

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 578.821.5:578.23].083.2

Замедянская А.С., Титова К.А., Сергеев Ал.А., Кабанов А.С., Булычев Л.Е., Сергеев Ар.А., Галахова Д.О., Нестеров А.Е., Носарева О.В., Шишкина Л.Н., Таранов О.С., Омигов В.В., Агафонов А.П., Сергеев А.Н.

ОЦЕНКА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЧЕЛОВЕКА К ВИРУСУ НАТУРАЛЬНОЙ ОСПЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЕРВИЧНЫХ КУЛЬТУР МОНОЦИТОВ-МАКРОФАГОВ

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»», 630559, пос. Кольцово, Новосибирская область

В исследованиях, проведенных на первичных культурах клеток гранулоцитов, мононуклеаров и моноцитов-макрофагов, полученных из крови человека, с использованием вируса натуральной оспы (ВНО) в дозах 0,001–0,021 БОЕ/кл. (бляшкообразующие единицы на лунку), была отмечена положительная динамика накопления вируса только в моноцитах-макрофагах с максимальными значениями его концентраций (5,0–5,5 lg БОЕ/мл) в основном через 6 сут после заражения. Факт размножения ВНО в моноцитах-макрофагах был подтвержден данными электронной микроскопии. В то же время вирус вакцины при испытанных дозах 3,3 и 4,2 lg БОЕ/мл не проявлял способности к размножению в этих клетках человека. Чувствительность людей к ВНО по данным, полученным на моноцитах-макрофагах человека, соответствовала ~1 БОЕ (с учетом беспрепятственного взаимодействия вируса в его организме с клетками такого типа), что согласуется с ранее опубликованными теоретическими данными о его чувствительности к этому вирусу. Экспериментально обоснованное нами значение чувствительности человека к ВНО позволит прогнозировать адекватность разрабатываемых *in vivo* моделей натуральной оспы с использованием чувствительных животных, что необходимо для надежной оценки эффективности лечебно-профилактического действия создаваемых препаратов против оспы.

Ключевые слова: вирус натуральной оспы; вирус вакцины; человек; первичная культура клеток крови; 50% инфицирующая доза; вирусная продукция.

Для цитирования: Замедянская А.С., Титова К.А., Сергеев Ал.А., Кабанов А.С., Булычев Л.Е., Сергеев Ар.А., Галахова Д.О., Нестеров А.Е., Носарева О.В., Шишкина Л.Н., Таранов О.С., Омигов В.В., Агафонов А.П., Сергеев А.Н. Оценка чувствительности человека к вирусу натуральной оспы с использованием первичных культур моноцитов-макрофагов. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61 (2): 69-73.

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-2- 69-73

Zamedyanskaya A.S., Titova K.A., Sergeev Al.A., Kabanov A.S., Bulychev L.E., Sergeev Ar.A., Galakhova D.O., Nesterov A.E., Nosareva O.V., Shishkina L.N., Taranov O.S., Omigov V.V., Agafonov A.P., Sergeev A.N. EVALUATION OF THE HUMAN SENSITIVITY TO SMALLPOX VIRUS BY THE PRIMARY CULTURES OF THE MONOCYTE-MACROPHAGES

State Research Center for Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk region, 630559, Russian Federation

Studies of the primary cultures of granulocytes, mononuclear, and monocyte-macrophage cells derived from human blood were performed using variola virus (VARV) in the doses of 0.001-0.021 PFU/cell (plaques-forming units per cell). Positive dynamics of the virus accumulation was observed only in the monocyte-macrophages with maximum values of virus concentration (5.0-5.5 lg PFU/ml) mainly within six days after the infection. The fact of VARV replication in the monocyte-macrophages was confirmed by the data of electron microscopy. At the same time, virus vaccines when tested in doses 3.3 and 4.2 lg PFU/ml did not show the ability to reproduce in these human cells. The people sensitivity to VARV as assessed from the data obtained on human monocyte-macrophages corresponded to ~1 PFU (taking into account the smooth interaction of the virus in the body to the cells of this type), which is consistent to previously found theoretical data on the virus sensitivity. The human susceptibility to VARV assessed experimentally can be used to predict the adequacy of developed smallpox models (*in vivo*) based on susceptible animals. This is necessary for reliable assessment of the efficiency of development of drugs for treatment and prophylaxis of the smallpox.

