



Анализ иммуногенной активности композиции инактивированных штаммов ротавируса вида А при иммунизации мышей

М.В. Коврижко , Е.П. Колпакова, Д.С. Колпаков, Т.И. Твердохлебова, Е.С. Курбатов

Федеральное бюджетное учреждение науки «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Газетный пер., д. 119, г. Ростов-на-Дону, 344000, Российская Федерация

✉ Коврижко Марина Владимировна; npo-kovrizhko@yandex.ru; rostovniimp@rniimp.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Для профилактики ротавирусной инфекции применяются живые аттенуированные вакцины. Однако, учитывая мировую и российскую практику вакцинации, а также особенности физиологии детского организма, актуальным представляется создание инактивированных ротавирусных вакцин. Необходимым условием при разработке таких вакцин является наличие стабильно реплицирующихся штаммов вируса и подбор оптимального режима инактивации для проявления необходимого уровня антигенной активности и иммуногенности.

ЦЕЛЬ. Оценка и сравнительная характеристика специфического противоротавирусного иммунного ответа на введение неинактивированных (нативных) штаммов и композиции инактивированных штаммов ротавируса вида А на модели мышей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. В работе использовали штаммы ротавируса человека вида А (RRV-4, RRV-5, RRV-6, RRV-7), стандартизированный штамм SA-11 № 2364 ГКВ, клеточные культуры линий Vero и СПЭВ. Инфекционную активность штаммов, выращенных на перевиваемых клетках линии Vero, определяли методом титрования вируса. Учет зараженных клеточных культур вели до наступления цитопатического действия и рассчитывали показатель ТЦД₅₀ (50% тканевая цитопатическая доза) по методу Кербера в модификации Ашмарина и выражали его в lg ТЦД₅₀/мл. Для инактивации штаммов вируса использовали формальдегид. Для оценки иммуногенной активности проводили иммунизацию нелинейных белых мышей с использованием нативных штаммов и композиции инактивированных штаммов (RRV-4, RRV-5, RRV-6, RRV-7). После иммунизации у животных отбирали кровь и в образцах сыворотки определяли титр антител к ротавирусу вида А с помощью метода гетерогенного непрямого иммуноферментного анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Штаммы ротавируса, адаптированные к росту на клеточной культуре линии Vero, проявляли инфекционную активность с уровнем титров от 8,9 до 7,9 lg ТЦД₅₀/мл. Показано, что инактивация штаммов наступала при температуре 37 °С и концентрации формальдегида от 0,05 до 0,025% в зависимости от длительности обработки. При оценке антигенной активности выявлено, что титр антигена в композиции инактивированных штаммов (1:16) был ниже, чем в случае нативных штаммов (1:32–1:64). Показано, что нативные штаммы и композиция инактивированных штаммов при иммунизации мышей обладали сравнимой специфической иммуногенной активностью.

ВЫВОДЫ. Получены штаммы-кандидаты ротавируса вида А, стабильно реплицирующиеся на перевиваемых клетках линии Vero. Подобраны оптимальные условия инактивации штаммов и разработана композиция инактивированных штаммов, обладающая специфической антигенной активностью и иммуногенностью. Представленные данные

позволяют рассматривать полученную композицию инактивированных штаммов ротавируса вида А как основу для дальнейшей разработки инактивированной ротавирусной вакцины.

Ключевые слова: ротавирус вида А; ротавирусная инфекция; вакцинация; инактивированные ротавирусные вакцины; композиция инактивированных штаммов; иммуногенная активность; инфекционная активность; антигенная активность; антитела к ротавирусу вида А

Для цитирования: Коврижко М.В., Колпакова Е.П., Колпаков Д.С., Твердохлебова Т.И., Курбатов Е.С. Анализ иммуногенной активности композиции инактивированных штаммов ротавируса вида А при иммунизации мышей. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2024;24(4):403–414. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-4-403-414>

Финансирование. Работа выполнена в рамках НИР № 121032300240-8.

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Immunogenicity analysis of a composition of inactivated human rotavirus A strains in mice following immunisation

Marina V. Kovrizhko ✉, Elena P. Kolpakova, Dmitry S. Kolpakov,
Tatiana I. Tverdokhlebova, Egor S. Kurbatov

Rostov Research Institute of Microbiology and Parasitology, 119 Gazetny Ln., Rostov-on-Don
344000, Russian Federation

✉ Marina V. Kovrizhko; npo-kovrizhko@yandex.ru; rostovniimp@rniimp.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Currently, rotavirus infection is prevented with live attenuated vaccines. However, international and Russian vaccination practices, as well as the physiological characteristics of paediatric patients, necessitate the development of inactivated rotavirus vaccines. Prerequisites for the development of such vaccines are the availability of virus strains capable of stable replication and the selection of optimal inactivation conditions providing for the required antigenicity and immunogenicity levels.

AIM. This study aimed to evaluate and compare the characteristics of the rotavirus-specific immune response to native strains and to a composition of inactivated rotavirus A strains in a mouse model.

MATERIALS AND METHODS. The study used human rotavirus A strains (RRV-4, RRV-5, RRV-6, and RRV-7), a standard rotavirus strain (SA-11 NVC 2364, National Virus Collection of the Russian Federation), and cultures of pig embryo kidney cells treated with Versene solution (SPEV) and Vero cells. Virus titration was used to determine the infectivity of the strains grown in Vero cells maintained in continuous culture. The authors monitored infected cell cultures up to the onset of the cytopathic effect, calculated the 50% tissue culture infectious dose (TCID₅₀) by the Kärber method modified by Ashmarin, and expressed the results as log₁₀ TCID₅₀/mL. Virus strains were inactivated with formaldehyde. To evaluate immunogenicity, outbred white mice were immunised with native strains and the composition of inactivated strains (RRV-4, RRV-5, RRV-6, and RRV-7). After immunisation, blood was taken from the animals, and the serum titre of rotavirus A antibodies was determined by indirect heterogeneous enzyme immunoassay.

RESULTS. The infectivity of the rotavirus strains adapted to Vero cells ranged from 8.9 to 7.9 log₁₀ TCID₅₀/mL. When selecting inactivation conditions, the authors showed that inactivation occurred at a temperature of 37 °C and a formaldehyde concentration of 0.05–0.025% (depending on the duration of treatment). The antigenicity analysis demonstrated that the

antigen titre of the inactivated strain composition (1:16) was lower than that of native strains (1:32–1:64). The authors demonstrated comparability of immunogenicity profiles of the inactivated strain composition and native strains in mice.

