



Определение специфической активности ротавирусной вакцины на основе вирусоподобных частиц с использованием иммуноферментного анализа: разработка и валидация методики

И.Е. Филатов , М.М. Силаенкова, В.В. Цибезов, М.В. Баландина, С.Н. Норкина, О.Е. Латышев, О.В. Елисеева, С.А. Черепушкин, Т.В. Гребенникова

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Гамалеи, д. 18, Москва, 123098, Российская Федерация

 Филатов Илья Евгеньевич; filat69rus@yandex.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Создание вакцин на основе вирусоподобных частиц (virus-like particles, VLP), состоящих из рекомбинантных белков ротавируса типа А человека, имитирующих структуру нативного вируса, но не обладающих инфекционной активностью, является перспективным направлением для вакцинопрофилактики. Для оценки специфической активности таких вакцин оптимальным представляется применение метода иммуноферментного анализа (ИФА) для определения титра специфических IgG-антител к белкам ротавируса А в образцах сыворотки крови иммунизированных животных.

ЦЕЛЬ. Разработка и валидация методики оценки специфической активности ротавирусной вакцины на основе VLP с использованием метода ИФА для определения уровня антител к белкам VP2/6 ротавируса А в образцах сыворотки крови иммунизированных морских свинок.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Оценка специфической активности ротавирусной вакцины на основе VLP проводили *in vivo* с использованием трех видов экспериментальных животных: мышей линии BALB/c, морских свинок породы агути и новорожденных карликовых свиней. Вакцину в дозе 30 мкг вводили животным трехкратно внутримышечно. Оценивали уровни специфических иммуноглобулинов класса G (IgG) к белкам VP2/6 ротавируса А и вируснейтрализующих антител (ВНА) в образцах сыворотки крови животных методом непрямого ИФА и в реакции нейтрализации соответственно. Определяли среднее геометрическое значение титров (СГТ) антител. Валидацию методики оценки специфической активности проводили на двух сериях вакцины с использованием стандартных методов статистического анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Проведено сравнение уровней специфических IgG-антител к белкам VP2/6 и ВНА к ротавирусу типа А через 14 сут после первой, второй и третьей иммунизаций. Значительное увеличение титра антител и статистически значимые различия ($p < 0,05$) между группами наблюдались уже после второй иммунизации. Двукратная иммунизация вакциной приводила к образованию IgG-антител и ВНА у новорожденных карликовых свиней (СГТ антител — 200,0 и 108,9 соответственно) и морских свинок (СГТ антител — 12800 и 2600 соответственно). У иммунизированных мышей наблюдался значительный рост уровня специфических IgG-антител (СГТ — 572440). В качестве релевантной модели для валидации методики ИФА для определения специфической активности были выбраны морские свинки при использовании двукратной схемы иммунизации. По результатам валидационных испытаний двух серий вакцины установлено, что метод ИФА удовлетворял

критериям приемлемости по характеристикам: специфичность, повторяемость (коэффициент вариации не более 15% — для 1 и 2 серий вакцины 12,4 и 7,7%) и промежуточная прецизионность (коэффициент вариации не более 15% — для 1 и 2 серий вакцины 6,9 и 10,2%).

ВЫВОДЫ. Разработана и валидирована методика оценки специфической активности ротавирусной вакцины на основе VLP с использованием ИФА. Метод ИФА может быть использован для контроля показателя качества «Специфическая активность» ротавирусной вакцины на основе VLP.

Ключевые слова: ротавирус типа А человека; вирусоподобные частицы; VLP; ротавирусная вакцина; специфическая активность; иммуноферментный анализ; реакция нейтрализации; валидация; *in vivo*

Для цитирования: Филатов И.Е., Силаенкова М.М., Цибезов В.В., Баландина М.В., Норкина С.Н., Латышев О.Е., Елисеева О.В., Черепушкин С.А., Гребенникова Т.В. Определение специфической активности ротавирусной вакцины на основе вирусоподобных частиц с использованием иммуноферментного анализа: разработка и валидация методики. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2024;24(4):389–402. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-4-389-402>

Финансирование. Работа выполнена в рамках Государственной тематики Минздрава России «Разработка подходов для создания вакцины против инфекции, вызванной ротавирусом типа А» (регистрационный номер АААА-А18-118051490143-3).

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Enzyme-linked immunosorbent assay to determine the potency of a rotavirus vaccine based on virus-like particles: analytical procedure development and validation

Ilya E. Filatov , Maria M. Silaenkova, Valeriy V. Tsibezov, Marina V. Balandina, Svetlana N. Norkina, Oleg E. Latyshev, Olesja V. Eliseeva, Stanislav A. Cherepushkin, Tatyana V. Grebennikova

National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after honorary academician N.F. Gamaleya, 18 Gamaleya St., Moscow 123098, Russian Federation

 Ilya E. Filatov; filat69rus@yandex.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Rotavirus vaccines based on virus-like particles (VLPs), non-infectious recombinant proteins of human rotavirus A that mimic the structure of the native virus, show promise for preventive vaccination. Presumably, the optimal method to determine the potency of VLP-based rotavirus vaccines is the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method used to measure the titre of specific IgG antibodies to rotavirus A proteins in serum samples from vaccinated animals.

AIM. This study aimed at assessing the potency of a VLP-based rotavirus vaccine by developing and validating an analytical procedure using ELISA to determine the levels of antibodies to the VP2 and VP6 proteins of rotavirus A in serum samples from vaccinated guinea pigs.

MATERIALS AND METHODS. The potency of the VLP-based rotavirus vaccine was determined *in vivo* in three types of experimental animals, including BALB/c mice, agouti guinea pigs, and newborn minipigs. The animals received three intramuscular injections of the vaccine at a dose of 30 µg. This study used the indirect ELISA method to quantify VP2- and VP6-specific immunoglobulin G (IgG) antibodies and the virus-neutralisation test to measure neutralising antibodies (nAbs) to rotavirus A in animal serum samples. The study involved calculating the geometric mean titres (GMTs) of antibodies. The authors validated the analytical procedure for potency assessment on two batches of the vaccine using standard statistical analysis methods.

RESULTS. The study compared VP2- and VP6-specific IgG and nAb levels 14 days after the first, second, and third vaccinations. The authors observed a significant increase in antibody titres and statistically significant ($p < 0.05$) differences between groups as early as after the second vaccination. Double vaccination induced rotavirus-specific IgGs and nAbs in newborn minipigs (GMTs of 200.0 and 108.9, respectively) and guinea pigs (GMTs of 12,800 and 2,600, respectively). Vaccinated mice demonstrated a significant increase in rotavirus-specific IgG levels (GMT of 572,440). Guinea pigs were selected as a relevant model for validating the ELISA-based potency assessment procedure. The validation study used a double vaccination scheme. The validation using two batches of the VLP-based rotavirus vaccine indicated that the ELISA-based analytical procedure met the acceptance criteria for specificity, repeatability, and intermediate precision. The repeatability assessment resulted in a coefficient of variation (CV) of 12.4% for batch 1 and a CV of 7.7% for batch 2, whereas the intermediate precision assessment showed a CV of 6.9% for batch 1 and a CV of 10.2% for batch 2, which were within the acceptance criteria for both validation parameters ($CV \leq 15\%$).

CONCLUSIONS. The authors developed and validated an ELISA-based analytical procedure for assessing the potency of VLP-based preventive rotavirus vaccines. According to the study results, ELISA is applicable to the control of the potency of VLP-based preventive rotavirus vaccines.