Key words: variola virus; vaccinia virus; human; primary blood cells; 50% infectious dose; virus production.

For citation: Zamedyanskaya A.S., Titova K.A., Sergeev Al.A., Kabanov A.S., Bulychev L.E., Sergeev Ar.A., Galakhova D.O., Nesterov A.E., Nosareva O.V., Shishkina L.N., Taranov O.S., Omigov V.V., Agafonov A.P., Sergeev A.N. Evaluation of the human sensitivity to smallpox virus by the primary cultures of the monocyte-macrophages. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2016; 61(2): 69-73. (In Russ.).

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-2- 69-73

For correspondence: Alena S. Zamedyanskaya, Junior research scientist, State Research Center for Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk region, 630559, Russian Federation, E-mail: zamedyanskaya_as@vector.nsc.ru

Information about authors:

Zamedyanskaya A.S., <http://orcid.org/0000-0002-1177-2693>

Sergeev Al.A., <http://orcid.org/0000-0001-8355-5551>

Titova K.A., <http://orcid.org/0000-0001-8764-9408>

Kabanov A.S., <http://orcid.org/0000-0002-6287-0912>

Bulychev L.Ye., <http://orcid.org/0000-0001-9598-7327>

Для корреспонденции: Замедянская Алена Сергеевна, младший научный сотрудник отдела «Коллекция микроорганизмов» ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»», 630559, пос. Кольцово, Новосибирская область, E-mail: zamedyanskaya_as@vector.nsc.ru

Sergeev Ar.A., <http://orcid.org/0000-0002-3591-1571>
Galakhova D.O., <http://orcid.org/0000-0002-7801-4141>
Nesterov A.E., <http://orcid.org/0000-0001-7943-3287>
Nosareva O.V., <http://orcid.org/0000-0003-2387-4299>
Shishkina L.N., <http://orcid.org/0000-0002-8264-0217>
Taranov O.S., <http://orcid.org/0000-0002-6746-8092>
Omigov V.V., <http://orcid.org/0000-0002-2028-6099>
Agafonov A.P., <http://orcid.org/0000-0003-2577-0434>
Sergeev A.N., <http://orcid.org/0000-0001-5984-8776>

Funding. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 24 February 2015

Accepted 19 March 2015

В научной литературе содержится информации о чувствительности людей к вирусу натуральной оспы (ВНО): до 10 вирусных частиц могут вызвать заболевание человека [1, 2], при этом доказательств, обосновывающих величину данного показателя, не приводится. В то же время существует экспериментальный подход, позволяющий оценить этот показатель для млекопитающих *in vitro*, используя их первичные культуры клеток-мишеней для того или иного вируса [3–5 и др.]. Известно, что основными первичными клетками-мишенями для ВНО у человека, судя по данным, полученным с этим вирусом на модельных животных [6–8], являются макрофаги (клетки системы мононуклеарных фагоцитов).

В связи с этим целью настоящих исследований было проведение экспериментальной оценки чувствительности человека к ВНО с использованием его первичных культур клеток системы мононуклеарных фагоцитов (моноцитов-макрофагов).

Материал и методы

Все эксперименты с живым ВНО были проведены на базе ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (Россия) в лаборатории с максимальным (первым по классификации РФ) уровнем биологической защиты (BSL-4 по зарубежной классификации) с использованием изолирующих пневмокапсулов.

Вирус. В экспериментах использовали штамм Ind-3a ВНО и штамм Л-ИВП вируса вакцины (ВВ), полученные из Государственной коллекции вирусов и риккетсий ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Две серии вирусосодержащего материала, использованные в экспериментах, были приготовлены при их культивировании в клетках Vero и имели биоконцентрацию 6,7 и 7,0 lg БОЕ/мл соответственно. Вирусосодержащий материал был расфасован в индивидуальные пробирки и хранился при минус 70°C.

