

ОЦЕНКА ИММУНОГЕННОСТИ И ПРОТЕКТИВНОСТИ ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ LIVP-GFP НА ТРЕХ ВИДАХ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

С.Н. Щелкунов, А.А. Сергеев, С.Н. Якубицкий, К.А. Титова, С.А. Пьянков

ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

Резюме. Ликвидация оспы и отсутствие адекватной животной модели оспенной инфекции у человека обуславливает необходимость оценки иммуногенных и протективных свойств создаваемых методами генетической инженерии живых аттенуированных противоспепных вакцин на разных животных моделях ортопоксвирусных инфекций. В данной работе проведено сравнение иммуногенных и протективных свойств рекомбинантного вируса осповакцины (VACV) LIVP-GFP при внутрикожном (в/к) введении мышам, морским свинкам и кроликам. Иммунизирующие дозы вируса LIVP-GFP для всех видов животных составляли 2×10^4 или 2×10^6 БОЕ. Контрольным животным в/к вводили физиологический раствор. Забор проб крови у животных проводили прижизненно через 28 суток после введения вируса LIVP-GFP или физиологического раствора: у мышей — из ретроорбитального венозного синуса, у морских свинок — из сердца, у кроликов — из краевой вены уха. Из образцов крови отдельных особей были получены сыворотки, в которых методом ИФА определяли титр VACV-специфичных антител. На 30-е сутки эксперимента иммунизированных вирусом LIVP-GFP и контрольных животных интраназально заражали летальными дозами соответствующих ортопоксвирусов, к которым каждый вид животных чувствителен. Мышей заражали вирусом оспы коров (CPXV) GRI-90 в дозе 68 ЛД₅₀, морских свинок — VACV GPA в дозе 56 ЛД₅₀, кроликов — VACV HB-92 в дозе 100 ЛД₅₀. Все контрольные животные после этого погибли, а все животные, иммунизированные аттенуированным рекомбинантным вирусом LIVP-GFP в дозе 2×10^6 БОЕ, выжили. При иммунизирующей дозе LIVP-GFP 2×10^4 БОЕ выжило 88% мышей после заражения CPXV, 67% кроликов после инфекции VACV HB-92 и 50% морских свинок после заражения VACV GPA. Данные ИФА сывороток крови показали корреляцию уровня VACV-специфичных антител с уровнем протективности, индуцируемым у соответствующих животных. На основании полученных результатов можно заключить, что все три изученные пары «лабораторное животное — ортопоксвирус» позволяют дать адекватную оценку иммуногенности и протективности создаваемых современных аттенуированных вакцин против оспы и других ортопоксвирусных инфекций человека. При этом мыши линии BALB/c являются наиболее удобным объектом исследования.

Ключевые слова: вирус осповакцины, аттенуация, иммунный ответ, антитела, протективность, ортопоксвирусы.

Адрес для переписки:

Щелкунов Сергей Николаевич
630559, Россия, Новосибирская область, р.п. Кольцово,
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.
Тел.: 8 903 939-94-80. Факс: 8 383 336-74-09.
E-mail: snshchel@vector.nsc.ru, snshchel@rambler.ru

Contacts:

Sergei N. Shchelkunov
630559, Russian Federation, Novosibirsk Region, Koltsovo,
State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector".
Phone: +7 903 939-94-80. Fax: +7 383 336-74-09.
E-mail: snshchel@vector.nsc.ru, snshchel@rambler.ru

Для цитирования:

Щелкунов С.Н., Сергеев А.А., Якубицкий С.Н., Титова К.А., Пьянков С.А.
Оценка иммуногенности и протективности вируса осповакцины LIVP-GFP на трех видах лабораторных животных // Инфекция и иммунитет.
2021. Т. 11, № 6. С. 1167–1172. doi: 10.15789/2220-7619-AIA-1668

Citation:

Shchelkunov S.N., Sergeev A.A., Yakubitskiy S.N., Titova K.A., Pyankov S.A.
Assessing immunogenicity and protectiveness of the vaccinia virus LIVP-GFP in three laboratory animal models // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 6, pp. 1167–1172. doi: 10.15789/2220-7619-AIA-1668

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 19-14-00006).

