



Оптимизированный метод подсчета количества вирусных частиц с помощью электронной микроскопии

Б.Н. Зайцев , О.С. Таранов, Н.Б. Рудометова, Н.С. Щербакова, А.А. Ильичев, Л.И. Карпенко

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


 e-mail: zaitsev@vector.nsc.ru

Вирусы поражают все типы организмов, от растений и животных до бактерий и архей. При исследовании образцов, содержащих вирусы, неизбежно встает вопрос количественного определения вирусных частиц в пробе. Одна из наиболее простых и эффективных методик количественного определения вирусных частиц в препарате – использование электронной микроскопии, однако основным ограничением метода является относительно высокий предел обнаружения (10^7 частиц/мл). Часто такая чувствительность недостаточна и может приводить к ошибочной диагностике. Цель данной работы заключалась в разработке методики, позволяющей более точно оценивать количество вирусных частиц и работать с образцами, в которых концентрация ниже, чем 10^7 частиц/мл. Метод заключается в концентрировании вирусных частиц на мембране из полиэфирсульфона, применяемой в центрифужных концентраторах, с последующим подсчетом с помощью электронной микроскопа. В качестве модельного объекта были выбраны env-псевдовирусы, созданные с использованием лентивирусной системы, которая позволяет получать стандартизованные образцы вирусоподобных частиц. Суспензию вирусных частиц (объемом 20 мл) помещали в центрифужный концентратор и центрифугировали. Затем извлекали мембрану из концентратора и оценивали количество осажденных на мембране частиц с помощью электронного микроскопа, используя метод ультратонких срезов. Количество вирусных частиц на всей поверхности фильтра (площадь 4 cm^2) составляло 4×10^7 вирионов, исходная концентрация псевдовирусов в образце – 2×10^6 на 1 мл (4×10^7 частиц/20 мл). Таким образом, предложенная методика позволяет преодолеть основной недостаток количественного определения вирусов с помощью электронной микроскопии, связанный с относительно высоким пределом обнаружения (10^7 частиц/мл). Кроме того, центрифужный концентратор дает возможность последовательно прогнать через один и тот же фильтр значительные объемы суспензии, содержащей вирусы, что также может привести к повышению чувствительности метода. Предложенный подход позволяет повысить чувствительность, точность и воспроизводимость количественного анализа различных образцов, содержащих вирусы животных, растений и человека, с использованием электронной микроскопии.


Ключевые слова: электронная микроскопия; псевдовирусы; концентрирование; количество вирусных частиц.

Для цитирования: Зайцев Б.Н., Таранов О.С., Рудометова Н.Б., Щербакова Н.С., Ильичев А.А., Карпенко Л.И. Оптимизированный метод подсчета количества вирусных частиц с помощью электронной микроскопии. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(3):337-342. DOI 10.18699/VJ19.498

An optimized method for counting viral particles using electron microscopy

B.N. Zaitsev , O.S. Taranov, N.B. Rudometova, N.S. Shcherbakova, A.A. Ilyichev, L.I. Karpenko

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia

 e-mail: zaitsev@vector.nsc.ru

Viruses can infect all types of life forms, from animals and plants to microorganisms, including bacteria and archaea. When studying samples containing viruses, one confronts an unavoidable question of the quantitative determination of viral particles in the sample. One of the simplest and efficient approaches to quantitative determination of viral particles in preparation includes the use of electron microscopy; however, a high detection threshold is a significant limitation of this method (10^7 particles per ml). Usually, such sensitivity is insufficient and can result in error diagnosis. This study aims to develop a method making it possible to detect the number of viral particles more precisely and work with samples in which the concentration of particles is lower than 10^7 /ml. The method includes a concentration of viral particles on the polyethersulfone membrane applied in centrifugal concentrators and subsequent calculation using an electron microscope. We selected env-pseudoviruses using a lentiviral system making it possible to obtain standardized samples of virus-like particles that are safer than a live virus. Suspension of viral particles (a volume of 20 ml) was placed into the centrifugal concentrator and centrifuged. After that, we took a membrane out of the centrifugal concentrator and evaluated the number of particles on the ultrathin section using an electron microscope. The number of viral particles on the whole surface of the filter (a square of 4 cm^2) was 4×10^7 virions, the initial concentration of pseudoviruses in the sample was 2×10^6 per 1 ml (4×10^7 particles per 20 ml). As a result, the developed method enables one to evade the major disadvantage of quantitative determination of viruses using