Клеточная культура. Для наработки вирусосодержащей суспензии и титрования различных биоматериалов использовали перевиваемую культуру клеток Vero, полученную из коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

Получение первичных клеток крови человека. Добровольцы перед взятием у них крови для приготовления первичных культур клеток были обследованы на наличие противооспепных антител в сыворотке крови с помощью реакции нейтрализации с использованием ВВ [9]. Для приготовления первичных культур клеток использовали кровь от 3 добровольцев (25–30 лет), 2 из которых ранее (1 и 3 года тому назад) были вакцинированы против натуральной оспы и имели титры антител к ВВ: 1:32 и более 1:256. Процедуру взятия венозной крови у добровольцев осуществляли в стационаре

ФБУЗ «Медико-санитарная часть № 163» Федерального медико-биологического агентства России в соответствии с протоколом № 3 от 02.12.13, утвержденным этической комиссией ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

Полученную от добровольцев кровь в растворе ЭДТА вносили на двойной градиент плотности фикоколл-верографина 1,077 и 1,119 г/мл в соотношении их объемов 1:2. После 40 мин центрифугирования в бакет-роторе с ускорением 200 g (1500–1800 об/мин) при 20°C над границей градиента плотности 1,077 г/мл собирали слой клеток для получения суспензионной первичной культуры мононуклеаров крови (СПКМК). Для получения суспензионной первичной культуры гранулоцитов крови (СПКГК) слой клеток собирали между верхней и нижней границей градиентов плотности 1,077 и 1,119 г/мл. Отобранные клетки дважды отмывали питательной средой RPMI-1640 путем центрифугирования при 3000 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре. После второго центрифугирования к клеткам добавляли поддерживающую питательную среду RPMI-1640 с гентамицином (80 мкг/мл) и эмбриональной бычьей сывороткой (2% по объему), подсчитывали концентрацию клеток и перед экспериментом вносили в лунки 24-луночных культуральных планшетов по $(7,5 \pm 0,5) \cdot 10^5$ кл/лунку. Для получения монослойной первичной культуры моноцитов-макрофагов крови (МПМК-МК) СПКМК заливали по 1 мл в лунки 24-луночного культурального планшета, сменив питательную среду на ростовую: среду RPMI-1640 с гентамицином (80 мкг/мл) и эмбриональной бычьей сывороткой (10% по объему) и инкубировали в атмосфере, содержащей 5% CO₂ при 37°C в течение 24 ч. Затем не адгезированные на дне лунок клетки удаляли и лунки промывали средой RPMI-1640. Непосредственно перед заражением в лунках с монослоем макрофагоподобных клеток меняли питательную среду на поддерживающую, при этом клетки из 4 лунок планшета снимали со дна и подсчитывали в камере Горяева, в среднем их концентрация составляла $(9,0 \pm 1,5) \cdot 10^5$ кл/лунку.

В качестве отрицательного контроля, показывающего отсутствие накопления вирусов, использовали суспензию клеточного дебриса, полученного путем 3-кратного замораживания – оттаивания смеси, приготовленной в равных пропорциях (по количеству клеток) СПКГК, СПКМК и МПМК-МК в поддерживающей питательной среде с последующей проверкой на отсутствие жизнеспособных клеток с помощью световой микроскопии и путем посева на культуральный планшет.