This work was financially supported by the Russian Science Foundation (grant 19-14-00006).

ASSESSING IMMUNOGENICITY AND PROTECTIVENESS OF THE VACCINIA VIRUS LIVP-GFP IN THREE LABORATORY ANIMAL MODELS

Shchelkunov S.N., Sergeev A.A., Yakubitskiy S.N., Titova K.A., Pyankov S.A.

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Abstract. Smallpox eradication and lack of adequate animal model for smallpox infection underlies a necessity to assess immunogenic and protective properties of genetic engineering-created live attenuated smallpox vaccines in several animal models of orthopoxviral infections. Here we compared immunogenic and protective properties of the recombinant vaccinia virus (VACV) LIVP-GFP intradermally (i.d.) inoculated to mice, guinea pigs and rabbits. LIVP-GFP immunization in all animal species was applied at dose of 2×10^4 or 2×10^6 PFU. Control animals were injected with saline. Blood sampling was performed on day 28 after virus LIVP-GFP or saline inoculation. Blood samples were taken intravitally from the retro-orbital venous sinus in mice, heart in guinea pigs or marginal ear vein in rabbits. Serum samples were isolated by precipitating blood cells via centrifugation. The serum anti-VACV IgG titers were determined by ELISA. On day 30 post-immunization animals were intranasally challenged with lethal dose of host specific orthopoxvirus species. Mice were infected by cowpox virus (CPXV) strain GRI-90 at dose 68 LD₅₀, guinea pigs – by VACV GPA at dose 56 LD₅₀, rabbits – by VACV HB-92 at dose 100 LD₅₀. All animals in control group died afterwards, whereas all animals immunized by attenuated recombinant virus LIVP-GFP at dose 2×10^6 PFU survived. In case of the LIVP-GFP immunization at dose 2×10^4 PFU, 88% of mice, 67% of rabbits and 50% of guinea pigs survived after being challenged with species-specific CPXV, VACV HB-92, and VACV GPA. ELISA data for the blood serum samples revealed a correlation between level of VACV-specific antibodies and level of protection in animal species. Based on the data obtained, it could be concluded that all three "animal–orthopoxvirus" models allow to provide with a proper evaluation of immunogenicity and protectiveness for generated modern attenuated vaccines against smallpox and other orthopoxviral human infections. Upon that, it was shown that BALB/c mouse strain was the most convenient investigational host species.

Key words: vaccinia virus, attenuation, immune response, antibodies, protectiveness, orthopoxviruses.

Введение

Вирус осповакцины (*Vaccinia virus*, VACV) стал живой противооспенной вакциной, с помощью которой впервые удалось ликвидировать особо опасное инфекционное заболевание человека [5]. Несмотря на то, что в 1980 г. было объявлено об искоренении оспы и рекомендовано прекратить противооспенную вакцинацию, интерес к VACV вскоре возобновился в связи с возникшей возможностью генноинженерной реконструкции генома этого вируса при направленной встройке чужеродных генов или удалении (делеции) определенных вирусных генов. Такая геномная технология позволила получать стабильно аттенуированные штаммы VACV, продуцирующие антигены различных инфекционных агентов. Создаваемые на основе VACV поливалентные живые вакцины обеспечивают индукцию как антительного, так и Т-клеточного иммунных ответов на чужеродные антигены [11]. В связи с возрастающей угрозой возникновения в результате естественной эволюции ортопоксвирусов, патогенных для человека, в последние годы важной задачей стало создание методами генетической инженерии живых аттенуированных вакцин против ортопоксвирусов [3, 11, 12].

В зависимости от животной модели или способа введения VACV с направленно нарушенными генами вирус может проявлять сниженную в разной степени вирулентность [4, 7, 8, 13], что может обеспечивать разные уровни иммун-

ного ответа на инфекцию. Поэтому при доклинических исследованиях новых кандидатных вакцин на основе VACV необходимо использовать разные животные модели ортопоксвирусных инфекций. При инфицировании мышей тремя разными способами (интраназальным (и/н), внутрикожным (в/к), подкожным) нами было показано, что оптимальным по соотношению «патогенность/иммуногенность» для штамма VACV LIVP-GFP с нарушенным геном тимидинкиназы является в/к введение [2].