CONCLUSIONS. The study generated candidate rotavirus A strains that exhibited stable replication in continuous cultures of Vero cells. The authors selected optimal inactivation conditions for these rotavirus strains and developed an inactivated strain composition showing antigenicity and immunogenicity. The presented data suggest that the composition of inactivated rotavirus A strains can be considered as a basis for further development of an inactivated rotavirus vaccine.

Keywords: rotavirus A; rotavirus infection; vaccination; inactivated rotavirus vaccines; composition of inactivated strains; immunogenicity; infectivity; antigenicity; anti-rotavirus A antibodies

For citation: Kovrizhko M.V., Kolpakova E.P., Kolpakov D.S., Tverdokhlebova T.I., Kurbatov E.S. Immunogenicity analysis of a composition of inactivated human rotavirus A strains in mice following immunisation. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2024;24(4):403–414. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-4-403-414>

Funding. This study was conducted as part of R&D project No. 121032300240-8.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Ротавирусная инфекция является ведущей причиной тяжелых гастроэнтеритов, особенно у детей до 5 лет¹. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) рекомендует включение ротавирусных вакцин в программы для иммунизации детей². В странах, где ротавирусные вакцины давно включены в национальный календарь прививок, наблюдается эффект формирования популяционного иммунитета [1, 2].

Ротавирусы вида А обладают выраженным серотиповым и генотипическим разнообразием. Геном ротавирусов сегментирован, и гены, кодирующие белки вируса VP4 (Р-белок) и VP7 (G-белок), могут независимо сегрегировать с образованием большого числа сочетаний этих белков [3]. По данным литературных источников, в настоящее время в мире, в том числе и в Российской Федерации, широкое распространение получили шесть комбинаций: G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8] и G12P[8] [4–7].

В настоящее время для профилактики ротавирусной инфекции применяются живые аттенуированные вакцины. Однако, учитывая мировую и отечественную практику вакцинации [8–10], а также принимая во внимание особенности физиологии детского организма, актуальным представляется разработка альтернативных подходов для вакцинации и создание нереплицирующихся ротавирусных вакцин [7, 11], что будет являться необходимым дополнением к существующим живым вакцинам. По мнению

авторов, нереплицирующиеся ротавирусные вакцины оптимальны для первоначального введения в организм ребенка с несовершенной пищеварительной системой и несформированным иммунитетом. Немаловажным аспектом является то, что использование этих вакцин не приводит к возникновению такого специфического нежелательного явления, как инвазия кишечника (у детей группы риска). Кроме того, при применении вышеуказанных вакцин отсутствуют риски реассортации генов дикого и вакцинного штаммов в кишечнике иммунизированного ребенка, что сопряжено с опасностью возникновения эпидемического геноварианта штамма. Важно отметить, что цельновирионные инактивированные вакцины содержат стабилизированные антигены VP4, VP7, VP6 и стимулируют у человека полноценный иммунный ответ [11, 12]. Нереплицирующиеся ротавирусные вакцины имеют ряд дополнительных преимуществ перед живыми вакцинами: возможность одновременного введения препарата с другими вакцинами, входящими в национальный календарь прививок, безопасность для детей из группы риска, экономическая эффективность [10, 11].

В настоящее время разрабатывается ряд новых видов инактивированных (нереплицирующихся) вакцин [7, 10, 11, 13]. Некоторые из этих вакцин успешно прошли доклинические исследования и показали перспективные результаты по защитной эффективности на экспериментальных животных [11, 13] и в настоящее время

¹ <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/342905/WER9628-301-319-eng-fre.pdf?sequence=1>

² Там же.

находятся на этапе клинических исследований [14, 15].

Следует отметить, что создание ротавирусной вакцины невозможно без наличия адаптированных к перевиваемым культурам клеток штаммов ротавируса человека. При разработке вакцинных препаратов используют линии клеток, рекомендуемые ВОЗ и разрешенные к применению в производстве³. Наиболее часто для производства вирусных вакцин используется культура клеток Vero, что связано с их высокой чувствительностью ко многим видам вирусов человека⁴ [16–19].

При создании полного цикла производства иммунобиологических препаратов неотъемлемой частью является разработка показателей качества вакцины⁵. Показатель «Подлинность» – один из важнейших при оценке качества вакцинного препарата. Поскольку технология производства ротавирусной вакцины включает в себя процесс инактивации штаммов-кандидатов, критической точкой данного этапа является контроль на специфическую антигенную активность композиции инактивированных штаммов, входящих в состав вакцинного препарата.

Цель работы – оценка и сравнительная характеристика специфического противоротавирусного иммунного ответа на введение неинактивированных (нативных) штаммов и композиции инактивированных штаммов ротавируса вида А на модели мышей.

В задачи исследования входили адаптация кандидатных штаммов ротавируса вида А к росту в культуре клеток линии Vero и их культивирование, определение инфекционной активности штаммов вируса, подбор метода их инактивации и отработка схемы иммунизации лабораторных животных для изучения иммуногенных свойств культуральных инактивированных штаммов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы вирусов, линии клеток

В работе использовали штаммы-кандидаты ротавируса вида А (RRV-4, RRV-5, RRV-6, RRV-7), полученные из рабочей коллекции вирусов ФБУН «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии»

Роспотребнадзора (ФБУН РостовНИИ микробиологии и паразитологии Роспотребнадзора). Кандидатные штаммы размножали в культуре клеток почки эмбриона свиньи СПЭВ в поддерживающей среде DMEM с глутамином (ООО «БиолоТ», Россия) с добавлением антибиотиков (пенициллин 100 ЕД/мл, стрептомицин 100 мкг/мл) и 5% эмбриональной телячьей сыворотки – ЭТС (ООО «БиолоТ», Россия) при температуре 37 °С и 5% CO₂. Цитопатическое действие (ЦПД) вирусов развивалось на 3–8 сут в зависимости от дозы заражения.

Штаммы-кандидаты были собраны от разных детей, больных ротавирусным гастроэнтеритом, в различные эпидемические периоды. Генотипы ротавирусных изолятов: RRV-4 G3[P8]; RRV-5G4[P8]; RRV-6 G9[P8], RRV-7 G4[P8].

Использовали стандартизированный штамм ротавируса вида А SA-11 № 2364 ГКВ, находящийся в коллекции вирусов ФБУН РостовНИИ микробиологии и паразитологии Роспотребнадзора и задепонированный в Государственной коллекции вирусов (Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского, ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России). Штамм SA-11 № 2364 ГКВ размножали в перевиваемых клетках линии СПЭВ: полная дегенерация монослоя – через 48–84 ч с концентрацией вирусных частиц не менее 10⁷–10⁸ в 1 мл культуральной жидкости; уровень титра антигена (определен с помощью иммуноферментного анализа) – не ниже 1:64.

