

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ИССЛЕДОВАНИЙ И РАЗРАБОТКИ
ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ИМ. М.П. ЧУМАКОВА РАН»

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

Диссертация
на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук
Дзагурова Т. К.

Научный консультант:
доктор медицинских наук,
профессор,
член-корреспондент РАН
Ишмухаметов А. А

Москва – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	14
Глава 1 Обзор литературы	14
1.1 Хантавирусные лихорадки (общая характеристика)	14
1.2 Методы инаktivации	35
1.3 Адьюванты	41
Глава 2 Материалы и методы	50
2.1 Культуры клеток	50
2.2 Вирусы	50
2.3 Вирусологические методы	50
2.4 Иммунологические методы	52
2.5 Молекулярно-генетические методы	53
2.6 Изготовление полуфабрикатов хантавирусных вакцинных препаратов	54
2.7 Методы инаktivации хантавирусов	55
2.8 Адьюванты	57
2.9 Лабораторные животные	58
2.10 Статистический анализ	61
Глава 3 Разработка контроля специфической активности вакцинных препаратов методом ПЦР в реальном времени	63
3.1 Построение стандартной кривой	65
3.2 Оценка специфичности и чувствительности метода ПЦР-РВ	68
3.3 Количественная оценка содержания РНК в вакцинном препарате	70
Глава 4 Сравнительная оценка эффективности методов инаktivации хантавирусов	72
4.1 Инаktivация формальдегидом и термоинаktivация	72
4.2 Инаktivация β -пропиолактоном	73
4.3 Инаktivация УФ-излучением	74

4.4	Инактивация перекисью водорода	75
4.5	Зависимость числа копий РНК от способа инаktivирования хантавируса	76
4.6	Специфический иммунный ответ на введение образцов экспериментального вакцинного препарата, инаktivированных различными способами	78
Глава 5	Сравнительная оценка иммуногенной активности экспериментальных хантавирусных вакцинных препаратов, содержащих адьюванты различного происхождения	82
5.1	Определение минимальной иммунизирующей дозы (МИД) вакцинного препарата	82
5.2	Анализ результатов исследования иммуностимулирующей активности адьювантов различного происхождения	86
5.3	Зависимость стабильности иммуногенной активности экспериментальных вакцинных препаратов от способов их приготовления и времени хранения	91
5.4	Иммуногенная активность поливалентных вакцинных препаратов	96
Глава 6	Анализ цитокинового профиля	99
ЗАКЛЮЧЕНИЕ		109
ВЫВОДЫ		114
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ		116
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ		119

ВВЕДЕНИЕ

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 природноочаговых нетрансмиссивных зоонозов, так называемых хантавирусных лихорадок.

В Российской Федерации ГЛПС занимает ведущее место среди всех природноочаговых болезней человека 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) [1-4].

За 20 последних лет по данным Роспотребнадзора зарегистрировано более 150 тысяч случаев ГЛПС в 69 из 85 субъектах Российской Федерации [5]. При этом, около 98% от общего числа случаев ГЛПС было зарегистрировано на территории Европейской части [6]. Более 97 % всех случаев ГЛПС в России этиологически обусловлены вирусом Пуумала, а 3 % - другими 5 возбудителями ГЛПС - вирусами Хантаан, Сеул, Амур и двумя подтипами (Куркино и Сочи)

вируса Добрава/Белград [4], что указывает на ведущую этиологическую роль вируса Пуумала в структуре заболеваемости ГЛПС в России [5].

Отсутствие тенденции к снижению заболеваемости ГЛПС, расширение ареала инфекции, тяжесть клинического течения болезни, сопровождающейся длительным сроком нетрудоспособности, отсутствие специфических средств лечения и профилактики свидетельствуют о чрезвычайной социальной и медицинской значимости ГЛПС [5,7].

Из всего комплекса мер неспецифической профилактики ГЛПС наиболее часто применяемой остается дератизация. Вместе с тем следует отметить, что дератизационные мероприятия обходятся довольно дорого и, кроме того, малоэффективны, так как их применение обеспечивает лишь кратковременное снижение численности грызунов на обработанных территориях и не решает проблемы ликвидации природного резервуара хантавируса [5]. Наиболее перспективным методом борьбы с этой инфекцией является вакцинация населения эндемичных по ГЛПС регионов. Эффективность вакцинопрофилактики ГЛПС была продемонстрирована на протяжении последних 30 лет в Китае, Южной и Северной Корее [8-12]. Однако вакцины, производимые в этих странах на основе вирусов Хантаан и Сеул, не обладают защитным действием против вируса Пуумала – основного возбудителя ГЛПС у жителей Европейской части России [5,13].

В связи с этим исследования по изучению биотехнологических основ конструирования и разработки наиболее перспективных технологических схем изготовления хантавирусных вакцинных препаратов относятся к числу наиболее

важных в настоящее время, что, в свою очередь, обуславливает актуальность темы исследований данной диссертационной работы.

Степень разработанности темы исследования

В процессе изготовления как экспериментальных и кандидатных отечественных [11-17], так и коммерческих зарубежных [18-22] 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, 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 вакцины против ГЛПС, предопределили цель и задачи настоящей работы.

Цель исследования

Оценка иммуностимулирующей эффективности адьювантов различного происхождения, а также анализ эффективности методов инаktivирования 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 адьювантов различного происхождения, способов инаktivирования 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 инаktivирования хантавирусов с использованием формальдегида, β -пропиолактона, УФ-излучения, перекиси водорода и термоинаktivации.
5. Провести сравнительную оценку иммуностимулирующей эффективности адьювантов 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 адьювантов различного происхождения в составе экспериментальных вакцинных препаратов, а также дана оценка эффективности методов инактивирования хантавирусов.

Впервые установлена способность 3-х адьювантов (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 эффективностью, 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

Иммуностимулирующая способность трех адьювантов различной природы (низкоэндетоксичный 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 усовершенствования 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 вакцинных препаратов против ГЛПС. 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, отражающих 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 инаktivирования 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 почти на порядок, 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*) обеспечивает 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, стимулировать индукцию интерлейкинов ИЛ-12 и ИФН- γ в сыворотках 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 (Левен, 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

Диссертационное исследование «Оценка эффективности адьювантов различного происхождения, методов инаktivации вирусов и контроля специфической активности хантавирусных вакцинных препаратов» соответствует формуле специальности 03.02.02 – Вирусология и областям исследования п. 2 «Изучение химического состава, структуры и строения вирусов, антигенных и биофизических свойств вирусов и их устойчивости в окружающей среде», п. 7 «Изучение противовирусного иммунитета, иммунохимические исследования вирусных антигенов, изучение гуморального, клеточного иммунитета и иммунопатологических реакций, исследования по изучению, получению и применению интерферона» и п. 10 «Разработка мер предупреждения, диагностики и лечения вирусных заболеваний, совершенствование лабораторных диагностических систем, терапии, химиотерапии и иммунопрофилактики вирусных инфекций, проблемы санитарной вирусологии».

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Глава 1 Обзор литературы

1.1 Хантавирусные лихорадки (общая характеристика)

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом вместе с другой этиологически сходной инфекцией, названной хантавирусный пульмональный синдром (ХПС) [7, 23], впервые обнаруженной в 1993 году и регистрируемой в настоящее время в странах Северной и Южной Америки [24], составляют группу так называемых хантавирусных лихорадок. В отличие от ГЛПС, в клинической картине ХПС ведущим является поражение легких (интерстициальная пневмония), сопровождающееся, как правило, очень тяжелым течением болезни, в 30-50 % случаев заканчивающимся летальным исходом [8, 25, 26].

Возбудители хантавирусных лихорадок в составе рода *Orthohantavirus*, семейства *Hantaviridae*, входят в отряд *Bunyavirales*. К настоящему времени в международном каталоге вирусов в семействе *Hantaviridae* зарегистрировано 47 вирусов, которые обнаружены у людей, животных, растений и членистоногих, 11 из них являются патогенными для человека [27, 28].

В соответствии с современной таксономией вирусов возбудителями ГЛПС являются представители рода *Orthohantavirus*: *Hantaan orthohantavirus* (*Hantaan virus*, *Amur virus*, *Soochong virus*), *Seoul orthohantavirus* (*Seoul virus*, *Gou virus*), *Puumala orthohantavirus* (*Puumala virus*, *Hokkaido virus*, *Muju virus*), *Dobrava-*

Belgrade orthohantavirus (Dobrava virus, Kurkino virus, Saaremaa virus, Sochi virus) [30-35]. Возбудителями ХПС на территории Северной Америки являются, в основном, ортохантавирусы *Sin Nombre, Black Creek Canal, Bayou* [36], на территории Южной Америки – ортохантавирусы *Andes, Laguna Negra, Cano Delgadito, Choclo* [37].

Возбудителями ГЛПС на территории РФ являются 6 вирусов: Хантаан, Амур, Сеул, Пуумала и два геноварианты ортохантавируса Добрава/Белград - Куркино и Сочи [38,39].

Резервуарными хозяевами ортохантавирусов, согласно современным данным, являются представители отряда *Rodentia*, семейств *Cricetidae (Myodes, Microtus)* и *Muridae (Apodemus, Rattus)*, при этом возбудители ГЛПС ассоциированы с представителями обоих семейств этого отряда [40].

Распространение хантавирусов носит повсеместный характер: они обнаружены на всех континентах, кроме Антарктического [40]. В то же время клинически диагностируемые формы ГЛПС у людей зарегистрированы только в странах Евразии [41].

В соответствии с этиологией заболеваемость ГЛПС подразделяют на вызываемую вирусами Пуумала (ГЛПС-ПУУ), Хантаан (ГЛПС-ХТН), Сеул (ГЛПС-СЕУ), Амур (ГЛПС-АМУ), Куркино (ГЛПС-КУР), Сочи (ГЛПС-СОЧИ). Этиологические формы ГЛПС имеют эпидемиологические и клинические особенности [38].

ГЛПС-ПУУ составляет около 97% всей заболеваемости ГЛПС на территории РФ. Примерно у четверти больных ГЛПС-ПУУ протекает в легкой

форме, у половины больных – в среднетяжелой и еще у четверти – в тяжелой форме. Геморрагический синдром встречается у 14-20 % пациентов ГЛПС-ПУУ. Другие клинико-лабораторные проявления достаточно типичны. Существенным является факт снижения относительной плотности мочи почти у 99,0 % больных. Летальность при ГЛПС-ПУУ составляет 0,4-1 % [38, 42, 43].

ГЛПС-ХТН регистрируется в дальневосточных регионах РФ. Заболевание протекает тяжелее, чем ГЛПС-ПУУ: более чем у трети пациентов заболевание протекает в тяжелой форме, геморрагический синдром наблюдается почти у половины пациентов. Летальность при ГЛПС-ХТН составляет 5-10 % [38].

ГЛПС-АМУ описана относительно недавно и регистрируется только в дальневосточных очагах ГЛПС. На основании наблюдения за небольшим количеством пациентов можно говорить о схожести клинической картины ГЛПС-АМУ и ГЛПС-ХТН с тенденцией к более частой регистрации тяжелых форм болезни [38, 41].

ГЛПС-СЕУ регистрируется преимущественно в городских очагах на территории Дальнего Востока РФ. Имеет относительно благоприятное течение, количество тяжелых форм болезни составляет 11-12 %. Геморрагический синдром встречается примерно у каждого десятого пациента. Особенностью данной формы является частое поражение печени. Повышение концентрации билирубина в сыворотке крови обнаруживается почти у каждого пятого больного, повышение активности АЛТ и АСТ - более чем у половины пациентов [36, 44].

ГЛПС-КУР регистрируется в очагах, расположенных в регионах Центральной России. Заболевание протекает подобно ГЛПС-ПУУ - тяжелые

формы наблюдается примерно у четверти пациентов. Геморрагические проявления фиксируются относительно редко – у 8-9 % больных. К особенностям клинического течения ГЛПС-КУР следует отнести редкое появление у больных жажды, нарушения зрения, гиперемии лица, ротоглотки и развития полиурии. Лабораторные изменения характеризуются чаще встречающейся лимфопенией и сдвигом лейкоцитарной формулы влево с редким обнаружением плазматических клеток, более значительным увеличением СОЭ и менее выраженным снижением относительной плотности мочи [8]. Летальность при данной форме не превышает 0,5 % [38].

ГЛПС-СОЧИ регистрируется в субтропической зоне Краснодарского края и представляет собой наиболее тяжелую форму ГЛПС, из регистрируемых к настоящему времени этиологических форм болезни [45]. Более половины пациентов ГЛПС-СОЧИ переносят заболевание в тяжелой форме и имеют выраженные геморрагические проявления. У большинства больных ГЛПС-СОЧИ отмечаются признаки поражения желудочно-кишечного тракта в виде болей в животе, тошноты, рвоты и диареи [45]. У каждого десятого пациента отмечаются признаки поражения печени: повышение показателей билирубина и трансаминаз. Летальность при ГЛПС-СОЧИ составляет 11-14 % [33, 38].

Следует отметить, что все описанные формы ГЛПС могут иметь атипичное течение болезни (без болевой и абдоминальный варианты) [45].

Молекулярно-биологическая характеристика хантавирусов. Вирионы хантавирусов, как правило, имеют сферическую форму [46], но наряду с округлой описаны варианты вытянутой и неправильной формы [47]. Структурные

исследования вирусов с помощью крио-ЭМ и криотомографии показывают, что размер частиц варьируется от 120 до 300 нм со средним диаметром 135 нм [47, 48].

Геном хантавирусов представлен трёхсегментной одно-цепочечной РНК с отрицательной полярностью. Большой (L), средний (M) и малый (S) геномные сегменты кодируют РНК-зависимую РНК-полимеразу (RdRp), гликопротеиновый белок предшественник двух оболочечных гликопротеинов (G_n и G_c) и нуклеокапсидный белок (N), соответственно [47]. Три сегмента хантавирусной РНК окружены нуклеокапсидным белком, формируя рибонуклеопротеин (RdRp). RdRp находится внутри липидной оболочки, в которую погружены гликопротеины G_n и G_c [49 - 51]. G_n и G_c опосредуют прикрепление вируса, проникновение в клетку и слияние с внутриклеточными органеллами [49 - 52]. Ортохантавирусы характеризуются внутрицитоплазматическим репликационным циклом, не обладают цитопатическим эффектом [23], поражают высокодифференцированные, поляризованные эпителиальные и эндотелиальные клетки [53], клубочковые и трубчатые клетки почки [54], нарушая целостность межклеточных контактов [55], а также макрофаги, дендритные клетки и лимфоциты [56].

Внутри эндолизосомных компартментов вирус освобождается от оболочки, с высвобождением РНК в цитоплазму. Вирусная RdRp инициирует первичную транскрипцию с образованием мРНК для S, M и L сегментов. Белок N является наиболее распространенным белком хантавирусов, синтезируется на ранних стадиях инфекции [48], модулирует иммунный ответ хозяина на инфекцию путем продукции антител (выработка гуморального иммунного ответа), а также является

мощным стимулятором Т-клеточного иммунитета, проявляющего высокую межвидовую кросс-реактивность [57]. Хантавирусный N-белок играет решающую роль в репликации вируса путем модуляции процессов трансляции, передачи сигналов и определения локализации вирусных компонентов во время сборки новых частиц [58].

Предшественник гликопротеина гликозилируется во время импорта в эндоплазматический ретикулум [49] и транслоцируется клеточным сигнальным пептидазным комплексом в консервативной последовательности WAASA на два структурных гликопротеиновых компонента, G_n (68 кДа) и G_c (58 кДа) [59]. Репликация, сборка и высвобождение новых частиц требуют взаимодействия с клеткой хозяина и сопровождаются реорганизацией цитоскелета и нарушением правильной передачи сигналов клетки-хозяина [60].