Изучение динамики накопления вирусов в первичных клетках крови человека. Клетки каждой лунки инфицировали в объеме 0,01 мл ВНО или ВВ в дозах

Таблица 1

Динамика накопления штамма Ind-3a ВНО в первичных культурах клеток крови не вакцинированного против натуральной оспы человека

Вид материала	Доза заражения, БОЕ/кл.	Концентрация ВНО, lg БОЕ/мл ($M \pm I_{95}$, $n = 4$), в клеточных материалах в разные часы п. з.				
		1	24	48	72	144
СПКГК	0,021	4,2±0,1	3,7±0,1	3,7±0,1	3,5±0,0	3,4±0,1
	0,001	3,0±0,1	2,5±0,1	2,4±0,0	2,8±0,0	2,5±0,0
СПКМК	0,008	3,8±0,1	4,7±0,1*	4,5±0,0*	4,5±0,1*	5,4±0,0***
	0,002	3,2±0,1	2,1±0,3	3,5±0,0**	4,0±0,3**	5,1±0,2***
МПКМ-МК	0,017	4,1±0,2	3,5±0,0	4,4±0,0**	5,2±0,1#	5,0±0,1#
	0,003	3,4±0,0	2,4±0,0	4,2±0,1**	4,3±0,0**	5,5±0,0***
Контроль (дебрис СПКГК, СПКМК, МПКМ-МК)	0,017 ^{###}	4,1±0,1	3,8±0,1	3,4±0,2	3,2±0,1	1,8±0,2
	0,003 ^{###}	3,5±0,0	2,5±0,0	1,7±0,2	1,8±0,1	<0,7

Примечание. * – величина достоверно выше, чем через 1 ч п. з., $p < 0,05$; ** – величина достоверно выше, чем через 24 ч п. з., $p < 0,05$; *** – величина достоверно выше, чем через 72 ч п. з., $p < 0,05$; # – величина достоверно выше, чем через 48 ч п. з., $p < 0,05$; ### – величина определена в пересчете на начальное количество взятых клеток в смеси до их дезинтеграции; < 0,7 – величина ниже порога чувствительности (0,7 lg БОЕ/лунку) использованного метода титрования. Здесь и в табл. 2: n – число повторов определения объединенных проб содержимого 4 лунок; M – среднее значение; I_{95} – 95% доверительный интервал.

0,001–0,021 БОЕ/кл. В каждой временной точке через 1, 24, 48, 72 и 144 ч после заражения (п. з.) или 1, 24, 48, 72, 96 ч п. з. делали объединенную пробу содержимого 4 лунок после 3-кратной заморозки-оттаивания для определения биологической концентрации ВНО или ВВ соответственно. Для электронно-микроскопического исследования инфицированный ВНО монослой МПКМ-МК отмывали, снимали резиновым полисменом и готовили образцы, для этой же цели использовали СПКМК, зараженные ВНО, предварительно сняв резиновым полисменом клетки, фиксированные ко дну лунок пластикового планшета.

Определение 50% инфицирующей дозы вируса и его урожайности. Показатели урожайности и инфекционности ВНО в МПКМ-МК определяли после их инфицирования в объеме 0,01 мл в лунках культуральных планшетов дозами от 0,05 до 1600 БОЕ/млн клеток с 10-кратным шагом, используя для каждой дозы по 6 лунок. Параметры урожайности ВНО оценивали в пересчете на 1 млн клеток, учитывая среднюю концентрацию клеток по 4 лункам и среднюю концентрацию вирусов по 6 лункам (после 3-кратной заморозки-оттаивания), соответствующим минимальной дозе вируса, вызывающей их накопление во всех 6 лунках.

Вирусологический анализ. Концентрацию жизнеспособного вируса в биоматериалах определяли методом титрования в монослое клеток Vero [9].

Электронно-микроскопическое исследование. Для этих исследований образцы МПКМ-МК и СПКМК, инфицированных ВНО, фиксировали в 4% растворе параформальдегида и дофиксировали 1% раствором осмиевой кислоты, обезвоживали по стандартной методике в растворах этилового спирта возрастающей концентрации и ацетоне и заливали в смесь эпон–аралдит. Ультратонкие срезы органов готовили на микротоме Райхерт–Янг (Австрия), контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца. Срезы исследовали в электронном микроскопе JEM 1400 («Jeol», Япония), фотосъемку проводили с помощью встроенной цифровой камеры Jeol и цифровой камеры бокового вывода Veleta («SIS», Германия). Для обработки и анализа снимков использовали программный пакет iTEM («SIS», Германия).