Keywords: human rotavirus A; virus-like particles; VLP; rotavirus vaccine; potency; enzyme-linked immunosorbent assay; virus neutralisation test; validation; *in vivo*

For citation: Filatov I.E., Silaenkova M.M., Tsibezov V.V., Balandina M.V., Norkina S.N., Latyshev O.E., Eliseeva O.V., Cherepushkin S.A., Grebennikova T.V. Enzyme-linked immunosorbent assay to determine the potency of a rotavirus vaccine based on virus-like particles: analytical procedure development and validation. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2024;24(4):389–402. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-4-389-402>

Funding. The study was conducted as part of the State Programme of the Ministry of Health of the Russian Federation 'Development of approaches to create a vaccine against rotavirus A infection' (registration No. AAAA-A18-118051490143-3).

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Ротавирусная инфекция (РВИ) человека представляет собой распространенное заболевание, вызванное ротавирусами типов А, В и С [1]. Наиболее частой причиной диареи у детей первых лет жизни являются ротавирусы типа А. Ежегодно в мире регистрируется около 1,8 млн случаев госпитализации детей с РВИ [2], из которых почти 130 тыс. заканчиваются летальным исходом [3]. На территории Российской Федерации в 2022 г. 49% случаев острых кишечных инфекций пришлось на РВИ. На 100 тыс. населения заболеваемость составила около 62 человек. Наиболее подверженными заболеванию оказались дети в возрасте до двух лет¹.

В настоящее время единственным эффективным методом борьбы с заболеваемостью РВИ является вакцинопрофилактика. На территории Российской Федерации одобрены две вакцины для профилактики ротавирусной инфекции, пентавалентные, живые. Ротавирусные вакцины российского производства отсутствуют. Следует отметить, что использование живых

ротавирусных вакцин первого поколения может быть ограничено, поскольку при широком охвате вакцинацией выявлены случаи таких нежелательных явлений, как инвагинация кишечника [4]. Перспективным направлением разработки вакцин представляется создание препарата на основе вирусоподобных частиц (virus-like particles, VLP). VLP, сформированные рекомбинантными белками, имитируют структуру нативного ротавируса и обладают высокой иммуногенностью. Небольшой размер (60–80 нм) позволяет им проникать в лимфу через поры стенок лимфатических сосудов и далее во вторичные лимфоидные органы с последующей активацией Т- и В-клеток [5, 6]. VLP могут содержать поверхностные эпитопы различных генотипов вируса, что способствует выработке антител широкого спектра действия и формированию устойчивого гуморального или клеточного иммунного ответа в организме хозяина. Вакцины на основе VLP стимулируют В- и Т-лимфоциты по механизму, похожему на действие вируса, попавшего в организм хозяина [7, 8]. VLP свободны

¹ О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2022 году: Государственный доклад. М.: Роспотребнадзор; 2023. https://www.rosпотребнадзор.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=25076

от инфекционной вирусной РНК и не могут реплицироваться в клетках, что имеет важное значение, учитывая риск возникновения вирусных ревертантов в случае применения живых аттенуированных вакцин [9]. Кроме того, защитный эффект VLP наблюдается при более низких дозах, что позволяет значительно снизить затраты на производство вакцины [8].

Согласно регуляторным требованиям к иммунобиологическим лекарственным препаратам, в том числе вакцинам, их качество должно соответствовать комплексу показателей на всех этапах производства препарата². Одним из основных показателей качества является специфическая активность [10]. Для оценки этого показателя используют в том числе методы *in vivo*, основанные на определении иммунологического ответа у экспериментальных животных, привитых исследуемыми препаратами. В качестве модельных используют виды животных, максимально восприимчивых к изучаемому вирусу, у которых патогенез инфекционного процесса наиболее сходен с человеком³. Выбор для оценки иммуногенности VP2/6 был обоснован тем, что белок VP6 является основным высококонсервативным группоспецифическим белком вириона, а использование в качестве антигена в ИФА смеси белков VP2 и VP6 увеличивает чувствительность тест-системы на 15–30% [11].

Одной из наиболее релевантных моделей являются новорожденные поросята карликовых свиней, использование которых показало эффективность при оценке иммуногенности и протективной активности ротавирусных вакцин, что обусловлено значительным сходством в физиологическом развитии, анатомических аспектах и механизмах формирования системного и местного иммунитета младенцев и новорожденных поросят [12]. Однако их использование в качестве модели для контроля специфической активности вакцин при их серийном производстве является дорогостоящим и трудоемким процессом. В связи с этим представляется актуальной разработка метода определения данного показателя с использованием доступных видов лабораторных животных, в частности морских свинок.

Цель работы — разработка и валидация методики оценки специфической активности ротавирусной вакцины на основе VLP с использованием метода ИФА для определения уровня

антител к белкам VP2/6 ротавируса А в образцах сыворотки крови иммунизированных морских свинок.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

В работе использовали разработанную в ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России) кандидатную вакцину против ротавируса человека типа А на основе вирусоподобных частиц, включающих рекомбинантные белки VP2, VP4, VP6, VP7 генотипов G1, G2, G4, G9, P4, P8, синтезированные в бакуловирусной системе экспрессии, с адъювантом на основе сквалена [11]. Были использованы две серии вакцины. Препараты представляли собой эмульсию для внутримышечного введения с содержанием антигена 30 мкг/доза, объем дозы 0,5 мл. В качестве контроля применяли натрия хлорид-СОЛОфарм, раствор для инфузий 0,9% (ООО «Гротекс», Россия).

Экспериментальные животные

В исследовании использовали мышей линии BALB/c (самки массой 14–16 г); морских свинок породы агути (самки массой 300–350 г). Животные получены из питомника ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий» ФМБА России, филиал «Столбовая». В работе использовали новорожденных поросят карликовых свиней (АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», Россия) от свиноматок, не имеющих специфических антител к ротавирусу А человека. Возраст поросят на момент первой иммунизации составлял 4–5 сут. В течение периода исследования животные содержались в стандартных условиях вивария со свободным доступом к пище и воде.

Протокол исследования с использованием экспериментальных животных был одобрен биоэтической комиссией АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» (№ БЭК 1.42/22 от 21.09.2022) и локальным комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (№ 05/2022 от 06.10.2022). Эксперименты с животными, в том числе процедуру эвтаназии, проводили в соответствии с требованиями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных,

² ОФС.1.7.1.0018.18 Иммунобиологические лекарственные препараты. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

³ Миронов АН, ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К.; 2012. Миронов АН, ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 2. М.: Гриф и К.; 2012.

используемых в научных целях⁴, а также в соответствии с ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики».

Методы

Иммунизация. Животных делили на опытные и контрольные группы по 5 особей в каждой. Мышам и морским свинкам в опытных группах вакцину в дозе 30 мкг вводили трехкратно внутримышечно с интервалом 10–14 сут, новорожденным карликовым свиньям — с интервалом 9–10 сут. Животным контрольных групп вводили 0,9% раствор натрия хлорида аналогичным способом. Отбор крови проводили через 10–14 сут после каждой иммунизации в сухие чистые пробирки без антикоагулянта. Пробирки с кровью выдерживали в термостате при 37 °C в течение 30 мин, отделяли образовавшийся сгусток крови, центрифугировали при 1100 об/мин в течение 10 мин (5430 G, Eppendorf, США) и аккуратно отбирали надосадочную жидкость в чистые пробирки. Гемолизированные образцы исключали из исследования.