Клетки линии Vero получены из главного банка культур клеток ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора. Клетки данной линии на всех пассажах контролировали согласно требованиям Государственной фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ) на стерильность, жизнеспособность, морфологическую однородность, присутствие посторонних агентов⁶. Подсчет клеток осуществляли в гемоцитометре по общепринятой методике [17, 20].

В работе использовали вакцину для профилактики ротавирусной инфекции, пентавалентную, живую (Serum Institute of India Pvt. Ltd., Индия) в виде лиофилизата для приготовления раствора для приема внутрь, содержащую пять реассортантных штаммов ротавируса

³ ОФС.1.7.1.0018.18 Иммунобиологические лекарственные препараты. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

⁴ ФС.3.3.1.0037.15 Вакцина полиомиелитная пероральная 1, 2, 3 типов, раствор для приема внутрь. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

⁵ ОФС.1.7.1.0018.18 Иммунобиологические лекарственные препараты. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

⁶ ОФС.1.7.2.0011.15 Требования к клеточным культурам-субстратам производства иммунобиологических препаратов. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

(человеческие и бычьи) серотипов G1, G2, G3, G4 и G9, выращенных на культуре клеток линии Vero. Все штаммы содержат антиген VP7 соответствующего серотипа из штаммов человеческих вирусов, реассортантных с бычьим ротавирусом (UK).

Культивирование и заражение клеточных линий вирусом

Клетки линии Vero выращивали до образования однородного монослоя (в среднем 5–6 сут). Клеточный монослой обрабатывали 0,25% раствором трипсина (ООО «БиолоТ», Россия) для получения клеточной взвеси. Клетки разводили до концентрации 100–150 тыс./мл в ростовой среде DMEM (ООО «БиолоТ», Россия) с содержанием 5–10% ЭТС и рассевали в культуральные флаконы (Greiner Bio-One, Германия) с площадью поверхности 175 см². Инкубацию клеток проводили при температуре 37 °С и 5% CO₂.

Клеточный монослой перед заражением промывали три раза раствором Хенкса. Штаммы-кандидаты ротавируса перед нанесением на монослой клеток обрабатывали раствором Хенкса, содержащим трипсин (20 мкг/мл), и проводили адсорбцию вируса на клетки при температуре 37 °С, после чего добавляли среду DMEM до первоначального объема. Далее проводили ежедневное наблюдение зараженных клеток под микроскопом до появления изменений структуры монослоя и морфологии клеток. Критерием адаптации штаммов-кандидатов ротавируса к росту на клетках линии Vero являлось стабильное ЦПД в последовательных пассажах. Первые пассажи на этапе переадаптации проводились в сравнении с заражением клеток СПЭВ штаммом SA11 № 2364 ГКВ, проявляющим стабильную инфекционную активность не ниже 9,0±0,2 lg ТЦД₅₀/мл (50% тканевая цитопатическая доза).

Выполняли молекулярно-генетический анализ штаммов ротавируса с использованием секвенирования по Сэнгеру с помощью генетического анализатора «Нанофор 05» (ООО «НПФ «Синтол», Россия) и набора реагентов производства ООО «НПФ «Синтол».

Определение инфекционной активности штаммов вируса

Инфекционную активность кандидатных штаммов ротавируса, выращенных на клетках линии Vero, определяли методом титрования вируса [21]. Титрование вируса проводили на клетках линии СПЭВ. Для этого готовили разведения вируса от 10¹ до 10⁻⁶ и с помощью

каждого разведения заражали клетки СПЭВ в культуральных флаконах. Использовали следующие контроли: контроль интактной культуры клеток линии СПЭВ; контроль клеток СПЭВ в присутствии трипсина; контроль инфекционной активности ротавируса вида А (неразведенный вирус).

Учет зараженных клеточных культур вели до наступления цитопатического действия и рассчитывали показатель ТЦД₅₀ по методу Кербера в модификации Ашмарина и выражали его в lg ТЦД₅₀/мл [22].

Характеристика антигенной активности штаммов вируса методом иммуоферментного анализа

Методом иммуоферментного анализа (ИФА) устанавливали титры антигенов ротавируса в неинaktivированных штаммах и в композиции инаktivированных штаммов.

Определение титров проводили при помощи тест-системы «Ротавирус-антиген-ИФА-Бест» (АО «Вектор-Бест», Россия). Метод определения основан на твердофазном ИФА с применением моноклональных антител к группоспецифическому антигену VP6 ротавируса человека и конъюгата поликлональных антител с пероксидазой хрена.

В качестве групп сравнения использовали препарат коммерческой вакцины пентавалентной живой для профилактики ротавирусной инфекции и стандартизированный штамм ротавируса вида А SA-11 № 2364 ГКВ.

Подбор оптимальных условий инаktivации штаммов-кандидатов ротавируса вида А

Для инаktivации штаммов-кандидатов использовали растворы 0,1; 0,05; 0,03; 0,025% формальдегида. Инаktivацию проводили при температуре 27 и 37 °С. Данные регистрировали на 5, 10, 30 сут. При оценке специфической безопасности (контроль полноты инаktivации) использовали метод, включающий проведение 3 серийных пассажей штаммов ротавируса после обработки раствором формальдегида. Каждой пробой инаktivированных штаммов проводили заражение монослоя клеток линии СПЭВ. Использовали следующие контроли: интактная культура клеток линии СПЭВ; клетки СПЭВ после воздействия раствора формальдегида; контроль инфекционной активности нативного вируса. Последовательные заражения проводили независимо от характера ЦПД до трех пассажей. Положительным результатом считали тот, в котором при последовательных заражениях культуры клеток линии СПЭВ инаktivированным

вирусом отсутствовало ЦПД в трех заражениях; отрицательным результатом – в случае если при любом из последовательных заражений культуры клеток инактивированным вирусом наблюдалось минимальное проявление ЦПД. Критерием инактивации вирионов являлась потеря инфекционных свойств ротавируса по отношению к культуре клеток линии СПЭВ.