Гликопротеины ответственны за связывание с клеточными рецепторами и проникновение в клетку [61 - 63]. Предполагается, что хантавирусы используют рецепторы интегрин для связывания с клеткой [53]. Возможно, интегрины не единственные рецепторы, определяющие проникновение вируса в клетку. Например, было показано, что ХТН проникает в клетку посредством клатрин-зависимого эндоцитоза [64]. Гликопротеины являются индукторами нейтрализующих антител. Также было показано, что пассивная иммунизация иммунными сыворотками и моноклональными антителами с нейтрализующей способностью защищает от хантавирусных инфекций [61, 65]. Несколько нейтрализующих доменов были идентифицированы как в составе G_n, так и в G_c. Предполагается, что многие различные классы иммуноглобулинов (IgM, IgG и

IgA) участвуют в нейтрализации вируса [66, 67]. Известно, что IgM является наиболее важным изотипом для нейтрализации во время острой фазы инфекции [66]. Поверхностные белки гликопротеина индуцируют образование нейтрализующих, а также гемагглютинирующих антител, высокоспецифичных для каждого отдельного вида хантавирусов. Большинство эпитопов гликопротеинов, по-видимому, являются конформационными, так как немногие или ни одно из доступных в настоящее время моноклональных антител (mAb) не являются реактивными в иммуноблотах, проводимых в денатурирующих условиях [68]. Белок Gc содержит эпитопы, которые являются общими для нескольких хантавирусов, тогда как эпитопы Gp более специфичны для определенного генотипа вируса [69].

Иммунный ответ при хантавирусных инфекциях. Врожденная иммунная система способна воспринимать вирусы, бактерии, паразитов и грибки посредством экспрессии паттерн-распознающих рецепторов (PRR), которые экспрессируются дендритными клетками (ДК) и другими клетками врожденной иммунной системы [70]. Toll-подобные рецепторы (TLR) представляют собой наиболее изученное семейство PRR [71, 72]. Однако другие семейства врожденных рецепторов, не относящихся к TLR, такие как лектиноподобные рецепторы типа C [73], нуклеотид связывающие рецепторы (NLR) [74], индуцируемый ретиноевой кислотой I (RIG-I) – подобные рецепторы [75] также играют критическую роль в распознавании антигенов врожденным иммунитетом и индукции воспалительных реакций.

Иммунопатогенез заболеваний, ассоциированных с хантавирусами, представляет собой сложный многофакторный процесс, который включает иммунные реакции, дисфункцию тромбоцитов и нарушение регуляции барьерных функций эндотелиальных клеток [76]. У пациентов с ГЛПС формируется стойкий длительный иммунный ответ. Повторные случаи заболевания ГЛПС не отмечались [45]. Патогенные хантавирусы вызывают у людей иммунный ответ, обеспечивающий противовирусную защиту, но также способствуют развитию иммунопатологических реакций организма и, возможно, распространению вируса [77, 78]. На самом деле, ортохантавирусы, как и другие вирусы, ассоциированные с геморрагическими лихорадками, нацелены на ДК и другие клетки системы мононуклеарных фагоцитов для репликации, распространения и защиты от иммунной атаки [79]. Незрелые ДК экспрессируют рецепторы $\beta 3$ -интегрина и расположены вблизи эпителиальных клеток, поэтому они играют ключевую роль в распространении ортохантавирусов к лимфатическим узлам и эндотелиальным клеткам [77]. В отличие от других вирусов, которые ингибируют созревание инфицированных дендритных клеток, хантавирусы вызывают их созревание и, таким образом, вызывают сильный Т-клеточный ответ во время острой инфекции [80]. ДК подразделяются на две основные группы: плазмцитоподобные ДК (пДК) и миелоидные ДК (мДК). пДК устойчивы к большинству вирусных патогенов [81], быстро высвобождая интерферон (ИФН) I типа в ответ на антигенные раздражители и, тем самым, способствуют элиминации вирусов [82]. мДК находятся либо в лимфоидных органах, либо в барьерной ткани, такой как кожа (например, кожные и интерстициальные ДК) и слизистые оболочки легких и

кишечника [83]. Поглощая антиген на периферии путем фагоцитоза и мигрируя через афферентную лимфу в дренирующие лимфатические узлы, они действуют как сенсоры патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (PAMP) [84]. После миграции в дренирующие лимфатические узлы зрелые мДК [85] представляют антиген CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитам, тем самым инициируя мощные адаптивные иммунные ответы [86, 87].

CD4⁺ Т-хелперы способны индуцировать секрецию антиген-специфичными В-лимфоцитами или IgG1 (Тх2-клетки) или IgG2a (Тх1-клетки) изотипы IgG. В ответ на внутриклеточные вирусы CD4⁺ Тх-клетки дифференцируются в Тх1-клетки, которые продуцируют ИФН- γ и помогают индуцировать CD8⁺ цитотоксические Т-клетки (CTL), которые убивают клетки, инфицированные внутриклеточными патогенами [88, 89]. Цитотоксические Т-клетки у пациентов с ГЛПС за счет увеличения концентрации оксида азота и фактора некроза опухоли- α (ТНФ- α) могут вносить вклад в повреждение капилляров [90, 91]. При этом увеличивается количество активированных CD8⁺ Т-клеток, нарушается соотношение CD4⁺ к CD8⁺ Т-клеткам, и это совпадает с началом клинического заболевания [92, 93]. В дополнение к этому наблюдается высокий уровень провоспалительных цитокинов и их недостаточное подавление регуляторными цитокинами приводит к иммунопатологии [78]. Тх1 клетки продуцируют ИФН- γ и ТНФ- α , отвечающие за клеточно-опосредованный иммунитет, и эта дифференцировка регулируется ИЛ-12. Тх2 клетки продуцируют ИЛ-4 и ИЛ-5 и стимулируют гуморальные и аллергические реакции [94]. В исследованиях было показано, что на ранних стадиях ГЛПС уровень активности супрессорных Т-

клеток снижался [80, 92]. При хантавирусной инфекции возможно происходит ингибирование продукции тромбоцитарного фактора роста [95], путем ингибирования пролиферации Т-клеток и подавления их функций [96]. Общеизвестно, что ответы ИФН типа I необходимы для защиты хозяев от хантавирусной инфекции [97, 98].

Задержка выработки ИФН может отличаться у разных хантавирусов в зависимости от того, насколько быстро они размножаются в человеческих эндотелиальных клетках. Показано, что непатогенный вирус Prospect Hill индуцировал более высокие уровни ИФН, чем ХПС-ассоциированный вирус New York-1 или ГЛПС-ассоциированный вирус ХТН [99]. Также есть подтверждение того, что G_n, а не белок N, эффективно ингибирует продукцию ИФН-β, что позволяет предположить, что G_n обладает уникальной способностью препятствовать ответам ИФН типа I [100].

В исследовании Wang K. et al показано, что вирус Хантаан может сдерживать врожденные иммунные реакции, манипулируя макроаутофагией хозяина. ХТН вызывает полную митофагию на ранней стадии инфекции, и неполную аутофагию на поздней стадии, и эти ответы зависят от вирусного G_n и N белка, соответственно. G_n транслоцируется в митохондрии и взаимодействует с TUFM, рекрутируя LC-3B и стимулируя митофагию. G_n-индуцированная митофагия ингибирует ответы ИФН I типа, разрушая MAVS. Кроме того, белок N конкурирует с G_n за связывание с LC-3B, который ингибирует G_n-опосредованное образование аутофагосом и взаимодействует с SNAP29, который предотвращает слияние аутофагосом с лизосомами. Таким образом, белок N

нарушает аутофагическую деградацию Gn [100]. Эти результаты показывают, как хантавирусы избегают врожденных иммунных реакций.

Гуморальный иммунный ответ при хантавирусной инфекции характеризуется высокими уровнями анти-хантавирусных IgM, появляющихся в сыворотке в начале заболевания, и достигающими своего максимума, как правило, на 7–11-й день после появления клинических симптомов [101]. Антитела класса IgM направлены против всех трёх структурных белков хантавирусов, включая N белок и 2 гликопротеина [102 - 104].

IgG изотипы появляются на ранних стадиях болезни, первыми регистрируются IgG1 антитела. Вирус-специфичные антитела подкласса IgG1 вырабатываются против всех структурных белков [102], средние титры антител к гликопротеинам Gn и Gc выше, по сравнению с титром к N-белку [105]. Вирус-специфичные IgG2, IgG3 против N и Gn-Gc белков обычно выявляются к моменту госпитализации. Они достигают пика к 3-4 неделе болезни и постепенно снижаются к концу года. В дальнейшем угасание титра антител после перенесённой инфекции может происходить очень медленно в течение десятилетий [102, 105].

Несмотря на активацию разных подклассов IgG антител у больных с ГЛПС, корреляция между тяжестью заболевания и уровнями подклассов IgG не была обнаружена [105]. В то же время показано, что разные изотипы антител класса IgG коррелируют с активацией определённых популяций CD4⁺ Т-хелперов и формированием специфических лимфокиновых профилей [106 - 108]. CD4⁺ Т-хелперы способны индуцировать секрецию антиген-специфичными В-

лимфоцитами или IgG1 (Тх2-клетки) или IgG2a (Тх1-клетки) изотипы IgG, следовательно, ранняя активация подклассов IgG1 и IgG3 при ГЛПС и ХПС без существенных изменений уровня класса IgG2 указывает на активацию иммунного ответа Тх2-типа [102].

Нейтрализующие антитела, триггерами которых являются белки G_n и G_s, могут выявляться уже в фебрильную стадию заболевания и титры их могут нарастать в течение последующих 2-х лет, сохраняясь более, чем до 30 лет после перенесенного заболевания [103, 109, 110].

По результатам изучения клеточного иммунитета к хантавирусам было установлено, что мононуклеарные лейкоциты крови чувствительны к инфицированию хантавирусами: от 2 до 20% лейкоцитов больных ГЛПС были позитивны на присутствие хантавирусных антигенов. Исследования также выявили корреляцию между количеством вирус позитивных лейкоцитов и тяжестью заболевания [111]. Внутриклеточный вирус был инфекционным и выделялся из клеточной фракции, в то же время тромбоцитарная популяция была свободна от вируса [112].

Выявление вирус-специфических цитотоксических Т-лимфоцитов в крови инфицированных животных и больных ГЛПС подтверждает важную роль цитотоксических Т-лимфоцитов в патогенезе хантавирусной инфекции [113]. N-белок является основным антигеном, активирующим цитотоксические Т-лимфоциты. К настоящему времени идентифицировано несколько эпитопов Т-лимфоцитов на молекуле N-белка вирусов Хантаан, Пуумала и Син Номбре. Некоторые эпитопы являются вирус-специфическими, то есть эпитоп-специфические

цитотоксические Т-лимфоциты уничтожают преимущественно клетки, экспрессирующие N-белок соответствующего хантавируса.

Следует отметить, что существует связь между определенным типом человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) и проявлением хантавирусных инфекций [114]. Было показано, что генетическая предрасположенность к тяжелой форме ГЛПС, вызванной вирусом Пуумала, ассоциирована с гаплотипами HLA B8 и DR3 [114 - 116], тогда как аллель HLA B27 ассоциирована с лёгким течением заболевания [117]. Высокий риск развития фульминантной формы хантавирусного пульмонального синдрома, с дыхательной недостаточностью и кардиогенным шоком у пациентов с HLA-B*3501 гаплотипом [80]. Кроме того, гаплотип HLA-B*35 чаще встречался у пациентов при тяжелом течении ГЛПС, вызванной вирусом Добрава/Белград, особенно в летальных случаях [116].

Разработка хантавирусных вакцинных препаратов. Начало исследований по созданию хантавирусных вакцинных препаратов приходится на середину 80-х годов, когда методы выделения и культивирования хантавирусов в лабораторных условиях стали доступными для широкого применения. Пионерами этих исследований были учёные из Японии, Китая, Северной и Южной Кореи, при этом в итоге, китайским и корейским учёным к настоящему времени удалось успешно решить проблему вакцинопрофилактики ГЛПС в своих странах [8, 117 - 129].

Приняв за основу технологию изготовления коммерческой вакцины против японского энцефалита [130], разработанную в 1976 году, авторами были приготовлены и испытаны 11 модификаций инактивированной мозговой вакцины

против ГЛПС (Таблица 1). Большинство таких вакцин содержали инактивированные формалином хантавирусы, которые были культивированы в мозговой ткани лабораторных животных [14, 16, 17, 117 - 125].

В Южной Корее в период с 1991 по 1998 год вакциной Hantavax™ было иммунизировано более 5 миллионов человек. Вакцинация способствовала значительному снижению общего числа больных, госпитализированных с диагнозом ГЛПС: с 1234 случаев в 1991 году до 415 случаев в 1997 году [119].

В Северной Корее при иммунизации 1,2 миллиона человек инактивированной вакциной на основе субстрата мозговой ткани лабораторных крыс, инфицированных вирусом Хантаан, было показано, что эта вакцина обладала высокой профилактической эффективностью (88–100%), что может быть также объяснено выработкой тканевого протективного иммунитета, высокоэффективного при хантавирусной инфекции [122 - 123].

В настоящее время в Китае разрешена продажа четырех инактивированных вакцин на основе хантавирусов, размноженных в культуре клеток, и одной вакцины на основе вируса, размноженного в мозговой ткани лабораторных мышей. Эти вакцины успешно применяют в высоко эндемичных по ГЛПС районах страны с 1995 года. В Китае для профилактики ГЛПС ежегодно производят и применяют около двух миллионов доз инактивированных вакцин [128, 129].

12 модификаций культуральных хантавирусных вакцинных препаратов были созданы на основе субстратов клеток почек золотистого хомяка,

монгольской песчанки, полевой мыши, а также клеток перевиваемых линий Vero, Vero-6 и клеток куриных эмбрионов (Таблица 1).

Таблица 1 - Инактивированные цельновирионные вакцинные препараты

Страна	Вирус	Субстрат		Инактиватор	Адьювант	Введение	Источник	
Япония	СЕУ	мозговая	новорожденные мыши	ФА	Al(OH) ₃	в/м	117	
Южная Корея	ХТН (Hantavax®)		новорожденные мыши/крысы				118	
	ХТН (Hantavax™)		мышь линии ICR				119	
	ПУУ (PUUVAX)		новорожденные хомяки				120	
	ХТН/ПУУ		новорожденные хомяки/мышь				121	
Северная Корея	ХТН		новорожденные крысы/хомяки					122,123
Россия	ХТН		новорожденные мыши					14
Китай	ХТН, СЕУ		новорожденные мыши	β-ПЛ			124,125	
	ХТН		куриный эмбрион				128	
Россия	ПУУ/ДОБ (КомбиГЛПС-Вак)		линия клеток Vero	ФА			Al(OH) ₃	в/м
	ПУУ	линия клеток Vero	6					
	ПУУ/ХТН/СОЧИ	линия клеток Vero	17					
Южная Корея	ХТН	линия клеток Vero Е6		126,128, 129				
Китай	ХТН	клетки почек сирийского хомяка	ФА					
	СЕУ	клетки почек сирийского хомяка						
	ХТН/СЕУ	клетки почек сирийского хомяка						
	ХТН	клетки почек монгольской песчанки			β-ПЛ			
	СЕУ	клетки почек монгольской песчанки						
	ХТН/СЕУ	клетки почек монгольской песчанки						
	СЕУ	клетки почек полевки						
	ХТН/СЕУ	линия клеток Vero						

Следует отметить, что ни одна из разработанных к настоящему времени вакцин против ГЛПС не получила одобрения для применения в странах Европы.

Согласно результатам исследований на животных, иммунизация вакцинами на

основе вирусов Хантаан или Сеул не в состоянии предотвратить развитие инфекции, вызванной вирусом Пуумала [16].