electron microscopy regarding a high detection threshold (concentration of particles 10^7 /ml). Furthermore, the centrifugal concentrator makes it possible to sequentially drift a considerable volume of the suspension through the filter resulting in enhancement of test sensitivity. The developed approach results in increased sensitivity, accuracy, and reproducibility of quantitative analysis of various samples containing animal, plant or human viruses using electron microscopy.

Key words: electron microscopy; pseudoviruses; concentrating; number of viral particles.

For citation: Zaitsev B.N., Taranov O.S., Rudometova N.B., Shcherbakova N.S., Ilyichev A.A., Karpenko L.I. An optimized method for counting viral particles using electron microscopy. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(3):337-342. DOI 10.18699/VJ19.498 (in Russian)

Введение

В наши дни интерес к вирусам неизмеримо возрос. Вирусы поражают все типы организмов, от растений и животных до бактерий и архей. Согласно последнему релизу Международного комитета по таксономии вирусов (International Committee on Taxonomy of Viruses), в настоящее время известно почти 5 тыс. видов вирусов, и каждый год открываются новые.

Важным звеном в системе защиты от инфекционных заболеваний является своевременная диагностика, которая определяет применение адекватных профилактических мер и эффективность лечебных мероприятий в дальнейшем. Однозначно положительным результатом диагностики считается визуальное обнаружение возбудителя инфекции микроскопическими методами и его идентификация. Для исследования вирусов широко используют методы электронной микроскопии (Goldsmith, Miller, 2009). Помимо диагностических целей, электронную микроскопию применяют также для структурных исследований наночастиц, таких как искусственные вирусоподобные частицы, созданные в целях конструирования вакцин и для геномных исследований. Электронная микроскопия не только позволяет идентифицировать отдельные наноразмерные объекты, но и дает важную информацию об их морфологических характеристиках, степени сохранности при воздействии на них различных физических и химических (в том числе фармакологических) факторов, позволяет определить их содержание в биологических жидкостях. Последнее в ряде случаев достигается только с помощью методов электронной микроскопии.

Основное препятствие для применения электронной микроскопии в исследовании вирусных объектов – недостаточная для их обнаружения концентрация частиц в жидкостях. При использовании наиболее простого и популярного метода негативного контрастирования концентрация вирионов (или других нанообъектов) должна быть не менее 10^7 частиц/мл (Reid et al., 2002; Malenovska, 2013). Но часто такая чувствительность недостаточна и может приводить к ошибочной диагностике. В настоящее время для повышения чувствительности метода широко используется концентрирование наноразмерных частиц с помощью ультрацентрифугирования. Метод позволяет увеличить концентрацию исследуемых частиц в единице объема примерно в тысячу раз. Однако при этом для исследования требуется дорогостоящее оборудование и продолжительное время подготовки образцов.

В нашей работе представлена оригинальная методика, позволяющая более точно оценивать количество вирусных частиц на примере env-псевдовирюсов.

