-матриц. Идея амплифицировать в одной пробирке сразу несколько различных генетических локусов привела к разработке в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» одностадийного экспресс-метода идентификации четырех видов ортопоксвирусов, патогенных для человека, на основе мультиплексной ПЦР (МПЦР) с последующим электрофоретическим анализом продуктов реакции [1, 42]. Специфичность разработанного метода МПЦР оценили на панели образцов ДНК 59 штаммов ортопоксвирусов, включая архивный клинический материал (корочки кожных поражений), полученный от людей, болевших в 1970–1975 гг. натуральной оспой или оспой обезьян (коллекция ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»). Специфичность составила 100 %.

Результаты выполненной работы представляют значительный практический интерес. Данный подход лег в основу набора реагентов «ВЕКТОР-МПЦР-ОСПА» на которое получено регистрационное удостоверение № ФСР 2010/09002 и разрешение к производству, продаже и применению на территории Российской Федерации.

На основе ПЦР в реальном времени в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» также разработан метод мультиплексной TaqMan ПЦР в реальном времени (MuRT-PCR) для специфического выявления и дифференциации в одной реакции ДНК патогенных для человека ВНО, ВОО, ВОК, ВОВ [44]. Для проведения MuRT-PCR-анализа ортопоксвирусов ДНК использовали одновременно четыре пары видоспецифичных олигонуклеотидных

праймеров и четыре гибридизационные олигонуклеотидные пробы с различными флуоресцентными красителями и соответствующими тушителями флуоресценции. Специфичность и чувствительность разработанного метода оценена при анализе ДНК 29 штаммов ортопоксвирусов, включая архивный клинический материал, полученный от людей, больных оспой, а также при анализе ДНК экспериментального материала, выделенной от мышей, зараженных ВОК и сурков, зараженных ВОО. Специфичность составила 100 %. Данная процедура позволяет с большей чувствительностью и в более короткое время по сравнению с ранее разработанным методом МПЦР осуществлять видоспецифичную генодиагностику ортопоксвирусов, патогенных для человека.

Таким образом, существование связанных с грызунами природных очагов таких патогенных для человека ортопоксвирусов, как ВОО и ВОК в пределах экваториального, тропического, субтропического, умеренного климатических поясов [43]; многочисленные сообщения о случаях поражения человека данными вирусами в последнее время; отсутствие у населения поствакцинального иммунитета и в связи с этим возрастающая угроза биотерроризма – все это создает риск обострения эпидемической ситуации по ортопоксвирусным инфекциям с возможными катастрофическими последствиями. В связи с этим разработка быстрых высокочувствительных методов видоспецифичной диагностики ортопоксвирусов становится все более актуальной.

Развитие молекулярно-диагностических методов открывает новые возможности в лабораторной диагностике ортопоксвирусных инфекций. Рассмотренные в данном обзоре современные генетические методы обладают рядом преимуществ, в частности, высокой специфичностью и чувствительностью. Возможность проводить анализ в формате мультиплекс обеспечивает быстрое получение результата и возможность работы с большим количеством образцов. Однако крайне высокая чувствительность может привести к ложноположительным результатам, а положительный результат, играет важную роль в случае принятия экстренных мер. В связи с этим на современном этапе развития лабораторной диагностики ортопоксвирусных инфекций человека очевидна необходимость комплексного подхода, который заключается в использовании различных лабораторных методов, как классических (выделение вируса на ХАО, ИФА, ЭМ), так и современных (методы на основе ПЦР, секвенирование). Это значительно повысит надежность получаемых результатов по видовой идентификации ортопоксвирусов.

Исследование выполнено при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, соглашения № 8152, № 8536 и № 8802.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гаврилова Е.В., Бабкин И.В., Щелкунов С.Н. Мультиплексный ПЦР-анализ для видоспецифичной экспресс-идентификации ортопоксвирусов. *Мол. генет. микробиол. и ви-*

русол. 2003; 1:45–52.

2. Методические рекомендации. Натуральная оспа (клиника, лечение, иммунопрофилактика). М.: ФМБА; 2006. 60 с.

3. Abrahao J.S., Guedes M.I.M., Trindade G.S., Fonseca F.G., Campos R.K., Mota B.F., Lobato Z.I., Silva-Fernandes A.T., Rodrigues G.O., Lima L.S., Ferreira P.C., Bonjardim C.A., Kroon E.G. One more piece in the VACV ecological puzzle: could peridomestic rodents be the link between wildlife and bovine vaccinia outbreaks in Brazil? *PLoS ONE*. 2009; 4:e7428.