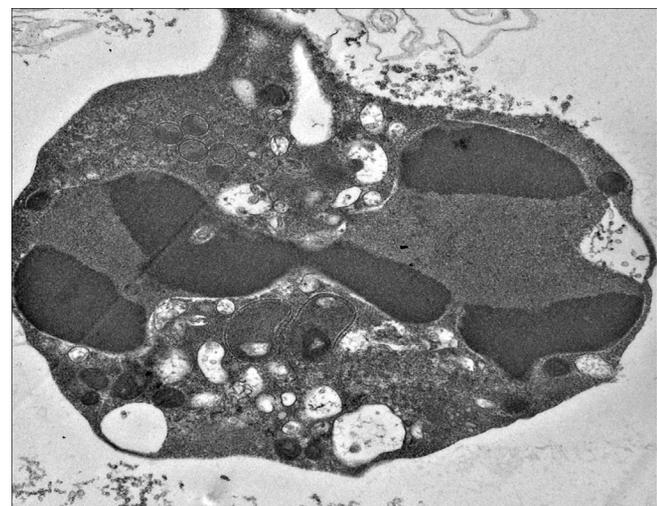
Статистическую обработку результатов проводили стандартными методами [10] с помощью пакета компьютерных программ Statistica 6.0 («StatSoft Inc.» 1984–2001) с оценкой достоверности различий ($p \leq 0,05$) для 95% доверительного уровня (I_{95}). ИД₅₀ рассчитывали по формуле Спирмена–Кербера.

Результаты и обсуждение

На начальном этапе необходимо оценить возможность размножения ВНО в первичных культурах клеток, полученных из крови человека. Для этого были приготовлены на основе крови добровольца, не вакцинированного против натуральной оспы, СПКГК, СПКМК и МПКМ-МК, включая контроль (их клеточный дебрис). С целью сравнения результатов исследования на ВНО парал-

ельно проводили аналогичного типа эксперимент на МПКМ-МК, но с использованием ВВ. Результаты этих исследований представлены в табл. 1 и 2.

Данные табл. 1 убедительно свидетельствуют о размножении ВНО в СПКМК и МПКМ-МК, при этом в зависимости от используемой в эксперименте заражающей дозы вируса наблюдали значимый прирост его биологической концентрации уже через 1 и 2 сут п. з. Максимального уровня накопления вирус достигал в основном через 6 сут п. з. По данным электронной микроскопии обнаружены признаки размножения вируса



Электроннограмма человеческой монослойной первичной культуры моноцитов-макрофагов крови через 72 ч после заражения штаммом Ind-3a ВНО в дозе 0,017 lg БОЕ/кл.: моноцит-макрофаг в состоянии апоптоза, в его цитоплазме (вверху слева) несколько незрелых вирусных частиц

Таблица 2

Динамика накопления штамма Л-ИВП ВВ в первичных культурах клеток крови не вакцинированного против натуральной оспы человека

Вид материала	Доза заражения, БОЕ/кл.	Концентрация ВНО, lg БОЕ/мл ($M \pm I_{95}$, $n = 4$), в клеточных материалах в разные часы после заражения				
		1	24	48	72	96
МПКМ-МК	0,017	4,1±0,0	4,2±0,1	4,2±0,2	4,1±0,0	4,0±0,0
	0,002	3,2±0,1	3,1±0,0	3,0±0,1	3,0±0,1	3,0±0,3
Контроль (дебрис МПКМ-МК)	0,017*	4,2±0,1	4,3±0,1	4,2±0,1	4,2±0,2	3,8±0,1
	0,002*	3,3±0,0	3,0±0,1	3,1±0,1	3,0±0,3	2,9±0,1

Примечание. * – величина определена в пересчете на начальное количество взятых клеток до их дезинтеграции.