Материалы и методы

Получение псевдовирюсов и их характеризацию проводили согласно ранее описанной методике (Рыжиков и др., 2012), с небольшими модификациями. Клетки HEK293T/17 высевали в концентрации 5×10^5 клеток/лунку в 6-луночный культуральный планшет и инкубировали в CO_2 -инкубаторе при $+37^\circ\text{C}$ в среде DMEM, содержащей 10 % фетальную бычью сыворотку, 600 мг/мл L-глутамина и 50 мкг/мл гентамицина. Для получения псевдовирюсов проводили трансфекцию клеток HEK293T одновременно двумя плазмидами: pcDNA3.1env (SF162.LS) (NIH) и backbone pSG3 Δ env (дефектной по гену *env*) с использованием реагента MATra (PromoKine) по протоколу, рекомендованному фирмой-изготовителем. Планшеты помещали в CO_2 -инкубатор и инкубировали при $+37^\circ\text{C}$. Через 4–6 ч производили смену среды в планшетах. Через 48 ч инкубации собирали культуральную среду. От клеток псевдовирюсы отделяли путем низкоскоростного центрифугирования с последующей фильтрацией через нитроцеллюлозный фильтр с диаметром пор 0.45 мкм. Полученные препараты псевдовирюсов хранили при -80°C в среде DMEM, содержащей 20 % фетальной бычьей сыворотки.

Определение функциональной активности. У полученных псевдовирюсов определяли функциональную активность при помощи клеток TZM-bl. В лунки 96-луночного культурального планшета вносили по 5×10^4 клеток TZM-bl, далее добавляли по 50 мкл суспензии исследуемых env-псевдовирюсов, по четыре лунки для каждого псевдовирюса. Планшеты инкубировали при 37°C и 5 % CO_2 . Через 48 ч инкубации в клетках определяли люциферазную активность при помощи набора LAR (Promega) согласно рекомендации производителя. В качестве контроля использовали клетки TZM-bl без псевдовирюса. Сигнал люминесценции определяли на люцинометре STATFAX® 4400 (Lumate) и выражали в относительных единицах люминесценции (relative light units – RLU). Интенсивность люминесценции коррелирует с количеством псевдовирюса, попавшего в клетку (Рыжиков и др., 2012). Env-псевдовирюсы использовали в дальнейшей работе, если значение RLU превышало двукратное значение спонтанной люминесценции клеток TZM-bl в 50 раз и более.

Электронная микроскопия. Очищенный от клеток супернатант, содержащий псевдовирюсные частицы, фиксировали добавлением равного объема 8 % раствора параформальдегида. Время фиксации – 48 ч при $+4^\circ\text{C}$.

Для контрольного подсчета, изучения размеров и формы вирусоподобных частиц использовали общепринятый метод негативного контрастирования (Harris, Horne,

1994). Супернатант наносили на медные сеточки для электронной микроскопии, покрытые пленкой-подложкой из формвара, стабилизированной углеродом. Препараты окрашивали 2 % водным раствором уранилацетата.

Культуру клеток отделяли от поверхности с помощью резинового шпателя, фиксировали в 4 % растворе параформальдегида при +4 °С в течение 24 ч. Промывали в буферном растворе, дополнительно фиксировали 1 % раствором осмиевой кислоты, обезвоживали по общепринятой методике в растворах этилового спирта возрастающей концентрации и ацетоне, заливали в смесь эпон-аралдит. Процедура описана ранее (Sergeev et al., 2016). Полутонкие (1 мкм) и ультратонкие (50–60 нм) срезы готовили на микротоме Райхерт-Янг (Австрия). Полутонкие срезы окрашивали раствором азура-П и исследовали с помощью светового микроскопа AxioImagerZ1 (Zeiss, Германия). Ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца, исследовали на электронном микроскопе JEM 1400 (Jeol, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ. Микросъемка, анализ и обработка изображения осуществлялись с помощью цифровой камеры Veleta (SIS, Германия) и программного пакета iTEM (SIS, Германия).

Концентрирование псевдовirusа. 20 мл очищенного от клеток супернатанта последовательно прогоняли через центрифужный концентратор Vivaspin 6 (300 000 MWCO) (Sartorius, Великобритания) порциями по 5 мл (5 мин на порцию при скорости 3000 об/мин). В таком концентрате используется мембранный фильтр с порогом отсеивания по молекулярной массе 300 000 кДа, задерживающий объекты с молекулярной массой больше 300 000 кДа и пропускающий через себя макромолекулы меньшей молекулярной массы. После этого извлекали фильтр и вырезали из различных областей кусочки размером приблизительно 1 × 1 мм. Дальнейшую подготовку образцов проводили по той же методике, что описана выше для культуры клеток. При заливке в смолу кусочки мембраны ориентировали таким образом, чтобы получить срез через всю толщину фильтра.