Иммуноферментный анализ. Для определения титра специфических иммуноглобулинов IgG к белкам VP2/6 в сыворотке крови иммунизированных животных использовали метод непрямого иммуноферментного анализа (ИФА). В лунки иммунологического 96-луночного планшета (Greiner, Германия) вносили 0,1 мл очищенных белков VP2/6 (5 мкг/мл) в 0,1 М карбонатно-бикарбонатном буфере, pH 9,5. Планшет инкубировали 18 ч при 4 °C, после чего удаляли избыток антигена четырехкратной отмывкой фосфатно-солевым буфером, содержащим 0,1% Твин-20, ФСБТ (pH 7,4). Блокирование свободных участков связывания проводили 1% желатином (GERBU Biotechnik, Германия) в ФСБТ в течение 1 ч при 37 °C, далее удаляли раствор и вносили в лунки по 0,1 мл исследуемых сывороток в различных разведениях в ФСБТ с содержанием 0,5% бычьего сывороточного альбумина (Sigma, США), ФСБТ-БСА. Планшет инкубировали 1 ч при 37 °C, промывали ФСБТ и добавляли 0,1 мл меченых пероксидазой антител к IgG мыши, морской свинки или свиньи (Sigma, США) в ФСБТ-БСА. Через 1 ч инкубации при 37 °C планшет отмывали ФСБТ и вносили в лунки 0,1 мл субстратного раствора 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ООО «Хема», Россия), далее проводили инкубацию 15 мин при комнатной температуре и останавливали реакцию добавлением 0,05 мл 1М серной кислоты. Оптическую

плотность определяли с использованием спектрофотометра Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 450 нм (ОП₄₅₀) [11]. За титр антител принимали разведение, в котором значение ОП₄₅₀ образца сыворотки в 2 раза превышало значение ОП₄₅₀ отрицательного контроля (сыворотка крови неиммунизированного животного).

Реакция нейтрализации. Определение уровня вируснейтрализующих антител (ВНА) к ротавирусу типа А проводили в реакции нейтрализации *in vitro* классическим методом [13]. Для постановки реакции использовали перевиваемую культуру клеток почки африканской зеленой мартишки MARC-145, полученную из коллекции культур клеток ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. Клетки культивировали в 96-луночном планшете в среде DMEM («ПанЭко», Россия), содержащей 5% фетальной сыворотки при 37 °C в атмосфере 5% CO₂. Исследуемые образцы сыворотки предварительно термически инактивировали при 56 °C в течение 30 мин, затем готовили двукратные последовательные разведения образцов (начальное разведение — 1:100) в среде DMEM с глутамином («ПанЭко», Россия). Ко всем разведениям сыворотки добавляли аттенуированный штамм Wa G1P[8] ротавируса человека, любезно предоставленный профессором L.J. Saif (OARDC, FAHRP, университет штата Огайо, США) [12], титр которого по уровню показателя 50% тканевой цитопатической дозы (ТЦД₅₀) составлял 5,5 lg ТЦД₅₀/0,1 мл (100 ТЦД₅₀/лунку). Разведение вируса готовили в питательной среде, содержащей 10 мкг/мл трипсина («Самсон-Мед», Россия). Образцы с сывороткой крови и вирусом выдерживали при температуре 37 °C в течение 1 ч, затем вносили к клеткам линии MARC-145, находящимся в состоянии 80–90% монослоя. Через 4–5 сут инкубации при 37 °C в атмосфере 5% CO₂ проводили учет результатов с использованием микроскопии (Olympus, CKX31SF, Япония) для определения цитопатического действия (ЦПД) в клетках [11, 14]. При учете результатов использовали следующие контроли: контроль клеток — лунки с клетками, не инфицированными вирусом (с полным сохранением клеточного монослоя); контроль инфицирующей дозы — лунки с клетками, инфицированными рабочим титром вируса (с полной деградацией клеточного монослоя). Нейтрализующим титром сыворотки считали ее наибольшее разведение, при котором наблюдалась нейтрализация вируса с отсутствием ЦПД в культуре клеток [14].

⁴ Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes.

Статистическая обработка данных.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программного пакета OriginPro 2023 (США). Для полученных данных в ИФА и реакции вирусной нейтрализации определяли среднее геометрическое значение обратных титров (СГТ) антител с указанием 95% доверительного интервала (95% ДИ).

Программа валидации включала исследование специфичности, повторяемости, промежуточной прецизионности. Регрессионный анализ калибровочной зависимости, расчет коэффициентов детерминации R^2 и статистический анализ данных проводили с использованием программы Microsoft Office Excel 2010.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Выбор экспериментальной модели животных и схемы иммунизации

При выборе модели животных и схемы иммунизации для оценки специфической активности ротавирусной вакцины на основе VLP наиболее значимыми параметрами являлись следующие: достоверное повышение титра специфических IgG-антител к белкам VP2/6 ротавируса типа А в сыворотках иммунизированных животных с последующим его нарастанием; достоверное повышение титра ВНА, при котором не регистрировали признаков ЦПД в культуре клеток в реакции нейтрализации.

Было проведено сравнение данных показателей на трех моделях животных, иммунизированных ротавирусной вакциной на основе VLP:

мыши, морские свинки и новорожденные карликовые свиньи (рис. 1–3). Выявлено, что однократная иммунизация не вызывает образования специфических IgG-антител и ВНА у карликовых свиней и морских свинок, однако приводит к значительной выработке IgG-антител у мышей – значение СГТ антител составило 128000.

После второй иммунизации наблюдалось статистически значимое повышение титра антител, а также были выявлены статистически значимые различия между группами животных. Двукратная иммунизация приводила к образованию специфических IgG-антител и ВНА у карликовых свиней (СГТ антител – 200,0 и 108,9 соответственно) и морских свинок (СГТ антител – 12800 и 2600 соответственно). У иммунизированных мышей наблюдался значительный рост уровня IgG-антител – значение СГТ антител составило 572440.

После третьей иммунизации наблюдался прирост специфических IgG-антител у всех трех видов модельных животных: у морских свинок уровень антител увеличился в 8 раз, у карликовых свиней – в 18,4 раза, у мышей – в 4,5 раза. Значения СГТ специфических IgG-антител составили: у мышей – 2457600, у морских свинок – 105733, у карликовых свиней – 3675,8. Эти данные коррелируют с результатами, полученными в реакции вирусной нейтрализации: уровень ВНА у морских свинок – 4800, у карликовых свиней – 485. Реакция вирусной нейтрализации у мышей не проводилась.

