

Ал.А.Сергеев, Л.Е.Булычев, О.В.Пьянков, Ар.А.Сергеев, С.А.Боднев, А.С.Кабанов, Ю.В.Туманов, И.А.Юрганова, Л.Н.Шишкина, А.П.Агафонов, А.Н.Сергеев

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ЖИВОТНЫХ К ВИРУСУ ОСПЫ ОБЕЗЬЯН

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», п. Кольцово, Новосибирская обл.

Проведено изучение чувствительности к вирусу оспы обезьян (ВОО) различных видов животных (белые мыши, кролики, мини-свиньи и сурки). Установлено, что чувствительными животными к ВОО являются сурки (ID_{50} и $LD_{50} < 2,2$ лг БОЕ при подкожном заражении) и мыши ($ID_{50} = 4,8$ лг и $LD_{50} > 5$ лг БОЕ при интраназальном заражении). Наиболее выраженные внешние клинические признаки заболевания отмечались у сурков: оспоподобная сыпь на коже по всей поверхности тела и слизистых, гнойные выделения из носовой полости, лимфаденит, нарушение координации, тремор конечностей, лихорадка, повышенная агрессивность, взъерошенность шерсти. У большинства павших сурков самые высокие концентрации вируса были обнаружены в стенке слизистой носа, трахее, легких и коже с оспинами ($> 6,0$ лг БОЕ/г). Заболевание у мышей по сравнению с сурками сопровождалось более скудной симптоматикой: гнойный конъюнктивит, блефарит, взъерошенность шерсти, тогда как у мини-свиней и кроликов каких-либо визуальных проявлений заболевания не наблюдалось.

Ключевые слова: вирус оспы обезьян, сурок, мышь, кролик, мини-свинья, интраназальное инфицирование, подкожное инфицирование, 50 % летальная доза, 50 % инфицирующая доза.

Al.A.Sergeev, L.E.Bulychev, O.V.P'yankov, Ar.A.Sergeev, S.A.Bodnev, A.S.Kabanov, Yu.V.Tumanov, I.A.Yurganova, L.N.Shishkina, A.P.Agafonov, A.N.Sergeev

Sensitivity of Different Animal Species to Monkeypox Virus

State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector", Kol'tsovo, Novosibirsk Region

Studied is the sensitivity of different animal species (white mice, rabbits, mini-pigs, and marmots) to Monkeypox virus (MPXV). Determined is the fact that MPXV-sensitive are groundhogs (ID_{50} and $LD_{50} < 2,2$ lg of PFU in case of subcutaneous inoculation) and mice ($ID_{50} = 4,8$ lg and $LD_{50} > 5$ lg of PFU in case of intranasal inoculation). The most pronounced clinical signs of the disease such as varioliform eruption all over body and mucous linings, purulent discharges out of nasal cavity, lymphadenitis, loss of coordination, tremor of extremities, fever, hyper-aggressiveness, disheveled hair have been registered in groundhogs. The highest viral loads in the majority of fallen marmots have been observed in nasal mucosa, trachea, lungs, and pock-marked skin ($> 6,0$ lg PFU/g). The symptomatology of the disease in mice as compared to groundhogs is a bit milder: purulent conjunctivitis, blepharitis, and disheveled hair. As for mini-pigs and rabbits, no visual signs of the disease have been observed in them.

Key words: Monkeypox virus, marmot, mouse, rabbit, mini-pig, intranasal inoculation, subcutaneous inoculation, 50 % lethal doze, 50 % infective doze.

Широко известно, что при разработке препаратов для лечения, профилактики и диагностики инфекционных болезней у людей очень важно проводить исследования на животных, моделирующих соответствующий инфекционный процесс у человека.