По разным причинам попытки технологической разработки вакцины против ГЛПС на основе вируса Пуумала заканчивались безуспешно, в основном из-за трудностей размножения и получения высоко титражного урожая этого вируса в культурах клеток [16]. В то же время применение мозговых вакцин не соответствует нормам Евросоюза.

В связи с одновременной циркуляцией хантавирусов Пуумала и Добрава/Белград в странах Европы и на территории Европейской части России эффективной для применения в Европе могла бы быть только вакцина, содержащая антигены обоих этих вирусов.

Подобные экспериментальные вакцины были разработаны в России. Так, на основе перевиваемой линии клеток Vero были разработаны технологии изготовления инактивированных формалином трёх кандидатных вакцинных препаратов: моновакцины с использованием вируса Пуумала, двухкомпонентной вакцины на основе вирусов Пуумала и Добрава/Белград (подтип Куркино), а также трёхкомпонентной вакцины на основе вирусов Пуумала, Добрава/Белград (подтип Сочи) и Хантаан [6, 16, 17, 127].

Помимо инактивированных цельновирионных вакцин, к настоящему времени авторами (главным образом, в США) предприняты попытки создания рекомбинантных генно-инженерных хантавирусных вакцин (Таблица 2). К ним относятся четыре вакцины на основе субклонированных кДНК, представляющих М- и S-сегменты РНК вируса Хантаан, встроенных в геном вируса осповакцины и

в геном вируса Синдбис, а также вирусов Сеул и Син Номбре, встроенных в геном цитомегаловируса.

Таблица 2 – Рекомбинантные генно-инженерные вакцины

Страна	Вирус	Антиген	Вектор	Система экспрессии	Инактиватор/ Адьювант	Животная модель	Введение	Источник
США	ХТН	N, Gn и Gc	pACYM1-Hantaan S	baculovirus, vaccinia virus		самки 8-10 недель беспородных сирийских хомячков, CB6F1/J мышей	Скарификация хвоста	65
Швеция	ПУУ	N	pGEX2T vector	baculovirus (bac-PUU-N), Spodoptera frugiperda (Sf9)		10-недельные рыжие полевки		131
Швеция	ПУУ, Топо - граф, AND	rN	pQE-32	<i>E. coli</i>	Полный/неполный адьювант Фрейнда	4-10-недельные рыжие полевки	подкожно	132
США	ПУУ	NP, G1 и G2	pBSK.K27S pWRG7079 K27 G1 pELVS K27 G2 pSC11T7	vaccinia virus, CV-1 и COS-7 клетки				133
Швеция	ПУУ	Gn и Gc	pTrcHis2 Топо [®] TA vector, Vr1020-FLAG-MCS	COS-1 клетки				134
Литва	ПУУ	rN	pFX7-His-N-Vranica/Hällnäs	<i>S.cerevisiae</i> (FH4C)	Полный/неполный адьювант Фрейнда	4-10-недельные рыжие полевки	подкожно	135
	ПУУ, ДОБ, ХТН	NP	pFX7-His6	<i>S. cerevisiae</i>		кролики	подкожно	136
Германия	ДОБ	NP	pFX7-derived expression plasmids	<i>S. cerevisiae</i>		BALB/c и C57BL/6 мыши	в/м	137
Германия	СЕУ	NP	pSTBLUE-1/SEOV-N pFX7-His-SEOV-N; Vr1020-FLAG-MCS.	<i>S. cerevisiae</i>				138
	ПУУ	NP	pFD3	<i>S. cerevisiae</i> FH4C/pFD3-h-N-GFP		-		139
Бельгия	ДОБ	rNp	P40pDob118	<i>E. coli</i>	2% Alhydrogel	6-недельные NMRI мыши	подкожно	140
	ПУУ	NP	pTEXmp18	<i>E. coli</i> mutant ICONE 200		самцы 6-недельных беспородных NMRI мышей	подкожно	141

Таблица 2 – Продолжение

Страна	Вирус	Антиген	Вектор	Инактиватор/ Адьювант	Животная модель	Введение	Источ- ник
США	СЕУ	M/S	pWRG7077	не применяются	хомяки	в/м	142
Швеция	ПУУ	N	HuAC/pUC19		мыши BALB/c		143
США	XTH, СЕУ	M	pWRG/SEO-M, pWRG/HTN-M		резус макаки		144
	ANDV	M	pWRG/AND-M			генная пушка	145
	XTH и ANDV	M	pWRG/HA-M		генная пушка	146	
	ANDV	M	pWRG/AND-M		хомяки, кролики	э* инджектором с двойной иглой в/м	147
	XTH и ПУУ	M	pWRG7077		хомяки	генная пушка или в/м э	148
	ПУУ	M	pWRG/PUU-M			генная пушка	149
	ANDV	M	pWRG/AND-M		хомяки, утки	в/м	149
	SNV/ANDV и SNV, XTH, ПУУ	M	pWRG/SN-M		белые новозеландские кролики	м/э	150
	SNV, ANDV	M	pWRG/SN-M, pWRG/AND-M		кролики, сирийские хомяки, резус макаки, яманские макаки	в/м шприц без иголки	151
	SNV, ANDV	Gp	pWRG/AND- M;pWRG/SN-M		сирийские хомяки	шприц без иголки	152
ANDV	M	pWRG/AND-M	153				
Китай	XTH, СЕУ, ПУУ	25 Gp epitopes	pcDNA3.1-SHP; pGEX-6p-1-SHP		мыши BALB/c	в/м	154
	XTH	Gn	pVAX-LAMP/Gn				155
	XTH	Gn	pVAX-Gn, pVAX-LAMP и pVAX- LAMP/Gn;				156

* э – электропорация

На лабораторных животных была показана иммуногенная и протективная активность рекомбинантных вакцинных препаратов в отношении соответствующих хантавирусов. Вместе с тем, при испытании таких препаратов (на основе встроенных в геном вируса осповакцины сегментов генома Хантаан)

на волонтерах было установлено, что среди ранее привитых против оспы, процент выявления вируснейтрализующих антител к вирусу Хантаан составлял лишь 26%, в то время как у непривитых – 72% [133].

В последнее десятилетие интенсивно разрабатывается новый класс противовирусных вакцин – так называемых ДНК-вакцин. Считается, что преимущество ДНК-вакцин заключается в том, что в процессе их создания исключается присутствие инфекционного начала и, предположительно, они способны индуцировать длительный гуморальный и клеточный иммунитет. Для подтверждения этого требуются дальнейшие испытания по определению их безопасности, переносимости и иммуногенной активности [39, 157]. В настоящее время ДНК-вакцины могут успешно применяться для получения антител с лечебной целью (использование трансгенных животных с гуманизированной иммунной системой в качестве доноров антител) [152].

Таким образом, за последнее десятилетие отмечен явный прогресс как в изучении хантавирусов, так и разработке вакцинопрофилактики хантавирусных инфекций. К настоящему времени лицензированы 6 хантавирусных вакцин, включая 3 культуральных и одну мозговую в Китае, и по одной мозговой вакцине в КНДР и Южной Корее. К сожалению, ни одна из этих вакцин не может применяться в европейских регионах России, поскольку все они производятся на основе хантавирусов Хантаан или Сеул и не обладают защитным действием против вируса Пуумала – основного возбудителя ГЛПС на территории Европейской части России [8].

Поствакцинальный иммунитет. Для эффективной защиты необходимо гармоничное усиление гуморального и клеточного иммунного ответа на вводимые живые, ослабленные, модифицированные или убитые микроорганизмы (или их токсины). Однако чаще всего каскад иммунной активности после вакцинации заканчивается выработкой антител на блокирование патогенной инфекции [158] и создание клеток иммунной памяти, способных к быстрой и эффективной реактивации после повторного воздействия патогена [159].

Важную роль в регуляции противовирусного иммунитета играют цитокины - белки, которые имеют аутокринные или паракринные сигнальные механизмы и участвуют в стимулировании пролиферации, дифференцировки и регуляции кроветворных клеток и других клеток с защитными функциями хозяина и определяют характер иммунного ответа [160]. Все больше исследований отмечают клиническую необходимость точных измерений цитокинов в крови для прогнозирования, начиная от клинических исходов при сепсисе [161], трансплантации [162], бактериальной инфекции у детей [163], возникновении шизофрении [164], болезни Альцгеймера у пожилых людей [165] и т.д. Предполагается, что адъюванты увеличивают кинетику титров сывороточных антител и индуцируют вакцин-специфические цитокин-продуцирующие CD4+ Т-клетки по сравнению с без адъювантными вакцинными препаратами [166].

Таким образом, профилактические вакцины должны стимулировать, как долгоживущие антигенспецифические плазматические клетки, которые продуцируют нейтрализующие антитела, так и сохраняющиеся CD4+ и CD8+ Т-

клетки и патоген-специфические Т и В-клетки в участках слизистой оболочки [167].

Праймирование Т-клеток является важным событием для индукции адаптивного иммунного ответа на вакцинацию. На праймирование Т-клеток влияет тип вакцинного состава (антиген, адъювант, система доставки), доза и способ введения, а также местная провоспалительная среда. Поэтому характеристика праймирования Т-клеток, индуцированного стратегией вакцинации, имеет решающее значение для разработки оптимальной комбинации прайм - буст, способной вызывать тип иммунного ответа, необходимый для борьбы с конкретным патогеном [168, 169].

Анализ цитокинового ответа. Для точного анализа концентрации сывороточных цитокинов применяются различные платформы, как в клинических, так и в научных исследованиях. Согласно литературным данным, возможно количественное определение сывороточных цитокинов с использованием наборов ELISA для изучения вовлечения иммунного ответа Тх1. В исследованиях для определения экспрессии цитокинов с использованием проточной цитометрии (определение процента циркулирующих Тх-клеток), РТ-ПЦР и ИФА наблюдалась положительная корреляция между уровнем цитокинов и иммунным ответом [169 - 171]. Одной из причин отсутствия согласования между анализами является наличие эндогенных белков плазмы, включая гетерофильные антитела, растворимые рецепторы и комплемент, которые могут повлиять на результаты испытаний [173].

Сами цитокины образуют сложную каскадную коммуникационную сеть, и предполагается, что присутствие цитокинов в образце крови может привести к выработке и колебаниям уровней других цитокинов в каскаде [174].

По данным исследований, цитокины могут циркулировать в крови определённое время после инфицирования или иммунизации. Уровни ИФН- γ , ИЛ-10 и ТНФ- α в сыворотке крови телят *Bubalus bubalis* в ответ на иммунизацию инактивированной вакциной против ящура достигали пика на третьей неделе после иммунизации, тогда как оставшиеся цитокины достигали максимума на второй неделе, и их количество снижалось к третьей неделе [175]. При этом уровень цитокинов коррелировал с титром антител к вирусу ящура, и резко снижался до интактного (может исходного) уровня [176].

1.2 Методы инаktivации

Для производства инактивированных хантавирусных вакцин важным аспектом исследований остается анализ способов инаktivации вирусов. Помимо полного инаktivирования инфекционного агента, инаktivатор не должен оказывать отрицательного влияния на иммуногенность вакцины [177].

В настоящее время в производстве инактивированных вакцин используют различные физические и химические методы. Из физических методов наиболее распространенными являются: γ -лучи [178], УФ-лучи [179], воздействие температуры [180]. Среди химических инаktivаторов наиболее широкое применение получили: формальдегид и β -пропиолактон [180]. В последнее время

для инактивирования вирусов большое внимание привлекает применение перекиси водорода (H_2O_2) [181].

Наиболее общепринятым инактивирующим агентом является формальдегид [182]. Формальдегид, хорошо известный как сшивающий агент между белками, белком и ДНК, а также белком и РНК [183], с большей скоростью взаимодействует с аминогруппами аминокислот и белков с образованием метильных производных, чем с азотистыми основаниями нуклеиновых кислот, образуя меж- и внутримолекулярные метиленовые мостики между первичными аминогруппами [184]. Процесс взаимодействия вируса с формальдегидом зависит от таких факторов, как концентрация реагента, температура, рН среды [185].

Было показано, что для инактивации вирусов формальдегидом, температура является важным фактором. Оптимальной температурой для инактивирования формальдегидом является $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, что не приемлемо для хантавирусов в связи с термоинактивацией вируса, приводящей к потере иммуногенности. Для полной инактивации вируса Пуумала формалином при $6 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ (для исключения термоинактивации) требовалось не менее 30 дней [6].

Следует отметить, что реакция формальдегида с аминогруппами является обратимой, то есть, удаляя избыток реагента из смеси или разбавляя ее, инфекционная активность может быть восстановлена [182], как это было показано для вирусов ящура [185] и венесуэльского энцефалита [186]. Было отмечено несколько неудач при использовании вакцин, инактивированных формальдегидом, против вируса респираторно-синцитиального синдрома и вируса кори, которые приводили к потере защитного иммунитета и заболеванию

[187]. Основным фактором, который может способствовать этим обстоятельствам, является «хвостовой» эффект с постепенно более медленной нелинейной кинетикой инактивацией вирусов [188], что обычно компенсируется увеличением времени воздействия до нескольких недель или месяцев для достижения полной инактивации, подходящие для производства вакцины [6, 189 - 191].

Другим инактивирующим агентом является β -пропиолактон, который воздействует в основном на вирусную нуклеиновую кислоту [192, 193], вызывая мутацию и блокируя репликацию вируса [194] и незначительно повреждая белки [195]. β -пропиолактон действует путем алкилирования в основном пуриновых остатков клеточной ДНК и вирусной РНК, вызывая ассоциации внутрицепочечных и межцепочечных связей, что приводит к ошибкам репликации [196].

Исходя из этого можно предположить, что иммуногенные эпитопы будут в большой степени сохранены [197], что не всегда имеет место для вирусов, инактивированных формальдегидом [180]. Инактивация вирусов β -пропиолактоном зависит от концентрации инактиватора, температуры взаимодействия и содержания белка в вирусной смеси, которая содержит также белки клеток - субстрата вакцины. Повышение концентрации β -пропиолактон может привести к снижению антигенной активности [196]. Как было показано в эксперименте по инактивации вируса гриппа, вирус был легко разрушен при обработке β -пропиолактоном в высокой концентрации, однако был успешно инактивирован при более низкой концентрации (0,02 % - 0,08 %) с сохранением иммуногенности [198].

Для инактивации культуральной вакцины, разработанной в Китае против вируса Хантаан (штамм Z10), использовали концентрацию β -пропиолактона 0,05 % [124].

Реагенты, которые используют для инаktivирования, являются мутагенами, поэтому для безопасности вакцины инаktivатор должен либо подвергнуться самораспаду, либо переведен в неактивную форму (нейтрализован), а продукты нейтрализации остаться безопасными. По данным исследования гидролиз β -пропиолактона происходит в течение 3 часов при pH 6.6 и 2 часов при pH 7.8 [199] до нетоксичной 3-гидроксипропионовой кислоты в течение нескольких часов [197]. Эти продукты распада не проявляют токсичности для клеток, так как они участвуют в жировом обмене у людей [186].

Другим инаktivатором, представляющим интерес является УФ-излучение, применение которого удешевляет и упрощает технологический процесс производства вакцины. Известно, что УФ-излучение повреждает нуклеиновые кислоты (ДНК/РНК), а также белки, ингибируя репликацию генома/транскрипцию и изменение поверхностных структурных белков [200]. Согласно литературным данным, на инаktivацию вирусов УФ-излучением влияют: концентрация белка, прозрачность, интенсивность потока, время экспозиции и толщина обрабатываемого слоя [201].