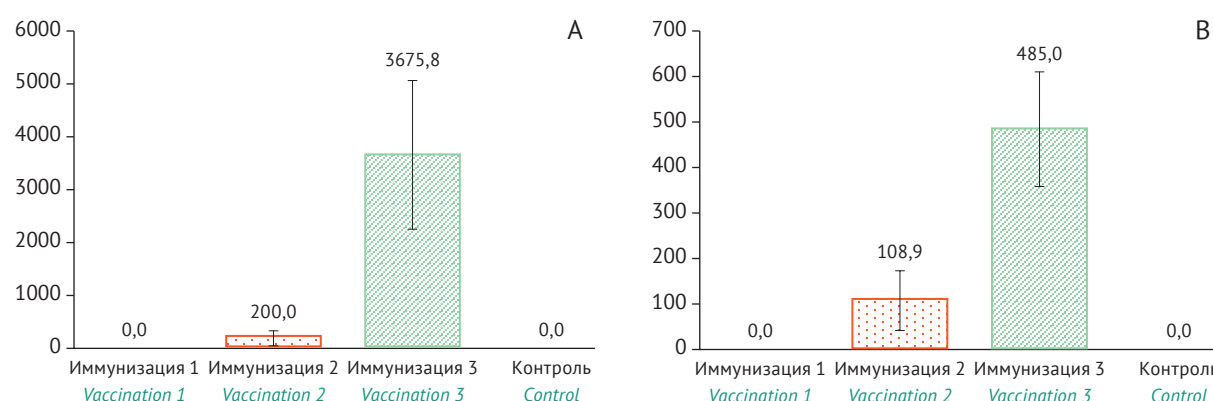


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. Уровень специфических IgG-антител к белкам VP2/6 (А) и вируснейтрализующих антител (В) у новорожденных карликовых свиней после трехкратной иммунизации ротавирусной вакциной на основе вирусоподобных частиц (30 мкг/доза). Ось X – номер иммунизации, ось Y – среднее геометрическое значений обратных титров антител. Данные представлены с указанием значений доверительного интервала (95% доверительный интервал). Различия между группой иммунизированных животных (иммунизация 2 и 3) и контролем (введение физиологического раствора) статистически значимы ($p < 0,05$).

Fig. 1. Levels of anti-VP2 and anti-VP6 IgG antibodies (A) and neutralising antibodies (B) to rotavirus after three vaccinations of newborn minipigs with a rotavirus vaccine based on virus-like particles (30 µg/dose). The X-axis represents the vaccination number, and the Y-axis shows the geometric means of reciprocal antibody titres. The data are presented with 95% confidence intervals. The differences between the vaccinated group (vaccinations 2 and 3) and the control group (normal saline administration) are statistically significant ($p < 0.05$).

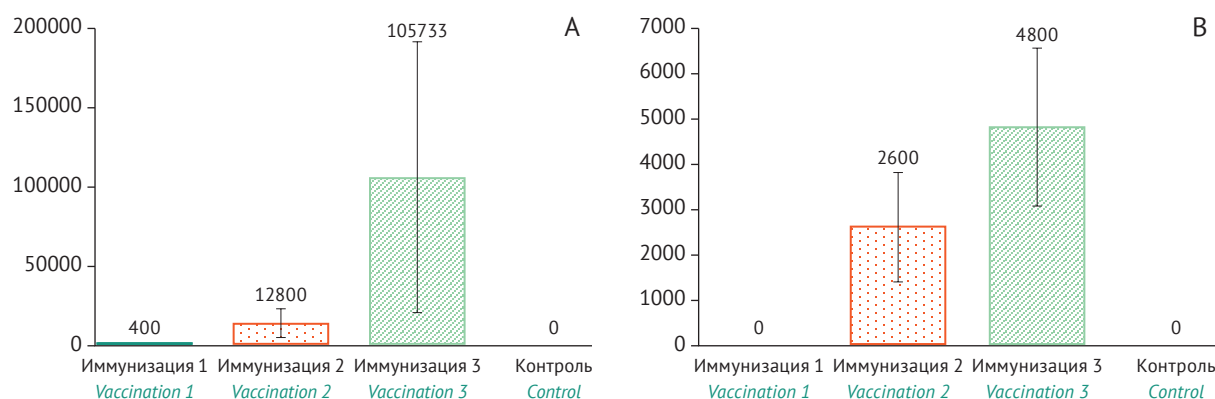


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 2. Уровень специфических IgG-антител к белкам VP2/6 (А) и вируснейтрализующих антител (В) у морских свинок после трехкратной иммунизации ротавирусной вакциной на основе вирусоподобных частиц (30 мкг/доза). Ось X — номер иммунизации, ось Y — среднее геометрическое значений обратных титров антител. Данные представлены с указанием значений доверительного интервала (95% доверительный интервал). Различия между группой иммунизированных животных (иммунизация 2 и 3) и контролем (введение физиологического раствора) статистически значимы ($p < 0,05$).

Fig. 2. Levels of anti-VP2 and anti-VP6 IgG antibodies (A) and neutralising antibodies (B) to rotavirus after three vaccinations of guinea pigs with a rotavirus vaccine based on virus-like particles (30 μ g/dose). The X-axis represents the vaccination number, and the Y-axis shows the geometric means of reciprocal antibody titres. The data are presented with 95% confidence intervals. The differences between the vaccinated group (vaccinations 2 and 3) and the control group (normal saline administration) are statistically significant ($p < 0.05$).

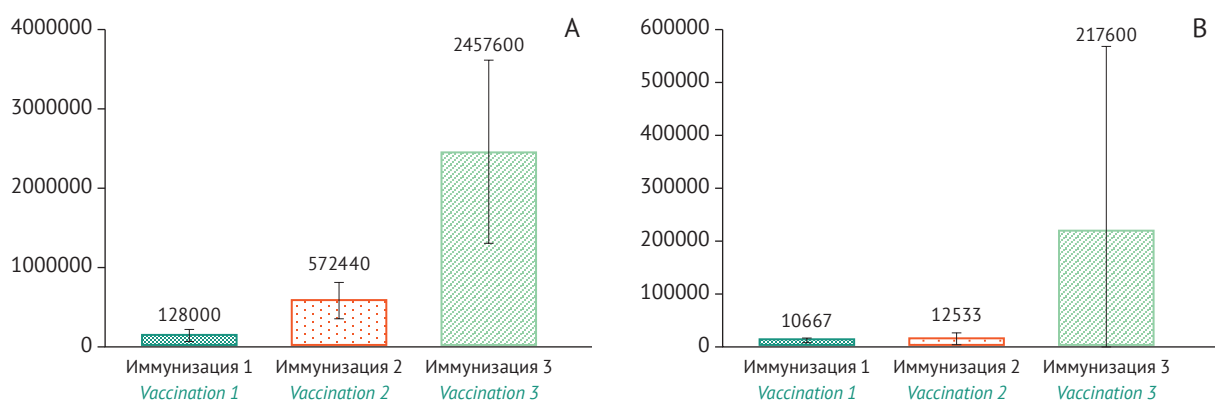


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 3. Уровень специфических IgG-антител к белкам VP2/6 после трехкратной иммунизации мышей линии BALB/c ротавирусной вакциной на основе вирусоподобных частиц (30 мкг/доза) (А) и уровень IgG-антител в контрольной группе с введением физиологического раствора (В). Ось X — номер иммунизации, ось Y — среднее геометрическое значений обратных титров антител. Данные представлены с указанием значений доверительного интервала (95% доверительный интервал). Различия между группой иммунизированных животных и контролем (введение физиологического раствора) статистически значимы ($p < 0,05$).

Fig. 3. Levels of anti-VP2 and anti-VP6 IgG antibodies after three vaccinations of BALB/c mice with a rotavirus vaccine based on virus-like particles (30 μ g/dose) (A) and levels of IgG antibodies in the control group receiving normal saline (B). The X-axis represents the vaccination intervals, and the Y-axis shows the geometric means of reciprocal antibody titres. The data are presented with 95% confidence intervals. The differences between the vaccinated group and the control group (normal saline) are statistically significant ($p < 0.05$).