Что касается вируса оспы обезьян (ВОО), то в качестве таких животных ряд исследователей использует нечеловекообразных приматов, луговых собачек, африканских белок и иммунодефицитных мышей [6, 10, 11, 12]. В то же время для ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», единственной в России организации, работающей с вирусами натуральной оспы и оспы обезьян, использование этих видов модельных животных крайне затруднительно. Это связано с высокой стоимостью нечеловекообразных обезьян и большими сложностями, возникающими с приобретением луговых собачек и африканских белочек из стран дальнего зарубежья, требующим регулярного проведения экспортного и таможенного контролей. С другой стороны, использование иммунодефицитных мышей неадекватно моделирует инфекционный процесс, который возникает во время вспышки оспы

обезьян среди людей, так как эта болезнь, в основном, была зарегистрирована у людей с нормальной иммунной системой.

Целью настоящих исследований (на первом этапе разработки модельной биосистемы) явилось изучение чувствительности к ВОО различных видов животных (белые мыши, кролики, мини-свиньи и сурки).

Материалы и методы

Вирус. В работе использовали Центрально-Африканский штамм ВОО V79-1-005 из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Путем культивирования этого штамма на культуре клеток Vero были приготовлены два препарата вирусосодержащей суспензии (биологическая концентрация первого препарата составляла $1,3 \cdot 10^7$ бляшкообразующих единиц в мл – БОЕ/мл, а второго – $5,0 \cdot 10^6$ БОЕ/мл). Первый препарат в дальнейшем использовался для инфицирования сурков, а второй – для мини-свиней, мышей и

кроликов. Вирусосодержащий материал перед экспериментами хранили при температуре минус 70 °С.

Животные. В исследовании использовали интактных беспородных разнополых белых 8–15-суточных мышей ICR (массой 9–11 г) и 1,5-месячных кроликов породы шиншилла (массой 1500 г), полученных из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

Кроме того, исследованиям подвергали разнополых 1,5-месячных сурков вида Байбак со средней массой тела (1230±347) г, полученных из Пушкинского питомника Московской области в количестве 16 голов, а также разнополых 2-месячных свиней породы Сибирская мини-свинья (мини-свиньи) со средней массой тела (6000±2000) г, полученных из питомника ИЦиГ СО РАН Новосибирской области в количестве 16 голов.

Наблюдение за инфицированными животными осуществляли в течение 21 сут с момента заражения. 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 [2].

Методы инфицирования животных. Заражение сурков проводили путем подкожного (п/к) введения (в холку) по 1 мл вирусосодержащего материала в дозах $1,3 \cdot 10^7$, $3,9 \cdot 10^5$, $1,2 \cdot 10^4$, $3,5 \cdot 10^2$ БОЕ. Мини-свиней, кроликов и мышей инфицировали интраназальным (и/н) способом, вводя вирусосодержащую жидкость мини-свиньям и кроликам по 0,5 мл в каждую ноздрю (суммарно 1,0 мл), а мышам – 0,03 мл суммарно в обе ноздри. При этом мышам и мини-свиней заражали ВОО в дозах 10^5 , 10^3 , 10^1 , 10^{-1} БОЕ, а кроликов – в дозах 10^4 , 10^2 , 10^0 БОЕ. Эти эксперименты были проведены с целью определения 50 % инфицирующих и летальных доз (ID_{50} и LD_{50}) ВОО.

Определение специфичности гибели животных. Факт гибели сурков вследствие инфекции, вызванной ВОО, подтверждали путем определения наличия жизнеспособного вируса в гомогенатах органов.

Изучение накопления вируса в органах пасти животных. Образцы органов (стенки носовой полости, трахея, сердце, легкие, печень, поджелудочная

железа, почки, селезенка, головной мозг, поднижнечелюстные, паховые, подмышечные и брызжеечные лимфоузлы, яички, яичники и кусочки кожи с оспинами) брали после гибели у п/к инфицированных сурков. С целью приготовления 10 % гомогенатов органы животных дезинтегрировали механическим способом с помощью пестика в ступке с речным песком. Перед вирусологическим исследованием гомогенаты органов и тканей инфицированных сурков хранили при температуре -70 °С.