Для определения физического титра псевдовirusных частиц в суспензии подсчитывали среднее число таких частиц на единицу длины верхней (со стороны фильтруемой жидкости) кромки фильтра на срезе. Исходя из предположения об однородности потока жидкости при фильтровании по площади фильтра и изотропности самого фильтра, считали, что плотность частиц на фильтре однородна во всех направлениях и, следовательно, является квадратом линейной плотности. Это значение подсчитывалось для полной площади фильтра – 4 см².

Результаты

Для подсчета количества вирусных частиц используется ряд методов, в том числе метод бляшек (подсчет негативных колоний вирусов, представляющих собой очаги разрушенной под действием вируса культуры клеток под агаровым покрытием); количественная РТ-ПЦР; иммунофлуоресцентная микроскопия, аналитическая проточная цитометрия, электронная микроскопия и др. (Ferris et al., 2002; Reid et al., 2003; Malenovska, 2013; Heider, Metzner, 2014; Rossi et al., 2015).

Среди перечисленных методов электронная микроскопия обладает рядом преимуществ, поскольку позволяет получить информацию не только о количестве всех вирусных частиц (независимо от того, являются ли они инфекционными), но и о морфологии исследуемого объекта (Malenovska, 2013). Кратко метод заключается в следующем. В исследуемую пробу, содержащую вирусный материал, добавляется определенное количество суспензии с известной концентрацией латексных шариков. Смесь наносится на медные сеточки, покрытые опорной пленкой, которая укреплена напылением углерода, или адсорбцией в течение определенного времени, или распылением смеси над сетками с помощью ультразвукового зонда. Затем электронно-микроскопические сетки изучают в электронном микроскопе. В нескольких ячейках сетки одновременно подсчитывается количество частиц латекса и количество вирусных частиц. Зная концентрацию латекса и сопоставляя ее с количеством обнаруженных вирусных частиц, можно рассчитать концентрацию вируса в исходной пробе. Естественно, этот метод не совсем точный, но удобный, и его широко используют для количественной оценки тех или иных вирусов.

При таком подсчете ошибки обусловлены неоднородностью свойств поверхности опорной пленки, агрегацией как латекса, так и вирусного материала, отклонениями от точной схемы опыта, такими как недостаточное смешивание или загрязнение во время распыления. Однако основным ограничением метода негативного контрастирования при подсчете количества вирусных частиц с помощью электронной микроскопии является недостаточная чувствительность: для получения надежных результатов необходима концентрация не менее 10⁷ частиц/мл (Reid et al., 2003).

В настоящей работе (на примере env-псевдовirusов) представлена оригинальная методика, позволяющая оценивать количество вирусоподобных частиц в образцах, в которых их концентрация ниже, чем 10⁷ частиц/мл.

В качестве модельного объекта были выбраны вирусоподобные частицы ВИЧ-1 (env-псевдовirusы). Env-псевдовirusы могут проникать в клетку аналогично живому вирусу иммунодефицита человека, но из-за дефектного генома не способны формировать полноценное вирусное потомство, поэтому в работе они безопасны. При получении env-псевдовirusов используют два типа плазмид: оболочечную и упаковочную. Упаковочная, или коровая, плазида (pSG3Δenv) кодирует все белки ВИЧ-1, кроме оболочечных. Вторая плазида (pEnv), наоборот, кодирует только белки оболочки ВИЧ-1. Для проверки инфекционности env-псевдовirusов используют генно-инженерные клетки TZM-bl, которые несут в составе своего генома ген люциферазы, активирующийся при попадании в клетку ВИЧ-1 или псевдовirusа (Montefiori, 2009).