Коротковолновые УФ-лучи приводят к образованию димеров между двумя соседними пиримидинами (урацилом и тимином). Образование пиримидиновых димеров может привести к возникновению напряжения в сахарном остове генома, что, возможно, приводит к разрывам в геноме [202]. Коротковолновые УФ-лучи

могут также сшивать белки [203] и вызывать сшивку между нуклеиновыми кислотами и белками [204]. Также известно, что УФ влияет на структуру белка: в смеси аминокислот, ультрафиолетовый свет разрушает тирозин, триптофан и цистеин [205]. Было показано, что вирус Син Номбре, инактивированный УФ-излучением, специфически связывался с родственными рецепторами для проникновения в клетку, а именно фактором, ускоряющим распад (DAF/CD55) и интегрином $\alpha\upsilon\beta 3$. Также вестерн-блот-анализы показали, что УФ-излучение не оказывает значительного влияния на уровень экспрессии белков N, Gn и Gc [206]. В экспериментах по инаktivации вируса гриппа было показано, что для полной инаktivации достаточно 6 минут без значительного повреждения иммуногенных свойств [207].

Методы формалиновой и УФ-инаktivации были использованы при производстве вакцин против полиомиелита и гриппа, но титры нейтрализующих антител у вакцинированных УФ-инаktivированными вакцинами, по сообщениям, были ниже, чем после введения формалин-инаktivированных вакцин [208].

В последнее время большой интерес вызывает применение перекиси водорода, которая способна к необратимой инаktivации как РНК, так и ДНК вирусов с минимальным повреждением антигенной структуры по сравнению с формальдегидом или β -пропиолактоном [209 - 211]. Перекись водорода является сильным окислителем, и как сообщалось, признан эффективным методом инаktivации в производстве вакцин против бешенства [181] и гриппа [206]. Однако не было подтверждено, насколько этот метод инаktivации сохраняет антигенные и иммуногенные свойства хантавирусов.

Повреждение нуклеиновых кислот, в том числе индукция одноцепочечных и двухцепочечных разрывов в геномной РНК или ДНК, является наиболее вероятным механизмом необратимой инактивации [207]. От более традиционных подходов, таких как формальдегид, где полная инактивация вируса может занимать несколько недель [6, 212], применение H_2O_2 отличает короткое время экспозиции. Инактивация вируса бешенства [181] и вируса гриппа [210] в присутствии перекиси водорода (3%) происходит в течение 2 часов, при этом сохраняется способность к индукции как клеточного, так и гуморального ответов. Во многих исследованиях показана способность перекиси к (консервированию) изолированию антигенных эпитопов, что используется при создании вакцин, как против ДНК, так и РНК-содержащих вирусов, включая вирусы лимфоцитарного хориоменингита, желтой лихорадки, Западного Нила, вирус натуральной оспы и оспы обезьян [209, 213], вируса гриппа [210]. В исследованиях по разработке вакцины против вируса Эбола проводили сравнение двух методов инактивации: γ -облучение и H_2O_2 . γ -облучение не привело к полной инактивации вируса в заданных условиях эксперимента, напротив, инактивирование H_2O_2 обеспечило полную инактивацию вируса, и при этом защиту иммунизированных макаков при заражении вирусом (challenge) спустя 4 недели после вакцинации. Этот опыт показал, что ключевые антигенные эпитопы сохранялись после воздействия перекиси водорода [213].

В отличие от других химических инактивирующих агентов, таких как формальдегид или β -пропиолактон, перекись водорода может быть существенно или полностью удалена из вакцины в виде пара путем лиофилизации, оставляя

после себя стабильную и стерильную вакцину, с сохранением иммуногенных эпитопов [215].

1.3 Адьюванты

Адьюванты, широко используемые в настоящее время как в вакцинах, применяемых для людей, так и для животных, по большей части разработаны эмпирически, без четкого понимания их клеточных и молекулярных механизмов действия [216]. Термин «иммунологический адьювант» был впервые предложен в 1920-е годы Гастоном Раймоном, знаменитым французским иммунологом и ветеринаром [217]. По своему химическому составу и механизму действия адьюванты представляют собой гетерогенную группу соединений, которые объединяет лишь одно свойство – способность усиливать иммунный ответ [218]. Адьюванты традиционно использовались для увеличения силы адаптивного ответа на вакцину на основе титра антител или способности предотвращать инфекцию, но вторая роль адьювантов становится все более важной: определение типа адаптивного ответа для получения наиболее эффективных форм иммунитета против каждого конкретного патогена [219]. Таким образом, есть несколько разных причин для включения адьюванта в вакцину: увеличение ответа на вакцину в общей популяции, увеличение средних титров антител; увеличение частоты сероконверсии в популяциях с пониженной чувствительностью из-за возраста (как у детей, так и у пожилых), заболеваний или терапевтических вмешательств. Примером может служить использование адьюванта MF59 для усиления реакции пожилых людей на вакцину против гриппа [220], а также

других адъювантов, способствующих использованию меньших доз антигена [221, 222]. Способность адъюванта разрешать сопоставимые ответы с существенно меньшими количествами антигена может иметь важное значение в обстоятельствах, когда широкомасштабная вакцинация является неотложной, а производственные мощности ограничены; разрешить иммунизацию меньшими дозами вакцины, необходимыми для достижения защиты [221 - 223]. Еще одна причина включения адъюванта в вакцину заключается в достижении качественного изменения иммунного ответа: обеспечения функционально подходящих типов иммунного ответа (например, соотношение T_H1 / T_H2 клеток, CD8⁺ / CD4⁺, специфические изотипы антител), а также увеличения генерации клеток памяти [224, 225] и скорости первоначального ответа, который может быть критическим [225].

Адъюванты в широком клиническом или экспериментальном использовании долгое время считались либо иммуностимулирующими агентами, либо пассивными депо или носителями [70]. Большинство иммуностимулирующих адъювантов являются лигандами для PRR, которые являются потенциальными мишенями для адъювантов. К ним относятся TLR, распознающие липиды, липопротеины, нуклеиновые кислоты и белки; NLR, NOD, реагирующие на множественные лиганды, такие как виды пептидогликанов, флагеллин, токсины и АТФ; хеликазы (RIG-I-подобные рецепторы, RLR), запускаемые цитоплазматической РНК и рецепторы лектина С-типа (CLR), распознающие углеводы и липиды [226 - 229]. Некоторые адъюванты действуют, обеспечивая ключевой компонент врожденного ответа (цитокины) или

непосредственно стимулируя путь активации, минуя врожденный рецептор (токсины). В настоящее время становится ясным, что адъюванты, которые когда-то считались действующими, главным образом, в качестве депо, такие как квасцы и эмульсии, вызывают врожденные реакции, и эти реакции являются центральными для их адъювантной активности [216, 230]. По этой причине важно определить врожденные рецепторы и пути, используемые существующими эмпирически полученными адъювантами, и попытаться установить корреляцию с безопасностью, эффективностью, и механизмами действия [70].

Несмотря на впечатляющий успех одобренных в настоящее время адъювантов для создания иммунитета к вирусным и бактериальным инфекциям, остается потребность в улучшенных адъювантах, которые усиливают ответы защитных антител, особенно в популяциях, которые плохо реагируют на современные вакцины [70]. Инактивированные вакцины, особенно очищенные или рекомбинантные субъединичные вакцины, часто являются слабо иммуногенными и требуют дополнительных компонентов, помогающих стимулировать защитный иммунитет на основе антител и функций эффекторных Т-клеток. Последние данные свидетельствуют о том, что большинство, если не все, адъюванты усиливают ответы Т и В-клеток за счет вовлечения компонентов врожденной иммунной системы, а не за счет прямого воздействия на сами лимфоциты [231].

Минеральные адъюванты. Основными адъювантами, применяемыми в вакцинах для людей, остаются минеральные адъюванты (гидроксид алюминия, фосфат алюминия, фосфат кальция), на которых адсорбируются антигены. Хотя

традиционно считается, что они функционируют главным образом путем формирования долговременного депо для антигенов и стимулирования их поглощения АПК, теперь ясно, что врожденная иммунная стимуляция играет основную роль в адьювантной активности квасцов [232].

Адьюванты на основе алюминия имеют длинную историю применения и наиболее широко применяются по всему миру. [233]. Они являются компонентами при производстве различных лицензированных препаратов (дифтерийно-коклюшно-столбнячная, дифтерийно-столбнячная, дифтерийно-столбнячно-гепатитная, инактивированная полиомиелитная вакцины) [234]. К сожалению, алюминиевые соли являются относительно бедными иммуностимуляторами во многих ситуациях, особенно в индукции клеточного иммунного ответа [235]. Адьювантная активность препаратов проявляется в способности адсорбировать антигены, формировать и медленно реализовать депо антигенов, постепенно доставляя его в зоны локализации иммунокомпетентных клеток. Возникающие в области введения адьюванта воспалительные реакции способствуют макрофагальному транспорту антигена к лимфатическим тканям [234]. Другой возможный механизм – активация комплемента, или активация эозинофилов или макрофагов [235]. Квасцы используются главным образом для усиления выработки антител [236]. В отличие от других адьювантов, гидроксид алюминия подает сигнал подавления секреции ИЛ-12 дендритными клеткам, что является сигналом для приостановки дифференциации Th1 типа. Установлено, что адьюванты, содержащие алюминий, в основном усиливают продукцию IgG и IgE путем стимулирования Th2-типа иммунного ответа, хотя также сообщалось об

индукции CD8+Т-клеток [237-239]. У людей ответы на белки с квасцами, как правило, представляют собой смесь клеток Th2 и Th1 [240]; однако у мышей квасцы индуцируют глубоко поляризованный Th2 ответ с изо типами зависимых от Th2-антител практически на все белковые антигены. Исследования *in vitro* с использованием макрофагов и ДК показали, что после праймирования липополисахаридами (ЛПС) квасцы могут индуцировать образование зрелого ИЛ-1 β [241]. Этот процесс, по-видимому, включает фагоцитоз кристаллов квасцов и лизосомальное высвобождение катепсина в цитоплазму, где фермент локализуется в месте активности, связанной с каспазой-1, с воспалительной активностью [242]. Имеются данные, подтверждающие активацию NLRP3 с помощью квасцов *in vitro*, однако, существует значительная полемика относительно роли этого пути в адьювантной эффективности квасцов *in vivo* [233]. Игр ают ли ИЛ-1 и ИЛ-18 роль в сильной поляризации Th2, вызываемой квасцами у мышей, также неясно [230].

Основными недостатками алюминиевых адьювантов являются: отсутствие воздействия на клеточный иммунитет, формирование гранул ем в области введения [234], повышение продукции IgE, аллергенность и потенциальная нейротоксичность, нефротоксичность [235].

Корпускулярные адьюванты. Другой группой адьювантов, представляющих интерес, являются корпускулярные адьюванты. Эта группа адьювантов включает липосомы, полимерные микро частицы, наночастицы, вирусоподобные частицы и иммуностимулирующие комплексы [243]. Среди них вирусы растений и их вирусоподобные частицы представляют особый интерес и интенсивно

исследуются в настоящее время. Вирусы растений обладают полной биобезопасностью для млекопитающих и людей, а иммуногенность делает их привлекательным инструментом для разработки вакцин [244]. Наиболее изученным представителем таких адъювантов являются сферические частицы (СЧ), полученные термическим ремоделированием спирального вируса табачной мозаики. Уникальной особенностью СЧ является их способность неспецифически адсорбировать чужеродные белки и даже вирионы на поверхности, таким образом усиливать иммунный ответ [245, 246]. По-видимому, это может приводить к эффективному распознаванию В-клетками, повышению экспрессии главного комплекса гистосовместимости II типа, что в свою очередь способствует выработке высоких титров специфических антител. [243]. На модели лабораторных животных было показано отсутствие токсических эффектов применения СЧ [246, 247].

Полисахаридные адъюванты. Углеводные адъюванты модулируют иммунный ответ посредством активации специфических рецепторов врожденной иммунной системы. Множество адъювантов на основе углеводов, в том числе зимозан, маннан, ЛПС, монофосфориллипид А (МПЛ) действуют путем активации таких рецепторов врожденного иммунитета, как TLR, NOD2 и лектины С-типа, что вызывает продукцию воспалительных цитокинов. Бактериальные липополисахариды уже давно признаны сильнодействующими адъювантами, но их пирогенная активность исключает использование в качестве адъюванта у человека [248]. Поэтому было разработано менее токсичное производное ЛПС, МПЛ, которое сохраняет адъювантную функцию без токсичности благодаря

преимущественной стимуляции сигнального пути TLR4 и TRIF [249]. Показано, что монофосфориллипид эффективен для стимулирования долгосрочного гуморального и клеточного иммунитета в вакцинах против вирусов гепатита В и папилломы у людей [249 - 251]. Низкоэндоотоксичный липополисахарид (нЭТ-ЛПС), полученный из оболочки *Shigella sonnei* [252], который является специфическим агонистом TLR4 [235], также, как ЛПС, зимозан, маннан, β -глюканидельта-инулин, активирует комплемент, который приводит к усилению иммуногенности вакцины [234]. ЛПС стимулирует TLR4, который активирует сигнальные пути, опосредованно через адапторные белки, ген первичного ответа MyD88 и TRIF [253].

Передача сигналов от липополисахарида происходит в различных типах клеток, включая негемопозитические клетки, но лучше всего этот процесс изучен в АПК [231].

Липополисахарид является мощным адьювантом Th1 [226], с многофакторным механизмом управления иммунным ответом, включая индукцию интерлейкина ИЛ-12 и ИФН- γ , активацию дендритных клеток через ИФН I типа и индукцию факторов выживания T-клеток [226]. Это желательные свойства для вакцин, поскольку они обеспечивают количество, качество и локализацию T-клеток для контроля вновь приобретенных инфекций [226]. Кроме того, активность липополисахарида в качестве адьюванта обеспечивает концептуальный мостик между врожденными реакциями и индукцией приобретенного иммунитета [254].

TLR-опосредованное распознавание микробных компонентов программирует ДК, участвует в регуляции Т-клеточного и В-клеточного ответов, индуцирует экспрессию костимулирующих молекул, таких как CD80/CD86 дендритными клетками, и продукцию воспалительных цитокинов, таких как ИЛ-12 [255]. С учетом этого лиганды TLR, введенные в состав вакцин, способствуют формированию длительной иммунологической памяти [256].

Белковые адъюванты. Большой интерес представляют белковые адъюванты, такие как термолабильные энтеротоксины *Vibrio cholerae* [257] и *Escherichia coli* [255]. Термолабильные энтеротоксины используются в качестве молекулярного носителя в двухвалентной вакцине для профилактики бруцеллеза и диареи, вызванных *Brucella abortus* и энтеропатогенной кишечной палочкой, *Vibrio cholera* в ветеринарии. В-субъединицы термолабильного энтеротоксина (ТЛБ) *E. coli* можно использовать в качестве адъюванта. В этом случае IgG и IgA продуцируются против нацеливающих антигенов [258]. Механизм этого явления не совсем ясен, но было показано, что в дополнение к гуморальному иммунному ответу стимулируется Th1 путь [259]. Предполагается, что ТЛБ может индуцировать функциональную активацию дендритных клеток костного мозга и стимулировать пролиферацию CD4⁺ Т-клеток, продуцируя цитокины и увеличивая костимулирующие молекулы, необходимые для эффективной активации Т-клеток [260]. Также, возможна опосредованная иммуностимуляция через TLR2, что может привести к генерации регуляторных дендритных клеток и к индукции Т-клеток [261]. Адъювантный эффект термолабильного энтеротоксина усиливается при сочетании с антигенами, которые эффективно

представлены макрофагами и дендритными клетками [262]. Термолабильный энтеротоксин может стимулировать как слизистые, так и системные иммунные ответы [263].

Глава 2 Материалы и методы

2.1 Культуры клеток

Vero – (ATCC CCL-81) перевиваемая культура клеток почки зеленой мартышки. Получена из ВОЗ (WHO VERO cell bank from ECACC, Accession number 991042).