4. Aitichou M., Saleh S., Kyusung P., Huggins J., O'Guinn M., Jahrling P., Ibrahim S. Dual-probe real-time PCR assay for detection of variola or other orthopoxviruses with dried reagents. *J. Virol. Methods*. 2008; 153(2):190–5.

5. Bonnekoh B., Falk K., Reckling K., Kenkies S., Nitsche A., Ghebremedhin B., Pokrywka A., Franke I., Thriene B., König W., Pauli G., Gollnick H. Cowpox infection transmitted from a domestic cat. *J. Dtsch Dermatol. Ges*. 2008; 6:210–3.

6. Bray M., Buller M. Looking back at smallpox. *Clin. Infect. Dis*. 2004; 38:882–9.

7. Breman J.G. Monkeypox: an emerging infection for humans? In: Scheld W.M., Craig W.A., Hughes J.M., editors. *Emerging infections 4*. Washington: ASM Press; 2000. P. 45–67.

8. Campe H., Zimmermann P., Glos K., Bayer M., Bergemann H., Dreweck C., Graf P., Weber B.K., Meyer H., Büttner M., Busch U., Sing A. Cowpox virus transmission from pet rats to humans, Germany. *Emerg. Infect. Dis*. 2009; 15:777–80.

9. Carletti F., Bordini L., Castilletti C., Di Caro A., Falasca L., Gioia C., Ippolito G., Zaniratti S., Beltrame A., Viale P., Capobianchi M.R. Cat-to-human orthopoxvirus transmission northeastern Italy. *Emerg. Infect. Dis*. 2009; 15:499–500.

10. CDC. Update: multistate outbreak of monkeypox in Illinois, Kansas, Missouri, Ohio, and Wisconsin, 2003. *MMWR Morb. Mortal Wkly Rep*. 2003; 52:642–6.

11. Damon I.K., Roth C.E., Chowdhary V. Discovery of monkeypox in Sudan. *N. J. Engl. Med*. 2006; 355(9):962–3.

12. Elsendoorn A., Agius G., Le Moal G., Aajaji F., Favier A.L., Wierzbicka-Hainault E., Béraud G., Flusin O., Crance J.M., Roblot F. Severe ear chondritis due to cowpox virus transmitted by a pet rat. *J. Infect*. 2011; 63(5):391–3.

13. Espy M.J., Cockerill F.R., Meyer R.F., Bowen M.D., Poland G.A., Hadfield T.L., Smith T.F. Detection of smallpox virus DNA by LightCycler PCR. *J. Clin. Microbiol*. 2002; 40(6):1985–8.

14. Fedele C.G., Negrolo A., Molero F., Sanchez-Seco M.P., Tenorio A. Use of Internally Controlled Real-Time Genome Amplification for Detection of Variola Virus and Other Orthopoxviruses Infecting Humans. *J. Clin. Microbiol*. 2006; 44(12):4464–70.

15. Fitzgibbon J.E., Sagripanti J.L. Simultaneous identification of orthopoxviruses and alphaviruses by oligonucleotide macroarray with special emphasis on detection of variola and Venezuelan equine encephalitis viruses. *J. Virol. Methods*. 2006; 131(2):160–7.

16. Gallwitz S., Schutzbank T., Heberling R.L., Katler S.S., Galpin J.E. Smallpox: residual antibody after vaccination. *J. Clin. Microbiol*. 2003; 41:4068–70.

17. Gavrilova E.V., Shcherbakov D.N., Maksyutov R.A., Shchelkunov S.N. Development of Real-Time PCR Assay for Detection of Cowpox Virus. *J. Clin. Virol*. 2010; 49(1):37–40.

18. Gurav Y.K., Raut C.G., Yadav P.D., Tandale B.V., Sivaram A., Pore M.D., Basu A., Mourya D.T., Mishra A.C. Buffalo pox outbreak in humans and animals in Western Maharashtra, India. *Prev. Vet. Med*. 2011; 100(3–4):242–7.

19. Honlinger B., Huemer H.P., Romani N., Czerny C.P., Eisendel K., Hopel R. Generalized cowpox infection probably transmitted from a rat. *Br. J. Dermatol*. 2005; 153:451–3.