в моноцитах-макрофагах МПКМ-МК (см. рисунок) и СПКМК человека. В то же время сколько-нибудь значимого прироста биологической концентрации ВНО в СПКМК при заражении разными дозами вируса не наблюдалось в течение всего срока наблюдения. В противоположность результатам, полученным на МПКМ-МК с ВНО, приведены данные, указывающие на отсутствие размножения в этой клеточной культуре в течение 4 сут наблюдения другого представителя рода ортопоксвирусов ВВ (см. табл. 2).

Используя представленные результаты исследований, провели эксперименты по изучению чувствительности к ВНО МПКМ-МК людей (3 человека: 2 вакцинированных против натуральной оспы и 1 невакцинированный), а также уровня вирусной продукции этими клетками, рассчитанных с учетом регистрации данных через 6 сут п. з. о наличии в них вируса или величины его концентрации соответственно. Результаты приведены в табл. 3.

Несмотря на некоторую тенденцию к снижению чувствительности к ВНО моноцитов-макрофагов, полученных из крови вакцинированных оспенной вакциной людей по сравнению с таковой у невакцинированного, существенных различий между величинами ID_{50} этого вируса для моноцитов-макрофагов от 3 добровольцев выявить не удалось (см. табл. 3). Это скорее всего объясняется тем, что забор крови у вакцинированных добровольцев осуществляли через достаточно большой промежуток времени после проведенной вакцинации (1

Таблица 3

Чувствительность к штамму Ind-3a ВНО и его продуктивность для МПКМ-МК 3 человек (2 вакцинированных против натуральной оспы и 1 невакцинированный)

Показатель	Значения показателей для сыворотки и МПКМ-МК крови от 3 человек		
	1*	2**	3**
Титры противооспепных антител в реакции нейтрализации	< 1:4	1:32	> 1:256
ID_{50} ВНО, lg БОЕ ($M \pm I_{95}$, $n = 6$)	-0,13±0,41	0,03±0,33	0,03±0,33
Урожайность вируса, lg БОЕ/млн кл. ($M \pm I_{95}$, $n = 6$)	2,13±0,39	2,87±1,21	2,01±0,45

Примечание. * – человек, не вакцинированный против оспы; ** – вакцинированные против оспы; n – число проб, взятых на разведение вируса; M – среднее значение; I_{95} – 95% доверительный интервал.

и 3 года), когда у них уже отсутствовали активированные моноциты-макрофаги, которые, как известно, появляются и находятся в организме в ранние сроки после введения антигена. Отсутствие достоверных различий между значениями ID_{50} ВНО для моноцитов-макрофагов от 3 добровольцев позволило провести оценку средней величины этого показателя по измерениям, выполненным на всех этих людях ($ID_{50} = -0,02 \pm 0,23$ lg БОЕ; урожайность – $2,34 \pm 1,16$ lg БОЕ/млн кл.).

Если учесть, что основными первичными клетками-мишенями у человека для ВНО, судя по данным, полученным на модельных для ВНО животных (макака циномогус и мышь популяции ICR) [6–8], являются клетки системы мононуклеарных фагоцитов, с которых в основном и начинается инфекционный процесс при этом заболевании, наши данные позволяют оценить чувствительность людей к этому возбудителю инфекции, которая примерно соответствует 1 БОЕ ($-0,02 \pm 0,23$ lg БОЕ) при условии его беспрепятственного взаимодействия в организме человека с клетками такого типа. Следует обратить внимание на то, что результат определения чувствительности людей к ВНО на основе наших экспериментальных данных, полученных на первичных культурах клеток человека (моноцитах-макрофагах), не противоречит таковому (до 1 lg БОЕ) для самих людей, теоретически оцененному по развитию клинической картины заболевания [1, 2].