Цель данной работы — впервые провести сравнение иммуногенности и протективности (защитного эффекта) аттенуированного штамма LIVP-GFP VACV при его в/к введении мышам линии BALB/c, беспородным морским свинкам или кроликам породы «Шиншилла».

Материалы и методы

Вирусы. В работе использовали следующие штаммы, полученные из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора: штамм GRI-90 вируса оспы коров (CPXV) [1]; штамм LIVP-GFP VACV [9]; штамм HB-92, выделенный из ткани головного мозга кролика породы «Шиншилла», интрацеребрально (и/ц) инфицированного вирусом VACV LIVP; адаптированный к морским свинкам штамм GPA, полученный в результате пассирования штамма HB-92 VACV при и/ц (5 пассажей) и и/н (3 пассажа) заражении морских свинок.

Животные. Поскольку в предварительных экспериментах на животных разного пола не выявили достоверных различий у самок и самцов в уровне антител, синтезируемых в ответ на иммунизацию VACV, в данной работе использовали разнополых животных. В исследованиях использовали инбредных 5–6-недельных мышей линии BALB/c массой 13–16 г, беспородных 4-недельных морских свинок массой 210–230 г и 4-месячных кроликов породы «Шиншилла» массой 3,0–3,5 кг, полученных из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Подопытных животных содержали на стандартном рационе с достаточным количеством воды согласно ветеринарному законодательству и в соответствии с требованиями по гуманному содержанию и использованию животных в экспериментальных исследованиях. Исследования и манипуляции на животных были проведены с одобрения комитета по биоэтике ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (Протокол № 08-09.2020 от 25.09.2020).

Манипуляции с животными. В/к введение вирусного препарата либо физиологического раствора (ФР) осуществляли мышам в корень хвоста в объеме 30 мкл, морским свинкам — в область таза с предварительно удаленным шерстяным покровом в объеме 100 мкл, кроликам — в область холки с предварительно удаленным шерстяным покровом в объеме 100 мкл. Инфицирующие дозы вируса LIVP-GFP для всех видов животных составляли 2×10^4 или 2×10^6 БОЕ. Каждая группа экспериментальных животных состояла из 6–8 мышей, 4–6 морских свинок и 3–6 кроликов. Всего в экспериментах было задействовано 46 мышей, 34 морские свинки и 25 кроликов.

Забор проб крови у животных проводили прижизненно через 28 суток после введения препаратов: у мышей — из ретроорбитального венозного синуса с помощью одноразовых стерильных капилляров, у морских свинок — из сердца с помощью шприца объемом 5 мл, у кроликов — из краевой вены уха путем ее прокалывания иглой от шприца объемом 2,5 мл. Из образцов крови отдельных особей была получена сыворотка путем осаждения ее форменных элементов с помощью центрифугирования при 3000–4000 г в течение 7–10 мин. Полученные сыворотки были термически инактивированы при температуре 56°C в течение 30 мин и хранились при минус 20°C.

На 30-е сутки эксперимента (второй день после взятия крови) в/к иммунизированных вирусом LIVP-GFP и контрольных (в/к инъецированных ФР) животных и/н заражали летальными дозами соответствующих ортопоксвирусов. Мышей заражали CPXV GRI-90 в дозе 68 ЛД₅₀, морских свинок — VACV GPA в дозе 56 ЛД₅₀,

кроликов — VACV HB-92 в дозе 100 ЛД₅₀. За животными наблюдали в течение 14 суток и регистрировали у них клинические проявления инфекции и гибель.