20. Human monkeypox in Kasai Oriental, Zaire (1996–1997). *Wkly Epidemiol. Rec*. 1997; 72(15):101–4.

21. Ibrahim M.S., Kulesh D.A., Saleh S.S., Damon I.K., Esposito J.J., Schmaljohn A.L., Jahrling P.B. Real-time PCR assay to detect smallpox virus. *J. Clin. Microbiol*. 2003; 41(8):3835–39.

22. Kinnunen P.M., Henttonen H., Hoffmann B., Kallio E.R., Korthase C., Laakkonen J., Niemimaa J., Palva A., Schlegel M., Ali H.S., Suominen P., Ulrich R.G., Vaheri A., Vapalahti O. Orthopox virus infections in Eurasian wild rodents. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2011; 11(8):1133–40.

23. Kroon E.G., Mota B.E., Abrahão J.S., Fonseca F.G., Trindade G.D. Zoonotic Brazilian Vaccinia virus: From field to therapy. *Antiviral Res*. 2011; 92(2):150–63.

24. Kulesh D.A., Baker R.O., Loveless B.M., Norwood D., Zwiers S.H., Mucker E., Hartmann C., Herrera R., Miller D., Christensen D., Wasieleski L.P.Jr., Huggins J., Jahrling P.B. Smallpox and pan-orthopox virus detection by real-time 3'-minor groove binder TaqMan assays on the Roche LightCycler and the Cepheid Smart Cycler platforms. *J. Clin. Microbiol*. 2004; 42(2):601–9.

25. Kulesh D.A., Loveless B.M., Norwood D., Garrison J., Whitehouse C.A., Hartmann C., Mucker E., Miller D., Wasieleski L.P.Jr., Huggins J., Huhn G., Miser L.L., Imig C., Martinez M., Larsen T., Rossi C.A., Ludwig G.V. Monkeypox virus detection in rodents using real-time 3'-minor groove binder TaqMan assays on the

Roche LightCycler. *Lab. Invest*. 2004; 84(9):1200–8.

26. Learned L.A., Reynolds M.G., Wassa D.W., Li Y., Olson V.A., Karem K., Stempora L.L., Braden Z.H., Kline R., Likos A., Libama F., Moudzeo H., Bolanda J.D., Tarangonia P., Boumandoki P., Formenty P., Harvey J.M., Damon I.K. Extended interhuman transmission of monkeypox in a hospital community in the republic of the Congo, 2003. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 2005; 73(2):428–34.

27. Mukinda V.B.K., Mwema G., Kilundu M., Heymann D.L., Khan A.S., Esposito J.J. Re-emergence of human monkeypox in Zaire in 1996. Monkeypox Epidemiologic Working Group. *Lancet*. 1997; 349:1449–50.

28. Ninove L., Domart Y., Vervel C., Voinot C., Salez N., Raoult D. Cowpox virus transmission from pet rats to humans, France. *Emerg. Infect. Dis*. 2009; 15:781–4.

29. Nitsche A., Kurth A., Pauli G. Viremia in human Cowpox virus infection. *J. Clin. Virol*. 2007; 40:160–2.

30. Nitsche A., Ellerbrok H., Pauli G. Detection of orthopoxvirus DNA by real-time PCR and identification of variola virus DNA by melting analysis. *J. Clin. Microbiol*. 2004; 42(3):1207–13.

31. Nitsche A., Steger B., Ellerbrok H., Pauli G. Detection of vaccinia virus DNA on the LightCycler by fluorescence melting curve analysis. *J. Virol. Methods*. 2005; 126:187–95.

32. Olson V.A., Laue T., Laker M.T., Babkin I.V., Drosten C., Shchelkunov S.N., Niedrig M., Damon I.K., Meyer H. Real-time PCR system for detection of orthopoxviruses and simultaneous identification of smallpox virus. *J. Clin. Microbiol*. 2004; 42(5):1940–46.

33. Panning M., Asper M., Kramme S., Schmitz H., Drosten C. Rapid detection and differentiation of human pathogenic orthopoxviruses by a fluorescence resonance energy transfer real-time PCR assay. *Clin. Chem*. 2004; 50(4):702–8.

34. Putkuri N., Piiparinen H., Vaheri A., Vapalahti O. Detection of human orthopoxviruses infections and differentiation of smallpox virus with real-time PCR. *J. Med. Virol*. 2009; 81:146–52.