Вирусологический анализ проб. Определение концентрации и наличия жизнеспособного вируса в образцах органов и тканей животных проводили традиционным методом бляшек путем их титрования или посева на культуру клеток Vero [8].

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку и сравнение результатов осуществляли стандартными методами [1].

Результаты и обсуждение

На первом этапе были проведены исследования по определению чувствительности разных видов животных к ВОО при и/н и п/к заражении, результаты которых представлены в табл. 1. Через 6–8 сут после заражения (п/з) у сурков регистрировали ряд внешних клинических признаков заболевания (оспоподобная сыпь на коже по всей поверхности тела и слизистых, гнойные выделения из носовой полости, лимфаденит, нарушение координации, тремор конечностей, лихорадка, повышенная агрессивность, взерошенность шерсти), и через 11–21 сут п/з наступал летальный эффект. Сыпь на теле сурков имела дискретный характер с постепенно сменяющимися форменными элементами (макула, папула, везикула, пустула, корка), рисунок. Отмечено, что с увеличением дозы заражения ВОО уменьшался срок жизни инфицированных животных. В то же время, и/н инфицирование ВОО не приводило к летальности среди мышам. Тем не менее, начиная с 7-х суток п/з, у них отмечали внешние клинические признаки заболевания (гнойный конъюнктивит, блефарит, взерошенность шерсти), которые исчезали через 11–13 сут п/з. У

Таблица 1

Данные биологической активности штамма вируса оспы обезьян V79-1-005 при интраназальном и подкожном заражении различных видов животных

| Наименование показателя | Вид животного | | | |
|--|--|--|----------------|----------------|
| | Мышь | Сурок | Кролик | Мини-свинья |
| Способ заражения | Интраназальный | Подкожный | Интраназальный | Интраназальный |
| ID_{50} * (в lg БОЕ), $M \pm I_{95}$ | 4,8±0,3 | <2,5 | >4,0 | >5 |
| LD_{50} (в lg БОЕ) | >5,0 | <2,5 | >4 | >5 |
| Клинические признаки заболевания | Гнойный конъюнктивит, блефарит, взерошенность шерсти | Оспоподобная сыпь на коже по всей поверхности тела и слизистых, гнойные выделения из носовой полости, лимфаденит, нарушение координации, тремор конечностей, лихорадка, повышенная агрессивность, взерошенность шерсти | Отсутствуют | Отсутствуют |

Примечание: * – величина определена по внешним клиническим проявлениям заболевания; M – средняя 50 % летальная доза; I_{95} – доверительный интервал для M с вероятностью 95 %.



Сыпь на коже после заражения сурка
Центрально-Африканским штаммом V79-1-005
вируса оспы обезьян

остальных взятых в эксперимент животных (кроликов и мини-свиней) не выявлено внешних клинических признаков заболевания и тем более летального эффекта при использованных дозах заражения ВОО. Исходя из представленных результатов, чувствительными животными, учитывая внешние клинические признаки заболевания и летальность, являются сурки (ID_{50} и $LD_{50} < 2,2$ lg БОЕ при п/к заражении) и мыши ($ID_{50} = 4,8$ lg и $LD_{50} > 5$ lg БОЕ при и/н заражении).

На втором этапе были определены концентрации ВОО в органах павших сурков, результаты которых представлены в табл. 2. При этом наибольшие концентрации вируса были обнаружены в стенке слизистой носа, трахее, легких и участках кожи с оспинами ($> 7,3$ lg БОЕ/г).