Иммуноферментный анализ сывороток крови экспериментальных животных. Титр антител к антигенам (вирионным белкам) VACV LIVP определяли методом ИФА. Использовали «Набор реагентов для иммуноферментного выявления антител к антигенам поксвирусов “Вектор ИФА Покс-АТ” для научных исследований» по ТУ 21.10.60-085-05664012-2019 (далее по тексту — набор реагентов «Вектор ИФА Покс-АТ»). Набор зарегистрирован в Росстандарте России, ФБУ Новосибирский ЦСМ, КЛП № 080/007372 от 03.07.2019. Основой набора является иммуносорбент, на поверхности лунок которого иммобилизован очищенный на сахарозе препарат вирионов VACV LIVP. При выявлении антител в крови животных использован пероксидазный конъюгат белка *A. S. aureus*.

Для сравнения концентрации специфических IgG к VACV в различных образцах применяли титрование. Каждый исследуемый образец в дубле разводили предварительно 1:10 в растворе для предварительного разведения образцов с использованием планшета для предварительного разведения согласно инструкции. Затем предварительно разведенный образец в объеме 20 мкл вносили в верхнюю лунку вертикального ряда планшета-иммуносорбента со 180 мкл раствора для разведения образцов (РРО). Таким образом получали разведение образца 1:100. Перемешивали пипетированием, отбирали 100 мкл и переносили в лунку ниже со 100 мкл РРО, затем после перемешивания в лунку ниже со 100 мкл РРО и т. д. до восьмой нижней лунки вертикального ряда. Получали дублированную серию последовательных двукратных разведений $\times 100$, $\times 200$, $\times 400$, $\times 800$, $\times 1600$, $\times 3200$, $\times 6400$, $\times 12\ 800$ раз.

Каждый планшет содержал 1 лунку со 100 мкл положительного контрольного образца и 2 лунки по 100 мкл отрицательного контрольного образца.

Анализ результатов проводили согласно инструкции по применению «Вектор ИФА Покс-АТ». Он позволял выявить положительные образцы, то есть имеющие титр не менее 1:100. Для положительных результатов определяли титры. На каждое разведение сыворотки было использовано по 2 лунки планшета (2 повтора). По результатам измерения оптической плотности (ОП) двух лунок рассчитывали среднее арифметическое значение ОП для данного разведения. Далее по инструкции по применению набора рассчитывали критическую оптическую плотность (ОП_{крит}) для планшета, которая является верхним пределом фоновых значений отрицательных контролей.

