

На правах рукописи

Курашова Светлана Сергеевна

**ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ АДЬЮВАНТОВ РАЗЛИЧНОГО
ПРОИСХОЖДЕНИЯ, МЕТОДОВ ИНАКТИВИРОВАНИЯ ВИРУСОВ И
КОНТРОЛЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ
ХАНТАВИРУСНЫХ ВАКЦИННЫХ ПРЕПАРАТОВ**

03.02.02 - Вирусология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН»

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

Дзагурова Тамара Казбековна

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор,
член-корреспондент РАН

Ишмухаметов Айдар Айратович

Официальные оппоненты:

Юминова Надежда Васильевна – доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории эпидемиологического анализа и мониторинга инфекционных заболеваний, отдел вирусологии им. О.Г. Анджапаридзе, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»

Красильников Игорь Викторович – доктор биологических наук, профессор, директор НОЦ «Иммунобиотехнология». Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова» Роспотребнадзора

Защита диссертации состоится «15» сентября 2021 г. в 12:00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.255.01 (Д 001.026.02) на базе Федерального государственного автономного научного учреждения «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) по адресу: 108819, г. Москва, поселение Московский, посёлок Института полиомиелита, домовладение 8, корп. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного автономного научного учреждения «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) по адресу: 108819, г. Москва, поселение Московский, посёлок Института полиомиелита, домовладение 8, корп. 1 и на сайте <http://www.chumakovs.ru/>

Автореферат разослан «__» _____ 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат медицинских наук

Колясникова Надежда Михайловна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС), впервые выявленная на территории Евразии более 80 лет тому назад, вместе с другой этиологически сходной инфекцией - Хантавирусный пульмональный синдром (ХПС), впервые обнаруженной в 1993 году и широко распространённой в настоящее время в странах Северной и Южной Америки, составляют группу природно-очаговых не трансмиссивных зоонозов, так называемых хантавирусных лихорадок (Kruger D.H. et al., 2015).

В Российской Федерации ГЛПС занимает ведущее место среди всех природно-очаговых болезней человека (Tkachenko E.A. et al., 2019) и характеризуется преимущественно аэрогенным механизмом передачи возбудителя, системным поражением мелких сосудов, гемодинамическими расстройствами, геморрагическими проявлениями и своеобразным поражением почек (интерстициальный нефрит с развитием острой почечной недостаточности) (Лещинская Е.В., 1960; Сиротин Б.З., Клебанов Ю.А., 1987; Рощупкин В.И. Суздальцев А.А., 1990).

До сих пор не существует этиотропных средств лечения хантавирусных лихорадок, которые были бы направлены на элиминацию возбудителя инфекции. Профилактика заболеваний посредством дератизации мышевидных грызунов эффективна лишь отчасти, а во многих эндемичных районах и вовсе невозможна. Наиболее перспективным методом борьбы с хантавирусной инфекцией является вакцинопрофилактика населения эндемичных регионов. Так, эффективность вакцинопрофилактики ГЛПС была продемонстрирована на протяжении последних 30 лет в Китае, Южной и Северной Корее (Song G. et al., 1992; Choi Y. et al., 2003; Kim R.J. et al., 1991; Schmaljohn C.S., 2012). Однако вакцины, производимые в этих странах на основе вирусов Хантаан и Сеул, не обладают защитным действием против вируса Пуумала – основного возбудителя ГЛПС у жителей России и других стран Европы (Ткаченко Е.А и соавт., 2015).

В связи с этим, исследования по разработке наиболее перспективных вакцинных препаратов для специфической профилактики хантавирусных инфекций и, в том числе ГЛПС в России, относятся к числу наиболее важных (Ткаченко Е.А. и соавт., 2015), что, в свою очередь, обуславливает актуальность темы исследований данной диссертационной работы.

Степень разработанности темы исследования

В процессе изготовления как отечественных (Astakhova T. et al., 1995; Lee H.W. et al., 1999; Ткаченко Е.А. и соавт., 2009; Бархалёва О.А. и соавт., 2011; Ткаченко Е.А и соавт., 2015; Дзагурова Т.К. и соавт., 2019; Dzagurova T.K. et al., 2020), так и зарубежных (Hjelle B., 2002; Cho H.W. et al., 2002; Kruger D. et al., 2011) экспериментальных инактивированных хантавирусных вакцин были отмечены технологические сложности, обусловленные длительным сроком инактивирования вируса при обработке вируссодержащего субстрата формальдегидом, затруднениями с очисткой вирусспецифического антигена вследствие агрегации вирусных частиц и низкомолекулярных белков (последствие добавления формальдегида), а также необходимостью оптимизации методов оценки специфической

активности на технологических этапах изготовления вакцинных препаратов. Кроме того, недостатком убитых вакцин являются недолговечность иммунного ответа и снижение иммуногенности вакцины при ее хранении. Эти проблемы, возможно, имеют решение в случае применения соответствующих адъювантов. Публикаций, касающихся применения адъювантов в составе вакцин против хантавирусных инфекций, за исключением гидроксида алюминия, не удалось найти в научных изданиях, в том числе индексируемых в международных системах цитирования. Также отсутствуют литературные данные о влиянии разных способов инактивирования хантавирусов на иммуногенные свойства вакцин. Эти нерешенные вопросы, касающиеся выяснения биотехнологических закономерностей изготовления инактивированных вакцин против ГЛПС, предопределили цель и задачи настоящей работы.

Цель исследования

Оценка иммуностимулирующей эффективности адъювантов различного происхождения, а также анализ эффективности методов инактивирования хантавирусов и контроля специфической активности хантавирусных вакцинных препаратов.

Задачи исследования

1. Провести анализ научно-информационных источников, затрагивающих научно-технологическую проблему, исследуемую в рамках темы диссертации, включая применение адъювантов различного происхождения, способов инактивирования хантавирусов и методов контроля специфической активности вакцинных препаратов.
2. Разработать метод контроля специфической активности хантавирусных вакцинных препаратов на основе ПЦР в реальном времени.
3. Разработать способ определения минимальной и рабочей иммунизирующих доз вакцинного препарата по соотношению числа копий вирусной РНК/мл и уровня продуцирования нейтрализующих антител в ответ на введение вакцинного препарата мышам BALB/c.
4. Провести сравнительную оценку эффективности методов инактивирования хантавирусов с использованием формальдегида, β -пропиолактона, УФ-излучения, перекиси водорода и термоинактивации.
5. Провести сравнительную оценку иммуностимулирующей эффективности адъювантов различного происхождения в составе экспериментальных вакцинных препаратов по степени продуцирования нейтрализующих антител и отдельных цитокинов у мышей BALB/c.
6. Определить зависимость стабильности иммуногенной активности экспериментальных вакцинных препаратов от разных способов их приготовления и хранения.
7. Провести анализ профиля цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-12, ИНФ- γ в сыворотках крови мышей BALB/c, иммунизированных экспериментальными вакцинными препаратами.

Научная новизна

Впервые на основании полученных результатов исследования проведен анализ иммуностимулирующей и иммуномодулирующей эффективности адъювантов различного происхождения в составе экспериментальных хантавирусных вакцинных препаратов, а также дана оценка эффективности методов инактивирования хантавирусов.

Впервые установлена способность 3-х адъювантов (липополисахарид Ac3-S-LPS *Shigella sonnei*, рекомбинантный термолабильный энтеротоксичный белок В *Escherichia coli* и

ремоделированные сферические частицы *Tobacco mosaic virus*) повышать иммуногенную активность хантавирусных вакцинных препаратов.

Показано, что липополисахарид Ac3-S-LPS, помимо наиболее высокой по сравнению с другими адьювантами иммуностимулирующей эффективности, способствовал повышению стабильности вакцинных препаратов при хранении.

Установлено, что липополисахарид Ac3-S-LPS в составе хантавирусных вакцин активизирует как гуморальное, так и клеточное звено иммунитета, стимулируя индукцию цитокинов ИЛ-12 и ИФН- γ .

Впервые установлено свойство β -пропиолактона снижать агрегацию инактивированных вирусных частиц и фрагментов клеточных белков, что приводит к снижению концентрации общего белка в вакцинном препарате и сокращению потерь вирусного компонента.

Впервые установлена прямая зависимость между содержанием количества копий вирусной РНК в инактивированном β -пропиолактоном вакцинном препарате и его иммуногенной активностью.

Теоретическая и практическая значимость работы

Имуностимулирующая способность трех адьювантов различной природы (низкоэндогенный липополисахарид Ac3-S-LPS *Shigella sonnei*, рекомбинантный термолабильный энтеротоксичный белок В *Escherichia coli* и ремоделированные сферические частицы *Tobacco mosaic virus*), установленная на модели хантавирусов, теоретически может быть использована для совершенствования вакцинных препаратов против возбудителей других вирусных инфекций.

Разработаны оптимальные условия применения β -пропиолактона для инактивирования вакцинных штаммов хантавирусов, а также метода ПЦР в реальном времени для контроля специфической активности, что позволяет значительно повысить технологичность изготовления хантавирусных вакцинных препаратов. Все методические подходы, в соответствии с полученными результатами, могут быть использованы при конструировании и освоении промышленного производства хантавирусных вакцин, широкое внедрение которых в практику здравоохранения позволит в значительной степени уменьшить тяжесть социально-экономических последствий, связанных с проблемой ГЛПС в России.

Методология и методы исследования

Для выполнения исследований и решения поставленных задач с учётом теоретической базы, использовали комплекс современных лабораторных методов (включая вирусологические, иммунологические и молекулярно-генетические), отражающий новизну научных подходов в изучаемой области. На основании анализа отечественной и зарубежной библиографии была организована исследовательская деятельность.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Разработаны оптимальные условия применения метода ПЦР в реальном времени для контроля специфической активности хантавирусных вакцинных препаратов.
2. Количественное содержание числа копий вирусной РНК в экспериментальной вакцине, инактивированной β -пропиолактоном, пропорционально степени её иммуногенной активности, что

позволяет использовать этот критерий оценки специфической активности вакцины для расчета минимальной и рабочей иммунизирующих доз вакцинных препаратов.

3. Применение метода ПЦР в реальном времени позволяет контролировать количественное содержание целевых компонентов (хантавирусов) в составе экспериментальных вакцинных препаратов.

4. В результате исследования сравнительной эффективности 5 методов инактивирования хантавирусов установлена наибольшая эффективность использования β -пропиолактона, который, в отличие от формальдегида, перекиси водорода и ультрафиолетового облучения, обуславливает снижение содержания балластных белков в экспериментальных вакцинных препаратах примерно в 10 раз, что повышает технологичность процесса производства хантавирусных вакцин.

5. Применение адъювантов различной природы (низкоэндоотоксичный липополисахарид Ac3-S-LPS *Shigella sonnei*, рекомбинантный термолабильный энтеротоксичный белок В *Escherichia coli* и ремоделированные сферические частицы *Tobacco mosaic virus*) обеспечивают повышение иммуногенной активности вакцинных препаратов.

6. Низкоэндоотоксичный липополисахарид Ac3-S-LPS *Shigella sonnei*, на фоне усиления иммуногенной активности, способствует повышению стабильности вакцинных препаратов при хранении.