Лабораторные животные

Эксперименты проводили на белых нелинейных мышах в возрасте 6–8 нед. обоего пола (масса 19–21 г). Лабораторные животные были выращены в условиях конвенционального вивария ФБУН РостовНИИ микробиологии и паразитологии Роспотребнадзора. В период проведения исследования животных содержали в изолированном помещении вивария при температуре 22–24 °С и относительной влажности воздуха не выше 60% в условиях свободного доступа к корму и воде на стандартном рационе кормления. Работу с животными проводили в соответствии с международными и национальными требованиями⁷. Протокол исследования одобрен Биоэтической комиссией ФБУН РостовНИИ микробиологии и паразитологии Роспотребнадзора (протокол № 05/17 от 23.05.2023).

Оценка иммуногенной активности нативных штаммов и композиции инактивированных штаммов-кандидатов ротавируса вида А

Для оценки иммуногенной активности штаммов вирусов проводили иммунизацию мышей в количестве 70 особей (7 групп; 10 животных в группе) с использованием нативных штаммов, композиции инактивированных штаммов, стандартизированного штамма SA-11 № 2364 ГКВ; в качестве контроля применяли физиологический раствор (табл. 1). Прививочную дозу нативных штаммов-кандидатов ротавируса вида А (объем 0,2 мл) выражали в lg ТЦД₅₀ [22]. Прививочную дозу композиции инактивированных штаммов (объем 0,2 мл) определяли до процесса инактивации и выражали в lg ТЦД₅₀ [22].

Через 28 сут после иммунизации у животных отбирали кровь и в образцах сыворотки определяли титр антител к ротавирусу вида А с помощью метода твердофазного гетерогенного непрямого ИФА. Схема ИФА включала в себя сорбцию антигена – ротавируса вида А штамма SA-11 № 2364 ГКВ с концентрацией вирусных

частиц не менее 10⁷–10⁸ в 1 мл культуральной жидкости, внесение образцов исследуемых сывороток и конъюгата антител козы (к суммарным IgG, IgA, IgM мыши) с пероксидазой хрена (ООО «Имтек», Россия). Методика включала обязательный этап отмывки реагентов от непрореагировавших компонентов на каждой стадии, в результате чего на последнем этапе анализа оставались антитела к ротавирусу вида А, содержащие суммарные иммуноглобулины классов G, A, M мыши к антигенам цельной ротавирусной частицы.

Статистические методы

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием стандартного пакета программы Microsoft Office Excel 2010, рассчитывая значения среднего геометрического титра антител и доверительные интервалы для каждой группы образцов сыворотки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Адаптация штаммов к росту на культуре клеток линии Vero и культивирование кандидатных штаммов ротавируса вида А

На первом этапе работы было проведено исследование чувствительности к штаммам ротавируса человека вида А клеток линии Vero, которые наиболее часто используются при разработке вирусных вакцин [19].

На клетках линии Vero в ходе первых пассажей штаммов ротавируса выявлен низкий уровень ЦПД, не достигающий 80% в течение 14 сут (табл. 2). Начиная с 3–4 пассажа наблюдали увеличение уровня ЦПД с сокращением сроков его проявления – от 5 до 11 сут в зависимости от штамма.

Для исключения кросс-контаминации образцов штаммов проводили их контроль методом секвенирования по Сэнгеру. Анализ показал, что нуклеотидная последовательность штаммов после заражения клеточного субстрата осталась прежней (данные запланированы к опубликованию).

В ходе исследований были получены штаммы ротавируса вида А, стабильно реплицирующиеся на перевиваемых клетках линии Vero. Установлено, что ЦПД изучаемых штаммов вируса характеризуется различной величиной и сроками наступления (табл. 2).

Для каждого из кандидатных штаммов, выращенных на перевиваемых клетках линии Vero,

⁷ Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и других научных целей. ETS N 123. Страсбург; 1986.

Приказ Минздрава России от 01.04.2016 № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики».

Таблица 1. Схема иммунизации мышей
Table 1. Mouse immunisation scheme

Группа (n=10) Group (n=10)	Препарат для иммунизации Preparation used for immunisation	Прививочная доза Immunisation dose	Способ введения Route of administration		
			1 сут Day 1	7 сут Day 7	14 сут Day 14
1	Нативный штамм RRV-4 <i>Native strain RRV-4</i>	8,3 lg ТЦД ₅₀ /0,2 мл <i>8.3 log₁₀ TCID₅₀/0.2 mL</i>	в/м <i>i.m.</i>	в/б <i>i.p.</i>	в/м <i>i.m.</i>
2	Нативный штамм RRV-5 <i>Native strain RRV-5</i>	7,3 lg ТЦД ₅₀ /0,2 мл <i>7.3 log₁₀ TCID₅₀/0.2 mL</i>	в/м <i>i.m.</i>	в/б <i>i.p.</i>	в/м <i>i.m.</i>
3	Нативный штамм RRV-6 <i>Native strain RRV-6</i>	8,3 lg ТЦД ₅₀ /0,2 мл <i>8.3 log₁₀ TCID₅₀/0.2 mL</i>	в/м <i>i.m.</i>	в/б <i>i.p.</i>	в/м <i>i.m.</i>
4	Нативный штамм RRV-7 <i>Native strain RRV-7</i>	7,3 lg ТЦД ₅₀ /0,2 мл <i>7.3 log₁₀ TCID₅₀/0.2 mL</i>	в/м <i>i.m.</i>	в/б <i>i.p.</i>	в/м <i>i.m.</i>
5	Композиция инактивированных штаммов <i>Inactivated strain composition</i>	7,8 lg ТЦД ₅₀ /0,2 мл <i>7.8 log₁₀ TCID₅₀/0.2 mL</i>	в/м <i>i.m.</i>	в/б <i>i.p.</i>	в/м <i>i.m.</i>
6	Стандартизированный штамм SA-11 № 2364 ГКВ <i>Standard strain SA-11 NVC 2364</i>	9,3 lg ТЦД ₅₀ /0,2 мл <i>9.3 log₁₀ TCID₅₀/0.2 mL</i>	в/м <i>i.m.</i>	в/б <i>i.p.</i>	в/м <i>i.m.</i>
7	Физиологический раствор <i>Normal saline</i>	0,2 мл <i>0.2 mL</i>	в/м <i>i.m.</i>	в/б <i>i.p.</i>	в/м <i>i.m.</i>

Таблица составлена авторами по собственным данным /The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. ТЦД₅₀ – 50% тканевая цитопатическая доза; в/м – внутримышечно; в/б – внутрибрюшинно.
Note. TCID₅₀, 50% tissue culture infectious dose; i.m., intramuscular; i.p., intraperitoneal.