В научной литературе [4, 7, 12] имеются данные о высокой чувствительности к ВОО луговых собак

и белок, относящихся к семейству беличьих. Кроме того, клиническая картина заболевания у этих животных напоминает таковую у человека. В наших же исследованиях был взят другой представитель этого же семейства – сурок. Этот вид животных из семейства беличьих оказался наиболее доступным для нас, так как сурков в настоящее время выращивают в некоторых зверохозяйствах России. Проведенные эксперименты с использованием сурков показали их высокую чувствительность к ВОО, причем, кроме летального эффекта, у них наблюдалась клиническая картина соответствующего заболевания, в общем виде напоминающая таковую у луговых собачек и белок. Из всех исследованных органов павших сурков самые высокие концентрации вируса регистрировались в органах респираторной системы (не считая кожи с оспинами), что, вероятно, свидетельствует о выраженной чувствительности дыхательного тракта этого вида животных к данному возбудителю и поддерживает точку зрения, касающуюся большой значимости аэрогенного пути передачи инфекции, вызванной ВОО.

В экспериментальных исследованиях, проведенных на 8–15-суточных мышях и 1,5-месячных кроликах, некоторыми учеными получены данные о 100 % летальности этих животных при и/н инфицировании штаммом Копенгаген ВОО в дозе 6 lg БОЕ [9]. В наших же исследованиях на мышях того же возраста, судя по наличию внешних клинических признаков заболевания, при дозе 4,8 lg БОЕ отмечалось только 50 % их инфицирование, а у кроликов при инфицирующей дозе 4 lg БОЕ отсутствовала какая-либо визуальная клиническая симптоматика. Такое несоответствие полученных результатов объясняется, скорее всего, различием используемых в экспериментах штаммов ВОО и доз заражения.

Следует отметить, что при использовании тра-

Таблица 2

Данные накопления вируса оспы обезьян в органах павших сурков

| Вид органа | Титр вируса в органах следующих животных в lg БОЕ/мл [$M \pm I_{95}$] (lg БОЕ/г): | | | | |
|-----------------------------------|---|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | №1 | №2 | №3 | №4 | №5 |
| Мозг | 5,1±0,1 (5,6) | 4,8±0,1 (5,3) | 3,7±0,2 (4,1) | 1,5±0,5 (2,1) | <0,7 (1,2) |
| Стенка слизист. носа | >5,7 (7,3) | 4,5±0,1 (6,4) | >5,7 (6,8) | 5,1±0,4 (6,1) | >5,7 (6,6) |
| Трахея и с участком ее бифуркации | >5,7 (7,3) | >5,7 (7,4) | 4,8±0,1 (6,4) | 3,2±0,1 (4,3) | 5,0±0,3 (7,3) |
| Легкие | >5,7 (7,3) | 4,9±0,1 (6,5) | 4,1±0,1 (5,0) | 5,0±0,3 (5,9) | >5,7 (6,8) |
| Сердце | 2,6±0,7 (3,2) | <0,7 (1,4) | 1,0±0,3 (2,0) | <0,7 (1,2) | 1,5±0,4 (2,0) |
| Печень | 2,6±0,5 (3,2) | <0,7 (2,3) | <0,7 (1,3) | <0,7 (1,1) | 3,6±0,5 (4,0) |
| Селезенка | <0,7 (1,5) | <0,7 (1,4) | 2,0±0,5 (3,0) | <0,7 (1,2) | <0,7 (1,4) |
| Поджел. железа | 4,8±0,1 (5,6) | <0,7 (1,7) | 3,2±0,4 (4,4) | <0,7 (1,5) | 2,6±0,3 (3,2) |
| Почка | 4,3±0,2 (4,8) | 4,3±0,1 (4,8) | >5,7 (6,3) | <0,7 (0,9) | 3,0±0,1 (4,0) |
| Поднижнечелост. л/у | 4,2±0,4 (5,8) | <0,7 (2,3) | 4,1±0,3 (5,4) | 3,0±0,2 (4,1) | 5,1±0,3 (6,1) |
| Подмышечн. л/у | 5,7±0,1 (6,5) | 1,5±0,3 (2,0) | 4,9±0,2 (6,2) | <0,7 (1,6) | <0,7 (2,0) |
| Паховые л/у | <0,7 (2,3) | 4,9±0,2 (6,2) | >5,7 (6,7) | 3,1±0,5 (3,7) | 4,0±0,3 (5,1) |
| Брызж. л/у | <0,7 (2,0) | 2,7±0,3 (3,3) | 4,7±0,1 (5,7) | <0,7 (1,2) | <0,7 (2,0) |
| Яичко или яичник | <0,7 (2,0) | >5,7 (7,0) | >5,7 (6,8) | 5,2±0,5 (6,2) | >5,7 (6,0) |
| Кусочек кожи с оспиной | >5,7 (6,3) | >5,7 (7,9) | >5,7(7,4) | <0,7 (1,5) | >5,7 (6,8) |