Vero E6 – (ATCCNo. CRL-1586) клон Vero C1008 культуры VERO. Получена на 108 пассаже из Каролинского Института, Швеция.

2.2 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 [264]. 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.

2.3 Вирусологические методы

Метод фокус образующих единиц (ФОЕ). Использовали ранее описанный метод [265] для выявления и титрования вирусов (lg ФОЕ/мл) в культуре клеток Vero E6. Монослой клеток Vero E6, выращенных в 24-луночных панелях (фирма

Costar), заражали 10-кратными разведениями вируса. После контакта с клетками Vero E6 при 37 °C в течение 1 часа инокулят удаляли из лунок и вносили в них по 800 мкл 0,4 % или 0,6 % метилцеллюлозного покрытия. После инкубации в течение 6 - 7 суток при 37 °C, полужидкое покрытие удаляли, клетки Vero E6 один раз отмывали (здесь и далее для отмывки использовали 0,85 % раствор NaCl). Для фиксации монослоя клеток Vero E6 вносили по 400 мкл 96 % этиловый спирт в лунки панели и после 20 мин экспозиции при комнатной температуре спирт удаляли, клетки 3-хкратно отмывали по 10 мин и вносили в каждую лунку по 200 мкл специфической анти-хантавирусной сыворотки. После контакта при 37 °C в течение 60 мин клетки 3-хкратно по 5 мин отмывали, вносили в лунки по 200 мкл меченные пероксидазой антивидовые антитела или белок «А». После контакта в течение 60 мин при 37 °C или 18 час при 4 °C клетки 3-хкратно по 10 мин отмывали и вносили индикатор пероксидазы. В качестве субстрат-индикаторной системы применяли 0,05 % диаминобензидин тетрагидрохлорид с добавлением 0,02 % NiCl₂ и 0,01 % H₂O₂. Через 15-20 мин лунки панели промывали проточной водой и проводили учёт опыта. Количество инфицированных колоний клеток в виде темно-серых пятен подсчитывали визуальным способом и титр вируса выражали в виде lg ФОЕ/мл.

Реакция нейтрализации. Нейтрализующие антитела (нАТ) определяли в реакции нейтрализации (РН) по подавлению фокусобразующих единиц (ФОЕ) в культуре клеток Vero E6 по ранее описанной методике [265]. За титр нАТ принимали разведение сыворотки, подавляющее 50% ФОЕ, выявленных в контрольном образце вируса. Каждая проба сыворотки крови трижды исследована

в РН/ФОЕ50. Критерием достаточной иммуногенности (предел отсечения) считали наличие в сыворотке крови экспериментальных животных нАТ в титре $\geq 4,32 \log_2$.

2.4 Иммунологические методы

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 мышиных IgG+ IgM), меченных ФИТЦ [266]. Хантавирусные антигены в инфицированных клетках Vero E6 выявляли непрямом МФА. Для приготовления антигенных препаратов суспензии инфицированных клеток (450-550 тыс. кл/мл) вносили по 0,005 мл в лунки предметных стёкол с тефлоновым покрытием. После высушивания стёкла помещали на 20 мин в охлажденный ацетон для фиксации клеток и затем высушивали при комнатной температуре. На антигенные препараты наносили соответствующие референс сыворотки крови реконвалесцентов после ГЛПС (анти-Пуумала и др.) в разведениях, начиная с 1:64 и заканчивая разведением, соответствующим титру сыворотки, а также нормальную сыворотку, не содержащую антител к хантавирусам, в разведениях с 1:16 до 1:64. Препараты помещали во влажную камеру и инкубировали при 37 ± 1 °С в течение 30 мин (или при 6 ± 2 °С в течение 18 час). После окончания экспозиции препараты 3-кратно отмывали физиологическим раствором (0,85 % NaCl), промывали дистиллированной водой, высушивали и наносили на антиген антивидовые

антитела, меченные ФИТЦ. Препараты помещали во влажную камеру и инкубировали при 37 ± 1 °C в течение 30 мин, после чего их промывали 3-х кратно физиологическим раствором, 1-кратно дистиллированной водой, высушивали и исследовали с помощью люминесцентного микроскопа Olympus CX31 (Япония), используя водно-иммерсионный объектив LUM Plan FI 60x/0.90W [8].

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» [267].

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.

2.5 Молекулярно-генетические методы

Выделение РНК. РНК выделяли из хроматографически очищенного концентрата методом хлороформ-фенольной экстракции [267], с применением коммерческого

препарата TRI Reagent® (Sigma Aldrich, США) по методике, рекомендованной производителем.

Количественная ПЦР в реальном времени. Состав реакционной смеси и режим амплификации [269]: кДНК получали путем обратной транскрипции в общем объеме 20 мкл, содержащем 5× буфера (Fermentas), 2,5 мМ смеси трифосфатов (СибЭнзим), 20 пМ N6 праймера (СибЭнзим), 1 ед. акт. обратной транскриптазы (Fermentas), 10 мкл раствора РНК. Реакцию проводили при следующих условиях: 25 °С – 10', 42 °С – 30' и 96 °С – 6'. Объем реакционной смеси при ПЦР-РВ составлял 25 мкл и включал: 10× буфер, 2,5 мМ смеси трифосфатов, 5 пМ каждого праймера и зонда (Евроген), 2 ед. акт. HS Taq DNA Polymerase, 2 мкл кДНК и стерильную воду. Реакцию проводили при следующих условиях: 1 цикл 95 °С – 2'; 40 циклов 95 °С – 15'', 55 °С – 40'', 72 °С – 30''. Амплификацию и детекцию в реальном времени проводили на амплификаторе Agilent AriaMx 96 Bioanalyzer (США).

Результаты исследования положительных в ПЦР-РВ образцов на присутствие живого вируса были отрицательными.

2.6 Изготовление полуфабрикатов хантавирусных вакцинных препаратов

Полуфабрикаты вакцинных экспериментальных препаратов для исследований сравнительной эффективности адъювантов и методов инактивирования хантавирусов готовили, в основном, по ранее описанной технологии [6], 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 каждого из 3-х моновалентных препаратов (ВАК-ПУУ+ВАК-ХТН+ВАК-СОЧ).

2.7 Методы инактивации хантавирусов

Культуральную жидкость клеток Vero E6, содержащую вирус Пуумала с титром не менее $5,5 \pm 0,5 \lg$ ФОЕ/мл, разливали по 1 мл в инсулиновые флаконы, которые затем маркировали и размещали в соответствии с методами и режимами инактивации [6, 127]. При изучении динамики инактивации вируса были определены временные параметры и наиболее щадящие в отношении сохранения полноценности структурных белков вируса температурные режимы (6 ± 2 °С и 22 ± 2 °С), необходимые для полного удаления инфекционной активности исследованного нами вируса.

Инактивация формальдегидом (ФА). 36,5 % раствор формальдегида (Riedel-de Haen) разводили в стерильной дистиллированной воде в соотношении один к двум и вносили в конечной концентрации 1/4000 в бутылку с вирусосодержащим материалом, выдерживали при температуре 6 ± 2 °С в течение 30 суток. Пробы отбирались ежедневно.

Инактивация β -пропиолактоном (β -ПЛ). 98 % раствор β -пропиолактона (AcrosOrganics, Geel, Belgium) вносили в бутылку с вирусосодержащим материалом в конечном разведении 1/2000, 1/4000, 1/6000, 1/8000, и 1/10000. Смесь постоянно

перемешивали при комнатной температуре на магнитной мешалке для гидролиза остаточного β -пропиолактона. В процессе инактивации пробы отбирались через 5, 20, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 минут.

Инактивация перекисью водорода (H_2O_2). Раствор H_2O_2 вносили в бутылку с вирусодержащим материалом в конечной концентрации 1,5 % и 3 %. Смесь постоянно перемешивали при комнатной температуре на магнитной мешалке. В процессе инактивации пробы отбирались через 3, 5, 15, 30, 60 минут.

Термоинактивация. Аликвоты с вирусодержащим материалом выдерживали при температурах 6 ± 2 °С и $+ 22 \pm 2$ °С. Пробы отбирались ежедневно.

Инактивация ультрафиолетовым излучением (УФ). Для оценки потенциала инактивации хантавирусов ультрафиолетом устанавливали небольшую емкость с вирусодержащей жидкостью толщиной 3 мм на расстоянии 24 см от источника коротковолновых ультрафиолетовых лучей с максимальной длиной волны 253,7 нм. Отбор проб осуществляли через 1, 2 и 3 минуты.

Для определения полноты инактивации хантавируса разными способами применяли описанную ранее [6] методику, включающую проведение 5 серийных пассажей исследуемого субстрата на культуре клеток Vero E6 с исследованием лизата клеток и культуральной жидкости после каждого пассажа на присутствие вируса с помощью методов иммунофлюоресценции и фокусообразования.

Для определения зависимости уровня иммуногенной активности экспериментальных вакцинных препаратов от способа инактивации хантавирусов мышей BALB/c (n=7) иммунизировали образцами полуфабриката экспериментального вакцинного препарата ВАК-ПУУ, инактивированных

различными способами: формальдегидом, β -пропиолактоном, УФ-лучами и перекисью водорода.

2.8 Адьюванты

1. Гидроксид алюминия (АЛ), (Alhydrogel® «85» (Brenntag GmbH, Германия), добавляли в вакцину в концентрации 1 мг/мл.
2. Сферические частицы (СЧ), образованные в результате термического ремоделирования вируса табачной мозаики, лишены РНК и состоят из денатурированных субъединиц белка вирусной оболочки мозаики [270]. Средний размер частиц составлял 260 нм. Мы изучили адьювантный эффект СЧ в концентрации 100 мкг, 150 мкг и 300 мкг на 1 мл вакцины. Получены на кафедре вирусологии биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова.
3. Термолабильный энтеротоксин Б (ТЛБ) представляет собой рекомбинантный энтеротоксигенный белок *Escherichia coli*, очищенный с помощью аффинной хроматографии [270]. ТЛБ использовали в концентрации 7,5 мкг/мл и 0,2 мкг/мл вакцины. Получен в ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи».
4. Липополисахарид (ЛПС) - гомогенная ЛПС-субфракция *S. sonnei* - Ac3-S-LPS, содержащий длинноцепочечный O-специфический полисахарид (S-LPS) и преимущественно триацилированный липид А, без примесей пента- и гексаацилированного липида А [252]. ЛПС применяли в дозе 50 мкг/мл. Препарат получен в ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА.

Иммуностимулирующую активность адъювантов исследовали на модели полуфабриката экспериментального вакцинного препарата ВАК-ПУУ (далее ВАК) и трехвалентной – поли-ВАК: ВАК без адъювантов: 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 адъювантов; поли-ВАК-АЛ (1 мг/мл); поли-ВАК-ЛПС (50 мкг/мл). Контрольные группы: К-ФР; К-СЧ/300; К-ЛПС; К-ТЛБ; К-АЛ.

Образцы вакцинного полуфабриката распределяли на экспериментальные группы в соответствии с разведениями (н/р, 1/2, 1/4, и 1/8), после чего к каждой фракции соответствующего разведения добавляли исследуемые концентрации адъювантов. Таким образом, концентрация адъювантов была одинаковой для каждого препарата вне зависимости от его разведения.

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 адъювантов, ВАК-ЛПС (50 мкг/мл), ВАК-АЛ (1 мг/мл), ВАК/лиофилизация, ВАК-ЛПС/лиофилизация), а также образцами поливалентного препарата (поли-ВАК без адъювантов, поли-ВАК-АЛ (1 мг/мл), поли-ВАК-ЛПС (50 мкг/мл)). Контрольные группы: К-ФР; К-ЛПС.

2.9 Лабораторные животные

В экспериментальной работе использовались мыши, самки (BALB/c), массой тела 18-20 г на начало исследования, находившиеся в одинаковых

условиях содержания и кормления. Животные поступали из филиала «Андреевка» Федерального Государственного бюджетного учреждения науки «Научный центр биомедицинских технологий» Федерального медико-биологического агентства. Исследования на мышах BALB/c проводились в соответствии с рекомендациями Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях от 18 марта 1986 года [272], Европейского парламента и Директивы Европейского совета по защите животных, используемых в научных целях (2010/63/EU) [273], и ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур» [274], ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами» [275], ГОСТ 33218-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными, Правила содержания и ухода за нечеловекообразными приматами и ряд других» [276], ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики» [277]; ГОСТ Р 56699-2015 «Лекарственные средства медицинского назначения» [278], ГОСТ Р 56701-2015 «Лекарственные средства медицинского назначения» [279]. Протокол исследования был одобрен этическим комитетом ФГБНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН». Режим содержания животных во время процедур не изменился относительно стандарта. В ходе эксперимента не было обнаружено ухудшения состояния здоровья животных. Эксперименты с использованием инфекционных материалов проводились в

лаборатории, оборудованной специальным блоком для работы с вирусами 2-й группы патогенности, на работу с которыми имеется разрешение Роспотребнадзора.

Мыши BALB/c перед началом исследования находились в карантине 15 дней, затем животные, отвечающие критериям включения в эксперимент, были распределены рандомизировано на группы по 7 мышей (Рисунок 1).

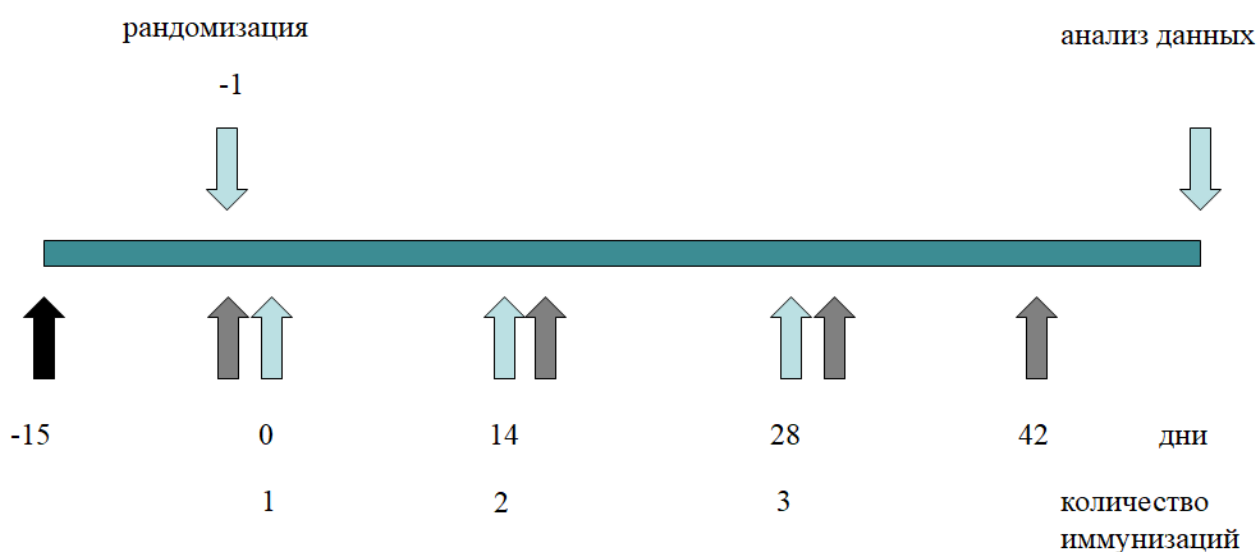


Рисунок 1 - График иммунизаций и взятия образцов у мышей BALB/c.

Черная стрелка – начало эксперимента. Собранные образцы обозначены серыми стрелками под горизонтальной линией. Кратность иммунизации указана голубыми стрелками под горизонтальной линией.

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 физиологический раствор натрия хлорида (ФР) с соответствующими

адьювантами. Забор крови проводился через 14 дней после второй и третьей иммунизаций. 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 $6 \pm 2^\circ\text{C}$ или в замороженном виде ($- 70^\circ\text{C}$) в течение не более 2-х месяцев до исследования.