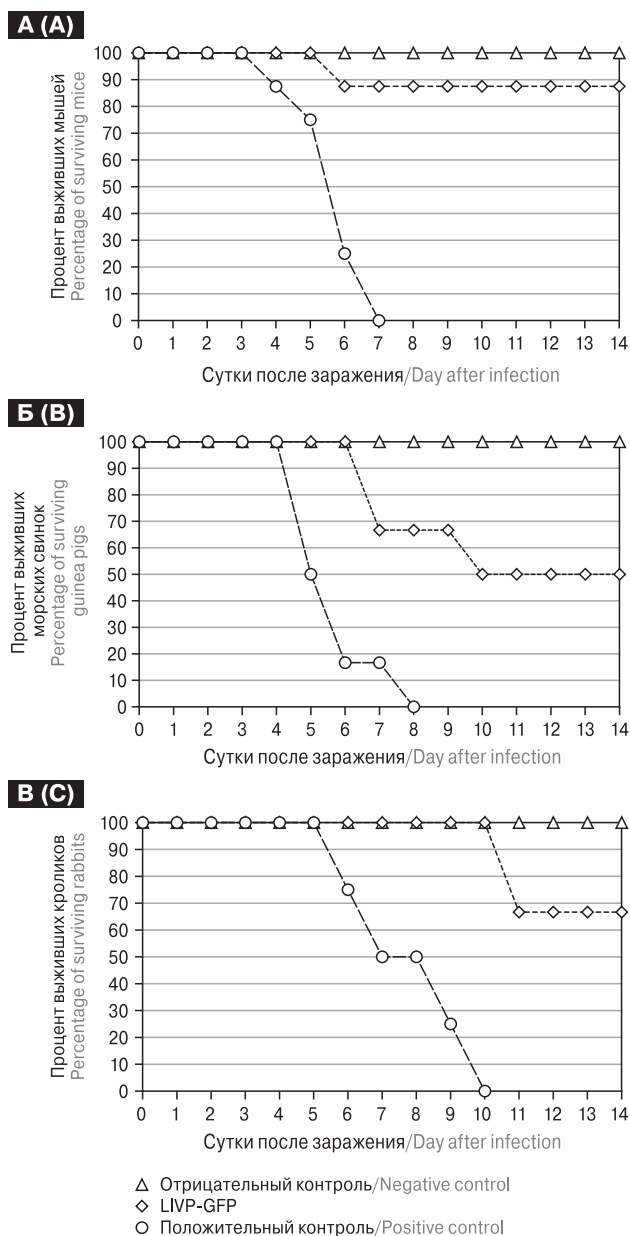


Рисунок 1. Динамика гибели мышей (А), морских свинок (Б) и кроликов (В), иммунизированных VACV L1VP-GFP в дозе 10^4 БОЕ/животное, при интраназальном заражении летальными дозами CPXV GRI-90 (А), VACV GPA (Б), VACV HB-92 (В)

Figure 1. Mortality rate in mice (A), guinea pigs (B) or rabbits (C) immunized by VACV L1VP-GFP at dose 10^4 PFU/animal after intranasal challenge at lethal doses with CPXV GRI-90 (A), VACV GPA (B) or VACV HB-92 (C)

Примечание. Приведены данные для групп животных, иммунизированных вирусом L1VP-GFP, а также групп, не иммунизированных L1VP-GFP и не инфицированных (отрицательный контроль) или зараженных (положительный контроль) соответствующим летальным ортопоксвирусом.

Note. Data for animal groups immunized with virus L1VP-GFP or groups unimmunized with L1VP-GFP and uninfected (negative control) or infected (positive control) by corresponding lethal species-specific orthopoxvirus.

Затем проводили сравнение среднеарифметических значений ОП разведений с ОП_{крит} для планшета. Титром сыворотки было последнее разведение со значением ОП больше ОП_{крит}.

Статистический анализ. Статистическую обработку полученных данных проводили стандартными методами, используя пакет компьютерных программ Statistica 10.0 (StatSoft Inc. 1984–2001). Нормальность распределения титров антител в сыворотках крови животных оценивали с помощью W-критерия Шапиро–Уилка. В связи с тем, что нормальность распределения титров антител в сыворотках крови иммунизированных дозой 2×10^4 БОЕ L1VP-GFP VACV животных была установлена при $p > 0,05$ только для мышей, межвидовые сравнения титров антител для мышей, морских свинок и кроликов проводили с помощью непараметрического метода — U-критерия Манна–Уитни с определением двусторонней вероятности (p-value). Коэффициент корреляции между индуцированными разными дозами L1VP-GFP VACV титрами антител у животных и наблюдаемыми уровнями защиты от гибели определяли методом Спирмена [10]. Расчет 50% летальной дозы (ЛД₅₀) производили на основании показателей количества погибших животных по методу Спирмена–Кербера [10].

Результаты и обсуждение

Возрастающая в последние годы опасность перехода локальных вспышек зоонозных ортопоксвирусных инфекций среди людей в распространенные эпидемии остро ставит вопрос о необходимости создания живых аттенуированных вакцин нового поколения против этих инфекций и использования адекватных животных моделей для оценки их иммуногенных свойств [3, 8, 13].

В подавляющем большинстве работ свойства создаваемых штаммов VACV изучают на лабораторных мышах [2, 4, 7, 8, 13]. Это обусловлено тем, что мышьяная модель обладает способностью имитировать иммунный ответ на инфекцию VACV, наблюдаемый при противооспенной иммунизации людей. Показано, что суммарные антитела, синтезируемые в организме мышей в ответ на VACV-вакцинацию, узнают схожий спектр вирионных белков, с которыми взаимодействуют антитела сывороток крови вакцинированных пациентов [6].

Расширение спектра биологических систем для оценки свойств кандидатных противооспенных вакцин позволит получать более корректные данные об их иммуногенных и протективных свойствах на этапе доклинических исследований. Поэтому нами проведено сравнение таких свойств аттенуированного штамма L1VP-GFP при в/к иммунизации им не только мышей, но и морских свинок и кроликов.