Следует отметить, что у мышей в контрольной группе с введением физиологического раствора были зарегистрированы фоновые значения уровня антител (СГТ антител 10667) после первого введения, а также отмечался дальнейший рост значений (СГТ антител 12533 и 217600 для 2 и 3 иммунизации), чего не наблюдалось

в образцах сыворотки морских свинок и карликовых свиней. Полученные данные можно объяснить тем, что в организме мышей имеется определенный уровень гуморальной защиты в отношении ротавируса за счет уже сформированных собственных антител вне зависимости от вакцинации, вследствие чего их иммунная

система адаптирована для борьбы с этим вирусом [15]. Так как получение достоверных данных об эффекте исследуемой вакцины на мышах оказалось затруднительным, в связи с этим было принято решение об отказе от дальнейшего их использования в качестве модельных животных.

Результаты исследований показали, что карликовые свиньи являются подходящим модельным объектом для оценки специфической активности ротавирусных вакцин, однако это достаточно дорогостоящая модель для рутинных исследований. Применение морских свинок в качестве модельных животных обладает рядом преимуществ. В контрольной группе морских свинок с введением физиологического раствора не наблюдалось фоновых значений СГТ антител, в то время как в опытной группе животных, иммунизированных вакциной на основе VLP, выявлен выраженный иммунный ответ — при трехкратной внутримышечной иммунизации показано достижение высоких уровней специфических IgG-антител и ВНА. Сопоставление результатов ИФА и реакции нейтрализации, полученных после второй иммунизации, свидетельствует о формировании иммунного ответа на достаточном уровне, в связи с чем схема с двукратной иммунизацией представляется наиболее оптимальной для снижения нагрузки на иммунную систему при сохранении эффективности вакцинации.

Применение реакции нейтрализации как стандартной для определения уровня ВНА показало хорошие результаты в ходе исследования, однако данный метод является достаточно трудоемким и требует специальной подготовки персонала и оснащения помещений для обеспечения вирусной безопасности. Метод ИФА более простой в выполнении, при этом обладает высокой чувствительностью, что позволяет выявлять специфические антитела даже при их минимальной концентрации. Вследствие согласованности результатов методов ИФА и вирусной нейтрализации дальнейшие исследования по валидации метода определения специфической активности ротавирусной вакцины на основе VLP были проведены с использованием ИФА.

Валидация методики определения специфической активности

Валидация проводилась в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации XV изд. ОФС.1.1.0012⁵ с целью экспериментального подтверждения

пригодности метода непрямого ИФА для определения антител, специфических к ротавирусу А, в сыворотках крови иммунизированных морских свинок. Программа валидации включала исследование специфичности, повторяемости, промежуточной прецизионности.

Специфичность. В ходе исследования оценивали способность методики ИФА однозначно определять антитела, специфичные к белкам VP2/6 ротавируса А. Для подтверждения специфичности методики были подготовлены следующие образцы: положительный контрольный образец (К+) — поликлональная гипериммунная сыворотка морской свинки в разведении 1:100 в ФСБТ-БСА; отрицательный контрольный образец (К-) — образцы сыворотки трех неиммунизированных морских свинок в разведениях от 1:100 до 1:12800 с шагом 2 в ФСБТ-БСА; модельные растворы № 1–3 — образцы гипериммунной сыворотки морской свинки в разведениях от 1:100 до 1:12800 с шагом 2 в ФСБТ-БСА; контроль реагентов (КР) — ФСБТ-БСА.

Критерии приемлемости:

- среднее значение оптической плотности (OP_{450}) в образцах, содержащих КР, не должно превышать 0,1, что также подтверждает отсутствие влияния компонентов ФСБТ-БСА на результаты реакции;
- среднее значение OP_{450} в образце, содержащем К+, должно превышать 0,6;
- среднее значение OP_{450} в образцах, содержащих К-, не должно превышать 0,2;
- OP_{450} модельных растворов, содержащих антитела, специфичные к белкам VP2/6 ротавируса А, пропорциональна разведению модельных растворов.

Показано, что для полученных результатов соблюдены установленные критерии приемлемости (табл. 1).

Зависимость значений OP_{450} модельных растворов от количественного содержания специфических к ротавирусу А антител представлена на рисунке 4 (опубликован на сайте журнала⁶).

Таким образом, в ходе исследования специфичности методики показана способность предложенной тест-системы селективно выявлять IgG к VP2/6 ротавируса А. Определены критерии работоспособности предложенной методики, при которых полученные результаты соответствуют критериям приемлемости, в частности, среднее значение OP_{450} для образца К+ более 0,6; среднее значение OP_{450} для образцов

⁵ ОФС.1.1.0012 Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. Т. 1; 2023.

⁶ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-4-389-402-fig4>

Таблица 1. Результаты оценки специфичности методики иммуноферментного анализа
Table 1. Specificity validation results for the enzyme-linked immunosorbent assay

Наименование образца <i>Sample name</i>	Значения оптической плотности (ОП ₄₅₀) при разведениях <i>Absorbance (A₄₅₀) for the following dilutions</i>							
	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800
Сыворотка крови неиммунизированного животного № 1, К- <i>Serum of non-vaccinated animal 1, K-</i>	0,136	0,105	0,079	0,068	0,055	0,048	0,046	0,046
Сыворотка крови неиммунизированного животного № 2, К- <i>Serum of non-vaccinated animal 2, K-</i>	0,129	0,101	0,074	0,066	0,053	0,049	0,046	0,045
Сыворотка крови неиммунизированного животного № 3, К- <i>Serum of non-vaccinated animal 3, K-</i>	0,135	0,106	0,077	0,065	0,055	0,048	0,046	0,046
Стандартное отклонение, SD <i>Standard deviation, SD</i>	0,004	0,003	0,003	0,002	0,001	0,001	0,000	0,001
Среднее значение К- в каждом разведении <i>Mean K- for each dilution</i>	0,133	0,104	0,077	0,066	0,054	0,048	0,046	0,046
Среднее значение К- <i>Mean K-</i>	0,072							
Коэффициент вариации, CV (%) <i>Coefficient of variation, CV (%)</i>	2,8	2,5	3,3	2,3	2,1	1,2	0	1,3
Модельный раствор № 1 <i>Model solution 1</i>	0,643	0,539	0,480	0,462	0,407	0,392	0,302	0,243
Модельный раствор № 2 <i>Model solution 2</i>	0,618	0,546	0,506	0,470	0,396	0,396	0,294	0,246
Модельный раствор № 3 <i>Model solution 3</i>	0,684	0,627	0,534	0,508	0,427	0,349	0,333	0,267
Поликлональная гипериммунная сыворотка морской свинки (1:100), К+ <i>Polyclonal hyperimmune guinea pig serum (1:100), K+</i>	0,697	0,695	–	–	–	–	–	–
Контроль реагентов <i>Reagent control</i>	0,049	0,046	–	–	–	–	–	–

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

Примечание. К-, отрицательный контрольный образец; К+, положительный контрольный образец; «–» – не применимо.
Note. K-, negative control sample; K+, positive control sample; –, not applicable.

К- менее 0,2; значение ОП₄₅₀ контроля реагентов менее 0,1. Таким образом, методика непрямой ИФА обеспечивает высокую селективность определения специфических IgG-антител к ротавирусу А в образцах сыворотки крови морских свинок, иммунизированных вакциной.