35. Reynolds M.G., Carroll D.S., Olson V.A., Hughes C., Galley J., Likos A., Montgomery J.M., Suu-Ire R., Kwasi M.O., Jeffrey Root J., Braden Z., Abel J., Clemmons C., Regnery R., Karem K., Damon I.K. A Silent Zoonotic of an Orthopoxvirus in Ghana, West Africa: Evidence for Multi-Species. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 2010; 82(4):746–54.

36. Rimoin A.W., Mulembakani P.M., Johnston S.C., Lloyd Smith J.O., Kivalu N.K., Kinkela T.L., Blumberg S., Thomassen H.A., Pike B.L., Fair J.N., Wolfe N.D., Shongo R.L., Graham B.S., Formenty P., Okitolonda E., Hensley L.E., Meyer H., Wright L.L., Muyembe J.J. Major increase in human monkeypox incidence 30 years after smallpox vaccination campaigns cease in the Democratic Republic of Congo. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2010; 107:16262–7.

37. Ryabinin V.A., Shundrin L.A., Kostina E.B., Laassri M., Chizhikov V., Shchelkunov S.N., Chumakov K., Sinyakov A.N. Microarray assay for detection and discrimination of Orthopoxvirus species. *J. Med. Virol*. 2006; 78(10):1325–40.

38. Saijo M., Ami Y., Suzuki Yuriko., Nagata N., Iwata N., Hasegawa H., Ogata M., Fukushi S., Mizutani T., Iizuka I., Sakai K., Sata T., Kurata T., Kurane I., Morikawa S. Diagnosis and assessment of monkeypox virus (MPXV) infection by quantitative PCR assay: differentiation of congo basin and west African MPXV strains. *Jpn. J. Infect. Dis*. 2008; 61:140–2.

39. Scaramozzino N., Ferrier-Rembert A., Favier A., Rothlisberger C., Richard S., Crance J., Meyer H., Garin D. Real-time PCR to identify variola virus or other human pathogenic orthopoxviruses. *Clin. Chem*. 2007; 53(4):606–13.

40. Schmidt M., Roth K.W., Meyer H., Seifried E., Hourfar M.K. Nucleic acid test screening of blood donors for orthopoxviruses can potentially prevent dispersion of viral agents in case of bioterrorism. *Transfusion*. 2005; 45:399–403.

41. Shchelkunov S.N. How long ago did smallpox virus emerge? *Arch. Virol*. 2009; 154:1865–71.

42. Shchelkunov S.N., Gavrilova E.V., Babkin I.V. Multiplex PCR detection and species differentiation of orthopoxviruses pathogenic to humans. *Mol. Cell. Probes*. 2005; 19:1–8.

43. Shchelkunov S.N., Marennikova S.S., Moyer R.W. Orthopoxviruses pathogenic for humans. New York: Springer; 2005. 425 p.

44. Shchelkunov S.N., Shcherbakov D.N., Maksyutov R.A., Gavrilova E.V. Species-specific identification of variola, monkeypox, cowpox, and vaccinia viruses by multiplex real-time PCR assay. *J. Virol. Methods*. 2011; 175(2):163–9.

45. Trindade G.H., Li Y., Olson V.A., Emerson G., Regnery R.L., Fonseca F.G., Kroon E.G., Damon I. Real-time PCR assay to identify variants of Vaccinia virus: implications for the diagnosis of bovine vaccinia in Brazil. *J. Virol. Methods*. 2008; 152:63–71.

46. Vorou R.M., Papavassiliou V.G., Pierroutsakos I.N. Cowpox virus infection: an emerging health threat. *Curr. Opin. Infect. Dis*. 2008; 21:153–6.

47. Zafar A., Swanepoel R., Hewson R., Nizam M., Ahmed A., Husain A., Grobbelaar A., Bewley K., Mioulet V., Dowsett B., Easterbrook L., Hasan R. Nosocomial buffalopoxvirus infection, Karachi, Pakistan. *Emerg. Infect. Dis*. 2007; 13:902–4.