Таблица 2. Показатели динамики проявления цитопатического действия вируса (ЦПД) при адаптации штаммов ротавируса вида А к культуре клеток линии Vero
Table 2. Indicators of changes in the cytopathic effect (CPE) with adaptation of human rotavirus A strains to Vero cells

Штаммы Strains	Время проявления (сут) и уровень ЦПД в зависимости от номера пассажа вируса на культуре клеток линии Vero <i>CPE onset time (day) and level depending on the passage number in Vero cells</i>									
	1 пассаж Passage 1		2 пассаж Passage 2		3 пассаж Passage 3		4 пассаж Passage 4		5 пассаж Passage 5	
	ЦПД, % CPE, %	Сут Day	ЦПД, % CPE, %	Сут Day	ЦПД, % CPE, %	Сут Day	ЦПД, % CPE, %	Сут Day	ЦПД, % CPE, %	Сут Day
RRV-4	40	14	80	14	80	8	100	7	100	5
RRV-5	30	14	30	14	50	14	50–70	12	100	9
RRV-6	20	14	20	14	30	10	80	10	90	10
RRV-7	20	14	40	14	50	10	50–60	10	100	9
SA-11 № 2364 ГКВ <i>SA-11 NVC 2364</i>	100	4	100	4	100	3	100	4	100	4

Таблица составлена авторами по собственным данным /The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. SA-11 № 2364 ГКВ – стандартизированный штамм.

Note. SA-11 NVC 2364 is the standard rotavirus strain deposited at the National Virus Collection of the Russian Federation.

был определен инфекционный титр, значение которого составило для штамма вируса RRV-4 – 8,9 lg ТЦД₅₀/мл; RRV-5 – 7,9 lg ТЦД₅₀/мл; RRV-6 – 8,9 lg ТЦД₅₀/мл; RRV-7 – 7,9 lg ТЦД₅₀/мл. Таким образом, штаммы-кандидаты имели различную инфекционную активность на культуре клеток Vero, что свидетельствует о разной тропности

поверхностных антигенов вирусов к клеточным рецепторам.

Инактивация штаммов-кандидатов ротавируса вида А

Технология производства инактивированных вирусных вакцин (против вирусов полиомиелита,

гриппа и др.) является наиболее безопасной, однако требует подбора оптимальных условий [23–25].

При отработке условий инактивации кандидатных штаммов ротавируса были определены варианты инактивации, сочетающие в себе разную концентрацию формальдегида,

температурный режим и продолжительность обработки штаммов (табл. 3).

Представленные данные свидетельствуют о том, что инактивация вирусов наступала при температуре 37 °С и концентрации формальдегида от 0,05 до 0,025% в зависимости от длительности обработки. В тесте при оценке

Таблица 3. Результаты подбора условий инактивации штаммов ротавируса человека RRV-4, RRV-5, RRV-6, RRV-7
Table 3. Results of selecting inactivation conditions for human rotavirus strains RRV-4, RRV-5, RRV-6, and RRV-7

Концентрация формальдегида, % <i>Formaldehyde concentration, %</i>	Температура инактивации, °С <i>Inactivation temperature, °C</i>	Период инактивации, сут <i>Inactivation time, days</i>	Контроль полноты инактивации вируса на культуре клеток линии СПЭВ <i>Control of viral inactivation completeness in SPEV cells</i>				
			Контроль (воздействие раствора формальдегида), ЦПД, % <i>Control with formaldehyde solution, CPE (%)</i>	Контроль инфекционности нативного вируса, ЦПД, % <i>Control of native virus infectivity, CPE (%)</i>	Результат инактивации <i>Inactivation result</i>		
					ЦПД после заражения на 1 пассаже, % <i>Infection after passage 1, CPE (%)</i>	ЦПД после заражения на 2 пассаже, % <i>Infection after passage 2, CPE (%)</i>	ЦПД после заражения на 3 пассаже, % <i>Infection after passage 3, CPE (%)</i>
0,1	27	5	100	100	100	0	0
		10	100	100	100	0	0
		30	100	100	100	0	0
	37	5	100	100	100	0	0
		10	100	100	100	0	0
		30	100	100	100	0	0
0,05	27	5	100	100	100	0	0
		10	100	100	100	0	0
		30	100	100	100	0	0
	37	5	80	100	100	0	0
		10	80	100	100	0	0
		30	80	100	100	0	0
0,03	27	5	5	50	100	50	0
		10	10	50	100	50	0
		30	30	80	100	50	0
	37	5	5	80	100	80	5
		10	10	80	100	80	0
		30	30	50	100	50	0
0,025	27	5	50	100	50	10	10
		10	50	100	50	20	10
		30	50	100	50	10	10
	37	5	50	100	50	10	10
		10	50	100	50	3	0
		30	50	100	50	0	0

Таблица составлена авторами по собственным данным /The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. СПЭВ – клетки свиной почки эмбриональной; ЦПД – цитопатическое действие вируса.

Note. SPEV, pig embryo kidney cells; CPE, cytopathic effect of the virus.

специфической безопасности (контроль полноты инактивации) показано отсутствие инфекционных вирусных частиц.

Сравнительную антигенную активность неинактивированных (нативных) культуральных штаммов ротавируса и композиции инактивированных штаммов в сравнении с коммерческой ротавирусной пентавалентной, живой вакциной определяли методом ИФА по содержанию антигена VP6 (табл. 4).

Выявленные для нативных штаммов вируса значения титров составили от 1:32 до 1:64, что может являться характерной особенностью штаммов для этого способа культивирования при постановке реакции ИФА. Титр антигенов в композиции инактивированных штаммов был ожидаемо ниже, чем у нативных штаммов, так как в процессе инактивации при температуре 37 °С вирусные белки подвергаются конформационным изменениям в условиях длительного воздействия формальдегида. Следует отметить, что содержание антигена VP6 в нативных штаммах оказалось сопоставимо с таковым в образцах коммерческой вакцины и стандартизированного штамма.

Сравнительная иммуногенность нативных и инактивированных штаммов ротавируса

Защитная роль специфичных антител к ротавирусу вида А при иммунизации инактивированными вакцинами показана при использовании различных животных моделей, в том числе мышей [23]. Формирование гуморального иммунного ответа (по оценке сывороточных иммуноглобулинов классов А, G, М) выявлено при иммунизации с помощью разных способов введения инактивированной вакцины, при этом показано, что на полноту иммунного ответа влияет наличие белковых антигенов VP6, VP7, VP4 [23, 26].

В данной работе для исследования иммуногенности использовалась модель мышей как наиболее удобная для изучения формирования гуморального иммунитета и контроля иммуногенности препарата. Для сравнительной оценки иммуногенности нативных штаммов и композиции инактивированных штаммов был использован метод ИФА (непрямой гетерогенный вариант) (табл. 5).