Котрансфекция клеток 293Т двумя плазмидами приводит к формированию псевдовirusного потомства, способного только к однократному заражению клеток и не способного к дальнейшей репликации. Сборку и выход псевдовirusных частиц подтверждали методом электронной микроскопии ультратонких срезов (рис. 1).

Характеризацию псевдовirusа проводили также по определению функциональной активности при одном

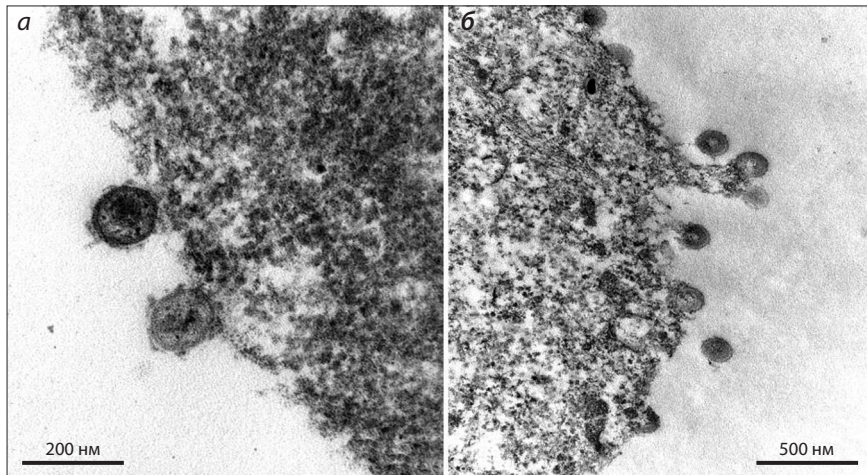


Рис. 1. Почкующийся псевдовирус SF162 на клетках 293Т (а) и несколько частиц псевдовируса разной степени созревания (б).

Просвечивающая электронная микроскопия, ультратонкий срез.

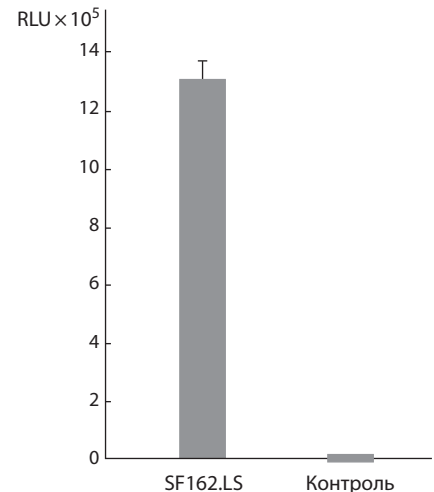


Рис. 2. Функциональная активность псевдовирусов SF162.LS.

цикле инфекции в культуре клеток-мишеней TZM-bl. Результаты представлены на рис. 2. Интенсивность сигнала выражали в условных единицах люминесценции (RLU/мл). Полученные данные говорят о функциональной активности вируса.

Однако в надосадочной жидкости с положительной функциональной активностью методом негативного контрастирования вирусоподобные частицы не обнаруживались. Наиболее вероятной причиной этого была низкая концентрация частиц в исходной жидкости. Для решения задачи мы предложили метод, который заключается в концентрировании вирусных частиц на мембране из полиэфирсульфона, применяемой в центрифужных концентраторах. Вирусные частицы осаждаются из суспензии на мембране концентратора с помощью низкоскоростного центрифугирования. В последующем участок мембраны

заливается в эпон-аралдит, и из него изготавливают ультратонкие срезы для исследования в электронном микроскопе. Мы использовали мембраны с порогом отсечения 300 000 кДа, которые должны были задерживать псевдовирусные частицы диаметром около 100 нм.