7. Установлена иммуномодулирующая эффективность адъювантов, особенно липополисахарида, вызывать индукцию цитокинов ИЛ-12 и ИФН- γ в сыворотках крови мышей BALB/c.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных в ходе работы данных определяется достаточным числом исследований, длительным сроком наблюдений, комплексным подходом к проведению исследований, выполненным с использованием современных методов и статистической обработкой полученных результатов. Все выводы и практические рекомендации диссертации логично вытекают из полученных результатов и соответствуют цели и задачам работы.

Материалы исследования были представлены и обсуждены на следующих конференциях: конференция молодых ученых «Фундаментальная и прикладная микробиология» (Москва, 19 апреля 2017 г.); научно-практическая конференция молодых ученых «Актуальные вопросы эпидемиологии, диагностики, лечения и профилактики инфекционных и онкологических заболеваний» (Москва, 17-18 апреля 2018 г.); конгресс по инфекционным болезням «Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы» (Москва, 1-3 апреля 2019 г.); XI Международная конференция по хантавирусам (Лёвен, Бельгия, 1-4 сентября 2019 г.); всероссийская научно-практическая конференция «Актуальные проблемы эпидемиологии инфекционных и неинфекционных болезней», (Москва, 24–25 октября 2019 г.).

Личное участие автора в получении результатов

Автором проведен анализ литературы, изучена степень разработанности проблемы с определением цели, задач исследования и его дизайна. Результаты, представленные в данной работе, получены лично автором или при его непосредственном участии. Автор лично провёл статистическую обработку, сформулировал основные положения и выводы диссертации. Лично или с участием автора

подготовлены основные публикации по материалам исследования. В целом, личный вклад в выполнение творческой части исследования – в пределах 90%.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 03.02.02 – «вирусология». Результаты проведенного исследования соответствуют областям исследований: пунктам 2, 7, 10 паспорта специальности «вирусология».

Публикации

Основные результаты работы полностью отражены в печати. По теме диссертации опубликовано 39 печатных работ, из них в журналах ВАК - 11 публикаций, в системе РИНЦ -25 публикаций (14 из них – тезисы), в системе Scopus- 7 публикаций, в системе Web of Science - 4 публикации, тезисы, опубликованные за рубежом – 5, тезисы, опубликованные в сборниках российских конференций – 18.

Структура и объем диссертации.

Диссертационная работа изложена на 162 странице и состоит из введения, обзора литературы, главы, посвящённой описанию материалов и методов исследования, 4 глав с результатами собственных исследований, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы. Диссертация иллюстрирована 13 таблицами, 21 рисунком. Библиографический указатель содержит 284 источника, включая 45 работ отечественных и 238 зарубежных авторов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение

Отражены актуальность и степень разработанности темы исследования, обозначены цель и задачи работы, определены научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, методология и методы исследования, основные положения, выносимые на защиту, степень достоверности и результаты апробации, обозначены личный вклад автора, публикации по теме диссертации, её структура и объём.

Обзор литературы

Проведена оценка данных отечественных и зарубежных исследователей в части общей характеристики геморрагической лихорадки с почечным синдромом, методов инактивирования вирусов, а также описания и применения адьювантов.

Материалы и методы

Культуры клеток. Vero – (ATCC CCL-81) перевиваемая культура клеток почки зеленой мартышки. Получена из ВОЗ (WHO VERO cell bank from ECACC, Accession number 991042). VeroE6 – (ATCCNo. CRL-1586) клон Vero C1008 культуры VERO. Получена на 108 пассаже из Каролинского Института, Швеция.

Вирусы. Вакцинные штаммы вирусов Пуумала, Хантаан и Сочи: ПУУ-ТКД/VERO, ХТН-Р-88/VERO и ДОБ-СОЧИ/VERO депонированы в Государственной коллекции вирусов (НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН) под номерами №1026, №1283 и №1282, соответственно. Полногеномные сиквенсы вакцинных штаммов зарегистрированы в GenBank под номерами: PUU-TKD/VERO: S –

MH251331, M–MH251332, L–MH251333; HTN-P88/VERO: S–MH251328, M–MH251329, L–MH251330; DOB-SOCHI/VERO: S–MH251334, M - MH251335, L – MH251336.

Метод фокус образующих единиц (ФОЕ). Использовали ранее описанный метод (Дзагурова Т.К. и др., 2008) для выявления и титрования вирусов (lg ФОЕ/мл) в культуре клеток Vero E6.

Реакция нейтрализации (РН). Использовали ранее описанный метод (Дзагурова Т.К. и др., 2008) для выявления нейтрализующих антител (нАТ) по подавлению фокусобразующих единиц в культуре клеток Vero E6. За титр нейтрализующих антител принимали разведение сыворотки, подавляющее 50% ФОЕ, выявленных в контрольном образце вируса. Критерием достаточной иммуногенности считали наличие в сыворотке крови экспериментальных животных нейтрализующих антител в титре $\geq 4,32 \log_2$. В контрольных группах мышей BALB/c, которым вводили 0,85% физиологическим раствор, подавление ФОЕ не регистрировали (предел отсечения РН/ФОЕ₅₀ $\leq 2.32 \log_2$).

Непрямой метод флюоресцирующих антител (МФА). Антитела в сыворотках крови мышей BALB/c выявляли, используя культуральные антигены вирусов Пуумала (ПУУ), Куркино (КУР), Сочи (СОЧ), Хантаан (ХТН), Сеул (СЕУ) и антивидовые антитела (кроличьи IgG против мышинных IgG+ IgM), меченных ФИТЦ. Исследования проводили с помощью люминесцентного микроскопа Olympus CX31 (Япония), используя водно-иммерсионный объектив LUMPlanFI 60x/0.90W.

Метод иммуноферментного анализа (ИФА). Для определения антигенов хантавирусов использовали иммуноферментную тест-систему «Хантагност» производства ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» согласно инструкции производителя, а также метод ИФА с использованием моноклональных антител для детекции антигенов – тест-систему «ХАНТА-N» (Дзагурова Т.К. и др., 2013).

Индикация цитокинов. Содержание интерлейкинов в сыворотках крови мышей BALB/c, взятых у интактных мышей, и мышей, которым были введены исследуемые препараты, определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью коммерческого набора ELISA kits (Cusabio, WuhanHuamei, BiotechCo. Ltd, China), согласно инструкции производителя. Результаты выражали в пг/мл.

Молекулярно-генетические методы. Специфическую активность инактивированных экспериментальных вакцинных препаратов, приготовленных на основе вакцинных штаммов ПУУ-ТКД/VERO, ДОБ-СОЧИ/VERO и ХТН-P-88/VERO определяли методом ПЦР-РВ по ранее описанной методике (Егорова М.С. и др., 2013) с праймерами и зондами, содержащими флуоресцентную метку карбоксифлуоресцеин (FAM) на 5' конце и гаситель флуоресценции BHQ2 на 3'конце. Синтез праймеров и зондов выполнен в ЗАО «Евроген», Москва.

РНК выделяли из хроматографически очищенного концентрата ранее описанным методом хлороформ-фенольной экстракции (Епринцев А.Т. и др., 2008) с применением коммерческого препарата TRI Reagent® (Sigma Aldrich, США) по методике производителя.

Вакцинные препараты. Для исследований сравнительной эффективности адъювантов и методов инактивирования хантавирусов готовили полуфабрикаты экспериментальных вакцинных препаратов

по ранее описанной технологии (Ткаченко Е.А. и др., 2015), исключая этапы инактивации и добавления гидроксида алюминия. Было приготовлено четыре вида экспериментальных препаратов, включая три моновалентных: ВАК-ПУУ, ВАК-ХТН и ВАК-СОЧ на основе вакцинных штаммов вируса Пуумала (ПУУ-ТКД/VERO), вируса Хантаан (ХТН-Р-88/VERO) и вируса Сочи (ДОБ-СОЧИ/VERO), соответственно, а также поливалентный (трёхвалентный) поли-ВАК, для приготовления которого объединяли в равных объёмах каждый из 3-х моновалентных препаратов (ВАК-ПУУ+ВАК-ХТН+ВАК-СОЧ).

Методы инактивации. Исследования сравнительной инактивирующей активности методов с применением формальдегида (ФА), β -пропиолактона (β -ПЛ), перекиси водорода (H_2O_2), ультрафиолетового излучения (УФ), и термоинактивации проводили на модели вируса Пуумала по ранее описанным методикам (Ткаченко Е.А. и др., 2015, Курашова С.С. и др., 2018, Егорова М.С. и др., 2020).

Для определения полноты инактивации хантавируса применяли ранее описанную методику (Ткаченко Е.А. и др., 2015)

Адьюванты. Гидроксид алюминия (АЛ) (Alhydrogel® «85» (Brenntag GmbH, Германия); сферические частицы (СЧ) - продукт термического ремоделирования вируса табачной мозаики (получены на кафедре вирусологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова); термолабильный энтеротоксин Б (ТЛБ) - рекомбинантный энтеротоксигенный белок *Escherichia coli* (получен в ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи»); липополисахарид (ЛПС) - гомогенная ЛПС-субфракция *S. sonnei* - Ac3-S-LPS (получен в ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА).

К образцам разведений вакцинных полуфабрикатов добавляли исследуемые концентрации адьювантов, таким образом, чтобы концентрация адьювантов была одинаковой для каждого вакцинного препарата вне зависимости от его разведения.

Стабильность вакцинных препаратов определяли через 6, 12 и 32 месяцев хранения при температуре 6 ± 2 °С.

Лабораторные животные. Исследования выполнялись на мышах-самках BALB/c массой тела 18-20 г., поставляемых филиалом «Андреевка» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий» ФМБА. Содержание экспериментальных животных соответствовало правилам, принятым Европейской конвенцией по защите животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986) и правилами лабораторной практики (Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 19.06.2003, №267). Протокол исследования одобрен этическим комитетом ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН». Эксперименты с использованием инфекционных материалов проводили в лаборатории, оборудованной специальным блоком для работы с вирусами 2-й группы патогенности, на работу с которыми имеется разрешение Роспотребнадзора.

Перед началом исследования животные, отвечающие критериям включения в эксперимент, были распределены рандомизировано на группы по 7 мышей. Иммуностимулирующую активность адьювантов исследовали на модели полуфабриката вакцинного препарата ВАК-ПУУ (далее ВАК) и

трехвалентного препарата поли-ВАК. Экспериментальные группы включали: ВАК без адьювантов; ВАК-СЧ/100 (100 мкг/мл); ВАК-СЧ/150 (150 мкг/мл); ВАК-СЧ/300 (300 мкг/мл); ВАК-ТЛБ/7.5 (7.5 мкг/мл); ВАК-ТЛБ/0.2 (0.2 мкг/мл); ВАК-ЛПС (50 мкг/мл); ВАК-АЛ (1 мг/мл); поли-ВАК без адьювантов; поли-ВАК-АЛ (1 мг/мл); поли-ВАК-ЛПС (50 мкг/мл). Контрольные группы: К-ФР (физиологический раствор натрия хлорида); К-СЧ/300; К-ЛПС; К-ТЛБ; К-АЛ.

Для определения стабильности экспериментальных вакцинных препаратов при хранении в течение 6, 12 и 32 месяцев при температуре 6 ± 2 °С мышей BALB/c иммунизировали образцами готового экспериментального препарата, приготовленного на основе вируса Пуумала (ВАК без адьювантов, ВАК-ЛПС (50 мкг/мл), ВАК-АЛ (1 мг/мл), ВАК/лиофилизация, ВАК-ЛПС/лиофилизация), а также образцами поливалентного препарата (поли-ВАК без адьювантов, поли-ВАК-АЛ (1 мг/мл), поли-ВАК-ЛПС (50 мкг/мл)). Контрольные группы: К-ФР; К-ЛПС.