Продемонстрировано, что нативные штаммы и композиция инактивированных штаммов, введенные мышам парентерально, обладали специфической иммуногенной активностью. Значения уровней антител при иммунизации как в случае композиции инактивированных штаммов, так и в случае нативных штаммов оказались сопоставимы и отличались от фоновых значений (иммунизация физиологическим раствором). Это свидетельствует о сохранении вышеуказанными штаммами после инактивации функционально активных структур антигенспецифических эпитопов, инициирующих формирование антител.

На рисунке 1 представлены обобщенные данные по уровню антигенной активности и иммуногенности нативных штаммов, а также композиции инактивированных штаммов. Установлено, что между уровнем антителообразования и уровнем антигенной активности используемых штаммов не во всех случаях выявлена прямая зависимость. Композиция инактивированных штаммов ротавируса при меньшем уровне антигенной активности в сравнении с нативными штаммами инициировала формирование более высокого иммунного ответа с некоторыми нативными штаммами. Согласно данным литературы при первичной и вторичной ротавирусной инфекции формируются гомо- и гетеротипические антитела, способные нейтрализовать различные штаммы ротавируса вида А⁸ [10]. Полученные в данной работе результаты свидетельствуют

Таблица 4. Антигенная активность нативных штаммов ротавируса человека RRV-4, RRV-5, RRV-6, RRV-7, а также композиции инактивированных штаммов методом иммуноферментного анализа

Table 4. Antigenicity of native RRV-4, RRV-5, RRV-6, and RRV-7 strains and the inactivated strain composition determined by enzyme immunoassay

Параметр <i>Parameter</i>	RRV-4	RRV-5	RRV-6	RRV-7	Композиция инактивированных штаммов* <i>Inactivated strain composition*</i>	Коммерческая ротавирусная вакцина# <i>Commercial rotavirus vaccine#</i>	Стандартизированный штамм <i>Standard strain</i>
Титр антигенов <i>Antigen titre</i>	1:64	1:32	1:64	1:32	1:16	1:64	1:64

Таблица составлена авторами по собственным данным /The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. * состав композиции включал инактивированные штаммы: RRV-4, RRV-5, RRV-6, RRV-7; # вакцина для профилактики ротавирусной инфекции, пентавалентная, живая. Стандартизированный штамм – штамм SA-11 № 2364 ГКБ.

Note. *, composition including inactivated RRV-4, RRV-5, RRV-6, and RRV-7 strains. #, pentavalent live vaccine for rotavirus prevention; standard strain SA-11 NVC 2364 (National Virus Collection of the Russian Federation).

Таблица 5. Уровень специфических антител в образцах сыворотки крови мышей, иммунизированных с использованием нативных штаммов ротавируса человека RRV-4, RRV-5, RRV-6, RRV-7, а также композиции инактивированных штаммов
Table 5. Serum levels of antigen-specific antibodies in mice immunised with native human rotavirus strains RRV-4, RRV-5, RRV-6, and RRV-7 and the inactivated strain composition

Параметр <i>Parameter</i>	RRV-4	RRV-5	RRV-6	RRV-7	Композиция инактивированных штаммов* <i>Inactivated strain composition*</i>	Стандартизированный штамм <i>Standard strain</i>	Физиологический раствор <i>Normal saline</i>
Среднее геометрическое значение титров антител, ед. ИФА/мл <i>Geometric mean of antibody titres, EIA units/mL</i>	373,2 (355,4–392,6)	282,8 (276,1–290,1)	141,4 (137,8–145,0)	174,1 (165,4–182,6)	246,2 (242,1–250,3)	400,0 (388,9–412,9)	90,1

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. * состав композиции включал инактивированные штаммы: RRV-4, RRV-5, RRV-6, RRV-7. Стандартизированный штамм – штамм SA-11 № 2364 ГКБ; ИФА – иммуноферментный анализ.

Note. *, composition including inactivated RRV-4, RRV-5, RRV-6, and RRV-7 strains. Standard strain SA11 NVC 2364 (National Virus Collection of the Russian Federation). EIA, enzyme immunoassay.

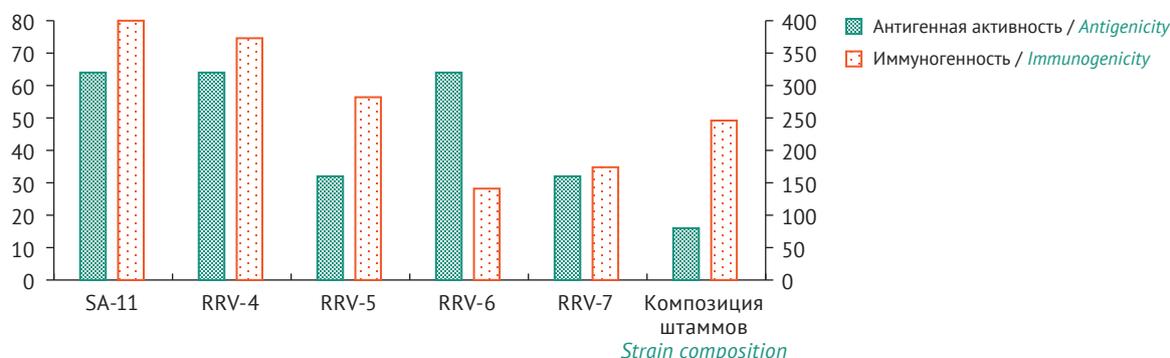


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. Антигенная активность и иммуногенность нативных штаммов ротавируса вида А (SA-11, RRV-4, RRV-5, RRV-6, RRV-7) и композиции инактивированных штаммов (RRV-4, RRV-5, RRV-6, RRV-7). По оси Y – антигенная активность, титры антигенов (по левой оси) и иммуногенность, титры антител (по правой оси).

Fig. 1. Antigenicity and immunogenicity of native rotavirus group A strains (SA-11, RRV-4, RRV-5, RRV-6, and RRV-7) and the inactivated strain composition (based on RRV-4, RRV-5, RRV-6, and RRV-7 strains). The Y-axis represents antigenicity with antigen titres (on the left) and immunogenicity with antibody titres (on the right).

о том, что композиция инактивированных штаммов, по-видимому, индуцирует гетеротипический иммунный ответ за счет наличия перекрестнореактивных эпитопов. Однако вопрос механизма формирования иммунного ответа при ротавирусной иммунизации, в том числе индукции гомо- и гетеротипических антител, требует дальнейшего изучения.