Кроме размножения ВНО в макрофагах у модельных животных (мышь популяции ICR и макака циномогус), ряд ученых [7] также отмечают репликацию вируса в их предшественниках (моноцитах крови макака циномогус), но только при внутривенном заражении этих животных огромной дозой вируса (9 lg БОЕ). Вероятно, такое размножение данного патогена в моноцитах крови человека тоже может происходить только при геморрагическом типе натуральной оспы, о чем свидетельствует регулярное обнаружение у людей вируса в существенных концентрациях в этой ткани [11–13 и др.], тогда как при обычном клиническом типе заболевания ВНО в крови практически не регистрируется [14–16 и др.]. В связи с этим скорее всего чувствительность макрофагов у человека и приматов к вирусу выше таковой их предшественника (моноцита крови). Несмотря на то что для многих ортопоксвирусных инфекций характерно размножение вируса в клетках системы мононуклеарных фагоцитов чувствительных макроорганизмов, в случае использования ВВ и МПКМ-МК человека не было зарегистрировано вируспродуктивной активности этих клеток. При выполнении аналогичной работы с данным вирусом другие ученые также не обнаружили его размножения в клетках, полученных из человеческих моноцитов [17].

Заключение

В исследованиях, проведенных на различных первичных культурах клеток, полученных из крови не вакцинированного против натуральной оспы человека, с использованием ВНО в дозах 0,001–0,021 БОЕ/кл., была отмечена положительная динамика накопления

вируса только в СПКМК и МПКМ-МК с максимальными значениями его концентраций (5,0–5,5 lg БОЕ/мл) в основном через 6 сут п. з. При этом по данным электронной микроскопии, размножение вируса наблюдалось только в моноцитах-макрофагах, присутствующих в СПКМК и МПКМ-МК. ВВ при испытанных дозах 0,002 и 0,017 БОЕ/кл. не проявлял способности к размножению в МПКМ-МК. Не было обнаружено достоверных различий между двумя вакцинированными против натуральной оспы добровольцами и одним невакцинированным по чувствительности к ВНО и вируспродуктивной активности их моноцитов-макрофагов крови. Чувствительность людей к ВНО по данным, полученным на моноцитах-макрофагах человека, соответствовала ~1 БОЕ (с учетом беспрепятственного взаимодействия вируса с клетками такого типа в организме людей), что подтверждает ранее опубликованные данные о его чувствительности к этому вирусу, теоретически оцененные с учетом развития клинической картины заболевания.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 7–9, 11–13, 16, 17
с м. REFERENCES)