Примечание: M – средняя величина концентрации вируса; I_{95} – доверительный интервал для M с вероятностью 95 %.

диционного метода и/н заражения мышей около 97 % вирусосодержащего материала попадает в желудочно-кишечный тракт и лишь около 3 % – в респираторный (наши данные, полученные с использованием физической метки). При этом, если учесть только количество апплицированного в дыхательном тракте материала, то ИД₅₀ ВОО для мышей в нашем случае должна быть существенно ниже (на 1,5 lg БОЕ). В этом смысле аэрозольный метод инфицирования животных и и/н, но с введением лишь микроколичеств вирусосодержащего материала на слизистую носа (как это делают некоторые исследователи [7]), являются наиболее эффективными, если рассматривать только респираторный путь инфицирования животных.

Ряд исследователей [6] отмечает снижение массы тела и взъерошенность шерсти у взрослых мышей BALB/c и C57BL/6 при и/н инфицировании только Центральным-Африканским штаммом ВОО, который является высоковирулентным для человека [5], в отличие от Западно-Африканского штамма, обладающего низкой вирулентностью. В нашем же случае при инфицировании штаммом Центральным-Африканского происхождения беспородных мышей ICR в тех же дозах заражения отмечались и другие ярко выраженные признаки заболевания: гнойный конъюнктивит и блефарит. Зарегистрированная нами более богатая клиническая симптоматика у этого вида животных объясняется, вероятно, существенной разницей в возрасте взятых в эксперименты мышей.

В нашей работе, кроме сурков, мышей и кроликов, исследованию были подвергнуты и мини-свиньи, несмотря на то, что этот вид животных ранее никто не использовал в своей работе с ВОО. Необходимость использования нами в экспериментах мини-свиней была обусловлена их выраженным сходством (по сравнению с другими видами лабораторных животных) с человеком по анатомии и физиологии сердечно-сосудистой и пищеварительной систем, строению кожи и картам генома клеток [3]. Тем не менее, чувствительность этих животных при и/н заражении ВОО оказалась более низкой, чем у человека.

Таким образом, в результате проведенных экспериментальных исследований установлено, что чувствительными животными к ВОО являются сурки (ИД₅₀ и ЛД₅₀ < 2,5 lg БОЕ при п/к заражении) и мыши (ИД₅₀ = 4,8 lg БОЕ и ЛД₅₀ > 5 lg БОЕ при и/н заражении). При этом наиболее выраженные внешние клинические признаки заболевания отмечались у сурков: осподобная сыпь на коже по всей поверхности тела и слизистых, гнойные выделения из носовой полости, лимфаденит, нарушение координации, тремор конечностей, лихорадка, повышенная агрессивность, взъерошенность шерсти. У большинства павших сурков самые высокие концентрации вируса были обнаружены в стенке слизистой носа, трахее, легких и коже с оспинами (> 6,0 lg БОЕ/г). Заболевание у мышей по сравнению с сурками сопровождалось более скудной симптоматикой: гнойный конъюнктивит,

блефарит, взъерошенность шерсти, а у мини-свиней и кроликов каких-либо визуальных проявлений заболевания вообще не наблюдалось.