Для в/к иммунизации мышей, морских свинок и кроликов использовали дозы вирусов 2×10^6 и 2×10^4 БОЕ/животное. В/к способ иммунизации использовали как наиболее оптимальный по соотношению «иммуногенность—вирулентность» [2]. Для всех трех видов животных прижизненный отбор крови и получение сывороток производили на 28 сутки после иммунизации. Сыворотки анализировали на уровни антител методом ИФА.

На 30 сутки эксперимента иммунизированных VACV L1VP-GFP и контрольных (инъекцированных ФР) животных и/н заражали летальными дозами соответствующих ортопоксвирусов, к которым каждый вид животных чувствителен.

Все контрольные (не иммунизированные) животные в результате таких заражений погибли: мыши на 4–7 сутки, морские свинки на 5–8 сутки, кролики на 6–10 сутки после инфицирования (рис. 1). Животные всех трех изученных видов, иммунизированные рекомбинантным вирусом L1VP-GFP в дозе 2×10^6 БОЕ, выжили после использования летальных доз соответствующих ортопоксвирусов.

При иммунизирующей дозе L1VP-GFP 2×10^4 БОЕ выжило после заражения 68 ЛД₅₀ CPXV 7 из 8 (88%) мышей. При той же дозе иммунизации вирусом L1VP-GFP выжило 4 из 6 (67%) кроликов после инфекции 100 ЛД₅₀ VACV NB-92. У морских свинок такая доза иммунизации обеспечивала защиту лишь 50% из 6 животных после заражения 56 ЛД₅₀ VACV GPA (рис. 1).

Данные ИФА сывороток крови (рис. 2А) для меньшей дозы иммунизации (2×10^4 БОЕ) показали высокую корреляцию (коэффициент корреляции $r = 0,95$, $p < 0,005$) уровня VACV-специфичных антител с уровнем протективности, индуцируемым у соответствующих животных.

Таким образом, выполненные эксперименты показали, что все три изученные пары «лабораторное животное – ортопоксвирус» позволяют дать адекватную оценку иммуногенности и протективности создаваемых аттенуированных вариантов противооспенных вакцин новейших поколений. При этом линейные мыши являются наиболее удобным объектом исследования, поскольку обеспечивают при меньших затратах выполнение экспериментов на большем числе животных.