2.10 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) непараметрическими методами. Определение уровня значимости различий между несколькими группами было выполнено с использованием 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, ** – высокосignимая 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 ($M \pm m$).

Глава 3 Разработка контроля специфической активности вакцинных препаратов методом ПЦР в реальном времени.

ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) — это быстрый, чувствительный и специфичный метод обнаружения вирусов [280,281]. Важным критерием оценки качества инактивированной цельновирионной вакцины является контроль ее специфической активности. Специфическая активность определяется по содержанию иммуногена (в мг целевого белка, титрах антигена) [282], и отличается от понятия иммуногенности (подлинности вакцины), определяемой по способности индуцировать протективный иммунный ответ. Последний определяется по способности вакцины индуцировать нейтрализующие антитела и/или в challenge - опытах. В технологическом цикле производства цельновирионной вакцины против ГЛПС после инактивации вируса осуществляют контроль специфической активности, как правило, по количественному содержанию хантавирусного антигена [267] – иммуногена. Для этого используют серологические методы (различные модификации ИФА), воспроизводимость результатов которых зависит от чувствительности метода, обусловленной активностью моноклональных антител, являющихся важным компонентом применяемого ИФА.

Нами разработан альтернативный (суррогатный) метод определения специфической активности вакцины основанной на соотношении содержания

копий вирусной РНК и иммуногенной активностью препарата, инактивированного бета-пропиолактон.

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. Исследования проводились совместно с к.б.н. Егоровой М. С.

Для определения специфической активности инактивированных экспериментальных вакцинных полуфабрикатов ВАК-ПУУ, ВАК-ХТН и ВАК-СОЧ методом ПЦР-РВ были разработаны праймеры и зонды, содержащие флуоресцентную метку карбоксифлуоресцеина FAM на 5'конце и гаситель флуоресценции BHQ2 на 3'конце, на вакцинные штаммы: ПУУ-ТКД/VERO, ХТН-Р-88/VERO и ДОБ-СОЧИ/VERO (Таблица 4).

Таблица 4 - Праймеры и зонды

Штамм	Название	Последовательность 5'→3'
ПУУ- ТКД/VERO	Ufa_Z 3780	BHQ1-TGCTCC TGG GAT GGT AAA TAA CCC AAC T-FAM
	Ufa_F 3760	GTA TTA TGT ACG AGT AAA GTT GAG AGA
	Ufa_R 3800	CCT AAA GGT ATA GGG ATT AAA CTC CT
ДОБ- СОЧ/VERO	Sochi_Z 4500	BHQ1-ATC CCA GCT GTG ATT GGG TAC AAG T-FAM
	Sochi_F 4480	TCA CTG TGA GAG AGA AGG ATC GA
	Sochi_R 4530	TAG AAC ATC TGA CAT TTC ATC AAC TGT
ХТН-Р- 88/VERO	Hantaan_Z3770	BHQ1-TAC AGC ACC AGG TAT GGT GAA CCA-FAM
	Hantaan_F3750	GTG TAC TAG TAA AGT TGA ACG GTT GT
	Hantaan_R3790	GTG TAT CAG CAT GCT TGA CTT GCA

В качестве диагностической мишени для олигонуклеотидов и флуоресцентных зондов были выбраны фрагменты L-сегмента для хантавирусных вакцинных штаммов. При выборе праймеров и зондов был выполнен анализ полногеномных сиквенсов вакцинных штаммов, а также геномов вирусов Пуумала, Хантаан и Сочи, представленных в базе данных GenBankNCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) с помощью программы с применением стандартных требований к выбору праймеров и зондов. Параметры праймеров рассчитывали с помощью онлайн-сервиса Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator, термодинамические характеристики флуоресцентных зондов и их вторичные структуры оценивали в онлайн-сервисе ThemfoldWebServer (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold/DNA-Folding-Form>).

Олигонуклеотиды содержали флуоресцентную метку FAM на 5'конце и гаситель флуоресценции black-holequencher 2 (BHQ2) на 3' конце. Проверку специфичности подобранных зондов и праймеров осуществляли на штаммах хантавирусов, а также на штаммах других вирусов (вирус бешенства, вирус клещевого энцефалита, вирус Кемерово, вирус жёлтой лихорадки, вирус Крым-Конго геморрагической лихорадки) [283].

3.1 Построение стандартной кривой

При постановке ПЦР-РВ проводили количественное определение целевой РНК в образце. Метод основан на построении стандартной кривой, которая отражает линейное отношение между значением порогового цикла (C_q) и исходным количеством РНК (копий/мл) (Рисунок 2, 3). Стандартные кривые были

получены амплификацией серии последовательных разбавлений стандарта со средними значениями C_q , полученными из трех повторностей в каждом анализе. Стандарты готовились из предельных десятикратных разведений очищенного вируса с известным титром, выраженным в $1g$ ФОЕ/мл. Чтобы определить взаимосвязь числа ФОЕ/мл с пороговыми значениями цикла, вирусы титровали. В зависимости от целей опыта, вирусную РНК выделяли из исходного материала (вирусодержащей культуральной жидкости) и далее титровали, или РНК выделяли из предварительно раститрованного исходного материала. В аликвотах из каждого разведения определяли титр вируса по количеству ФОЕ/мл и содержание вирусной РНК-копий/мл. Каждый опыт выполняли по три раза и по результатам экспериментов был построен график для определения численного соотношения между переменными. Определение числа копий РНК проводили методом цифровой ПЦР (droplet-digital PCR (ddPCR) в системе QX200 Droplet Digital PCR System (BioRad Laboratory, США). Далее инактивированные образцы анализировали с помощью стандартных кривых для количественного определения вирусной РНК. Стандартное отклонение результатов анализов составило $\leq 15\%$.

Данная стандартная кривая была использована для сравнительной оценки количества копий РНК в вакцинном полуфабрикате.

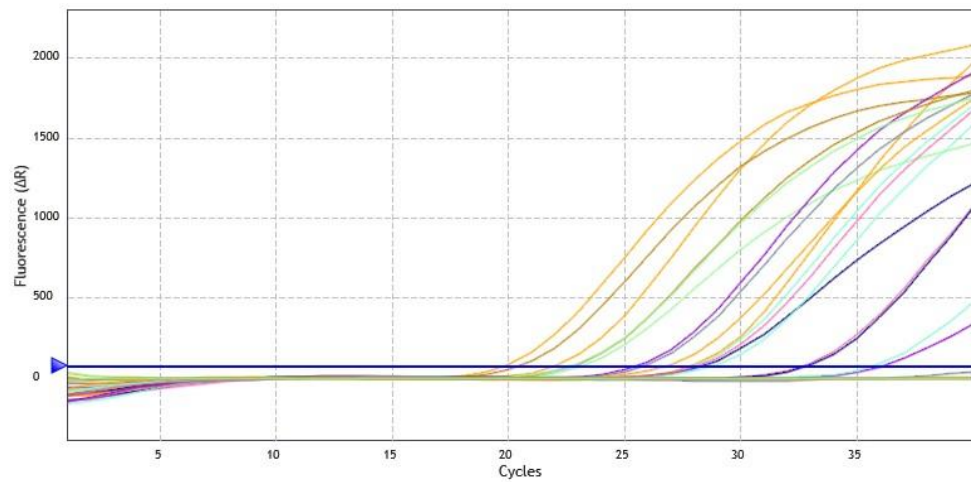


Рисунок 2 - Анализ чувствительности ПЦР-РВ. Кривые амплификации для 10-кратных последовательных разведений вируса Пуумала.

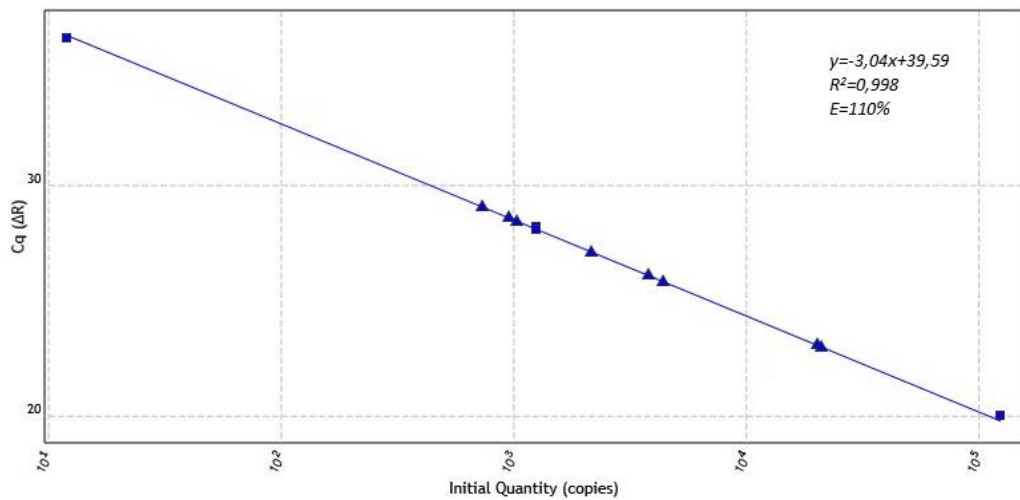


Рисунок 3 - Стандартная кривая зависимости порогового цикла от исходной концентрации количества молекул РНК-ПУУ /мл. Значения Cq были получены при анализе с помощью ПЦР-РВ РНК, экстрагированной из исходного материала и 10-кратно серийно разведенной. Угол наклона (slope), R^2 - коэффициент корреляции, E - эффективность линейной регрессии.

3.2 Оценка специфичности и чувствительности метода ПЦР-РВ

Оптимизированная нами система ПЦР-РВ обладает специфичностью, поскольку флуоресценция по флуоресцентной метке карбоксифлуоресцеина (FAM) регистрировалась только при исследовании РНК вакцинных штаммов (ПУУ-ТКД/VERO, ХТН-Р-88/VERO, ДОБ-СОЧИ/VERO) вирусов Пуумала, Хантаан и Сочи, в то время как при тестировании других штаммов хантавирусов: Пуумала (CG-Kazan-79, Halnaas 83-L20 и Sotkamo), Хантаан (Ли 83-61 и 76-118), Добрава/Белград (Белград-1), Сеул (SR-11 и А9), Sin Nombre (СС/107), а также вирусов других семейств, включая: вирус Крым-Конго геморрагической лихорадки (штамм IbAr 10200), вирус Денге (штаммы 8356/10, 4397/11, 3140/09 и 3274/09), вирус японского энцефалита (штамм Накаяма), вирус клещевого энцефалита (штамм Hochsterwitz), вирус лихорадки Западного Нила (штамм MgAn 786/6/1995), вирус лихорадки Зика (штамм MR766), вирус Usutu (штамм G39), вирус желтой лихорадки (штамм Asibi), вирус Чикунгунья (штамм 23161) и вирус Ласса (штамм Josiah), зафиксирован отрицательный результат, что свидетельствует об отсутствии ложноположительных результатов.

Для тестирования перекрестной реактивности праймеров исследовали РНК вирусов Пуумала, Хантаан и Сочи, смешанных в равных объемах, а также в присутствии геномного материала родственных хантавирусных штаммов (штаммы CG-Kazan-79, Halnaas 83-L20, Sotkamo, Ли 83-61, 76-118, Белград-1, SR-11, А9 и СС/107). В результате была установлена строгая специфичность подобранных праймеров к вакцинным штаммам, что позволяет определять подлинность хантавирусных вакцинных препаратов.

В очищенном вакцинном полуфабрикате нижний предел чувствительности выявления РНК составлял $1,2 \lg$ ФОЕ/мл анализируемого вируса (Таблица 5, Рисунок 2). Значения C_q праймеров показали линейную кривую ($R^2 = 0,998$) для обнаружения вакцинных штаммов хантавирусов. Полученная стандартная кривая позволяет количественно определять вирус на основании значений C_q (Рисунок 3).

Таблица 5 – Чувствительность анализа ПЦР-РВ

Вирус Пуумала			Вирус Хантаан			Вирус Сочи		
Титр вируса, \lg ФОЕ/мл	Количество копий/мл	Титр* антигена	Титр вируса, \lg ФОЕ/мл	Количество копий/мл	Титр** антигена	Титр вируса, \lg ФОЕ/мл	Количество копий/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

* тест-система «ХАНТАГНОСТ»

** ИФА тест-системы «Ханта-N»

[^] титр выражен в величинах, обратных разведению образца

*** порог отсечения - разведение препарата 1:128

^{..} N/A – отсутствует сигнал флюорисценции

Чтобы проверить чувствительность и специфичность анализа ПЦР-РВ мы сгенерировали стандартную кривую, чтобы определить предел обнаружения РНК для набора праймер-зонда. С этой целью были приготовлены десятикратные серийные разведения РНК вирусов Пуумала, Хантаан и Сочи, выделенных из очищенного вакцинного полуфабриката с содержанием клеточной ДНК меньше 20 пкг/мл. Вирусную РНК выявляли в диапазоне от $3,06 \times 10^5$ до 10 копий РНК/мл со

значением $R^2 = 0,998$, что свидетельствует о высокой достоверности корреляции значений C_q и количества молекул РНК в миллилитре. Мы также оценили самый низкий предел обнаружения РНК, используя 10-кратные разведения вирусов Пуумала, Хантаан и Сочи с известными титрами, что позволило определить корреляцию титра вируса (\lg ФОЕ/мл) со значениями C_q .

3.3 Количественная оценка содержания РНК в вакцинном препарате

Порог обнаружения для наиболее разбавленных образцов составлял: для вируса Пуумала - 40 копий/мл, что соответствовало $1,5 \lg$ ФОЕ/мл; вируса Хантаан - 10 копий/мл, что соответствовало $0,8 \lg$ ФОЕ/мл; вируса Сочи - 35 копий/мл, что соответствовало $1,2 \lg$ ФОЕ/мл. Чувствительность метода ИФА была значительно ниже: для вируса Пуумала - 1:256, что соответствует $3,5 \lg$ ФОЕ/мл, для вируса Хантаан - 1:128, что соответствует $2,8 \lg$ ФОЕ/мл и вируса Сочи - 1:128, что соответствует $3,2 \lg$ ФОЕ/мл (Таблица 5). Значения C_q были линейными и очень хорошо коррелировали с концентрацией РНК вирусов Пуумала, Хантаан и Сочи, которую мы использовали (значение $R^2 = 0,99$). Сравнение ФОЕ, ИФА и ПЦР-РВ показывает, что наименьшее количество вируса, в том числе инактивированного, было обнаружено с помощью метода ПЦР-РВ. Соответственно этот метод может успешно применяться для оценки количества копий РНК в различного рода исследованиях, включая и диагностические.

Таким образом, метод ПЦР-РВ, разработанный на основе данных полногеномного сиквенса хантавирусных вакцинных штаммов, показал высокую специфичность и чувствительность количественного определения вирусной РНК

в образцах инактивированных экспериментальных вакцинных препаратов. В отличие от ранее применяемых методов (ИФА с использованием моноклональных антител к N и/или G белкам хантавирусов [264], определение специфической активности вакцинного препарата по содержанию вирусной РНК, наряду с высокой специфичностью, обеспечивает высокую воспроизводимость результатов. Ещё одним преимуществом ПЦР-РВ является возможность анализировать количество РНК каждого вируса в составе поливалентной вакцины.

Глава 4 Сравнительная оценка эффективности методов инактивации хантавирусов

Культуральную жидкость клеток Vero E6, содержащую вирус Пуумала с титром не менее $5,5 \pm 0,5 \lg$ ФОЕ/мл, разливали по 1 мл в инсулиновые флаконы, которые затем маркировали и размещали в соответствии с методами и режимами инактивации. При изучении динамики инактивации вируса были определены временные параметры и наиболее щадящие в отношении сохранения полноценности структурных белков вируса температурные режимы (6 ± 2 °С и 22 ± 2 °С). Исследования проводились совместно с к.б.н. Егоровой М. С.