ВЫВОДЫ

1. Получены кандидатные штаммы ротавируса вида А, стабильно реплицирующиеся на перевиваемых клетках линии Vero, с уровнем инфекционной активности от 8,9 до 7,9 lg ТЦД₅₀/мл и с концентрацией, достаточной для создания вакцинного препарата.

- Инактивация штаммов-кандидатов ротавируса вида А достигается при температуре 37 °С и концентрации формальдегида от 0,05 до 0,025% в зависимости от длительности обработки. При инактивации вирусы теряют свою инфекционную активность, что было показано в тесте специфической безопасности (контроль полноты инактивации).
- После инактивации штаммов-кандидатов сохраняется антигенная активность капсидных белков (VP6) и иммуногенная активность штаммов при парентеральном введении мышам.
- Культуральные штаммы-кандидаты, полученные на клетках линии Vero, обладают специфическими антигенными свойствами рота-

⁸ Морозова ОВ. Генотиповое разнообразие и филодинамика циркулирующих на территории России ротавирусов, сравнение с вакцинными штаммами: дис. ... канд. биол. наук. М.; 2021.

- вируса вида А, позволяющими инициировать формирование у мышей специфического гуморального иммунного ответа, регистрируемого по уровню сывороточных иммуноглобулинов классов А, G, М при постановке непрямого гетерогенного варианта ИФА.
- Показано, что между уровнем антигенной активности (титр антигена) и уровнем иммуногенности (титр антител) используемых штаммов не во всех случаях выявлена прямая зависимость.
 - Для оценки иммуногенных свойств инактивированных штаммов ротавируса вида А достаточно применения экспериментальной мышинной модели. Определение иммуногенности важно для характеристики антигена ротавируса на этапах производства кандидатной вакцины для оценки ее качества по показателю «Подлинность».
 - Антитела к ротавирусу вида А, полученные при иммунизации, целесообразно использовать в тест-системе для контроля промежуточных продуктов в процессе производства вакцины.
 - Представленные данные позволяют рассматривать полученную композицию инактивированных штаммов ротавируса вида А в качестве основы для создания инактивированной ротавирусной вакцины.

Литература/References

- Бондарев ВП, Шевцов ВА, Индикова ИН, Евреинова ЕЭ, Горенков ДВ. Эпидемиология ротавирусной инфекции и тактика вакцинопрофилактики. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2019;19(2):81–7. Bondarev VP, Shevtsov VA, Indikova IN, Evreinova EE, Gorenkov DV. Rotavirus epidemiology and vaccination tactics. *BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2019;19(2):81–7 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-2-81-87>
- De Grazia S, Filizzolo C, Bonura F, Pizzo M, Di Bernardo F, Collura A, et al. Identification of a novel intra-genotype reassortant G₁P[8] rotavirus in Italy, 2021. *Int J Infect Dis*. 2024;140:113–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2024.01.020>
- Маянский НА, Куличенко ТВ, Маянский АН. Ротавирусная инфекция: эпидемиология, патология, вакцинопрофилактика. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2015;70(1):47–54. Mayansky NA, Kulichenko TV, Mayansky AN. Rotavirus infection: epidemiology, pathology, vaccination. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2015;70(1):47–54 (In Russ.). <https://doi.org/10.15690/vramn.v70i1.1231>
- Crawford SE, Ramani S, Tate JE, Parashar UD, Svensson L, Hagbom M, et al. Rotavirus infection. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17083. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.83>
- Sadiq A, Bostan N, Khan J, Aziz A. Effect of rotavirus genetic diversity on vaccine impact. *Rev Med Virol*. 2022;32(1):e2259. <https://doi.org/10.1002/rmv.2259>
- Jain S, Vashist J, Changotra H. Rotaviruses: is their surveillance needed? *Vaccine*. 2014;32(27):3367–78. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.04.037>
- Коровкин АС, Игнатьев ГМ. Результаты и перспективы вакцинопрофилактики ротавирусной инфекции в Российской Федерации. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(4):499–512. Korovkin AS, Ignatyev GM. Results and prospects of rotavirus immunisation in the Russian Federation. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(4):499–512 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-4-499-512>
- Burke RM, Tate JE, Dahl RM, Aliabadi N, Parashar UD. Rotavirus vaccination is associated with reduced seizure hospitalization risk among commercially insured US children. *Clin Infect Dis*. 2018;67(10):1614–6. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy424>
- Bibera GL, Chen J, Pereira P, Benninghoff B. Dynamics of G2P[4] strain evolution and rotavirus vaccination: a review of evidence for Rotarix. *Vaccine*. 2020;38(35):5591–600. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.06.059>
- Кондакова ОА, Никитин НА, Трифонова ЕА, Атабеков ИГ, Карпова ОВ. Вакцины против ротавируса: новые стратегии и разработки. *Вестник Московского университета. Серия 16. Биология*. 2017;72(4):199–208. EDN: ZISVQL
- Kondakova OA, Nikitin NA, Trifonova EA, Atabekov IG, Karpova OV. Rotavirus vaccines: new strategies and approaches. *Moscow University Biological Sciences Bulletin*. 2017;72(4):169–78. <https://doi.org/10.3103/S0096392517040071>
- Wang Y, Li J, Liu P, Zhu F. The performance of licensed rotavirus vaccines and the development of a new generation of rotavirus vaccines: a review. *Hum Vaccin Immunother*. 2021;17(3):880–96. <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1801071>
- Burke RM, Tate JE, Kirkwood CD, Steele AD, Parashar UD. Current and new rotavirus vaccines. *Curr Opin Infect Dis*. 2019;32(5):435–44. <https://doi.org/10.1097/qco.0000000000000572>
- Zhou Y, Wu J, Hu X, Chen R, Lin X, Yin N, et al. Immunogenicity of inactivated rotavirus in rhesus monkey, and assessment of immunologic mechanisms. *Hum Vaccin Immunother*. 2023;19(1):2189598. <https://doi.org/10.1080/21645515.2023.2189598>
- Костина ЛВ, Филатов ИЕ, Елисеева ОВ, Латышев ОЕ, Чернорыж ЯЮ, Юрлов КИ и др. Исследование безопасности и иммуногенности вакцины на основе VLP для профилактики ротавирусной инфекции на модели новорожденных карликовых свиней. *Вопросы вирусологии*. 2023;68(5):415–27. Kostina LV, Filatov IE, Eliseeva OV, Latyshev OE, Chernoryzh YaYu, Yurlov KI, et al. Study of the safety and immunogenicity of VLP-based vaccine for the prevention of rotavirus infection in neonatal minipig model. *Problems of Virology*. 2023;68(5):415–27 (In Russ.). <https://doi.org/10.36233/0507-4088-194>
- Fellows T, Page N, Fix A, Flores J, Cryz S, McNeal M, et al. Association between immunogenicity of a monovalent parenteral P2-VP8 subunit rotavirus vaccine and fecal shedding of rotavirus following Rotarix challenge during a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Viruses*. 2023;15(9):1809. <https://doi.org/10.3390/v15091809>
- Сейдахметова БА, Жаппарова ГА, Мараховская ЛГ, Теребай АА, Наханов АК. Масштабирование культуры клеток Vero для производства биопрепаратов. *Биобезопасность и биотехнология*. 2022;(9):44–52. Seidakhmetova BA, Zhapparova GA, Marakhovskaya LG, Terebay AA, Nakhanov AK. Scaling of Vero cell culture for the production of biological products. *Biosafety and Biotechnology*. 2022;(9):44–52 (In Russ.). <https://doi.org/10.58318/2957-5702-2022-9-44-52>
- Каа КВ, Игнатьев ГМ, Синюгина АА, Ишмухаметов АА. Чувствительность клеточных линий к вирусу Чикунгунья и подбор метода наработки вирусного материала в промышленных объемах. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(1):111–120. Kaа KV, Ignatyev GM, Sinyugina AA, Ishmukhametov AA. Suscepti-