Животным опытных групп вводили в/м 3-хкратно исследуемый препарат в объеме 0,5 мл. Животным контрольной группы вводили в том же объеме и той же кратности ФР с соответствующими адьювантами. Забор крови проводился через 14 дней после иммунизации. Животных выводили из эксперимента помещением в камеру с CO₂ с последующим обескровливанием методом декапитации.

Сыворотки крови мышей, собранные через две недели после второй и третьей иммунизаций, прогревали при +56 °С в течение 30 минут и хранили до исследования при 6 ± 2 °С или в замороженном виде (-70°С) не более 2-х месяцев.

Статистический анализ. Расчет минимального объема выборки вычисляли при помощи базовой функции power.t.test для уровня статистической значимости не менее 95%. Результаты экспериментов (совокупные данные трех независимых опытов) были проанализированы, сгенерированы и графически представлены в программном обеспечении GraphPad Prism версия 8.4.0 (Калифорния, США). Определение уровня значимости различий между несколькими группами было выполнено с использованием непараметрического метода одностороннего дисперсионного анализа ANOVA с тестом множественного сравнения Тьюки, Бартлетта и Даннетта. Значения количественных данных (количество копий РНК/мл, ФОЕ/мл, ИФА) выражались в виде среднего арифметического \pm стандартных отклонений ($M\pm m$) или в виде среднегеометрических значений титра нАТ в двоичных логарифмах \pm стандартное отклонение. Статистически значимыми принимали различия при $p\leq 0,05$, если не указано иное (ns = несущественные различия, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,005$, **** $p<0,0001$). Для оценки взаимосвязи количества копий РНК/мл и титра нейтрализующим антител определяли коэффициент ранговой корреляции Спирмена – r_s , с его статистической значимостью по степени вероятности – p . В зависимости от знака (+) или (-) корреляция оценивалась как прямая или обратная соответственно. Сила взаимосвязи определялась по величине коэффициента r_s : * – значимая корреляция, ** – высокозначимая корреляция; сила взаимосвязи при $r_s< 0,19$ – очень слабая, $r_s= 0,2-0,29$ – слабая; $r_s= 0,3-0,49$ – умеренная; $r_s= 0,5-0,69$ – средняя, $r_s> 0,7$ – сильная. Количественную оценку цитокинов проводили с помощью программного обеспечения CurveExpert и данными, представленными как среднее арифметическое \pm стандартное отклонение ($M\pm m$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка контроля специфической активности вакцинных препаратов методом ПЦР в реальном времени

Важным критерием оценки качества инактивированной цельновирионной вакцины является контроль ее специфической активности. В технологическом цикле производства цельновирионной вакцины против ГЛПС после инактивации вируса осуществляется контроль специфической активности, как правило, по количественному содержанию хантавирусного антигена – иммуногена (Дзагурова Т.К. и др., 2013). Для этого используют серологические методы (различные модификации ИФА), воспроизводимость результатов которых зависит от чувствительности метода, обусловленной активностью моноклональных антител, являющихся важным компонентом применяемого ИФА. В отличие от серологических методов ПЦР-РВ обеспечивает высокую специфичность в сочетании с количественным измерением и воспроизводимостью результатов исследований. Этот факт свидетельствует о перспективности использования метода ПЦР-РВ для контроля специфической активности вакцинных штаммов хантавирусов при изготовлении поливалентной хантавирусной вакцины, что, в свою очередь, обуславливает необходимость оптимизации метода ПЦР-РВ на основе хантавирусных штаммоспецифичных праймеров.

1. Оценка специфичности и чувствительности метода ПЦР-РВ. Подобранный система ПЦР-РВ обладает специфичностью, поскольку флуоресценция регистрировалась только при исследовании РНК вакцинных штаммов вирусов Пуумала, Хантаан и Сочи, и отсутствовала при тестировании других штаммов хантавирусов: Пуумала (CG-Kazan-79, Halnaas 83-L20 и Sotkamo), Хантаан (Ли 83-61 и 76-118), Доброва/Белград (Белград-1), Сеул (SR-11 и A9), Sin Nombre (CC/107), а также вирусов других семейств: геморрагической лихорадки Крым-Конго (IbAr 10200), Денге (8356/10, 4397/11, 3140/09 и 3274/09), японского энцефалита (Накаяма), клещевого энцефалита (Hochsterwitz), Западного Нила (MgAn 786/6/1995), Зика (MR766), Usutu (G39), желтой лихорадки (Asibi), Чикунгунья (23161) и Ласса (Josiah), что свидетельствует об отсутствии ложноположительных результатов.

Сравнение ФОЕ, ИФА и ПЦР-РВ показывает, что наименьшее количество вируса, в том числе инактивированного, было обнаружено с помощью молекулярно-генетического метода (Таблица 1).

Таблица 1 – Чувствительность определения РНК хантавирусных вакцинных штаммов методом ПЦР-РВ

Пуумала			Хантаан			Сочи		
Титр вируса, Ig	Количество копии/мл	Титр* антигена	Титр вируса, Ig ФОЕ/мл	Количество копии/мл	Титр** антигена	Титр вируса, Ig	Количество копии/мл	Титр** антигена
5,5	$1,24 \times 10^5$	2048 [^]	5,8	$3,06 \times 10^5$	4096	5,2	$1,01 \times 10^5$	2048
4,5	$3,55 \times 10^4$	1024	4,8	$2,16 \times 10^4$	1024	4,2	$2,25 \times 10^4$	1024
3,5	$6,91 \times 10^3$	256	3,8	$9,53 \times 10^3$	1024	3,2	$5,01 \times 10^3$	128
2,5	$8,58 \times 10^2$	отр***	2,8	$1,39 \times 10^3$	128	2,2	$6,12 \times 10^2$	отр
1,5	$4,1 \times 10^1$	отр	1,8	$3,52 \times 10^2$	отр	1,2	$3,52 \times 10^1$	отр
0,5	N/A	отр	0,8	$1,01 \times 10^1$	отр	0,2	N/A	отр

* выполнен с использованием тест-системы «ХАНТАГНОСТ», ** выполнен с использованием ИФА тест-системы «Ханта-Н», [^] титр выражен в величинах, обратных разведению образца, *** порог отсечения равен разведению препарата 1:128

Таким образом, метод ПЦР-РВ, разработанный на основе данных полногеномного секвенирования хантавирусных вакцинных штаммов, показал высокую специфичность и чувствительность количественного определения вирусной РНК. Другим преимуществом ПЦР-РВ является возможность анализировать количество РНК каждого вируса в составе поливалентной вакцины.

Сравнительная оценка эффективности методов инактивации хантавирусов

Результаты изучения динамики инактивирования вируса Пуумала в субстратах, обработанных разными инактиваторами, представлены на рисунках 1 и 2.

Формальдегид и термоинактивация. В вирусосодержащих субстратах, обработанных формальдегидом в конечной концентрации 1/4000 при температуре $6\pm 2^\circ\text{C}$, инфекционная активность вируса Пуумала не определялась по истечении экспозиции в течение 30 суток. Экспозиция вируса при температуре $22\pm 2^\circ\text{C}$ приводила к полной потере его инфекционной активности через 20 дней.

β -пропиолактон. Вирус Пуумала полностью терял инфекционность при температуре $22\pm 2^\circ\text{C}$ и концентрации β -пропиолактона в диапазоне от 0,0025% до 0,001% (Рисунок 1). Оптимальное время инактивации вируса составляло 40 минут при использовании β -пропиолактона в конечном разведении 1/6000, что совпадает с временем естественного гидролиза β -пропиолактона. Столь малые концентрации β -пропиолактона гидролизуются в течение нескольких часов (Uittenbogaard J.P. et al., 2011), сохраняя иммуногенность вакцинных препаратов.

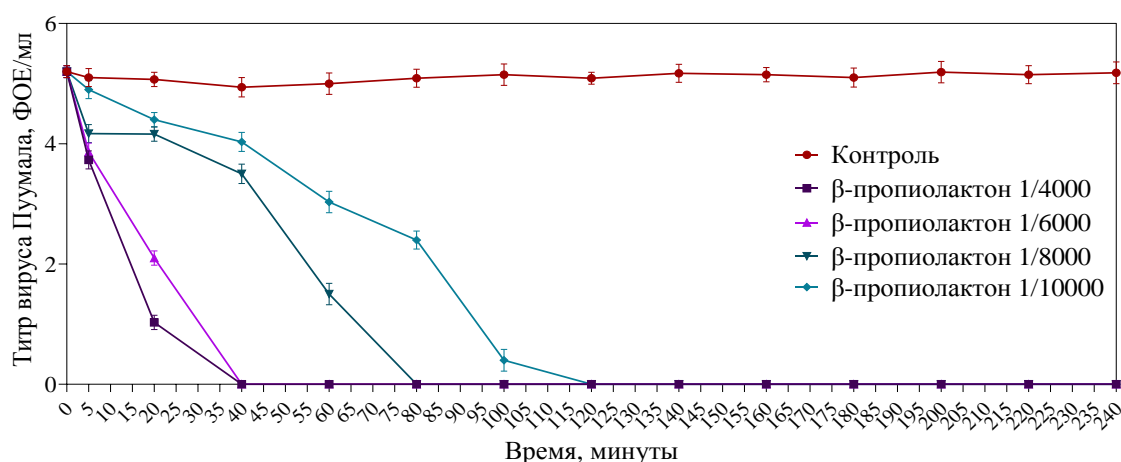


Рисунок 1 - Динамика инактивации вируса Пуумала β -пропиолактоном.

УФ-излучение - это недорогой и достаточно простой технологический процесс. В нашем эксперименте полное инактивирование вируса Пуумала наступало через 2 мин при толщине слоя вирусосодержащего материала 3 мм на расстоянии 24 см от источника коротковолновых ультрафиолетовых лучей.

Перекись водорода. При обработке вируса Пуумала 3% раствором H_2O_2 при комнатной температуре время полной инактивации составляло 5 минут. При обработке 1,5 % раствором H_2O_2 вирус полностью инактивировался через 15 минут. Температурный режим $22\pm 2^\circ\text{C}$ или $6\pm 2^\circ\text{C}$ не влиял на скорость инактивации вируса.

Установлены достоверные отличия между количеством копий РНК до и после инактивирования вакцинного полуфабриката различными способами, включая применение формальдегида, β -пропиолактона, УФ-излучения, перекиси водорода и термоинактивации (Рисунок 2).

Таким образом, установлена определенная зависимость количественного содержания РНК копий/мл вируса Пуумала в экспериментальных вакцинных препаратах от способа их инактивирования.

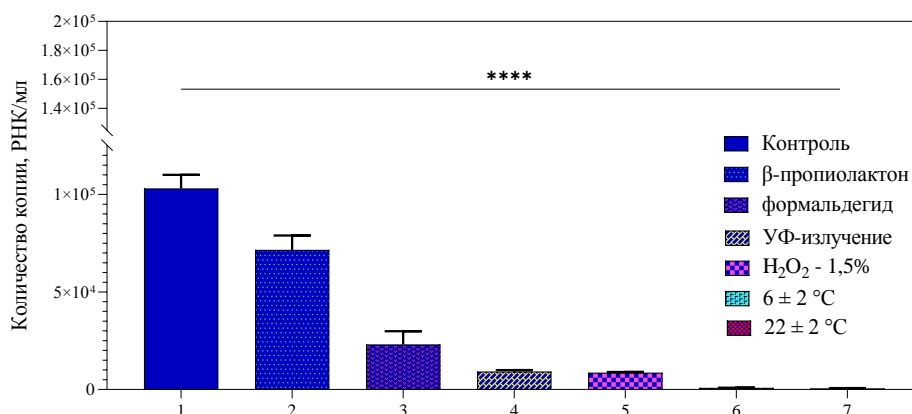


Рисунок 2 - Зависимость количества копий РНК/мл от способа инактивирования вакцинного препарата.