На рис. 3 показаны вирусоподобные частицы, захваченные нанофильтром при центрифугировании. Частицы хорошо различимы в теле и

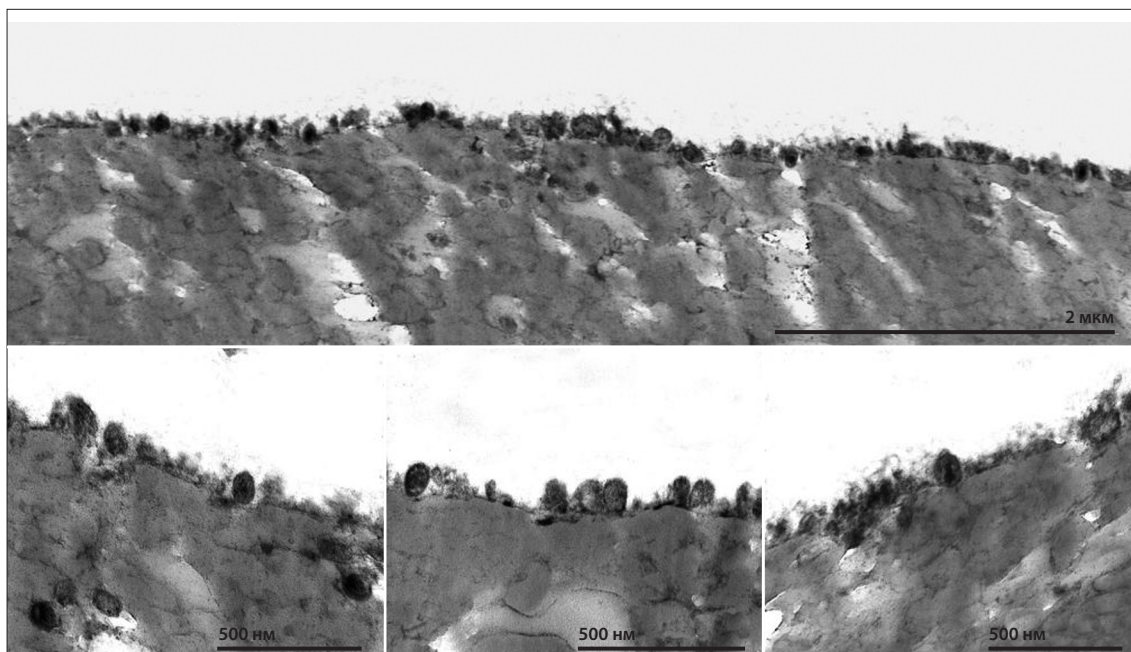


Рис. 3. Частицы псевдовируса, захваченные фильтром Vivaspin 6 (300 000 MWCO), с разным увеличением.

Фрагмент фильтра Vivaspin 6 (300 000 MWCO). Просвечивающая электронная микроскопия, метод ультратонких срезов.

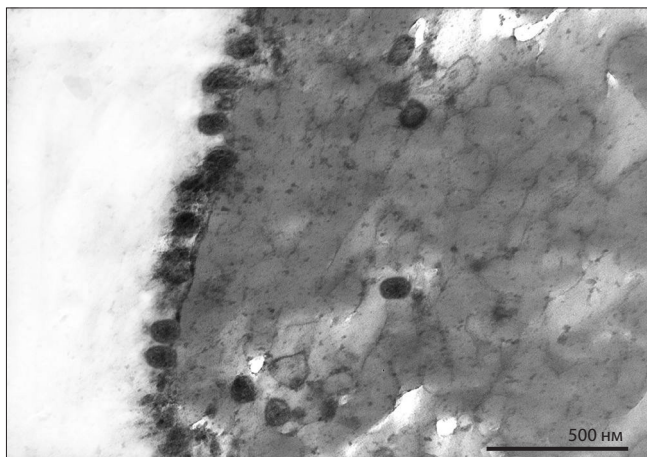


Рис. 4. Частицы псевдовируса, захваченные фильтром VivaSpin 6 (300000 MWCO), располагаются как на поверхности, так и в глубине фильтра.