Повторяемость. В ходе исследования оценивали степень близости друг к другу результатов измерений, получаемых в пределах короткого промежутка времени, при использовании одних и тех же реактивов и одного и того же оборудования. Для оценки повторяемости в качестве образцов были использованы образцы сыворотки крови морских свинок, иммунизированных ротавирусной вакциной на основе VLP (30 мкг/доза), и сыворотки контрольных (неиммунизированных) морских свинок. Был произведен расчет среднего значения обрат-

ной величины титра IgG к VP 2/6 ротавируса А, стандартного отклонения (SD) и коэффициента вариации (CV, %).

Критерий приемлемости. Коэффициент вариации результатов, полученных в условиях повторяемости, не должен быть более 15%.

Показано, что результаты оценки повторяемости соответствуют критериям приемлемости (табл. 2). Значения CV для вакцины серии 01 (12,4%), и для серии 02 (7,7%) не превышали 15%, что свидетельствует о повторяемости методики.

Промежуточная прецизионность. В ходе исследования оценивали степень близости друг к другу результатов измерений, получаемых разными сотрудниками в разные дни при использовании одних и тех же реактивов и одного и того же оборудования. Для оценки

Таблица 2. Результаты оценки повторяемости методики иммуноферментного анализа
Table 2. Repeatability validation results for the enzyme-linked immunosorbent assay

№ серии вакцины <i>Vaccine batch No.</i>	Обратная величина титра IgG к VP2/6 ротавируса А (индивидуальные и средние значения в измерениях) <i>Reciprocal titres of IgGs to rotavirus A VP2 and VP6 (individual and mean values)</i>								Среднее значение <i>Mean</i>	SD	CV, %
	Измерение 1 <i>Measurement 1</i>		Измерение 2 <i>Measurement 2</i>		Измерение 3 <i>Measurement 3</i>		Измерение 4 <i>Measurement 4</i>				
01	25600	22400	25600	28800	25600	25600	25600	22400	24800	3063,8	12,4
	12800		12800		25600		12800				
	25600		51200		25600		25600				
	25600		25600		25600		25600				
02	25600	25600	25600	22400	25600	25600	25600	22400	24000	1847,5	7,7
	25600		12800		25600		12800				
	25600		25600		25600		25600				
	25600		25600		25600		25600				

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

Примечание. SD – стандартное отклонение; CV – коэффициент вариации.
Note. IgG, immunoglobulin G; VP, virus protein; SD, standard deviation; CV, coefficient of variation.

Таблица 3. Результаты оценки повторяемости методики иммуноферментного анализа в условиях промежуточной прецизионности
Table 3. Intermediate precision validation results for the enzyme-linked immunosorbent assay

№ серии вакцины <i>Vaccine batch No.</i>	Обратная величина титра IgG к VP2/6 ротавируса А (индивидуальные и средние значения в измерениях) <i>Reciprocal titres of IgGs to rotavirus A VP2 and VP6 (individual and mean values)</i>								Среднее значение <i>Mean</i>	SD	CV, %
	Измерение 1 <i>Measurement 1</i>		Измерение 2 <i>Measurement 2</i>		Измерение 3 <i>Measurement 3</i>		Измерение 4 <i>Measurement 4</i>				
01	25600	25600	25600	22400	25600	22400	25600	22400	23200	1600	6,9
	25600		12800		12800		12800				
	25600		25600		25600		25600				
	25600		25600		25600		25600				
02	25600	25600	25600	22400	25600	25600	25600	28800	25600	1600	10,2
	25600		12800		25600		12800				
	25600		25600		25600		51200				
	25600		25600		25600		25600				

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

Примечание. SD – стандартное отклонение; CV – коэффициент вариации.
Note. IgG, immunoglobulin G; VP, virus protein; SD, standard deviation; CV, coefficient of variation.

промежуточной прецизионности анализ тех же образцов сывороток морских свинок, что и при оценке повторяемости, проводили на следующий день.
Критерий приемлемости. Сравнивали результаты оценки повторяемости и промежуточной прецизионности. Достоверность результатов ($P=95\%$) определяли по t -критерию Стьюдента. Рассчитанное значение критерия Стьюдента (t_{pac}) должно быть меньше табличного ($t_{табл}=2,45$ при $f=6$).

Показано, что результаты оценки промежуточной прецизионности соответствуют критериям приемлемости (табл. 3). Значения CV для вакцины серии 01 (6,9%) и серии 02 (10,2%) не превышали 15%, что подтверждает внутрилабораторную прецизионность методики. Рассчитанное значение критерия Стьюдента ($t_{pac}=0$) меньше табличного значения ($t_{табл}=2,45$), что свидетельствует об отсутствии существенных различий в результатах измерений, полученных при исследовании повторяемости и промежуточной прецизионности.

ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка специфической активности вакцин проводится в том числе по степени активации гуморального иммунного ответа у иммунизированных животных, используемых в качестве экспериментальной модели. Учитывая сложность и специфику иммунобиологических лекарственных препаратов, выбор подходящей модели животных для исследований крайне важен.

Способ и кратность введения вакцины также играют существенную роль при проведении исследований, так как от этого зависит выраженность иммунного ответа. Эти параметры должны быть аналогичны используемому в клинической практике. Внутримышечное введение вакцины является предпочтительным из-за оптимальных показателей всасывания, иммуногенности, скорости формирования поствакцинального иммунитета и требуемой точности вводимой дозы. Кроме того, этот путь введения соответствует способу, наиболее часто используемому в клинической практике.

Для ротавирусных вакцин в настоящее время отсутствует определенная модель для оценки эффективности вакцин, что является существенной проблемой [16]. Для изучения формирования иммунитета против РВИ используются разные модели животных (мыши, крысы, кролики, свиньи и др.)⁷. Каждая из этих моделей имеет свои преимущества и недостатки, включая восприимчивость к инфекции, влияние микробиоты на проявление РВИ и др. Наиболее часто применяются модели мышей и свиней [16]. В данной работе были рассмотрены три модели животных: мыши, морские свинки и карликовые свиньи.

Использование мышей в качестве модельных животных имеет ряд преимуществ. Мыши являются наиболее изученными животными, в том числе для исследования инфекций, включая ротавирус. Применение мышей экономически целесообразно при проведении экспериментов, так как они имеют относительно короткий срок жизни и быстро размножаются. Мыши, как и человек, восприимчивы к РВИ, что позволяет изучать развитие инфекции и эффективность вакцин на этих животных. Кроме того, в организме мышей регистрируется высокий уровень антител против ротавируса, что позволяет исследовать иммунные механизмы защиты от РВИ. На результат исследований при использовании этой модели влияет выбор линии мышей. Уровень иммунной защиты, сформированный у инбредных мышей, как правило, выше, чем

у беспородных мышей. В экспериментах чаще всего используются мыши линии BALB/c [17].

Применение морских свинок в качестве модельных животных широко распространено из-за их восприимчивости к РВИ и высокого уровня выработки антител против вируса. Чувствительность морских свинок к ротавирусу подтверждается серологическими данными. Кроме того, важное значение имеет доступность и экономичность этой модели.