Не было выявлено статистически значимой разницы в титрах нейтрализующих антител после 2-х кратной иммунизации мышей BALB/c образцами препарата ВАК-ПУУ, инактивированных β-пропиолактоном в конечном разведении 1/6000 в течение 40 минут; формальдегидом в конечной концентрации 0,025% в течение 30 дней; УФ-излучением (253,7 нм) при толщине слоя 3 мм и расстоянии 24 см от источника света в течение 2 минут и перекись водорода в конечной концентрации 1,5% в течение 15 минут. Это свидетельствует о сохранности иммуногенных эпитопов в результате разных способов инактивирования, несмотря на различную степень повреждения вирусной РНК (Таблица 2).

Таблица 2 - Соотношение количества копий РНК/мл и иммуногенной активности экспериментального вакцинного препарата ВАК-ПУУ, инактивированного разными способами

Инактивация	Титр вируса, lg ФОЕ/мл	Число копий РНК/мл	Белок, мг/мл	Титр нАТ**, log ²
ВАК-ПУУ				
без инактивации*	5,4	$(1,22 \pm 0,3) \times 10^5$	65,37	н/и***
формальдегид	-	$(2,31 \pm 0,4) \times 10^4$	62,4	8,8±0,08
β-пропиолактон	-	$(7,12 \pm 0,34) \times 10^4$	5,29	8,86±0,09
УФ-излучение	-	$(8,6 \pm 0,41) \times 10^3$	63,2	8,82±0,09
перекись водорода	-	$(4,2 \pm 0,41) \times 10^3$	60,1	8,5±0,1

* исходный вакцинный полуфабрикат до инактивации; ** титр нейтрализующих антител в сыворотках крови мышей BALB/c в ответ на двукратную иммунизацию; *** не исследовали.

Установлена наиболее высокая эффективность использования β-пропиолактона, который в качестве инактиватора, почти на порядок, по сравнению с формальдегидом, перекисью водорода и ультрафиолетовым излучением снижает содержание балластных белков за счет уменьшения их агрегации (Таблица 2). Это в свою очередь ведет к более эффективной очистке вируса на этапах

осветляющей фильтрации и гельфильтрации, а также препятствует снижению потерь вирусного компонента в результате стерилизующей фильтрации вакцинного материала, что позволяет повысить технологичность процесса производства хантавирусных вакцин.

Сравнительная оценка иммуногенной активности экспериментальных хантавирусных вакцинных препаратов, содержащих адьюванты различного происхождения

1. Определение минимальной иммунизирующей дозы (МИД) вакцинного препарата. Для определения иммунизирующей дозы были приготовлены разведения (двукратным шагом до 1/256) экспериментальных моновалентных вакцинных препаратов. Специфическую активность 3-х вакцинных препаратов оценивали в соответствии с титром вируса в исходных вакцинных препаратах до инактивирования, числом копии РНК/мл после инактивирования β -пропиолактоном и титром нейтрализующих антител после иммунизации мышей вакцинными препаратами, хранившимися в течение 6, 12 и 24 месяцев при температуре 6 ± 2 °С.

За МИД моновалентной вакцины принимали количество копий РНК/мл, способное вызвать продуцирование нейтрализующих антител с титром $\geq 4,32 \log_2$ не менее, чем у 50 % мышей BALB/c. За одну рабочую дозу (РД) моновалентного препарата принимали 4 МИД. За одну РД поливалентного (трёхвалентного) вакцинного препарата (поли-ВАК) принимали сумму РД трех моновалентных вакцинных препаратов (ВАК-ПУУ+ВАК-ХТН+ВАК-СОЧ).

В соответствии с этим критерием РД для экспериментального препарата ВАК-ПУУ составляла $6,91 \pm 0,4 \times 10^4$ копий/мл, для ВАК-ХТН - $9,53 \pm 0,2 \times 10^4$ РНК копий/мл, для ВАК-СОЧ - $6,21 \pm 0,3 \times 10^4$ РНК копий/мл.

В результате исследований по определению МИД наблюдали дозозависимый эффект, при котором уровень нейтрализующих антител пропорционально соответствовал количеству копий РНК/мл. Таким образом, титры нейтрализующих антител в сыворотке крови мышей BALB/c показали прямую корреляционную зависимость от количественного содержания копий РНК в вакцинном препарате, что позволяет нам определять ожидаемый уровень нейтрализующих антител на технологических этапах производства вакцинного материала.

2. Анализ результатов исследования иммуностимулирующей активности адьювантов различного происхождения.

Имуностимулирующую активность адьювантов исследовали на модели полуфабриката экспериментального вакцинного препарата ВАК-ПУУ (далее ВАК). Исходный титр вакцинного штамма ПУУ-ТКД/VERO до инактивации β -пропиолактоном составлял $5,4 \pm 0,16 \lg$ ФОЕ/мл, число определяемых копий вирусной РНК - $1,24 \times 10^6$. После инактивации специфическая активность препарата ВАК, определяемая методом ПЦР-РВ, составляла $4,00 \times 10^5$ копий РНК/мл.

В зависимости от вида и дозы вводимых в образцы препарата ВАК адьювантов, мыши BALB/c были распределены на следующие группы: 1 – ВАК (вакцинный препарат без адьювантов); 2 - ВАК-СЧ/100 (сферические частицы, 100 мкг/мл); 3 - ВАК-СЧ/150 (150 мкг/мл); 4 - ВАК-СЧ/300 (300 мкг/мл); 5 - ВАК-ТЛБ/7.5 (7.5 мкг/мл); 6 - ВАК-ТЛБ/0.2 (0.2 мкг/мл); 7 - ВАК-ЛПС (50 мкг/мл); 8 - ВАК-АЛ (1 мг/мл); 9 - Контроль.

В ответ на введение вакцинных препаратов с адъювантами в исходном и разведённом 1/2, 1/4 и 1/8 виде были выявлены нейтрализующие антитела во всех 8 экспериментальных группах мышей (Рисунок 3). До иммунизации, а также в контрольных группах нейтрализующие антитела в сыворотках крови мышей не были выявлены.

Наиболее высокие значения титров нейтрализующих антител относительно положительного контроля (ВАК без адъювантов) ($p < 0,0001$) были выявлены после иммунизации образцами препарата ВАК с адъювантами СЧ/300, ТЛБ/0.2 и ЛПС.

Кратность иммунизаций не влияла на уровень нейтрализующих антител в группах ВАК, ВАК-СЧ/100, ВАК-СЧ/150, ВАК-ТЛБ/7.5 и ВАК-ЛПС. В то время как в группах ВАК-СЧ/300 и ВАК-ТЛБ/0.2 наблюдали небольшое ($p < 0,05$) увеличение титров нейтрализующих антител после трёх иммунизаций по сравнению с двумя.

Отмечен прямо пропорциональный дозозависимый эффект во всех группах ($p < 0,0001$), кроме ВАК-ЛПС, т.е. уменьшение дозы препарата приводило к снижению титра нейтрализующих антител. Вместе с этим отмечены определенные особенности динамики нейтрализующих антител при разведении препаратов, содержащих испытываемые адъюванты (Рисунок 3).

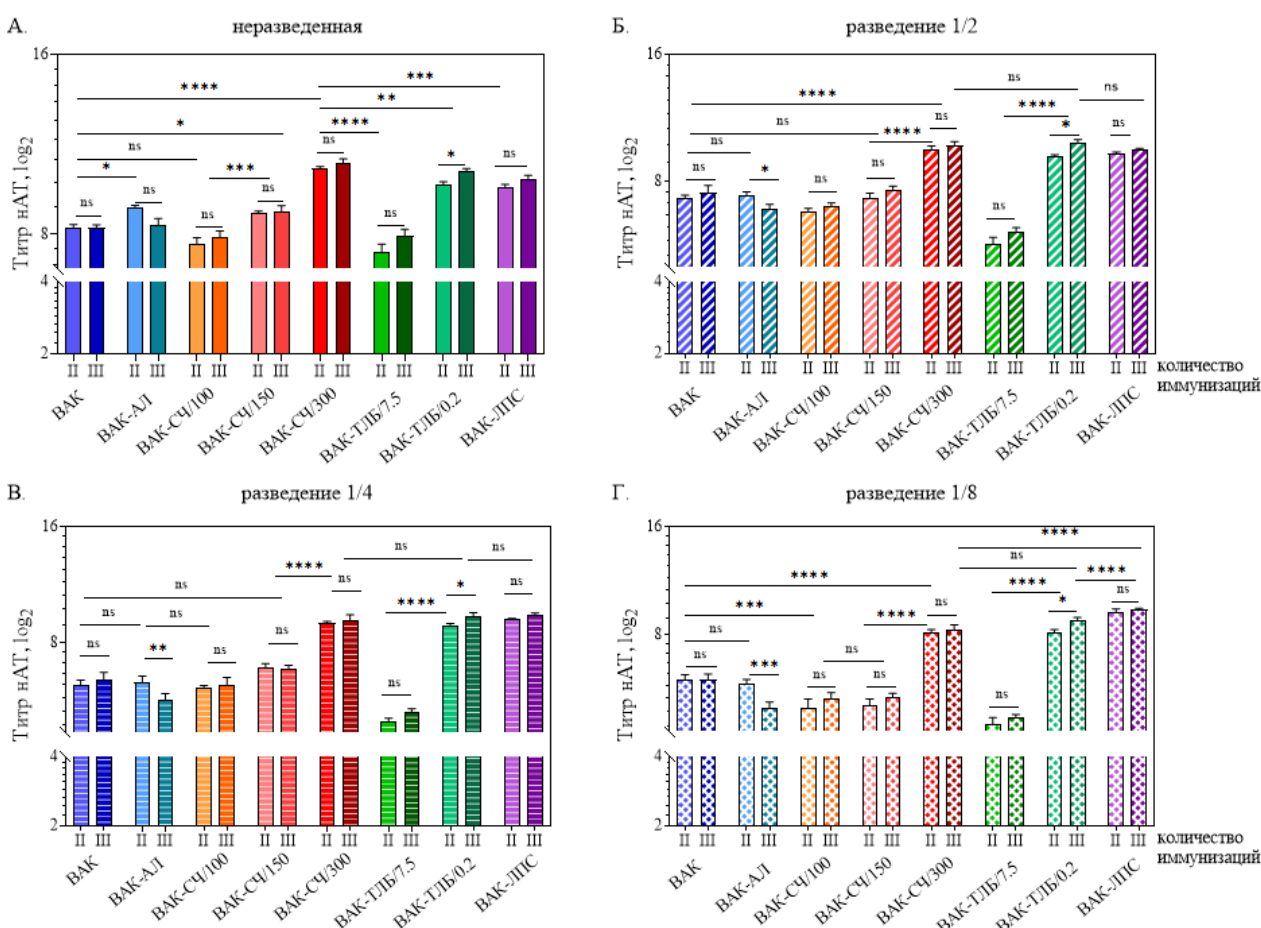


Рисунок 3 - Выявление нейтрализующих антител в сыворотках крови мышей BALB/c, иммунизированных образцами препарата ВАК, содержащими адъюванты разного происхождения.