- bility of various cell lines to the *Chikungunya virus* and method selection for commercial-scale production of viral material. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(1):111–120 (In Russ.).
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-1-111-120>
18. Грачев ВП, Хапчаев ЮХ. Применение перевиваемых линий клеток человека и животных для изготовления вирусных вакцин. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2008;(1):82–90. Grachev VP, Kharachaev YuKh. Use of continuous human and animal cell lines for the production of viral vaccines. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2008;(1):82–90 (In Russ.). EDN: [IJPFAR](https://doi.org/10.1586/erv.09.19)
 19. Barrett PN, Mundt W, Kistner O, Howard MK. Vero cell platform in vaccine production: moving towards cell culture-based viral vaccines. *Exp Rev Vaccines*. 2009;8(5):607–18. <https://doi.org/10.1586/erv.09.19>
 20. Louis KS, Siegel AC. Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. *Methods Mol Biol*. 2011;740:7–12. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6_2
 21. Белоусова РВ, Троценко НИ, Преображенская ЭА. *Практикум по ветеринарной вирусологии*. Москва: КолосС; 2013. Belousova RV, Trotsenko NI, Preobrazhenskaya EA. *Workshop on veterinary virology*. Moscow: KolosS; 2013 (In Russ.).
 22. Ашмарин ИП, Воробьев АА. *Статистические методы в микробиологических исследованиях*. Л.: Медгиз; 1962. Ashmarin IP, Vorobiev AA. *Statistical methods in microbiological research*. Leningrad: Medgiz; 1962 (In Russ.).
 23. Jiang B, Gentsch JR, Glass RI. Inactivated rotavirus vaccines: a priority for accelerated vaccine development. *Vaccine*. 2008;26(52):6754–8. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.10.008>
 24. Евреинова ЕЭ, Хантиминова ЛМ, Шевцов ВА, Меркулов ВА, Бондарев ВП. Перспективные направления в совершенствовании вакцин для профилактики полиомиелита. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(2):142–53. Evreinova EE, Khantimirova LM, Shevtsov VA, Merkulov VA, Bondarev VP. Promising opportunities to improve polio vaccines. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(2):142–53 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-2-336>
 25. Отрашевская ЕВ, Трухин ВП, Меркулов ВА, Игнатъев ГМ. Прогресс в разработке вакцин для профилактики лихорадки Чикунгунья и перспективы появления на рынке. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(1):42–64. Otraseuskaja EV, Trukhin VP, Merkulov VA, Ignatyev GM. Chikungunya vaccines: advances in the development and prospects for marketing approval. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(1):42–64 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-1-42-64>
 26. Coffin SE, Moser KA, Cohen S, Clark HF, Offit PA. Immunologic correlates of protection against rotavirus challenge after intramuscular immunization of mice. *J Virol*. 1997;71(10):7851–6. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.10.7851-7856.1997>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **М.В. Коврижко** — концепция исследования, формирование цели и задач исследований, написание и редактирование текста рукописи; **Е.П. Колпакова** — концепция исследования, написание текста рукописи, выполнение экспериментальных исследований, анализ и интерпретация результатов; **Д.С. Колпаков** — обсуждение результатов исследования и подготовка текста рукописи; **Т.И. Твердохлебова** — обсуждение и редактирование текста рукописи; **Е.С. Курбатов** — подготовка иллюстративного материала и редактирование текста рукописи.

Соответствие принципам этики. Протокол исследования одобрен Биоэтической комиссией ФБУН Ростов-НИИ микробиологии и паразитологии Роспотребнадзора (протокол № 05/17 от 23.05.2023).

Authors' contributions. All authors confirm that their authorship meets the ICMJE criteria. The most significant contributions were as follows. **M.V. Kovrizhko** conceptualised the study, formulated its aim and objectives, drafted and edited the manuscript. **E.P. Kolpakova** conceptualised the study, drafted the manuscript, conducted the experiments, analysed and interpreted the results. **D.S. Kolpakov** discussed the study results and prepared the manuscript for submission. **T.I. Tverdokhlebova** discussed and edited the manuscript. **E.S. Kurbatov** prepared the illustrative material and edited the manuscript.

Ethics approval. The study protocol was approved by the Bioethics Commission of the Rostov Research Institute of Microbiology and Parasitology of the Federal Service for Surveillance in Healthcare (Protocol No. 05/17 of 23 May 2023).

Об авторах / Authors

Коврижко Марина Владимировна / Marina V. Kovrizhko

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6571-7895>

Колпакова Елена Павловна / Elena P. Kolpakova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8090-2845>

Колпаков Дмитрий Сергеевич / Dmitry S. Kolpakov

ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-7604-4631>

Твердохлебова Татьяна Ивановна, д-р мед. наук, доц. / Tatiana I. Tverdokhlebova, Dr. Sci. (Med.), Assoc. Prof.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3912-0291>

Курбатов Егор Сергеевич / Egor S. Kurbatov

ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-2017-2974>

Поступила 22.04.2024

После доработки 18.10.2024

Принята к публикации 06.12.2024

Received 22 April 2024

Revised 18 October 2024

Accepted 6 December 2024