Использование в качестве модели новорожденных карликовых свинок обусловлено подверженностью данных животных инфекции, вызванной ротавирусом человека. Этот вид животных является универсальной моделью для оценки качества ротавирусных вакцин, что объясняется значительным сходством физиологии, анатомических особенностей и механизмов формирования системного и местного иммунитета у человека и свиньи, а также возможностью воспроизведения клинических проявлений заболевания [12]. Результаты исследований по сравнению эффективности ротавирусных вакцин при заражении ротавирусом свинок показали, что применение данной модели позволяет проводить более объективную оценку потенциала вакцины в сопоставлении с моделью мышей [18]. Недостатком мышей в качестве модели является то, что они подвержены ротавирусной диарее только в возрасте до 2–3 нед. Это усложняет изучение формирования иммунного ответа к РВИ у мышей. В то же время поросята чувствительны к заражению ротавирусом по меньшей мере до возраста 8 нед., что достаточно для изучения поствакцинального иммунитета [12, 19, 20].

В ходе данного исследования было продемонстрировано формирование выраженного иммунного ответа при вакцинации ротавирусной вакциной на основе VLP на модели морских свинок, а также отсутствие фоновых значений СГТ антител в контрольной группе у морских свинок с введением физиологического раствора. Полученные результаты свидетельствуют о релевантности модели морских свинок в рамках нашего исследования.

Выбор вирусного антигена имеет важное значение при изучении антигенных и иммуногенных свойств ротавирусных вакцин. Белок ротавируса VP6 обладает как антигенными, так и иммуногенными свойствами и способен инициировать выработку специфических IgG и IgA слизистой оболочки [21]. Благодаря своей высокой иммуногенности, консервативным характеристикам

⁷ Морозова ОВ. Генотиповое разнообразие и филодинамика циркулирующих на территории России ротавирусов, сравнение с вакцинными штаммами: автореф. дисс. ... канд. биол. наук. М.; 2021.

белок VP6 рассматривается как основа для разработки кандидатных нереплицирующихся вакцин против РВИ, способный индуцировать гетерологичный перекрестный защитный иммунитет к РВИ на животных моделях [22, 23]. Ранее была продемонстрирована способность белка VP6 формировать устойчивый, длительный и специфический IgG-опосредованный иммунный ответ против различных штаммов ротавируса типа А.

При оценке специфической активности ротавирусной вакцины на основе VLP при помощи ИФА для увеличения чувствительности метода была использована комбинация рекомбинантных белков VP2/6. Была показана взаимосвязь между титрами специфических IgG-антител и ВНА после иммунизации животных. Валидация разработанной методики ИФА для определения специфической активности ротавирусной вакцины на основе VLP на модели морских свинок показала ее специфичность, повторяемость и промежуточную прецизионность при соблюдении критериев приемлемости.

ВЫВОДЫ

1. Разработан подход для оценки специфической активности ротавирусной вакцины на осно-

ве вирусоподобных частиц для определения титра специфических IgG-антител к белкам VP2/6 ротавируса А в образцах сыворотки крови иммунизированных животных с использованием двух методов — иммуноферментного анализа и реакции нейтрализации.

2. Установлено, что для изучения иммунного ответа после иммунизации ротавирусной вакциной оптимальной моделью являются морские свинки. Двукратная схема иммунизации вакциной в дозе 30 мкг/доза достаточна для обеспечения выраженного поствакцинального иммунитета.
3. В ходе валидационных испытаний установлено, что методика ИФА для определения титра специфических иммуноглобулинов класса G к VP2/6 ротавируса А в образцах сыворотки крови вакцинированных морских свинок удовлетворяет критериям приемлемости по таким характеристикам, как специфичность, повторяемость и промежуточная прецизионность, что обеспечивает получение достоверных результатов анализа.
4. Метод ИФА может быть использован для контроля показателя качества «Специфическая активность» ротавирусной вакцины на основе вирусоподобных частиц.

Литература/References

1. Estes MK. Rotaviruses and their replication. In: Knipe DN, Howley PM, Griffin DE, eds. *Fields virology*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2001. P. 1747–86.
2. Hallowell BD, Chavers T, Parashar U, Tate JE. Global estimates of rotavirus hospitalizations among children below 5 years in 2019 and current and projected impacts of rotavirus vaccination. *J Pediatric Infect Dis Soc*. 2022;11(4):149–58. <https://doi.org/10.1093/jpids/piab114>
3. Troeger C, Khalil IA, Rao PC, Cao S, Blacker BF, Ahmed T, et al. Rotavirus vaccination and the global burden of rotavirus diarrhea among children younger than 5 years. *JAMA Pediatr*. 2018;172(10):958–65. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2018.1960>
4. Yen C, Healy K, Tate JE, Parashar UD, Bines J, Neuzil K, et al. Rotavirus vaccination and intussusception — science, surveillance, and safety: a review of evidence and recommendations for future research priorities in low- and middle-income countries. *Hum Vaccin Immunother*. 2016;12(10):2580–9. <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1197452>
5. Черепушкин СА, Цибезов ВВ, Южаков АГ, Латышев ОЕ, Алексеев КП, Алтаева ЕГ и др. Синтез и характеристика вирусоподобных частиц ротавируса А (*Reoviridae: Sedoreovirinae: Rotavirus: Rotavirus A*) человека. *Вопросы вирусологии*. 2021;66(1):55–64. Cherepushkin SA, Tsibezov VV, Yuzhakov AG, Latyshev OE, Alekseev KP, Altaeva EG, et al. Synthesis and characterization of human rotavirus A (*Reoviridae: Sedoreovirinae: Rotavirus: Rotavirus A*) virus-like particles. *Problems of Virology*. 2021;66(1):55–64 (In Russ.). <https://doi.org/10.36233/0507-4088-27>
6. Bachmann MF, Jennings GT. Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(11):787–96. <https://doi.org/10.1038/nri2868>
7. Li C, Luo G, Zeng Y, Song F, Yang H, Zhang S, et al. Establishment of sandwich ELISA for quality control in rotavirus vaccine production. *Vaccines (Basel)*. 2022;10(2):243. <https://doi.org/10.3390/vaccines10020243>
8. Gupta R, Arora K, Singha Roy S, Joseph A, Rastogi R, Mehrotra Arora N. Platforms, advances, and technical challenges in virus-like particles-based vaccines. *Front Immunol*. 2023;14:1123805. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1123805>
9. Яговкин ЭА, Онищенко ГГ, Попова АЮ, Ежлова ЕБ, Мельникова АА, Соловьев МЮ и др. Состояние и перспективы разработки вакцин для специфической профилактики этеровирусной (неполио) инфекции. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2016;15(4):74–82. Yagovkin EA, Onishchenko GG, Popova AYU, Ezhlova EB, Melnikova AA, Soloviev MYU, et al. Condition and prospects of development of vaccines for specific prevention of enterovirus (nonpolio) infection. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2016;15(4):74–82 (In Russ.). <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2016-15-4-74-82>
10. Воробьева МС, Афонина ОС, Бархалева ОА, Щербинина МС, Саркисян КА, Рукавишников АВ и др. Анализ многолетнего изучения инактивированных культуральных вакцин для профилактики клещевого энцефалита отечественного и зарубежного производства по показателю качества — специфическая активность (иммуногенность). *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2015;(4):4–10. Vorobieva MS, Afonina OS, Barhaleva OA, Shcherbinina MS,