1. Дроздов С.Г., Гарин Н.С., Джиндоян Л.С., Тарасенко В.М. *Основы техники безопасности в микробиологических и вирусологических лабораториях*. М.: Медицина; 1987.
2. Огарков В.И., Гапochko К.Г. *Аэрогенная инфекция*. М.: Медицина; 1975.
3. Жуков В.А., Шишкина Л.Н., Сафатов А.С., Сергеев А.А., Пьянков О.В., Петрищенко В.А. и др. Валидация модифицированного алгоритма прогнозирования восприимчивости хозяина к вирусам с учетом параметров восприимчивости первичных культур клеток-мишеней и факторов врожденного иммунитета. *Вестник РАМН*. 2010; 5: 24–9.
4. Сергеев А.А. *Изучение репродукции вируса гриппа в первичных культурах клеток респираторных органов для прогноза его инфекционности in vivo: Дисс. ... канд. мед. наук*. Кольцово; 2008.
5. Жуков В.А., Шишкина Л.Н., Сергеев А.А., Фанкин И.В., Сметанникова М.А., Пьянков О.В. и др. Изучение возможности прогнозирования чувствительности к гриппу различных отделов респираторного тракта хозяина. *Вестник РАМН*. 2007; 5: 32–7.
6. Сергеев А.А., Кабанов А.С., Булычев Л.Е., Сергеев А.А., Таранов О.С., Титова К.А. и др. Способ оценки активности лечебно-профилактических препаратов против вируса натуральной оспы. Патент РФ № 2522483, 2014.
10. Закс Л. *Статистическое оценивание*. М.: Statistics; 1976.
14. Маренникова С.С., Щелкунов С.Н. *Патогенные для человека ортопоксвирусы*. М.: КМК Scientific Press Ltd.; 1998.
15. Бургасов П.Н., Николаевский Г.П. *Натуральная оспа*. М.: Медицина; 1972.
1. Drozdov S.G., Garin N.S., Dzhindoyan L.S., Tarasenko V.M. *Fundamentals of Safety in Microbiological and Virological Laboratories [Osnovy tekhniki bezopasnosti v mikrobiologicheskikh i virusologicheskikh laboratoriyakh]*. Moscow: Meditsina; 1987. (in Russian)
2. Ogarkov V.I., Gapochko K.G. *Aerogenic Infection [Aerogennaya infektsiya]*. Moscow: Meditsina; 1975. (in Russian)
3. Zhukov V.A., Shishkina L.N., Safatov A.S., Sergeev A.A., P'yankov O.V., Petrishchenko V.A. et al. Validation of the modified algorithm predicting host susceptibility to viruses within the parameters of the susceptibility of primary cultures of target cells and factors of innate immunity. *Vestnik RAMN*. 2010; 5: 24–9. (in Russian)
4. Sergeev A.A. *The Study of the Reproduction of Influenza Virus in Primary Cell Cultures of Respiratory Organs for the Prediction of its Infectivity in Vivo: Diss. Kol'tsovo*; 2008. (in Russian)
5. Zhukov V.A., Shishkina L.N., Sergeev A.A., Fankin I.V., Smetannikova M.A., P'yankov O.V. et al. Study of the possibility predicting sensitivity to various influenza respiratory tract of the host. *Vestnik RAMN*. 2007; 5: 32–7. (in Russian)
6. Sergeev A.A., Kabanov A.S., Bulychev L.E., Sergeev A.A., Taranov O.S., Titova K.A. et al. A Method for Evaluating the Activity of Therapeutic and Prophylactic Drugs Against Smallpox Virus. Patent RF № 2522483, 2014. (in Russian)
7. Jahrling P.B., Hensley L.E., Martinez M.J., LeDuc J.W., Rubins K.H., Relman D.A. et al. Exploring the potential of variola virus infection of cynomolgus macaques as a model for human smallpox. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 2004; 101 (42): 15 197–200.
8. Wahl-Jensen V., Cann J.A., Rubins K.H., Huggins J.W., Fisher R.W., Johnson A.J. et al. Progression of pathogenic events in cynomolgus macaques infected with variola virus. *PLoS One*. 2011; 6 (10): e24832.
9. Lepar-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 (1): 47–52.
10. Zaks L. *Statistical Estimation [Statisticheskoe otsenivanie]*. Moscow: Statistika; 1976. (in Russian)
11. Downie A.W., McCarthy K., Macdonald A., MacCallum F.O., Macrae A.D. Virus and virus antigen in the blood of smallpox patients. Their significance in early diagnosis and prognosis. *Lancet*. 1953; 265 (6778): 164–6.
12. Downie A.W., Fedson D.S., St. Vincent L., Rao A.R., Kempe C.H. Haemorrhagic smallpox. *J. Hyg. (Lond.)*. 1969; 67 (4): 619–29.
13. Mitra A.C., Chatterjee S.N., Sarkar J.K., Manji P., Das A.K. Viraemia in haemorrhagic and other forms of smallpox. *J. Indian Med. Assoc.* 1966; 47 (3): 112–4.
14. Marennikova S.S., Shchelkunov S.N. *Human Pathogenic Orthopoxviruses [Patogennye dlya cheloveka ortopoksvirusy]*. Moscow: KMK Scientific Press Ltd.; 1998. (in Russian)
15. Burgasov P.N., Nikolaevskiy G.P. *Smallpox [Natrual'naya ospa]*. Moscow: Meditsina; 1972. (in Russian)
16. Rao A.R. *Smallpox. Bombay: The Kothari Book Depart.* WorldCat; 1972.
17. Drillien R., Spohner D., Bohbot A., Hanau D. Vaccinia virus-related events and phenotypic changes after infection of dendritic cells derived from human monocytes. *Virology*. 2000; 268 (2): 471–81.

Поступила 24.02.15
Принята в печать 19.03.15