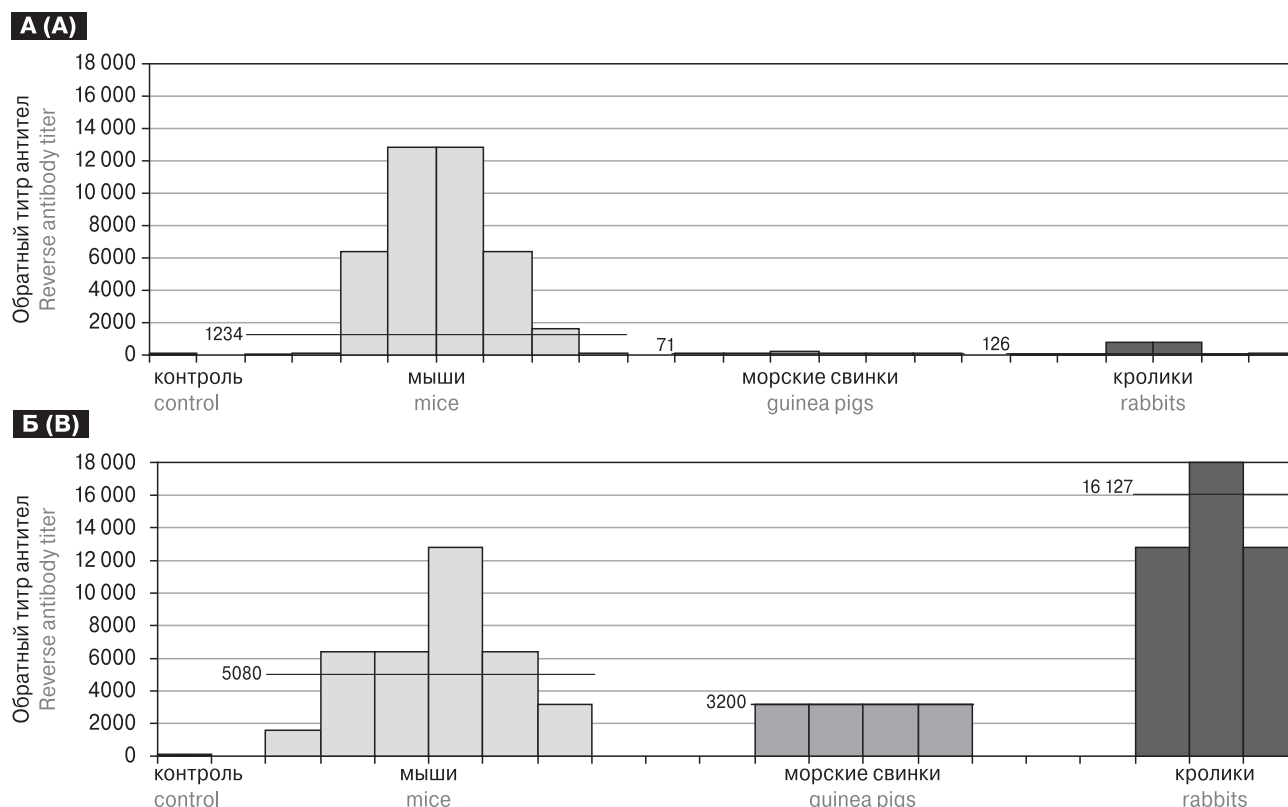


Рисунок 2. Определенные методом ИФА титры VACV-специфичных антител в сыворотке крови мышей, морских свинок и кроликов, инфицированных VACV L1VP-GFP в дозах 10^4 БОЕ (А) и 10^6 БОЕ (Б)
Figure 2. Serum VACV-specific antibody titer in mice, guinea pigs or rabbits infected by 10^4 PFU (A) and 10^6 PFU (B) VACV L1VP-GFP assessed by ELISA

Примечание. Указано среднее геометрическое значение обратного титра для каждой группы животных.
Note. The geometric mean of the back titer is indicated for each group of animals.