В рамках полученных результатов с целью завершения исследований по разработке модельной биосистемы для оценки эффективности действия лекарственных препаратов и диагностических тест-систем при оспе обезьян в дальнейшем предполагается акцентировать внимание только на двух видах испытанных нами животных: беспородных белых мышях ICR и сурках вида Байбак.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A.* Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.; 1962. 256 с.
2. Национальный научно-исследовательский совет. Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. Вашингтон: Национальная Академия; 1996.
3. *Tikhonov V.N.* Лабораторные мини-свиньи: генетика и медико-биологическое использование. Новосибирск: Изд-во СО РАН; 2010. 304 с.
4. *Khodakevich L.N.* Экологические и эпидемиологические аспекты оспы обезьян. М.; 1990. 320 с.
5. *Chen N., Li G., Liszewski M.K., Atkinson J.P., Jahrling P.B. et al.* Virulence differences between monkeypox virus isolates from West Africa and the Congo Basin. *J. Virol.* 2005; 340:46–63.
6. *Hutson C.L., Abel J.A., Carroll D.S., Olson V.A., Braden Z.H., Hughes C.M. et al.* Comparison of West African and Congo Basin Monkeypox Viruses in BALB/c and C57BL/6 Mice. *Plos One* 2009; 5(1):e8912.
7. *Hutson C.L., Carroll D.S., Self J., Weiss S., Hughes C.M., Braden Z. et al.* Dosage comparison of Congo Basin and West African strains of monkeypox virus using a prairie dog animal model of systemic orthopoxvirus disease. *J. Virol.* 2009; 402:72–82.
8. *Leparc-Goffart I., Poirier B., Garin D., Tissier M-H, Fuchs F., Crance J-M.* Standardization of a neutralizing anti-vaccinia antibodies titration method: an essential step for titration of vaccinia immunoglobulins and smallpox vaccines evaluation. *J. Clin. Virol.* 2005; 32:47–52.
9. *Marennikova S.S., Seluhina E.M.* Susceptibility of some rodent species to monkeypox virus, and course of the infection. *Bull. World Health Organ.* 1976; 53:13–20.
10. *Marriott K.A., Parkinson C.V., Morefield S.I., Davenport R., Nichols R., Monath T.P.* Clonal vaccinia virus grown in cell culture fully protects monkeys from lethal monkeypox challenge. *Vaccine.* 2007; 26:581–8.
11. *Osorio J.E., Iams K.P., Meteyer C.U., Roche T.E.* Comparison of monkeypox viruses pathogenesis in mice by *in vivo* imaging. *Plos One* 2009; 4(8):e6592.
12. *Schultz D.A., Sagartz J.E., Huso D.L., Mark R., Buller L.* Experimental infection of an African dormouse (*Graphiurus kelleni*) with monkeypox virus. *J. Virol.* 2009; 383(1):86–92.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. *Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A.* [Statistical Methods in Microbiological Investigations]. L.; 1962. 256 p.
2. National Research Council. [Guide for the Maintenance and Use of Laboratory Animals]. Washington; 1996.
3. *Tikhonov V.N.* [Laboratory Mini-Pigs: Genetics and Medical-Biological Usage]. Novosibirsk; 2010. 304 p.
4. *Khodakevich L.N.* [Ecological and Epidemiological Aspects of Monkeypox]. M.; 1990. 320 p.

Authors:

Sergeev A.A., Bulychev L.E., Pyankov O.V., Ar.A.Sergeev, Bodnev S.A., Kabanov A.S., Tumanov Yu.V., Yurganova I.A., Shishkina L.N., Agafonov A.P., Sergeev A.N. State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector". Koltsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russia. E-mail: vector@vector.nsc.ru

Об авторах:

Сergeev Ал.А., Булычев Л.Е., Пьянков О.В., Sergeev Ар.А., Боднев С.А., Кабанов А.С., Туманов Ю.В., Юрганова И.А., Шишкина Л.Н., Агафонов А.П., Сергеев А.Н. ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор». 630559, Новосибирская обл, п. Кольцово. E-mail: vector@vector.nsc.ru

Поступила 20.06.11.