References

- Gavrilova E.V., Babkin I.V., Shchelkunov S.N. [Multiplex-PCR assay for species-specific express identification of orthopoxviruses]. *Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol.* 2003; 1:45–52.
- [Smallpox virus (clinical picture, treatment and immune-prophylaxis)]. *Methodological Recommendations (MR)*. M.: FMBA; 2006. 60 p.
- Abraham J.S., Guedes M.I.M., Trindade G.S., Fonseca F.G., Campos R.K., Mota B.F., Lobato Z.I., Silva-Fernandes A.T., Rodrigues G.O., Lima L.S., Ferreira P.C., Bonjardim C.A., Kroon E.G. One more piece in the VACV ecological puzzle: could peridomestic rodents be the link between wildlife and bovine vaccinia outbreaks in Brazil? *PLoS ONE*. 2009; 4:e7428.
- Aitichou M., Saleh S., Kyusung P., Huggins J., O'Guinn M., Jahrling P., Ibrahim S. Dual-probe real-time PCR assay for detection of variola or other orthopoxviruses with dried reagents. *J. Virol. Methods*. 2008; 153(2):190–5.
- Bonnekoh B., Falk K., Reckling K., Kenkies S., Nitsche A., Ghebremedhin B., Pokrywka A., Franke I., Thriene B., König W., Pauli G., Gollnick H. Cowpox infection transmitted from a domestic cat. *J. Dtsch Dermatol. Ges.* 2008; 6:210–3.
- Bray M., Buller M. Looking back at smallpox. *Clin. Infect. Dis.* 2004; 38:882–9.
- Breman J.G. Monkeypox: an emerging infection for humans? In: Scheld W.M., Craig W.A., Hughes J.M., editors. *Emerging infections 4*. Washington: ASM Press; 2000. P. 45–67.
- Campe H., Zimmermann P., Glos K., Bayer M., Bergemann H., Dreweck C., Graf P., Weber B.K., Meyer H., Büttner M., Busch U., Sing A. Cowpox virus transmission from pet rats to humans, Germany. *Emerg. Infect. Dis.* 2009; 15:777–80.
- Carletti F., Bordini L., Castilietti C., Di Caro A., Falasca L., Gioia C., Ippolito G., Zaniratti S., Beltrame A., Viale P., Capobianchi M.R. Cat-to-human orthopoxvirus transmission northeastern Italy. *Emerg. Infect. Dis.* 2009; 15:499–500.
- CDC. Update: multistate outbreak of monkeypox in Illinois, Kansas, Missouri, Ohio, and Wisconsin, 2003. *MMWR Morb. Mortal Wkly Rep.* 2003; 52:642–6.
- Damon I.K., Roth C.E., Chowdhary V. Discovery of monkeypox in Sudan. *N. J. Engl. Med.* 2006; 355(9):962–3.
- Elsendoorn A., Agius G., Le Moal G., Aajaji F., Favier AL., Wierzbicka-Hainault E., Béraud G., Flusin O., Crance J.M., Roblot F. Severe ear chondritis due to cowpox virus transmitted by a pet rat. *J. Infect.* 2011; 63(5):391–3.
- Espy M.J., Cockerill F.R., Meyer R.F., Bowen M.D., Poland G.A., Hadfield T.L., Smith T.F. Detection of smallpox virus DNA by LightCycler PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(6):1985–8.
- Fedele C.G., Negro A., Molero F., Sanchez-Seco M.P., Tenorio A. Use of Internally Controlled Real-Time Genome Amplification for Detection of Variola Virus and Other Orthopoxviruses Infecting Humans. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44(12):4464–70.
- Fitzgibbon J.E., Sagripanti J.L. Simultaneous identification of orthopoxviruses and alphaviruses by oligonucleotide macroarray with special emphasis on detection of variola and Venezuelan equine encephalitis viruses. *J. Virol. Methods*. 2006; 131(2):160–7.
- Gallwitz S., Schutzbank T., Heberling R.L., Katler S.S., Galpin J.E. Smallpox: residual antibody after vaccination. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41:4068–70.
- Gavrilova E.V., Shcherbakov D.N., Maksyutov R.A., Shchelkunov S.N. Development of Real-Time PCR Assay for Detection of Cowpox Virus. *J. Clin. Virol.* 2010; 49(1):37–40.
- Guiray Y.K., Raut C.G., Yadav P.D., Tandale B.V., Sivaram A., Pore M.D., Basu A., Mourya D.T., Mishra A.C. Buffalopox outbreak in humans and animals in Western Maharashtra, India. *Prev. Vet. Med.* 2011; 100(3–4):242–7.