Список литературы/References

1. Маренникова С.С., Гашников П.В., Жукова О.А., Рябчикова Е.И., Стрельцов В.В., Рязанкина О.И., Чекунова Э.В., Янова Н.Н., Щелкунов С.Н. Биотип и генетическая характеристика изолята вируса оспы коров, вызвавшего инфекцию ребенка // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1996. № 4. С. 6–10. [Marennikova S.S., Gashnikov P.V., Zhukova O.A., Riabchikova E.I., Strel'tsov V.V., Riazankina O.I., Chekunova E.V., Yanova N.N., Shchelkunov S.N. Biotype and genetic characterization of the isolate of cowpox virus having caused infection in a child. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 1996, no. 4, pp. 6–10. (In Russ.)]
2. Щелкунов С.Н., Сергеев А.А., Кабанов А.С., Якубицкий С.Н., Бауэр Т.В., Пьянков С.А. Патогенность и иммуногенность вариантов вируса осповакцины при разных способах введения мышам // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 2. С. 357–364. [Shchelkunov S.N., Sergeev A.A., Kabanov A.S., Yakubitskiy S.N., Bauer T.V., Pyankov S.A. Route-coupled pathogenicity and immunogenicity of vaccinia virus variant inoculated mice. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2021, vol. 11, no. 2, pp. 357–364. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-PAI-1375
3. Щелкунов С.Н., Щелкунова Г.А. Нужно быть готовыми к возврату оспы // Вопросы вирусологии. 2019. Т. 64, № 5. С. 206–214. [Shchelkunov S.N., Shchelkunova G.A. We should be prepared to smallpox re-emergence. *Voprosy Virusologii = Problems of Virology*, 2019, vol. 64, no. 5, pp. 206–214. (In Russ.)] doi: 10.36233/0507-4088-2019-64-5-206-214
4. Belyakov I.M., Earl P., Dzutsev A., Kuznetsov V.A., Lemon M., Wyatt L.S., Snyder J.T., Ahlers J.D., Franchini G., Moss B., Berzofsky J.A. Shared models of protection against poxvirus infection by attenuated and conventional smallpox vaccine viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, vol. 100, pp. 9458–9463. doi: 10.1073/pnas.1233578100
5. Fenner F., Henderson D.A., Arita I., Jezek Z., Ladnyi I.D. Smallpox and its eradication. Geneva: WHO, 1988. 1460 p.
6. Jones-Trower A., Garcia A., Meseda C.A., He Y., Weiss C., Kumar A., Weir J.P., Merchlinsky M. Identification and preliminary characterization of vaccinia virus (Dryvax) antigens recognized by vaccinia immune globulin. *Virology*, 2005, vol. 343, pp. 128–140. doi: 10.1016/j.virol.2005.08.008
7. Lin L.C.W., Flesch I.E.A., Tschärke D.C. Immunodomination during peripheral vaccinia virus infection. *PLoS Pathog.*, 2013, vol. 9: e1003329. doi: 10.1371/journal.ppat.1003329
8. Moss B. Smallpox vaccines: targets of protective immunity. *Immunol. Rev.*, 2011, vol. 239, no. 1, pp. 8–26. doi: 10.1111/j.1600-065X.2010.00975.x
9. Petrov I.S., Goncharova E.P., Pozdnyakov S.G., Shchelkunov S.N., Zenkova M.A., Vlasov V.V., Kolosova I.V. Antitumor effect of the LIVP-GFP recombinant vaccinia virus. *Doklady Biological Sciences*, 2013, vol. 451. no. 1, pp. 248–252. doi: 10.1134/S0012496613040133
10. Sachs L. Statistische Auswertungsmethoden. Springer Verlag: Heidelberg, Germany, 1972. 193 p.
11. Sanchez-Sampedro L., Perdiguero B., Mejias-Perez E., Garcia-Arriaza J., Di Pilato M., Esteban M. The evolution of poxvirus vaccines. *Viruses*, 2015, vol. 7, pp. 1726–1803. doi: 10.3390/v7041726
12. Shchelkunov S.N. Emergence and reemergence of smallpox: the need in development of a new generation smallpox vaccine. *Vaccine*, 2011, vol. 29S, pp. D49–D53. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.05.037
13. Smith G.L., Benfield C.T.O., de Motes C.M., Mazzon M., Ember S.W.J., Ferguson B.J., Sumner R.P. Vaccinia virus immune evasion: mechanisms, virulence and immunogenicity. *J. Gen. Virol.*, 2013, vol. 94, pp. 2367–2392. doi: 10.1099/vir.0.055921-0

Авторы:

Щелкунов С.Н., д.б.н., профессор, главный научный сотрудник отдела геномных исследований ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия;

Сергеев А.А., к.б.н., ведущий научный сотрудник отдела «Коллекция микроорганизмов» ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия;

Якубицкий С.Н., младший научный сотрудник отдела геномных исследований ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия;

Титова К.А., младший научный сотрудник отдела «Коллекция микроорганизмов» ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия;

Пьянков С.А., ведущий научный сотрудник отдела «Коллекция микроорганизмов» ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия.

Authors:

Shchelkunov S.N., PhD, MD (Biology), Professor, Head Researcher, Department of Genomic Research, SRC VB "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation;

Sergeev A.A., PhD (Biology), Leading Researcher, Department of Microorganisms Collection, SRC VB "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation;

Yakubitskiy A.S., Junior Researcher, Department of Genomic Research, SRC VB "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation;

Titova K.A., Junior Researcher, Department of Microorganisms Collection, SRC VB "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation;

Pyankov S.A., Leading Researcher, Department of Microorganisms Collection, SRC VB "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation.

Поступила в редакцию 17.01.2021
Отправлена на доработку 24.07.2021
Принята к печати 05.08.2021

Received 17.01.2021
Revision received 24.07.2021
Accepted 05.08.2021