4.1 Инактивация формальдегидом и термоинактивация

В опубликованных ранее работах по изучению динамики инактивирования хантавирусов при разных температурных режимах и при обработке разными концентрациями формальдегида была выбрана оптимальная схема, включающая инактивирование вируса при температуре 6 ± 2 °С в присутствии 0,025 % раствора формальдегида в течение 30 суток, что практически совпадает по времени с динамикой естественной термоинактивации [15]. В нашем исследовании был получен аналогичный результат. В вирусосодержащих субстратах, обработанных формальдегидом в конечной концентрации 0,025 % при температуре 6 ± 2 °С, инфекционная активность вируса Пуумала не определялась по истечении экспозиции в течение 35 суток [8]. Экспозиция вируса при

температуре 22 ± 2 °С приводила к полной потере его инфекционной активности через 15 дней (Рисунок 4).

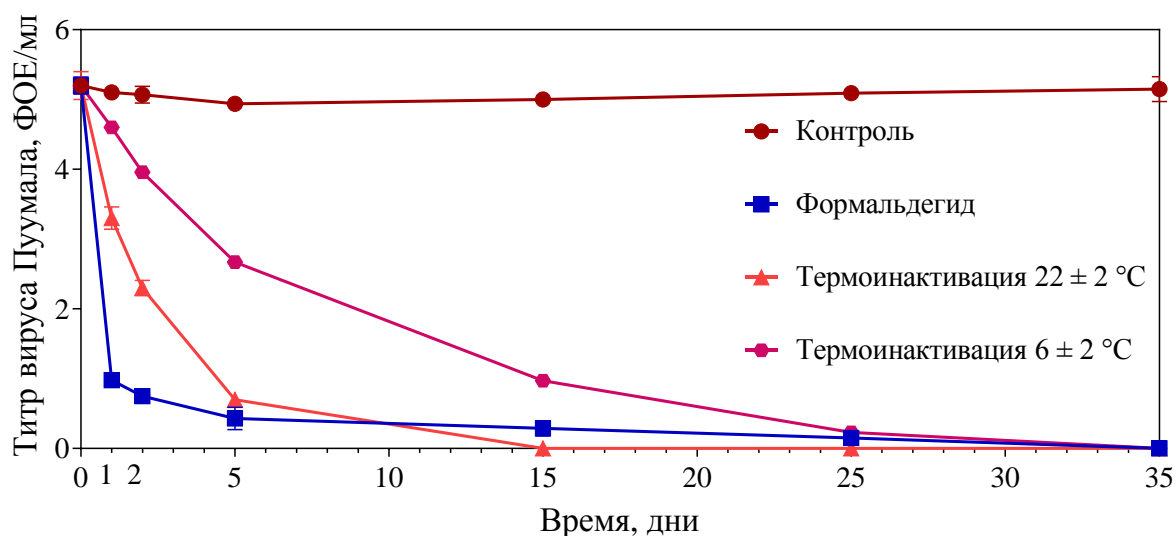


Рисунок 4 - Динамика инаktivации вируса Пуумала формальдегидом и термоинаktivация *in vitro*.

4.2 Инаktivация β-пропиолактоном

Вирус Пуумала с исходным титром $5,2 \lg$ ФОЕ/мл полностью терял инфекционность при температурe 22 ± 2 °С и концентрации β-пропиолактона в диапазоне от 0,0025% до 0,001% (Рисунок 5). Так, при 0,001% концентрации β-пропиолактона время полной инаktivации составило 150 минут, Оптимальное время инаktivации 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 легко гидролизуются [195], сохраняя иммуногенность вакцинных препаратов. При инаktivировании вирус Пуумала с исходным титром $6,1 \lg$

ФОЕ/мл, что крайне редко достигается при культивировании вируса, время полной инактивации β -пропиолактоном в разведении 1/6000 достигается в течение 2 часов.

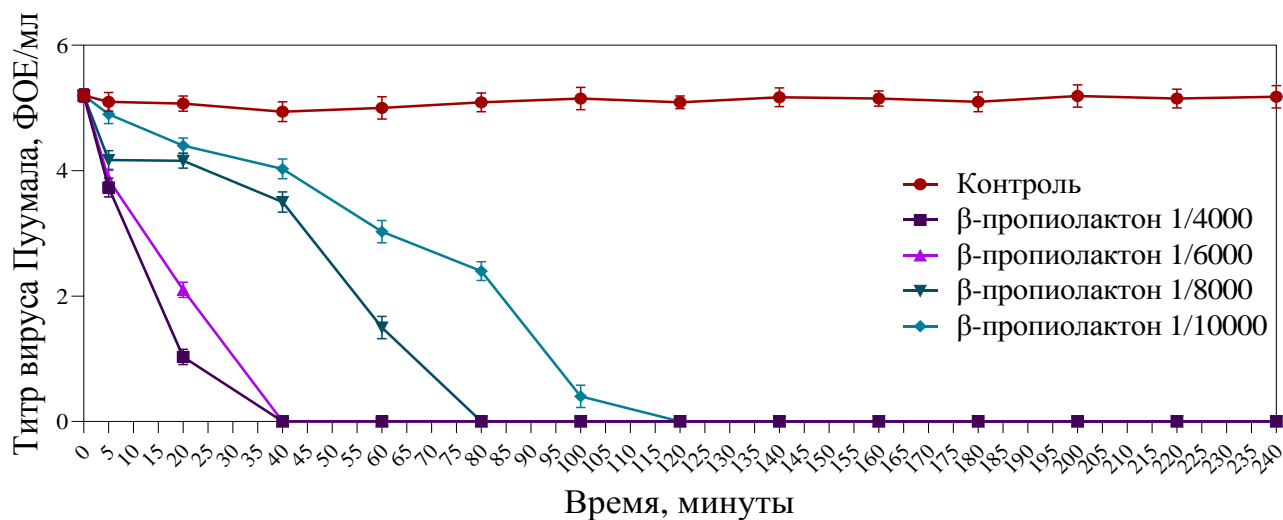


Рисунок 5 - Динамика инактивации вируса Пуумала β -пропиолактоном *in vitro*.

4.3 Инактивация УФ-излучением

Известно, что на полноту инактивации вирусов под действием УФ-излучения влияют следующие параметры инактивируемого препарата: концентрация белка, прозрачность раствора, время экспозиции, толщина обрабатываемого слоя и расстояние от источника излучения. 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 (Рисунок 6).

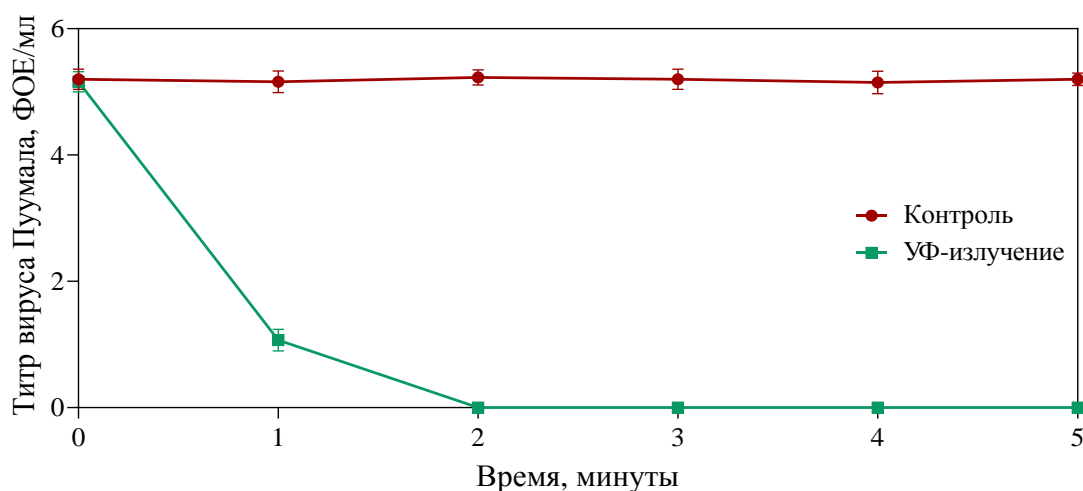


Рисунок 6 - Динамика инактивации вируса Пуумала УФ-излучением *in vitro*.

4.4 Инактивация перекисью водорода

Чтобы оценить надежность инактивации перекисью водорода, мы провели исследования, в которых тестировали ряд факторов, способных повлиять на эффективность инактивации. 33% раствор перекиси водорода капельно добавляли при комнатной температуре к исследуемому образцу (рН = 7,0) до конечной концентрации 1,5 % и 3 %. При обработке вируса Пуумала 3% раствором H_2O_2 при комнатной температуре время полной инактивации составляло 5 минут (Рисунок 7). При обработке вируса 1,5 % раствором H_2O_2 время полной инактивации составляло 15 минут. Различие температурных режимов (22 ± 2 °C или 6 ± 2 °C) не влияло на скорость инактивации вируса.

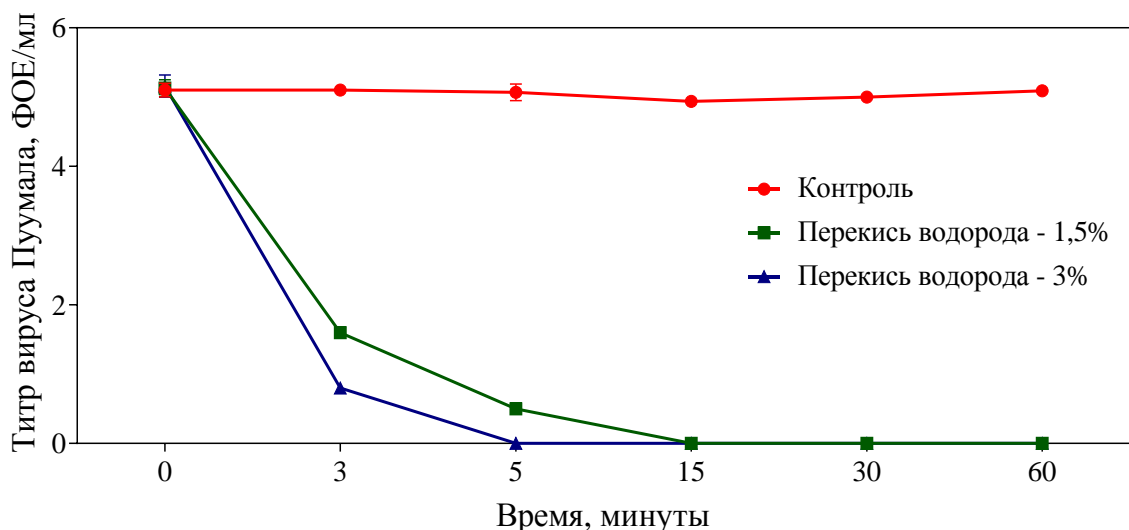


Рисунок 7 - Динамика инактивации хантавирусов перекисью водорода *in vitro*.

Эффективность применения формальдегида, β -пропиолактона, УФ-излучения и перекиси водорода для инактивации вируса Пуумала в неочищенных КЖ и очищенных экспериментальных вирусных препаратах не имела выраженных отличий.

4.5 Зависимость числа копий РНК от способа инактивирования хантавируса

Сопоставление количества копий РНК в мл образца с таковым в нативном образце до инактивации показало, что количественное снижение РНК после инактивации зависит от способа инактивирования. Следует отметить, что данные потери неизбежны и обусловлены механизмом действия инактивирующих агентов на вирусную РНК.

Установлена достоверная разница между количеством копий РНК до и после инактивирования вакцинного полуфабриката различными способами,

включая применение формальдегида, β -пропиолактона, и УФ-излучения, перекиси водорода и термоинактивации (Рисунок 8). Анализ проведен с помощью одностороннего ANOVA с тестом множественных сравнений Даннетта ($p < 0,0001$). Так, термоинактивация при 6 ± 2 °C и 22 ± 2 °C приводила к значительному ($p < 0,0001$) повреждению генетического материала в 240 и 410 раз по сравнению с контролем. В то же время для β -пропиолактона снижение числа копий РНК/мл ($p < 0,0312$) отмечалось в более чем 1,5 раза по сравнению с нативным препаратом; для формальдегида - в более чем в 5 раз; для УФ-излучения и перекиси водорода - в 13 и 60 раз, соответственно.

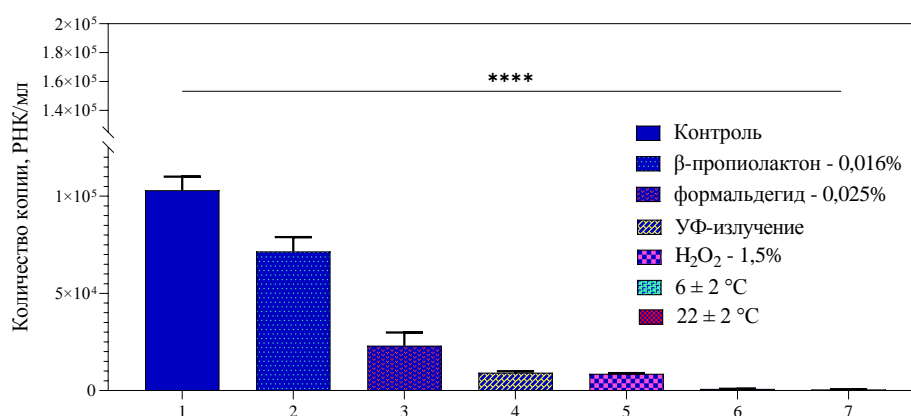


Рисунок 8 - Анализ зависимости количества копий РНК/мл от инактивирующего агента. Различия между группами статистически достоверны. Обозначения: ****

$$p < 0,0001.$$

Таким образом, показано, что применяемые нами инактиваторы инфекционности в различной степени повреждали вирусную РНК. Установлена определенная зависимость количественного содержания РНК копий/мл вируса

Пуумала в экспериментальных вакцинных препаратах от способа их инактивирования.

4.6 Специфический иммунный ответ на введение образцов экспериментального вакцинного препарата, инактивированных различными способами

Для контроля иммуногенной активности образцов полуфабриката экспериментального вакцинного препарата ВАК-ПУУ, инактивированных различными способами, использовали исходно один пул вирусного сбора с известным титром.

После иммунизации мышей BALB/c образцами, инактивированными формальдегидом, β -пропиолактоном, УФ-лучами и перекисью водорода, побочных эффектов, как локальных, так и общих, не наблюдалось. Иммуногенную активность препаратов определяли по уровню нейтрализующих антител после 2-х кратной иммунизации мышей. В контрольных группах мышей BALB/c, которым вводили 0,85% физиологическим раствор, нейтрализующих антител не выявляли (предел отсечения $RH/FOE_{50} \leq 2.32 \log_2$). За приемлемый уровень индукции нейтрализующих антител принимали количество нейтрализующих антител со $CGT \geq 4,32 \log_2$. Пробы сывороток, собранные после второй иммунизации, тестировали на нейтрализующую активность в отношении вируса Пуумала. Не было статистически значимой разницы в титрах нейтрализующих антител после иммунизации образцами препарата ВАК-ПУУ, инактивированных β -пропиолактоном в конечном разведении 1/6000 в течение

180 минут; формальдегидом в конечной концентрации 0,025 % в течение 35 дней, УФ-излучением (253,7 нм) при толщине слоя 3 мм и расстоянии 24 см от источника света и перекисью водорода в конечной концентрации 1,5% в течение 30 минут. Статистический анализ проводили с использованием одностороннего ANOVA с тестом множественных сравнений Тьюка (Рисунок 9), в которых титры СГТ нейтрализующих антител составляли 8.8; 8.86; 8.7; 8.5 \log_2 , соответственно ($p < 0,001$, ANOVA). Несмотря на различное количество выявляемых копий РНК/мл в препаратах, инактивированных разными способами, титры нейтрализующих антител у иммунизированных животных статистически значимо не различались. Это свидетельствует о сохранности иммуногенных эпитопов в результате разных способов инактивирования, несмотря на различную степень повреждения вирусной РНК (Таблица 6).