В частности, иммунизация препаратом ВАК-ТЛБ в концентрации 7.5 мкг/дозу вызывала иммуносупрессию продуцирования нейтрализующих антител на фоне токсических проявлений, которые отмечались и при концентрации 0,2 мкг/дозу.

Таким образом, наиболее высокий иммуностимулирующий эффект отмечен в группах ВАК-СЧ/300, ВАК-ТЛБ/0.2 и ВАК-ЛПС ($p < 0,0001$). Особенно это касается адьюванта липополисахарида, в присутствии которого даже уменьшение концентрации иммуногена в 8 раз не вызывало статистически значимого снижения иммуногенной активности препарата ВАК-ЛПС.

3. Зависимость стабильности иммуногенных свойств вакцинных препаратов от разных способов их приготовления и времени хранения. Для определения стабильности иммуногенной активности были исследованы экспериментальные препараты ВАК, ВАК-АЛ, ВАК-ЛПС. Препараты ВАК и ВАК-ЛПС, хранились при температуре 6 ± 2 °С в жидкой и лиофилизированной формах, а ВАК-АЛ - в жидкой форме.

Данные, представленные на рисунке 4, свидетельствуют о высокой стабильности иммуногенной активности экспериментальных вакцинных препаратов, хранившихся в течение 6 и 12 месяцев при температуре 6 ± 2 °С. Через 32 месяца хранения вакцинных препаратов титры нейтрализующих антител в сыворотках крови животных незначительно снизились. На фоне полученных результатов выделяются данные о существенно более высокой иммуногенной активности вакцинного препарата ВАК-ЛПС, в состав которого включён адьювант низкоэндоотоксичный липополисахарид Ас3-S-LPS *Shigella sonnei*.

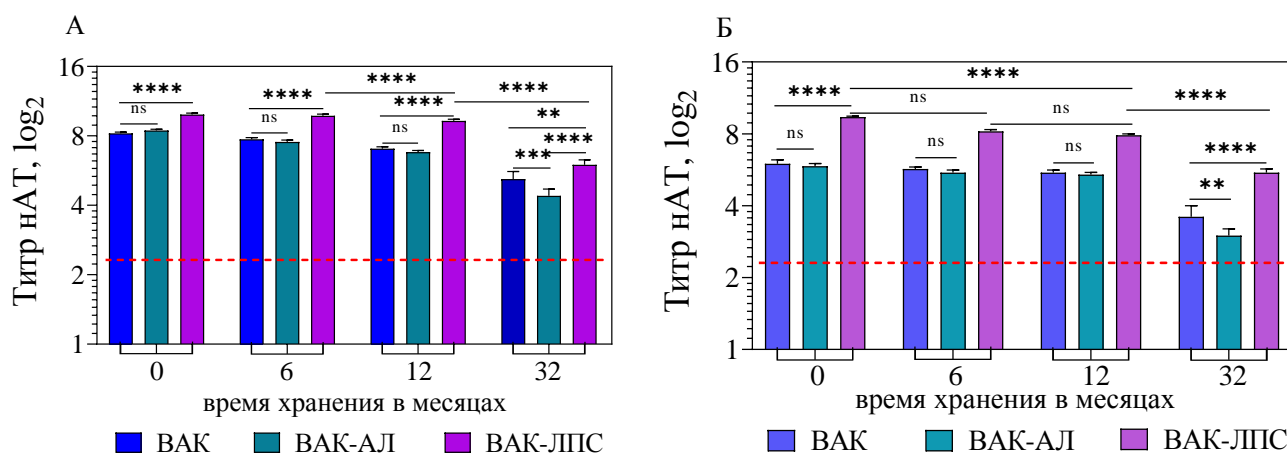


Рисунок 4 - Динамика титра нейтрализующих антител в зависимости от времени хранения вакцинных препаратов: А - в неразведенном виде; Б - в разведении 1/8.

Лиофилизация не влияла статистически значимо на сохранность иммуногенной активности вакцинных препаратов, хранившихся в течение 32 месяцев как в жидкой, так и в лиофилизированной формах.

С разведением вакцинных препаратов титр нейтрализующих антител динамично снижался в группах ВАК и ВАК-АЛ. Пороговый титр нейтрализующих антител ($4,32 \log_2$) для препарата ВАК приходился ориентировочно на разведение препарата 1/2, для ВАК-АЛ – в неразведенном виде. (Рисунок 5).

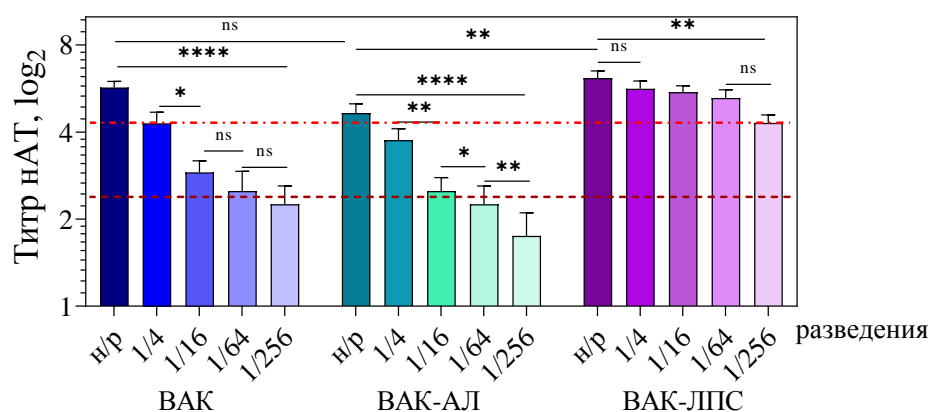


Рисунок 5 - Зависимость значений титра нейтрализующих антител от разведений вакцинных препаратов, хранившихся 32 месяца.

Существенно менее выраженной была динамика снижения титра нейтрализующих антител в группе ВАК-ЛПС, в результате чего, даже в разведении препарата 1/64 титр нейтрализующих антител не снизился до порогового уровня. Снижение дозы препарата ВАК-ЛПС в 16 раз соответствовало иммуногенности препарата ВАК в неразведенном виде.

4. Сравнение иммуногенной активности поливалентных вакцинных препаратов. По результатам предыдущих исследований были отобраны три варианта экспериментального поливалентного вакцинного препарата: поли-ВАК, поли-ВАК-АЛ, поли-ВАК-ЛПС. Препараты вводили мышам BALB/c в неразведенном виде и в разведении 1/8 (Рисунок 6).

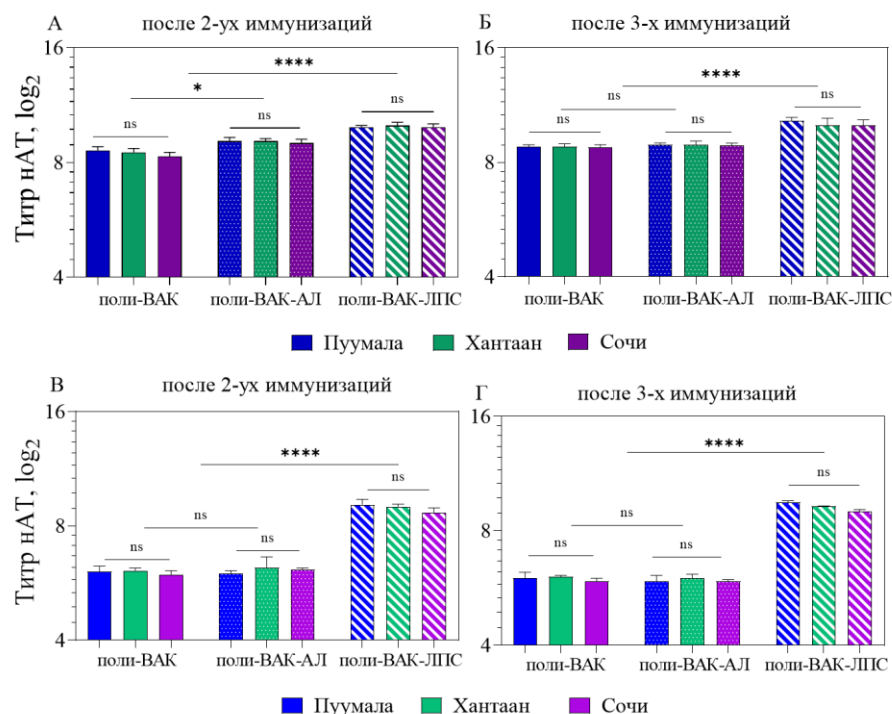


Рисунок 6 – Титры нейтрализующих антител при добавлении адъювантов различной природы к поливалентному вакцинному препарату:

А - в неразведенном виде после 2-х иммунизаций; Б - в неразведенном виде после 3-х иммунизаций; В - после 2-х иммунизаций в разведении 1/8; Г - после 3-х иммунизаций в разведении 1/8.

Иммунизация мышей препаратом поли-ВАК без добавления адъювантов вызывала иммунный ответ, на уровень которого количество иммунизаций (2 или 3) не влияло.

После двух иммунизаций препаратом поли-ВАК-АЛ уровень нейтрализующих антител был несколько выше ($p < 0,05$) такового для препарата поли-ВАК, но после трех иммунизаций эта разница нивелировалась.

Установлен более высокий иммунный ответ ко всем трем хантавирусам (Пуумала, Хантаан, Сочи) на введение препарата поли-ВАК-ЛПС, в состав которого включён адъювант низкоэндоотоксичный липополисахарид Ac3-S-LPS *Shigella sonnei*, по сравнению с таковым при введении препарата поли-ВАК (Рисунок 6 А, Б, В, Г).

5. Зависимость стабильности иммуногенных свойств поливалентных вакцинных препаратов от времени хранения. После хранения в течение 12 месяцев при температуре 6 ± 2 °С препарат поли-ВАК-ЛПС как в неразведенном виде, так и в разведении 1/8 индуцировал более высокие титры нейтрализующих антител к вирусам Пуумала, Хантаан и Сочи по сравнению с таковыми при введении препаратов поли-ВАК и поли-ВАК-АЛ (Рисунок 7 А, Б).

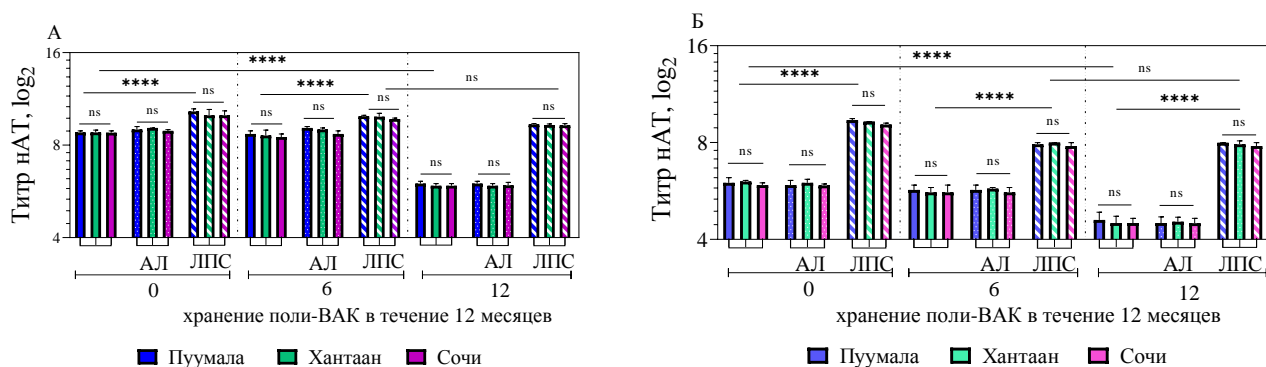


Рисунок 7 - Динамика уровня нейтрализующих антител, индуцируемых иммунизацией поливалентными вакцинными препаратами с адъювантами разного происхождения: А - в неразведенном виде, Б - в разведении 1/8.