- Honlinger B., Huemer H.P., Romani N., Czerny C.P., Eisendel K., Hopel R. Generalized cowpox infection probably transmitted from a rat. *Br. J. Dermatol.* 2005; 153:451–3.
- Human monkeypox in Kasai Oriental, Zaire (1996–1997). *Wkly Epidemiol. Rec.* 1997; 72(15):101–4.
- Ibrahim M.S., Kulesh D.A., Saleh S.S., Damon I.K., Esposito J.J., Schmaljohn A.L., Jahrling P.B. Real-time PCR assay to detect smallpox virus. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41(8):3835–39.
- Kinnunen P.M., Henttonen H., Hoffmann B., Kallio E.R., Korthase C., Laakkonen J., Niemimaa J., Palva A., Schlegel M., Ali H.S., Suominen P., Ulrich R.G., Vaheri A., Vapalahti O. Orthopox virus infections in Eurasian wild rodents. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2011; 11(8):1133–40.
- Kroon E.G., Mota B.E., Abraham J.S., Fonseca F.G., Trindade G.D. Zoonotic Brazilian Vaccinia virus: From field to therapy. *Antiviral Res.* 2011; 92(2):150–63.
- Kulesh D.A., Baker R.O., Loveless B.M., Norwood D., Zwiers S.H., Mucker E., Hartmann C., Herrera R., Miller D., Christensen D., Wasieleski L.P.Jr., Huggins J., Jahrling P.B. Smallpox and pan-orthopox virus detection by real-time 3'-minor groove binder TaqMan assays on the Roche LightCycler and the Cepheid Smart Cycler platforms. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(2):601–9.
- Kulesh D.A., Loveless B.M., Norwood D., Garrison J., Whitehouse C.A., Hartmann C., Mucker E., Miller D., Wasieleski L.P.Jr., Huggins J., Huhn G., Miser L.L., Imig C., Martinez M., Larsen T., Rossi C.A., Ludwig G.V. Monkeypox virus detection in rodents using real-time 3'-minor groove binder TaqMan assays on the Roche LightCycler. *Lab. Invest.* 2004; 84(9):1200–8.
- Learned L.A., Reynolds M.G., Wass D.W., Li Y., Olson V.A., Karem K., Stempora L.L., Braden Z.H., Kline R., Likos A., Libama F., Moudzeo H., Bolanda J.D., Tarangonia P., Boumandoki P., Formenty P., Harvey J.M., Damon I.K. Extended interhuman transmission of monkeypox in a hospital community in the republic of the Congo, 2003. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2005; 73(2):428–34.
- Mukinda V.B.K., Mwema G., Kilundu M., Heymann D.L., Khan A.S., Esposito J.J. Re-emergence of human monkeypox in Zaire in 1996. Monkeypox Epidemiologic Working Group. *Lancet*. 1997; 349:1449–50.
- Ninove L., Domart Y., Vervel C., Voinot C., Salez N., Raoult D. Cowpox virus transmission from pet rats to humans, France. *Emerg. Infect. Dis.* 2009; 15:781–4.
- Nitsche A., Kurth A., Pauli G. Viremia in human Cowpox virus infection. *J. Clin. Virol.* 2007; 40:160–2.
- Nitsche A., Ellerbrok H., Pauli G. Detection of orthopoxvirus DNA by real-time PCR and identification of variola virus DNA by melting analysis. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(3):1207–13.
- Nitsche A., Steger B., Ellerbrok H., Pauli G. Detection of vaccinia virus DNA on the LightCycler by fluorescence melting curve analysis. *J. Virol. Methods*. 2005; 126:187–95.
- Olson V.A., Laue T., Laker M.T., Babkin I.V., Drosten C., Shchelkunov S.N., Niedrig M., Damon I.K., Meyer H. Real-time PCR system for detection of orthopoxviruses and simultaneous identification of smallpox virus. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(5):1940–46.
- Panning M., Asper M., Kramme S., Schmitz H., Drosten C. Rapid detection and differentiation of human pathogenic orthopox viruses by a fluorescence resonance energy transfer real-time PCR assay. *Clin. Chem.* 2004; 50(4):702–8.
- Putkuri N., Piiparinen H., Vaheri A., Vapalahti O. Detection of human orthopoxviruses infections and differentiation of smallpox virus with real-time PCR. *J. Med. Virol.* 2009; 81:146–52.