Просвечивающая электронная микроскопия, метод ультратонких срезов.

на поверхности нанопористого фильтра, что позволяет их распознать морфологически и подсчитать среднее число на единицу длины сечения фильтра.

Исходя из предположения об однородности потока жидкости при фильтровании по площади фильтра и изотропности самого фильтра, считали, что плотность частиц на поверхности фильтра однородна во всех направлениях и, следовательно, является квадратом линейной плотности. Число частиц подсчитывалось для полной площади фильтра – 4 см². В среднем на срезе наблюдается по 3 вириона на отрезке 10 мкм. Если считать, что плотность в перпендикулярном направлении та же, получаем 3 × 3 = 9 вирионов на 100 мкм². Таким образом, на всей поверхности фильтра (площадь 4 см²) находится около 4 × 10⁷ вирионов. Исходя из того, что объем супернатанта, содержащего псевдовирусы, был 20 мл, можно определить исходную концентрацию псевдовирусов в образце: 4 × 10⁷ частиц / 20 мл = 2 × 10⁶ частиц на 1 мл. Эта величина на порядок меньше той, что может быть зарегистрирована методом негативного контрастирования, что и подтвердило наше предположение (методом негативного контрастирования частицы псевдовируса обнаружены не были).

Заключение

Таким образом, предложенная методика позволяет преодолеть основной недостаток количественного определения вирусов с помощью электронной микроскопии, связанный с относительно высоким пределом обнаружения (концентрация частиц больше 10⁷/мл). Как видно из рис. 4, плотность псевдовирусов на срезе достаточно велика. Это позволяет надеяться, что при уменьшении концентрации вирионов в суспензии еще на два порядка также будет возможно распознать захваченные вирионы. Кроме того, центрифужный концентратор позволяет последовательно прогнать через один и тот же фильтр значительные объемы суспензии, что тоже способствует повышению чувствительности метода.

Сравнивая предлагаемый метод с широко используемым методом бляшек, отметим преимущества, связанные со скоростью выполнения работы и возможностью определения общего титра вирусных частиц, включая «неинфекционные». С помощью метода бляшек можно обнаружить только частицы, обладающие в данных условиях инфекционными свойствами. Однако в ряде случаев, например при характеристике препаратов вакцин, необходимо знать количество всех частиц, включая и неинфекционные, которые также оказывают влияние на иммунный ответ хозяина (Blancett et al., 2017).

Разработанный метод может быть использован для количественного анализа различных образцов, содержащих вирусы животных, растений и человека, а также неинфекционные наночастицы и вирусоподобные частицы. Особенно полезна данная технология для анализа препаратов с низким содержанием вирусных частиц. Предложенный подход позволяет повысить чувствительность, точность и воспроизводимость количественного анализа вирусных частиц с применением электронной микроскопии.