Анализ цитокинового профиля

С помощью метода ИФА определяли содержание цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-12 и ИФН- γ в сыворотках крови как интактных мышей BALB/c, так и 2-х, 3-хкратно иммунизированных экспериментальными инактивированными вакцинными препаратами, включая: моновалентный препарат на основе вакцинного штамма вируса Пуумала и поливалентный на основе вакцинных штаммов вирусов Пуумала, Хантаан и Сочи (Рисунок 8, 9, 10). За фоновый уровень был принят уровень цитокинов у интактных мышей до иммунизации.

В контрольных группах статистически значимое превышение уровня ИЛ-1 β ($p < 0,0001$) относительно интактных мышей определялось при введении препаратов К-СЧ/300, К-ТЛБ/0.2, К-ТЛБ/7.5 (в 1,9; 2,58 и 4,5 раз, соответственно). При введении адъювантов АЛ, ЛПС и СЧ в дозе 100 мкг/мл статистически значимого превышения ИЛ-1 β относительно интактных мышей не было отмечено (Рисунок 8 А), что свидетельствует об отсутствии провоспалительной реакции на эти компоненты.

В группах мышей, иммунизированных экспериментальными вакцинными препаратами с адьювантами, уровень сывороточного ИЛ-1 β повышался незначительно в группах ВАК, ВАК-АЛ, ВАК-ЛПС, ВАК-СЧ/100 и статистически значимо - в группах ВАК-СЧ/300, ВАК-ТЛБ/0.2 и ВАК-ТЛБ/7.5 (Рисунок 8 Б). Следовательно, можно предположить, что иммунизации как препаратом ВАК (без адьювантов), так и препаратами с гидроксидом алюминия, липополисахаридом и сферическими частицами в дозе 100 мкг/мл не вызывают провоспалительных реакций у мышей BALB/c.

Введение К-ТЛБ/7.5 и ВАК-ТЛБ/7.5 мышам BALB/c сопровождалось, помимо повышения уровня провоспалительного цитокина ИЛ-1 β , токсическими проявлениями. При снижении дозы ТЛБ с 7.5 до 0.2 мкг/мл (ВАК-ТЛБ/0.2) видимых токсических проявлений у животных не наблюдалось, однако уровень провоспалительного цитокина ИЛ-1 β был существенно выше нормы, так же, как и в контрольной группе К-ТЛБ/0.2.

Уровень ИФН- γ в контрольных группах мышей К-АЛ, К-ЛПС и К-СЧ/100 не повышался относительно такового у интактных мышей, но при этом статистически значимо ($p < 0,0001$) повышался в контрольных группах К-СЧ/300, К-ТЛБ/0.2 и К-ТЛБ/7.5 (Рисунок 9 А).

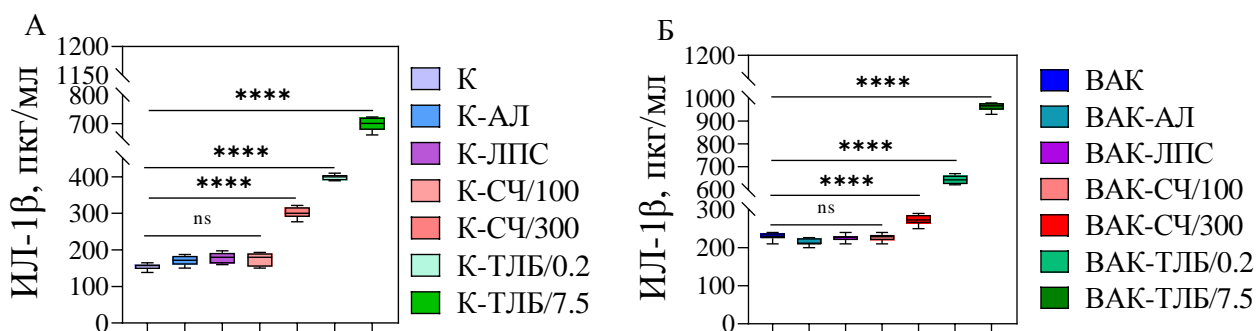


Рисунок 8 – Уровень содержания ИЛ-1 β в сыворотках крови мышей BALB/c. А - контрольные группы, Б – экспериментальные группы.

Уровень ИФН- γ в сыворотках крови мышей в группах экспериментальных вакцинных препаратов: ВАК, ВАК-АЛ, ВАК-СЧ/100, ВАК-СЧ/300, ВАК-ТЛБ/0.2, ВАК-ТЛБ/7.5 и ВАК-ЛПС повышался статистически значимо (в 3,28; 1,65; 3,25; 3,36; 3,38; 2,7 и 4 раза, соответственно) по сравнению с таковым у интактных мышей (Рисунок 9 А, Б).

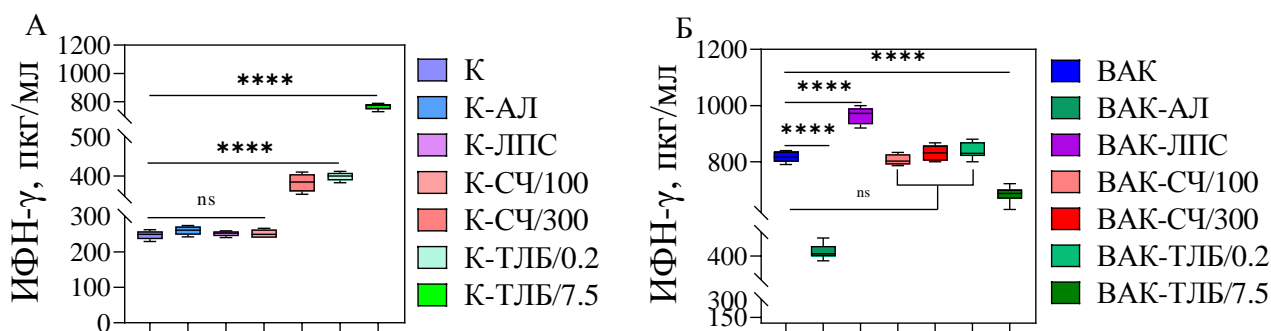


Рисунок 9 – Уровень ИФН- γ в сыворотках крови мышей BALB/c. А - контрольные группы, Б – экспериментальные группы.

Уровень ИФН- γ в группе ВАК-ЛПС был статистически выше, чем в остальных группах (Рисунок 9 Б). В то же время в группах мышей ВАК-АЛ и ВАК-ТЛБ/7.5 ($p < 0,0001$) отмечали более низкий уровень цитокина ИФН- γ относительно группы ВАК. Следовательно, экспериментальный вакцинный препарат без добавления адъювантов вызывает выраженную индукцию ИФН- γ , сравнимую с таковой в присутствии СЧ/100, СЧ/300, ТЛБ/0.2 и только в присутствии ЛПС отмечено статистически значимое усиление индукции ИФН- γ .

Содержание ИЛ-12 в контрольных группах мышей К-АЛ, К-ЛПС при введении исследуемых адъювантных препаратов достоверно не отличалось от такового у интактных мышей. В группах К-СЧ/100 ($p < 0,05$), К-СЧ/300, К-ТЛБ/0.2, К-ТЛБ/7.5 ($p < 0,0001$) отмечали превышение уровня цитокина ИЛ-12 относительно интактных мышей (Рисунок 10 А).

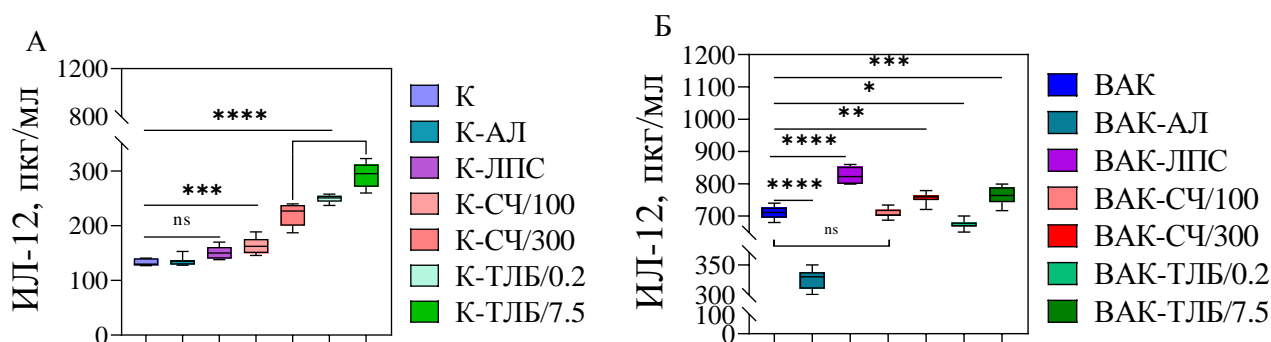


Рисунок 10 – Уровень цитокина ИЛ-12 в сыворотках крови мышей BALB/c. А – контрольные группы, Б – экспериментальные группы.

Содержание цитокина ИЛ-12 также, как и ИФН- γ в сыворотках крови мышей, иммунизированных экспериментальными вакцинными препаратами, значительно повышалось относительно такового у интактных мышей в 5,37; 2,47; 5,35; 5,7; 5,09; 5,7 и 6,23 раза, соответственно (Рисунок 10 Б). В экспериментальной группе ВАК-АЛ наблюдался наименьший подъем ИЛ-12. При этом только в группе ВАК-ЛПС уровень ИЛ-12 статистически значимо был выше, чем в остальных группах.

Корреляция ИЛ-12 с высоким уровнем ИЛ-1 β в результате иммунизации ВАК-ТЛБ косвенно подтверждает токсичность термолabileного энтеротоксина Б, особенно проявившуюся в концентрации 7,5 мкг/мл.

Таким образом, анализ профиля цитокинов ИЛ-12 и ИФН- γ в сыворотках крови мышей позволяет предположить индукцию Тх-1 иммунного ответа как нативным инактивированным вирусным препаратом, так и в присутствии адъювантов ЛПС, СЧ/100, СЧ/300, ТЛБ/0.2.

Количество иммунизаций (2-кратная или 3-кратная), способ инактивации и форма хранения вакцинных препаратов (жидкая или лиофилизированная) не повлияли на количественное содержание цитокинов ИЛ-1 β , ИФН- γ и ИЛ-12 в экспериментальных группах.

При иммунизации мышей BALB/c поливалентными экспериментальными препаратами наблюдалась индукция ИЛ-12 и ИФН- γ в экспериментальных группах относительно контрольных мышей на статистически достоверном уровне ($p < 0,0001$).