- Reynolds M.G., Carroll D.S., Olson V.A., Hughes C., Galley J., Likos A., Montgomery J.M., Suu-Ire R., Kwasi M.O., Jeffrey Root J., Braden Z., Abel J., Clemmons C., Regnery R., Karem K., Damon I.K. A Silent Zoonotic of an Orthopoxvirus in Ghana, West Africa: Evidence for Multi-Species. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2010; 82(4):746–54.
- Rimoin A.W., Mulembakani P.M., Johnston S.C., Lloyd Smith J.O., Kivalu N.K., Kinkela T.L., Blumberg S., Thomassen H.A., Pike B.L., Fair J.N., Wolfe N.D., Shongo R.L., Graham B.S., Formenty P., Okitolonda E., Hensley L.E., Meyer H., Wright L.L., Muyembe J.J. Major increase in human monkeypox incidence 30 years after smallpox vaccination campaigns cease in the Democratic Republic of Congo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2010; 107:16262–7.
- Ryabinin V.A., Shundrin L.A., Kostina E.B., Laassri M., Chizhikov V., Shchelkunov S.N., Chumakov K., Shnyakov A.N. Microarray assay for detection and discrimination of Orthopoxvirus species. *J. Med. Virol.* 2006; 78(10):1325–40.
- Saijo M., Ami Y., Suzaki Yuriko., Nagata N., Iwata N., Hasegawa H., Ogata M., Fukushi S., Mizutani T., Iizuka I., Sakai K., Sata T., Kurata T., Kurane I., Morikawa S. Diagnosis and assessment of monkeypox virus (MPXV) infection by quantitative PCR assay: differentiation of congo basin and west African MPXV strains. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2008; 61:140–2.
- Scaramozzino N., Ferrier-Rembert A., Favier A., Rothlisberger C., Richard S., Crance J., Meyer H., Garin D. Real-time PCR to identify variola virus or other human pathogenic orthopox viruses. *Clin. Chem.* 2007; 53(4):606–13.
- Schmidt M., Roth K.W., Meyer H., Seifried E., Hourfar M.K. Nucleic acid test screening of blood donors for orthopoxviruses can potentially prevent dispersion of viral agents in case of bioterrorism. *Transfusion.* 2005; 45:399–403.
- Shchelkunov S.N. How long ago did smallpox virus emerge? *Arch. Virol.* 2009; 154:1865–71.
- Shchelkunov S.N., Gavrilova E.V., Babkin I.V. Multiplex PCR detection and species differentiation of orthopoxviruses pathogenic to humans. *Mol. Cell. Probes.* 2005; 19:1–8.
- Shchelkunov S.N., Marennikova S.S., Moyer R.W. Orthopoxviruses pathogenic for humans. New York: Springer; 2005. 425 p.
- Shchelkunov S.N., Shcherbakov D.N., Maksyutov R.A., Gavrilova E.V. Species-specific identification of variola, monkeypox, cowpox, and vaccinia viruses by multiplex real-time PCR assay. *J. Virol. Methods.* 2011; 175(2):163–9.
- Trindade G.H., Li Y., Olson V.A., Emerson G., Regnery R.L., Fonseca F.G., Kroon E.G., Damon I. Real-time PCR assay to identify variants of Vaccinia virus: implications for the diagnosis of bovine vaccinia in Brazil. *J. Virol. Methods.* 2008; 152:63–71.
- Vorou R.M., Papavassiliou V.G., Pierroutsakos I.N. Cowpox virus infection: an emerging health threat. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2008; 21:153–6.
- Zafar A., Swanepoel R., Hewson R., Nizam M., Ahmed A., Husain A., Grobbelaar A., Bewley K., Miolet V., Dowsett B., Easterbrook L., Hasan R. Nosocomial buffalopoxvirus infection, Karachi, Pakistan. *Emerg. Infect. Dis.* 2007; 13:902–4.

Authors:

Gavrilova E.V., Maksyutov R.A., Shchelkunov S.N. State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector". Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russian Federation. E-mail: vector@vector.nsc.ru

Об авторах:

Гаврилова Е.В., Максюттов Р.А., Шелкунов С.Н. Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». Российская Федерация, 630559, Новосибирская обл, п. Кольцово. E-mail: vector@vector.nsc.ru

Поступила 11.09.13.