Список литературы / References

- Рыжиков А.Б., Саркисян К.А., Карпенко Л.И., Пьянкова О.Г., Шаламова Л.А., Борисевич И.В., Воробьева М.С., Богрянцева М.П., Ильичев А.А., Монтефиори Д.С., Нечаева Е.А. Аprobация в доклинических испытаниях метода определения вируснейтрализующей активности вакцины-кандидата против ВИЧ-инфекции КомбиВИЧвак с использованием технологии псевдовирусов ВИЧ-1. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2012;2(63):70-75.
- [Ryzhikov A.B., Sarkisyan K.A., Karpenko L.I., Pyankova O.G., Shalamova L.A., Borisevich I.V., Vorobyeva M.S., Bogryantseva M.P., Ilyichev A.A., Montefiori D.S., Nechaeva E.A. Testing in preclinical trials method for determining the neutralizing activity of vaccine-candidate against HIV infection CombiHIVvac using HIV-1 pseudoviruses technology. *Epidemiologiya i Vaktsynoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinoprophylactic*. 2012;2(63):70-75. (in Russian)]
- Blancett C.D., Fetterer D.P., Koistinen K.A., Morazzani E.M., Monninger M.K., Piper A.E., Kuehl K.A., Kearney B.J., Norris S.L., Rossi C.A., Glass P.J., Sun M.G. Accurate virus quantitation using a Scanning Transmission Electron Microscopy (STEM) detector in a scanning electron microscope. *J. Virol. Methods*. 2017;248:136-144. DOI 10.1016/j.jviromet.2017.06.014.
- Ferris M.M., Stoffel C.L., Maurer T.T., Rowlen K.L. Quantitative intercomparison of transmission electron microscopy, flow cytometry, and epifluorescence microscopy for nanometric particle analysis. *Anal. Biochem.* 2002;304(2):249-256. DOI 10.1006/abio.2002.5616.
- Goldsmith C.S., Miller S.E. Modern uses of electron microscopy for detection of viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 2009;22(4):552-563. DOI 10.1128/CMR.00027-09.
- Harris R.J., Horne R.W. Negative staining: a brief assessment of current technical benefits, limitations and future possibilities. *Micron*. 1994;25(1):5-13. DOI 10.1016/0968-4328(94)90051-5.
- Heider S., Metzner C. Quantitative real-time single particle analysis of virions. *Virology*. 2014;462-463(1):199-206. DOI 10.1016/j.virol.2014.06.005.
- Malenovska H. Virus quantitation by transmission electron microscopy, TCID₅₀, and the role of timing virus harvesting: a case study of three animal viruses. *J. Virol. Methods*. 2013;191(2):136-140. DOI 10.1016/j.jviromet.2013.04.008.
- Montefiori D.C. Measuring HIV Neutralization in a Luciferase Reporter Gene Assay. In: Prasad V.R., Kalpana G.V. (Eds.). *HIV Protocols*.

2nd edn. (Ser.: Methods in Molecular Biology). 2009;485:395-405. DOI 10.1007/978-1-59745-170-3_26.

Reid G.G., Milne E.W., Coggins L.W., Wilson N.J., Smith K.T., Shepherd A.J. Comparison of electron microscopic techniques for enumeration of endogenous retrovirus in mouse and Chinese hamster cell lines used for production of biologics. *J. Virol. Methods*. 2003;108(1):91-96. DOI 10.1016/S0166-0934(02)00263-X.

Rossi C.A., Kearney B.J., Olschner S.P., Williams P.L., Robinson C.G., Heinrich M.L., Zovanyi A.M., Ingram M.F., Norwood D.A.,

Schoepp R.J. Evaluation of ViroCyt® Virus Counter for rapid filovirus quantitation. *Viruses*. 2015;7(3):857-872. DOI 10.3390/v7030857. Sergeev A.I.A., Kabanov A.S., Bulychev L.E., Sergeev Ar.A., Pyankov O.V., Bodnev S.A., Galahova D.O., Zamedyanskaya A.S., Titova K.A., Glotov A.G., Taranov O.S., Omigov V.V., Shishkina L.N., Agafonov A.P., Sergeev A.N. The Possibility of Using the ICR Mouse as an Animal Model to Assess Antimonkeypox Drug Efficacy. *Transbound. Emerg. Dis.* 2016;63:e419-e430. DOI 10.1111/tbed.12323.

ORCID ID

B.N. Zaitsev orcid.org/0000-0001-6359-465X

O.S. Taranov orcid.org/0000-0002-6746-8092

N.B. Rudometova orcid.org/0000-0002-1684-9071

N.S. Shcherbakova orcid.org/0000-0002-0953-6333

A.A. Ilyichev orcid.org/0000-0001-5356-084

L.I. Karpenko orcid.org/0000-0003-4365-8809

Благодарности. Работа выполнена в рамках ГЗ-7/18 ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора и при финансовой поддержке РФФИ, грант № 18-34-00314.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 04.09.2018. После доработки 30.11.2018. Принята к публикации 05.12.2018.