В целом, анализ цитокинового профиля у мышей BALB/c показал, что независимо от добавления к хантавирусным вакцинным препаратам испытуемых адъювантов разного происхождения происходит активация эффекторов иммунной системы. В частности, это приводит к индукции синтеза регуляторных цитокинов ИЛ-12 и ИНФ- γ , наиболее выраженная в присутствии адъюванта низкоэндоксичного липополисахарида Ac3-S-LPS *Shigella sonnei*, что является показателем поляризации иммунного ответа по типу Th-1.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработаны оптимальные условия применения метода ПЦР в реальном времени с использованием данных полногеномного сиквенса вакцинных штаммов хантавирусов для определения специфической активности инактивированных хантавирусных вакцин. В отличие от применяемых до настоящего времени для этой цели серологического метода ИФА с использованием моноклональных антител к N и/или G белкам хантавирусов, ПЦР-РВ обеспечивает высокие чувствительность, специфичность и воспроизводимость количественного определения РНК в образцах инактивированных вакцинных препаратов. Количественное содержание числа копий вирусной РНК в экспериментальной вакцине, инактивированной β -пропиолактоном, пропорционально степени её иммуногенной активности, что позволяет использовать этот критерий оценки специфической активности для расчета минимальной и рабочей иммунизирующих доз вакцинных препаратов. Применение метода ПЦР-РВ позволяет контролировать количественное содержание отдельных вирусных компонентов в составе поливалентных вакцинных препаратов.

Выбор способа инактивирования вируса имеет важное значение при создании вакцинных препаратов. При анализе иммуногенной активности экспериментальных вакцинных препаратов, приготовленных на основе вируса Пуумала, инактивированных формальдегидом, β -пропиолактоном, УФ-излучением и перекисью водорода, статистически значимой зависимости от способа инактивирования не выявлено. Это позволяет сделать вывод о том, что иммуногенные эпитопы, отвечающие за выработку нейтрализующих антител сохраняются на фоне различной степени повреждения вирусной РНК (минимальной для β -пропиолактон). Таким образом, β -пропиолактон, УФ-излучение и перекись водорода могут потенциально рассматриваться в качестве доступных, более технологичных и безопасных методов инактивации, имеющих ряд преимуществ по сравнению с формальдегидом, в частности, в производстве инактивированных вакцин против ГЛПС. Во-первых, значительно укорачивается время инактивации, во-вторых, нет необходимости нейтрализовать остаточный формальдегид и контролировать его в составе вакцины. Установлена наибольшая эффективность использования β -пропиолактона, который в качестве инактиватора, почти на порядок, по сравнению с формальдегидом, перекисью водорода и ультрафиолетовым излучением снижает содержание балластных белков за счет уменьшения их агрегации, что в свою очередь ведет к более эффективной очистке вируса на этапах осветляющей фильтрации и гельфильтрации. Кроме того, снижение потерь целевого вирусного компонента в процессе стерилизующей фильтрации вакцинного материала позволяет повысить технологичность процесса производства хантавирусных вакцин.

Такие виды инактивации, как ультрафиолетовое излучение или использование перекиси водорода, требуют тщательного тестирования и стандартизации, прежде чем их можно будет использовать в производстве вакцин против ГЛПС.

В результате анализа эффективности применения адъювантов различной природы было выявлено усиление иммуногенной активности экспериментальных вакцинных препаратов. Кроме этого, использование низкоэндоотоксичного липополисахарида Ac3-S-LPS *Shigella sonnei* в качестве адъюванта позволяет снизить нагрузку вирусного компонента в вакцинных препаратах не менее чем в 8 раз и на фоне усиления иммуногенной активности, обеспечивает стабильность вакцинных препаратов, хранящихся при температуре 6 ± 2 °C.

Обобщая результаты испытания адъювантов, можно сделать вывод, что наиболее перспективным в составе исследованных нами вакцинных препаратов против ГЛПС является низкоэндоотоксичный липополисахарид Ac3-S-LPS *Shigella sonnei*. Его применение в дозе 50 мкг/мл способствовало увеличению титра нейтрализующих антител, а также регуляторных цитокинов ИФН- γ и ИЛ-12. В соответствии с клиническими испытаниями (Ледов В.А. и соавт., 2019) низкоэндоотоксичный липополисахарид Ac3-S-LPS *Shigella sonnei* безопасен для парентерального введения людям в дозе, которую мы использовали в своих исследованиях.

Известно, что индукция регуляторных цитокинов ИФН- γ поляризует иммунный ответ по типу Th-1 (Mullen A.C. et al., 2002). Интерлейкин-12 обеспечивает регуляторный путь через взаимодействие клеток с антигенами и направляет специфический иммунитет в соответствии с фенотипом Т-клеток (Hsieh C.S. et al., 1993). Оценка иммунологических показателей Т-клеточного иммунитета у лабораторных животных после введения вакцины является важной дополнительной характеристикой экспериментальной вакцины. Анализ цитокинового профиля мышей BALB/c в ответ на иммунизацию вакцинными препаратами позволяет предположить, что независимо от добавления адъювантов, активизируются эффекторы иммунной системы. Впервые была показана способность нативной вакцины индуцировать ИФН- γ и ИЛ-12, при этом уровень провоспалительного ИЛ-1 β оставался на границе нормы. Присутствие гидроксида алюминия в вакцинных препаратах в наименьшей степени способствовало увеличению цитокинов ИФН- γ и ИЛ-12 по сравнению с другими адъювантами. Эти результаты согласуются с данными других авторов о низкой иммуностимулирующей активности солей алюминия, особенно в отношении клеточного иммунного ответа (McKee A.S. et al., 2017). Анализ цитокинового профиля у мышей BALB/c показал, что индукция синтеза регуляторных цитокинов ИЛ-12 и ИФН- γ наиболее выражена при введении адъюванта низкоэндоотоксичного липополисахарида Ac3-S-LPS *Shigella sonnei*, что является показателем поляризации иммунного ответа по типу Th-1.

Анализ зависимости уровня иммуногенной активности от кратности иммунизации показал, что после трех иммунизаций мышей экспериментальными вакцинными препаратами иммуногенная активность (титр нейтрализующих антител, а также ИФН- γ и ИЛ-12) статистически достоверно не изменялась по сравнению с двукратной иммунизацией. Исходя из этого, целесообразно проведение двукратной иммунизации для контроля иммуногенной активности вакцин против ГЛПС. Возможно, что и для клинических испытаний вакцины целесообразно рекомендовать двукратную вакцинацию с применением третьей в качестве бустерной через месяц, полгода или год, в зависимости от длительности поствакцинального иммунного ответа.

Анализ стабильности экспериментальных вакцинных препаратов показал, что при хранении в течение 32 месяцев при температуре 6 ± 2 °C титры нейтрализующих антител снижались после иммунизации как нативными, так и препаратами с добавлением гидроксида алюминия. В то же время, при иммунизации препаратами с добавлением низкоэндоотоксичного липополисахарида Ac3-S-LPS

отмечали более высокую стабильность их иммуногенной активности, уровень которой не зависел от жидкой или лиофилизированной форм хранения вводимых мышам препаратов.

Таким образом, в результате проведенных исследований получены новые данные, позволяющие значительно усовершенствовать этапы технологического процесса изготовления экспериментальных вакцинных препаратов - повысить их специфическую эффективность, а также технологичность изготовления по сравнению с ранее применяемой технологией при создании кандидатных отечественных и зарегистрированных зарубежных хантавирусных вакцин.

ВЫВОДЫ

1. Разработан альтернативный метод оценки специфической активности хантавирусных вакцинных препаратов по количественному содержанию вирусной РНК. Установлена корреляция между числом копий РНК/мл в инактивированном вакцинном препарате и уровнем иммунного ответа, что позволяет определять иммуногенную дозу вакцины по числу копий вирусной РНК/мл.
2. Метод инаktivации хантавирусов с использованием β -пропиолактона является наиболее эффективным и перспективным по сравнению с другими исследованными нами методами инаktivации. Полная инаktivация хантавируса β -пропиолактоном в конечной концентрации 1/6000 достигается в течение 3 часов при температуре 22 ± 2 °С, что соответствует времени полного распада его до нетоксичных не канцерогенных соединений. Существенным преимуществом применения β -пропиолактона является снижение агрегации инаktivированных вирусных частиц и фрагментов клеточных белков, что приводит к снижению концентрации общего белка в вакцинном препарате.
3. Низкоэндогенный липополисахарид Ac3-S-LPS *Shigella sonnei* в составе вакцинных препаратов усиливает выработку нейтрализующих антител и цитокинов ИЛ-12, ИФН- γ , позволяет снизить нагрузку вирусного компонента в вакцинном препарате, не индуцирует выработку провоспалительного цитокина ИЛ-1 β и стабилизирует иммуногенную активность при хранении готового препарата при температуре 6 ± 2 °С.
4. Сферические частицы и термолабильный энтеротоксин Б, используемые в качестве адьювантов, способствуют усилению иммунного ответа на введение хантавирусных вакцинных препаратов, однако этот эффект для сферических частиц достигается только в концентрации 300 мг/мл, что в разы увеличивает белковую нагрузку, а термолабильный энтеротоксин Б на фоне усиления выработки нейтрализующих антител и цитокинов ИЛ-12, ИФН- γ активирует выработку провоспалительного цитокина ИЛ-1 β , что нежелательно для вакцин, вводимых людям. Гидроксид алюминия не усиливал индукцию нейтрализующих антител и не способствовал стабильности иммуногенной активности хантавирусных вакцинных препаратов на модели мышей BALB/c.
5. Иммунный ответ на введение хантавирусного вакцинного препарата достоверно не отличался после 2-кратной и 3-кратной иммунизации мышей BALB/c как по титру нейтрализующих антител, так и по уровню цитокинов ИЛ-12 и ИФН- γ , что позволяет ограничиться 2-кратной иммунизацией для контроля иммуногенной активности вакцины. Стабильность иммуногенной активности исследованных вакцинных препаратов не зависела от их хранения в жидкой или лиофилизированной формах при 6 ± 2 °С в течение 32 месяцев.
6. Практическое внедрение полученных нами приоритетных данных, касающихся эффективности и перспективности применения низкоэндогенного липополисахарида Ac3-S-LPS *Shigella sonnei* в составе вакцинных препаратов, метода инаktivации хантавирусов с использованием