- Sarkisyan KA, Rukavishnikov AV, et al. The analysis of a long-term experience of studying inactivated cell-culture vaccines for preventing tick-borne encephalitis of domestic and foreign manufacture in terms of specific activity (immunogenicity). *BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2015;(4):4–10 (In Russ.). EDN: [VAEGZN](https://doi.org/10.1016/0042-6822(92)90734-7)
11. Филатов ИЕ, Цибезов ВВ, Баландина МВ, Норкина СН, Латышев ОЕ, Елисеева ОВ и др. Использование вирусоподобных частиц на основе рекомбинантных вирусных белков VP2/VP6 ротавируса А для оценки гуморального иммунного ответа методом ИФА. *Вопросы вирусологии*. 2023;68(2):161–71. Filatov IE, Tsibezov VV, Balandina MV, Norkina SN, Latyshev OE, Eliseeva OV, et al. Virus-like particles based on rotavirus A recombinant VP2/VP6 proteins for assessment the antibody immune response by ELISA. *Problems of Virology*. 2023;68(2):161–171 (In Russ.). <https://doi.org/10.36233/0507-4088-169>
 12. Хаметова КМ, Алексеев КП, Южаков АГ, Костина ЛВ, Раев СА, Мусиенко МИ и др. Молекулярно-биологические свойства клонированного штамма Wa ротавируса А человека. *Вопросы вирусологии*. 2019;64(1):16–22. Khametova KM, Alekseev KP, Yuzhakov AG, Kostina LV, Raev SA, Musienko MI, et al. Evaluation of the molecular-biological properties of human rotavirus A strain Wa. *Problems of Virology*. 2019;64(1):16–22 (In Russ.). <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-1-16-22>
 13. Sullivan EJ, Rosenbaum MJ. Methods for preparing tissue culture in disposable microplates and their use in virology. *Am J Epidemiol*. 1967;85(3):424–37.
 14. 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):415–28. 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):415–28 (In Russ.). <https://doi.org/10.36233/0507-4088-194>
 15. Ward RL, McNeal MM, Sheridan JF. Evidence that active protection following oral immunization of mice with live rotavirus is not dependent on neutralizing antibody. *Virology*. 1992;188(1):57–66. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(92\)90734-7](https://doi.org/10.1016/0042-6822(92)90734-7)
 16. McAdams D, Estrada M, Holland D, Singh J, Sawant N, Hickey JM, et al. Concordance of *in vitro* and *in vivo* measures of non-replicating rotavirus vaccine potency. *Vaccine*. 2022;40(34):5069–78. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2022.07.017>
 17. Choi AH, McNeal MM, Basu M, Flint JA, Stone SC, Clements JD et al. Intranasal or oral immunization of inbred and outbred mice with murine or human rotavirus VP6 proteins protects against viral shedding after challenge with murine rotaviruses. *Vaccine*. 2002;20(27–28):3310–21. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(02\)00315-8](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(02)00315-8)
 18. El-Attar L, Oliver SL, Mackie A, Charpilienne A, Poncet D, Cohen J, Bridger JC. Comparison of the efficacy of rotavirus VLP vaccines to a live homologous rotavirus vaccine in a pig model of rotavirus disease. *Vaccine*. 2009;27(24):3201–8. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.03.043>
 19. Franco MA, Greenberg HB. Immunity to rotavirus infection in mice. *J Infect Dis*. 1999;179(Suppl. 3):466–9. <https://doi.org/10.1086/314805>
 20. Azevedo MP, Vlasova AN, Saif LJ. Human rotavirus virus-like particle vaccines evaluated in a neonatal gnotobiotic pig model of human rotavirus disease. *Expert Rev Vaccines*. 2013;12(2):169–81. <https://doi.org/10.1586/erv.13.3>
 21. Niu X, Liu Q, Wang P, Zhang G, Jiang L, Zhang S, et al. Establishment of an indirect ELISA method for the detection of the bovine rotavirus VP6 protein. *Animals (Basel)*. 2024;14(2):271. <https://doi.org/10.3390/ani14020271>
 22. Afchangi A, Jalilvand S, Mohajel N, Marashi SM, Shoja Z. Rotavirus VP6 as a potential vaccine candidate. *Rev Med Virol*. 2019;29(2):e2027. <https://doi.org/10.1002/rmv.2027>
 23. Shoja Z, Jalilvand S, Latifi T, Roohvand F. Rotavirus VP6: involvement in immunogenicity, adjuvant activity, and use as a vector for heterologous peptides, drug delivery, and production of nano-biomaterials. *Arch Virol*. 2022;167(4):1013–23. <https://doi.org/10.1007/s00705-022-05407-9>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **И.Е. Филатов** — проведение экспериментальных исследований, написание текста рукописи; **М.М. Силаenkova** — проведение экспериментальных исследований, написание и редактирование текста рукописи; **В.В. Цибезов** — проведение экспериментальных исследований, редактирование текста рукописи; **М.В. Баландина, С.Н. Норкина, О.Е. Латышев, О.В. Елисеева, С.А. Черепушкин** — сбор и анализ результатов исследований, редактирование текста рукописи; **Т.В. Гребенникова** — формулирование выводов, утверждение окончательной версии статьи для публикации.

Соответствие принципам этики. Протокол исследования с использованием экспериментальных животных был одобрен биоэтической комиссией АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» (№ БЭК 1.42/22 от 21.09.2022) и локальным комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (№ 05/2022 от 06.10.2022).

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **I.E. Filatov** conducted the experiments and drafted the manuscript. **M.M. Silaenkova** conducted the experiments, drafted and edited the manuscript. **V.V. Tsibezov** conducted the experiments and edited the manuscript. **M.V. Balandina, S.N. Norkina, O.E. Latyshev, O.V. Eliseeva, and S.A. Cherepushkin** collected and analysed the results and edited the manuscript. **T.V. Grebennikova** formulated the conclusions and approved the final version of the manuscript for publication.

Ethics approval. The research was approved by the Bioethics Committee of the research-and-manufacturing company 'HOME OF PHARMACY' (Approval No. BEC 1.42/22 dated 21 September 2022) and the Local Biomedical Ethics Committee of the Federal State Budgetary Institution 'National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after honorary academician N.F. Gamaleya' of the Ministry of Health of the Russian Federation (Approval No. 05/2022 dated 6 October 2022).

Дополнительная информация. На сайте журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» размещен рисунок 4.
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-4-389-402-fig4>

Additional information. Figure 4 is published on the website of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*.
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-4-389-402-fig4>

Об авторах / Authors

Филатов Илья Евгеньевич / Ilya E. Filatov

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5274-224X>

Силаенкова Мария Михайловна / Maria M. Silaenkova

ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-1545-3969>

Цибезов Валерий Владимирович, канд. биол. наук / **Valeriy V. Tsibezov**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2150-5764>

Баландина Марина Владимировна, канд. биол. наук / **Marina V. Balandina**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-8179-1379>

Норкина Светлана Николаевна, канд. биол. наук / **Svetlana N. Norkina**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-9608-4713>

Латышев Олег Евгеньевич, канд. биол. наук / **Oleg E. Latyshev**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5757-3809>

Елисеева Олеся Васильевна, канд. биол. наук / **Olesja V. Eliseeva**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0723-9749>

Черепушкин Станислав Андреевич / Stanislav A. Cherepushkin

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1734-5369>

Гребенникова Татьяна Владимировна, д-р биол. наук, проф., член-корр. РАН / **Tatyana V. Grebennikova**, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6141-9361>

Поступила 04.06.2024

После доработки 28.10.2024

Принята к публикации 06.12.2024

Received 4 June 2024

Revised 28 October 2024

Accepted 6 December 2024