β-пропиолактона, а также метода ПЦР в реальном времени для контроля специфической активности позволят значительно повысить технологичность изготовления вакцинных препаратов по сравнению с ранее применяемой технологией при создании кандидатных отечественных и зарегистрированных зарубежных хантавирусных вакцин.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Курашова С. С.** Сравнительная характеристика инактивирующих агентов для создания вакцины против геморрагической лихорадки с почечным синдромом / С. С. Курашова, А. А. Ишмухаметов, М. С. Егорова, М. В. Баловнева, Т. К. Дзагурова, Е. А. Ткаченко // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2018. – Т. 17. – № 4. – С. 26-29. DOI: 10.31631/2073-3046-2018-17-4-26-29. IF 1,143 РИНЦ **(ВАК)**.
2. **Kurashova S. S.** Various adjuvants effect on immunogenicity of Puumala virus vaccine / S. S. Kurashova, A. A. Ishmukhametov, T. K. Dzagurova, M. S. Egorova, M. V. Balovneva, N. A. Nikitin, E. A. Evtushenko, O. V. Karpova, A. A. Markina, P. G. Aparin, P. E. Tkachenko, V. L. L`vov, E. A. Tkachenko // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. – 2020. – Vol. 10. – P. 545371. DOI: 10.3389/fcimb.2020.545371. IF 4,123 WoS.
3. Dzagurova T. K. Pre-Clinical Studies of Inactivated Polyvalent HFRS Vaccine / Т. К. Дзагурова, А. А. Синюгина, А. А. Ишмухаметов, М. С. Егорова, **S. S. Kurashova**, М. В. Баловнева, А. А. Девиаткин, Р. Е. Ткаченко, О. А. Леонovich, Е. А. Ткаченко // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. – 2020. – Vol. 10. – P. 545372. DOI: 10.3389/fcimb.2020.545372. IF 4,123 WoS.
4. Егорова М. С. Разработка метода количественного определения вирусной РНК для контроля специфической активности вакцины против геморрагической лихорадки с почечным синдромом / М. С. Егорова, **С. С. Курашова**, А. А. Ишмухаметов, М. В. Баловнева, А. А. Девиаткин, М. В. Сафонова, С. В. Ожерелков, Ю. Х. Хапчаев, А. С. Балкина, А. В. Белякова, Т. К. Дзагурова, Е. А. Ткаченко // Вопросы вирусологии. – 2021. – Т. 66. – №1. С. 65-73. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-30>. IF 0,487 Scopus. **(ВАК)**.
5. Синюгина А. А. Доклинические исследования поливалентной вакцины против геморрагической лихорадки с почечным синдромом / А. А. Синюгина, Т. К. Дзагурова, А. А. Ишмухаметов, М. В. Баловнева, **С. С. Курашова**, Н. А. Коротина, М. С. Егорова, Е. А. Ткаченко // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2019. – Т. 18. – № 4. – С. 52-58. DOI: 10.31631/2073-3046-2019-18-4-52-58. IF 1,143 РИНЦ **(ВАК)**.
6. **Курашова С. С.** Адьюванты на основе углеводов для производства вакцин / С. С. Курашова, Т. К. Дзагурова, А. А. Ишмухаметов, М. С. Егорова, М. В. Баловнева, С. Е. Соцкова, Е. А. Ткаченко // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2018. – Т. 18. – № 2. – С. 81–91. DOI: 10.30895/2221-996X-2018-18-2-81-91. IF 0,600 РИНЦ **(ВАК)**.
7. Егорова М. С. Влияние инактивирующих вирус агентов на иммуногенность вакцин против геморрагической лихорадки с почечным синдромом / М. С. Егорова, **С. С. Курашова**, Т. К. Дзагурова, М. В. Баловнева, А. А. Ишмухаметов, Е. А. Ткаченко // Биотехнология. – 2020. – Т. 36. – № 2. – С. 64-73. DOI: 10.21519/0234-2758-2020-36-2-64-73. IF 0,582 Scopus.
8. **Курашова С. С.** Влияние адьювантов различных групп на иммуногенные свойства кандидатных вакцин против геморрагической лихорадки с почечным синдромом / С. С. Курашова, Т. К. Дзагурова, М. С. Егорова, М. В. Баловнева, А. А. Ишмухаметов, А. А. Маркина, П. Г. Апарин, В. Л. Львов, Е. А.

- Ткаченко // Биотехнология. – 2020. – Т. 36. – № 2. – С. 74-85. DOI: 10.21519/0234-2758-2020-36-2-74-85. IF 0,582 Scopus.
9. Egorova M. S. Effect of Virus-Inactivating Agents on the Immunogenicity of Hantavirus Vaccines against Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome / M. S. Egorova, **S. S. Kurashova**, T. K. Dzagurova, M. V. Balovneva, A. A. Ishmukhametov, E. A. Tkachenko // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2020. – Vol. 56. – № 9. – P. 940-947. DOI: 10.1134/S0003683820090045. IF 1,022 WoS.
10. Синюгина А. А. Вакцины для профилактики хантавирусных лихорадок / А. А. Синюгина, А. А. Ишмухаметов, Т. К. Дзагурова, М. В. Баловнева, М. С. Егорова, **С. С. Курашова**, Н. А. Коротина, О. А. Леонович, А. С. Балкина, Е. А. Ткаченко // *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. – 2019. – Т. 18. – № 5. – С. 98-108. DOI: 10.31631/2073-3046-2019-18-5-96-108. IF 1,143 РИНЦ (ВАК).
11. Дзагурова Т. К. Анализ групповой вспышки геморрагической лихорадки с почечным синдромом, вызванной вирусом Сочи / Т. К. Дзагурова, А. А. Ишмухаметов, В. А. Бахтина, В. Г. Морозов, М. В. Баловнева, **С. С. Курашова**, Б. Клемпа, Д. Кругер, Е. А. Ткаченко // *Вопросы вирусологии*. – 2019. – Т. 64. – № 1. – С. 36-41. DOI: 10.18821/0507-4088-2019-64-1-36-41. IF 0,487 Scopus. (ВАК).
12. **Курашова С. С.** Подходы к усовершенствованию инактивированных вакцин против геморрагической лихорадки с почечным синдромом / С. С. Курашова, Т. К. Дзагурова, М. В. Баловнева, М. С. Егорова // *Сборник тезисов докладов научно-практической конференции: «Конференция молодых ученых»*. – Москва. – 2018. – С. 34.
13. **Курашова С. С.** Усовершенствование технологии производства инактивированной вакцины против ГЛПС / С. С. Курашова, М. В. Баловнева, М. С. Егорова // *Сборник трудов научно-практической конференции: VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием молодых ученых и специалистов «Окружающая среда и здоровье. Наука и практика»*. – Москва. – 2018. – С. 139-141. РИНЦ.
14. **Курашова С. С.** Влияние инактивирующих агентов на иммуногенные свойства вакцины против Геморрагической лихорадки с почечным синдромом / С. С. Курашова, М. В. Баловнева, М. С. Егорова, А. А. Ишмухаметов, Е. А. Ткаченко, Т. К. Дзагурова // *Сборник трудов XI Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням с международным участием «Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы»*. – Москва. – 2019. – С. 107. РИНЦ.
15. Егорова М. С. Разработка контроля специфической активности инактивированной вакцины против Геморрагической лихорадки с почечным синдромом в формате РТ-ПЦР / М. С. Егорова, **С. С. Курашова**, М. В. Баловнева, А. А. Ишмухаметов, Е. А. Ткаченко, Т. К. Дзагурова // *Сборник трудов XI Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням с международным участием «Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы»*. – Москва. – 2019. – С. 55. РИНЦ.
16. Дзагурова Т. К. Доклинические исследования вакцины против геморрагической лихорадки с почечным синдромом / Т. К. Дзагурова, **С. С. Курашова**, М. В. Баловнева, М. С. Егорова, О. А. Леонович, А. А. Ишмухаметов, Е. А. Ткаченко // *Сборник трудов XI Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням с международным участием «Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы»*. – Москва. – 2019. – С. 52. РИНЦ.
17. Дзагурова Т. К. Технологические аспекты усовершенствования вакцин против ГЛПС / Т. К. Дзагурова, А. А. Синюгина, **С. С. Курашова**, М. С. Егорова, М. В. Баловнева, О. А. Леонович, А. А. Ишмухаметов, Е. А. Ткаченко // *Сборник трудов III Всероссийской научно-практической конференции с*

международным участием «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных». Ставрополь. – 2019. – С. 260-262. РИНЦ.

18. **Kurashova S. S.** Evaluation of adjuvants efficiency in the HFRS vaccine / **S. S. Kurashova**, T. K. Dzagurova, A. A. Siniugina, M. S. Egorova, M. V. Balovneva, A. A. Ishmukhametov, E. A. Tkachenko // Book of Abstracts 11th International Conference on Hantaviruses. - 2019. - Leuven, Belgium. - P. 97.

19. Dzagurova T. K. Pre-clinical studies of inactivated combined HFRS vaccine / T. K. Dzagurova, A. A. Siniugina, A. A. Ishmukhametov, M. S. Egorova, M. V. Balovneva, **S. S. Kurashova**, O. A. Leonovich, E. A. Tkachenko // Book of Abstracts 11th International Conference on Hantaviruses. - 2019. - Leuven, Belgium. - P. 98.

20. Dzagurova T. Hemorrhagic fever with renal syndrome: outbreak caused by Sochi virus / T. Dzagurova, A. Ishmukhametov, V. Bakhtina, V. Morozov, M. Balovneva, **S. Kurashova**, B. Klempa, D. Kruger, E. Tkachenko // Book of Abstracts 11th International Conference on Hantaviruses. - 2019. - Leuven, Belgium. - P. 108.

21. Дзагурова Т. К. Разработка экспериментально – промышленной технологии производства вакцины против ГЛПС / Т. К. Дзагурова, А. А. Синюгина, А. А. Ишмухаметов, Н. А. Коротина, П. А. Набатников, М. В. Баловнева, **С. С. Курашова**, М. С. Егорова, О. А. Леонович, Е. А. Ткаченко // Сборник трудов всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современная иммунопрофилактика: вызовы, возможности, перспективы». – Москва. – 2019. – С. 15. IF 0,459 РИНЦ.

22. Синюгина А. А. Доклинические исследования вакцины против ГЛПС / А. А. Синюгина, Т. К. Дзагурова, А. А. Ишмухаметов, М. В. Баловнева, **С. С. Курашова**, Н. А. Коротина, М. С. Егорова, Е. Г. Ипатова, Л. В. Гмыль, Е. А. Ткаченко // Сборник трудов всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современная иммунопрофилактика: вызовы, возможности, перспективы». – Москва. – 2019. – С. 45. IF 0,459 РИНЦ.

23. Сафонова М. В. Разработка ОТ-ПЦР тест-системы для определения РНК вирусов Добrava и Пуумала в формате ПЦР в режиме реального времени / М. В. Сафонова, Т. К. Дзагурова, А. А. Лопатин, М. С. Егорова, **С. С. Курашова**, В. Г. Дедков // Сборник трудов региональной научно-практической конференции «Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом: эпидемиология, профилактика и диагностика на современном этапе». - Казань. –2019. - С. 111-116. РИНЦ.

24. Balovneva M. V. Approaches to improve the chromatographic purification of the vaccine against hemorrhagic fever with renal syndrome / M. V. Balovneva, O. A. Leonovich, M. S. Egorova, **S. S. Kurashova**, A. A. Sinugina, T. K. Dzagurova // Book of Abstracts International Society for vaccines. Annual congress. - 2019. – Ghent, Belgium. - P. 15.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

β-ПЛ - β-пропиолактон

АЛ – гидроокись алюминия

ГЛПС – геморрагическая лихорадка с почечным синдромом

ИЛ – интерлейкин

ИНФ – интерферон

ИФА – иммуноферментный анализ

ЛПС – липополисахарид

нАТ – нейтрализующие антитела

МФА – метод флюоресцирующих антител

ИФА – иммуноферментный анализ

МИД – минимальная иммунизирующая доза

ПУУ – вирус Пуумала

РД – рабочая иммунизирующая доза
РН – реакция нейтрализации
ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени
СГТ – средний геометрический титр
СЧ – сферические частицы
ТЛБ – термолабильный белок
Тх – Т-лимфоциты, активирующие специфический иммунный ответ (Тх-1, Тх-2, Тх-17)
ФОЕ – фокусобразующие единицы
ХТН – вирус Хантаан
ХПС – Хантавирусный пульмональный синдром
G_n и G_c – оболочечные гликопротеины хантавирусов
N – нуклеокапсидный белок