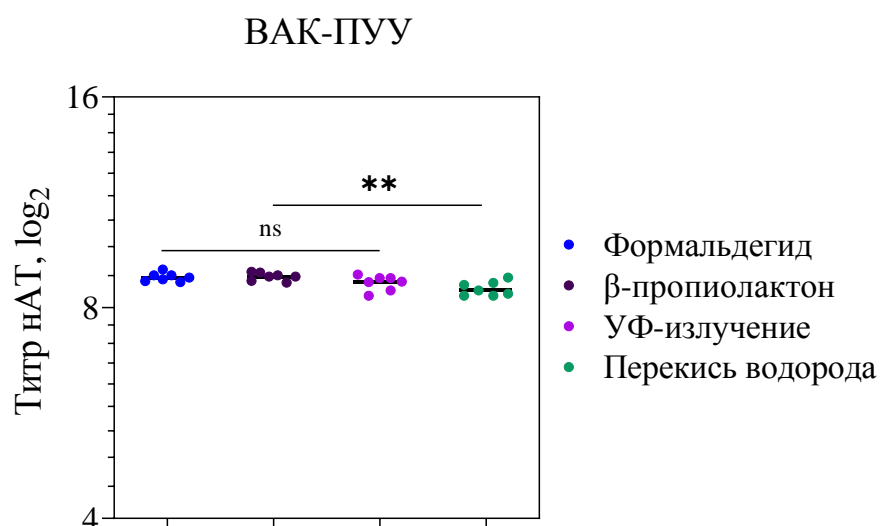


Рисунок 9 - Зависимость титра нейтрализующих антител при иммунизации мышей BALB/c образцами препарата ВАК-ПУУ, инактивированных разными способами. Обозначения: ns = несущественные различия, ** $p < 0,005$.

Таблица 6 - Соотношение количества копий РНК/мл и иммуногенности экспериментального вакцинного препарата ВАК-ПУУ, инактивированного разными способами

Инактивация	Титр вируса, lg ФОЕ/мл	Число копий РНК/мл	Белок, мг/мл	Титр нАТ**
ВАК-ПУУ				
без инактивации*	5,4	$(1,22 \pm 0,3)4 \times 10^5$	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.

В связи с различным повреждением вирусной РНК, в зависимости от способа инактивации, а также порогом чувствительности ПЦР-РВ, помимо технологических особенностей – выбран наиболее эффективным бета-пропиолактон.

Анализ иммуногенной активности экспериментального препарата ВАК-ПУУ демонстрирует, что независимо от способа инактивирования все испытанные образцы этого препарата индуцировали высокий уровень нейтрализующих антител, что свидетельствует о сохранности иммуногенных эпитопов вируса.

Установлена наибольшая эффективность использования β -пропиолактона, который в качестве инактиватора, на порядок по сравнению с формальдегидом, перекисью водорода и ультрафиолетовым излучением снижает содержание балластных белков за счет уменьшения их агрегации (Таблица 6), что в свою очередь ведет к более эффективной очистке вируса на этапах осветляющей фильтрации и гельфильтрации, а также снижению потерь вирусного компонента в результате стерилизующей фильтрации вакцинного материала, что позволяет повысить технологичность процесса производства хантавирусных вакцин.

Для выявления корреляции между уровнем специфической активности (количество копий РНК) и иммуногенной активностью были исследованы сыворотки крови мышей BALB/c, иммунизированных инактивированным β -пропиолактоном препаратом ВАК-ПУУ. В каждом разведении препарата определяли количество копий РНК/мл и соотносили с титром нейтрализующих антител, выявленных после иммунизации. Результаты опытов показали прямую зависимость между титром нейтрализующих антител и содержанием числа копий РНК.

Глава 5 Сравнительная оценка иммуногенной активности экспериментальных хантавирусных вакцинных препаратов, содержащих адьюванты различного происхождения

5.1 Определение минимальной иммунизирующей дозы (МИД) вакцинного препарата.

Следует отметить, что для исследования вирусов - возбудителей ГЛПС - отсутствует лабораторная модель животного, что, в свою очередь, делает невозможным применение метода разрешающей инфекции (challenge). Иммуногенную активность экспериментальных вакцинных препаратов определяли совместно с к.б.н. Егоровой М. С. и оценивали по результатам выявления нейтрализующих антител в сыворотках крови иммунизированных этими препаратами мышей BALB/c. Необходимость определения оптимальной минимальной иммунизирующей дозы вакцинного препарата обусловлена необходимостью предотвращения иммуносупрессивного эффекта высокой дозы иммуногена. Для определения иммунизирующей дозы были приготовлены разведения (двукратным шагом до 1/256) экспериментальных моновалентных вакцинных препаратов. Специфическую активность 3-х экспериментальных моновалентных вакцинных препаратов оценивали в соответствии с титром вируса (ФОЕ/мл) в исходных вакцинных препаратах до инактивирования, числом копии РНК/мл после инактивирования β -пропиолактоном и титром нейтрализующих

антител после иммунизации мышей вакцинными препаратами до хранения и через 6, 12 и 24 месяцев хранения при температуре 6 ± 2 °С (Таблица 7).

Таблица 7 - Характеристика минимальной иммунизирующей дозы для моновалентных вакцинных препаратов

Разведения вакциндо	Эффективность иммунизаций	Титр вируса,	Число копий	Титр нАТ, log ₂			
				до хранения	через 6 м	через 12м	через 24м
ВАК-ПУУ							
н/р	100,00%	5,5 ± 0,2	4×10 ⁵	8,67±0,18	8,2±0,08	5,4±0,19	4,9±0,17
1/2	100,00%	5,3 ± 0,15	1,24×10 ⁵	6,4±0,1	5,44±0,187	5±0,32	4,53±0,1
1/4	100,00%	5,05 ± 0,21	1,03×10 ⁵	5,6±0,27	5,36±0,32	4,74±0,21	4,47±0,2
1/8	100,00%	4,8 ± 0,27	6,91×10 ⁴	5,39±0,1	5,15±0,19	4,49±0,28	4,35±0,1
1/16	100,00%	4,6 ± 0,17	3,67×10 ⁴	4,9±0,1	4,77±0,18	4,4±0,15	4,1±0,08
1/32	100,00%	4,45 ± 0,22	3,55×10 ⁴	4,5±0,1	4,45±0,21	4,2±0,07	<4
1/64	100,00%	3,87 ± 0,1	7,46×10 ³	4,26±0,17	4,1±0,12	<4	<4
1/128	93,00%	3,7 ± 0,2	3,27×10 ³	<4	<4	<4	<4
1/256	78,00%	3,5 ± 0,2	3,12×10 ³	<4	<4	<4	<4
ВАК-ХТН							
н/р	100,00%	5,8± 0,19	3,06×10 ⁶	8,17±0,09	7,4±0,1	6,65±0,13	5,89±0,12
1/2	100,00%	5,63± 0,14	7,24×10 ⁵	7,35±0,1	6,78±0,19	6,1±0,1	5,57±0,16
1/4	100,00%	5,4± 0,12	2,03×10 ⁵	6,8±0,19	6,12±0,13	5,7±0,1	5,4±0,2
1/8	100,00%	5,19± 0,21	1,03×10 ⁵	5,56±0,13	5,72±0,2	5,38±0,28	5±0,12
1/16	100,00%	4,88± 0,11	9,53×10 ⁴	5,2±0,20	5,3±0,2	4,9±0,09	4,5±0,1
1/32	100,00%	4,57± 0,23	7,55×10 ⁴	5,06±0,18	4,8±0,2	4,4±0,18	4,24±0,13
1/64	100,00%	4,3± 0,3	5,46×10 ⁴	4,7±0,14	4,32±0,3	4,1±0,1	<4
1/128	85,00%	4± 0,26	2,62×10 ⁴	4,47±0,11	<4	<4	<4
1/256	78,00%	3,79± 0,2	6,39×10 ³	<4	<4	<4	<4
ВАК-СОЧ							
н/р	100,00%	5,37± 0,17	3,25×10 ⁵	6,09±0,24	6±0,3	5,83±0,1	5,3±0,14
1/2	100,00%	5,24± 0,3	1,02×10 ⁵	7±50,25	5,7±0,19	5,6±0,05	5±0,1
1/4	100,00%	5,03± 0,23	9,85×10 ⁴	5,24±0,16	5,2±0,18	5±0,14	4,53±0,16
1/8	100,00%	4,9± 0,2	6,21×10 ⁴	5,09±0,17	4,9±0,17	4,56±0,15	4,38±0,1
1/16	100,00%	4,68 ± 0,3	3,07×10 ⁴	4,57±0,2	4,4±0,2	4,2±0,15	4±0,23
1/32	100,00%	4,41 ± 0,2	2,47×10 ⁴	4,38±0,2	4,29±0,11	4±0,05	<4
1/64	100,00%	4,06± 0,3	6,56×10 ³	4,21±0,19	4±0,13	<4	<4
1/128	85,00%	3,73± 0,2	2,38×10 ³	<4	<4	<4	<4
1/256	78,00%	3,42 ± 0,3	1,13×10 ³	<4	<4	<4	<4

За МИД моновалентного вакцинного препарата, инактивированного β-пропиолактоном, принимали количество копий РНК/мл, способное вызвать выработку 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, что соответствовало разведению 1/8 исходного вакцинного материала, при котором индукция нейтрализующих антител наблюдалась у 100% мышей с титрами в диапазоне от $5,39 \pm 0,1$ до $4,4 \pm 0,1 \log_2$; РД для экспериментального препарата ВАК-ХТН составляла $9,53 \pm 0,2 \times 10^4$ РНК копий/мл, что соответствовало разведению 1/16 исходного вакцинного материала, при котором индукция нейтрализующих антител наблюдалась у 100% мышей с титрами в диапазоне от $5,2 \pm 0,2$ до $4,5 \pm 0,1 \log_2$; РД для экспериментального препарата ВАК-СОЧ составляла $6,21 \pm 0,3 \times 10^4$ РНК копий/мл, что соответствовало разведению исходного вакцинного материала 1/8, индуцирующего выработку нейтрализующих антител у 100% мышей с титрами в диапазоне от $5,09 \pm 0,2$ до $4,4 \pm 0,1 \log_2$.

В результате исследований по определению МИД наблюдали дозозависимый эффект, при котором уровень нейтрализующих антител пропорционально соответствовал количеству копий РНК/мл. При разведении вакцинного материала наблюдается умеренная положительная корреляционная зависимость ($r_s = 0,333$) количества копий РНК/мл в вакцинном препарате и титра нейтрализующих антител, выявленных в сыворотке крови мышей BALB/c (Таблица 7, Рисунок 10), также установлена высокозначимая сильная положительная корреляция между количеством копий РНК/мл и ФОЕ/мл ($r_s = 1$).

Выявленные взаимосвязи свидетельствуют о возможности прогнозирования титра нейтрализующих антител, основываясь на характеристике специфической активности вакцинного полуфабриката, на основе количества копий РНК/мл, ФОЕ/мл.

При хранении вакцинных препаратов наблюдали значимую отрицательную корреляцию ($r_s = -1$) исследуемых взаимосвязей, что можно объяснить снижением как количества копий РНК/мл, так и иммуногенной активности.

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.

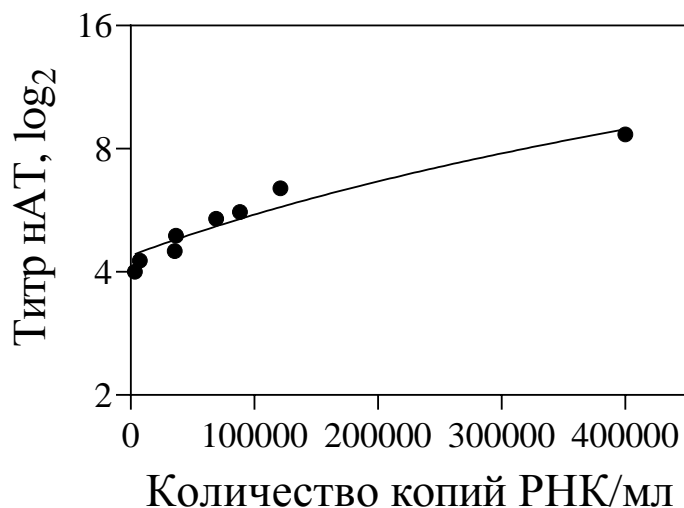


Рисунок 10 - График линейной регрессии, демонстрирующий зависимость количественного содержания количества копий РНК в вакцинном препарате и уровнем иммунного ответа.

5.2 Анализ результатов исследования иммуностимулирующей активности адьювантов различного происхождения.

Иммуностимулирующую 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 составляло $1,24 \times 10^6$ /мл. 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 (100 мкг/мл) (сферические частицы); 3 - ВАК-СЧ/150 (150 мкг/мл); 4 - ВАК-СЧ/300 (300 мкг/мл); 5 - ВАК-ТЛБ/7.5 (7.5 мкг/мл) (термолабильный энтеротоксин Б); 6 - ВАК-ТЛБ/0.2 (0.2 мкг/мл); 7 - ВАК-ЛПС (50 мкг/мл) (липополисахарид); 8 - ВАК-АЛ (1 мг/мл) (гидроксид алюминия); 9 - Контроль.

Забор сывороток крови у мышей проводили через 2 недели после 2-ой и 3-ей иммунизаций и исследовали в РН/ФОЕ₅₀. Предел отсечения при определении содержания специфических нейтрализующих антител составлял $2,32 \log_2$, что соответствовало наименьшему разведению контрольной сыворотки, не влияющего на титр вируса в контроле. Статистическую значимость различий определяли с помощью одностороннего ANOVA с тестом множественных

сравнений Тьюка: ns = несущественные различия, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,0001$.

В ответ на введение вакцинных препаратов с адьювантами в исходном и разведённом 1/2, 1/4 и 1/8 виде были выявлены нейтрализующие антитела во всех 8 экспериментальных группах иммунизированных мышей до разведения вакцинного препарата 1/8 включительно (Таблица 8, Рисунок 11). До иммунизации, а также в контрольных группах нейтрализующие антитела в сыворотках крови мышей не были выявлены.

Таблица 8 – Выявление нейтрализующих антител в сыворотках крови мышей BALB/c, иммунизированных образцами препарата ВАК, содержащими адьюванты разного происхождения

иммунизации	ВАК*	ВАК-AL	ВАК-СЧ/100	ВАК-СЧ/150	ВАК-СЧ/300	ВАК-ТЛБ/7.5	ВАК-ТЛБ/0.2	ВАК-ЛПС
в неразведенном виде								
II	8,2±0,1 ^ö	8,85 ± 0,1	7,7 ± 0,2	8,58 ± 0,3	10,3 ± 0,3	7,45 ± 0,2	9,7 ± 0,3	9,5 ± 0,2
III	8,2±0,2	8,3 ± 0,3	7,9 ± 0,21	8,73 ± 0,3	10,5 ± 0,3	7,95 ± 0,4	10,2 ± 0,3	9,9 ± 0,2
разведение 1/2								
II	7,3 ± 0,2	7,4 ± 0,32	6,8 ± 0,2	7,35 ± 0,2	9,5 ± 0,26	5,7± 0,31	9,16 ± 0,2	9,3 ± 0,2
III	7,5 ± 0,3	6,86± 0,3	7 ± 0,29	7,6 ± 0,4	9,73 ± 0,2	6,05 ± 0,2	9,9 ± 0,25	9,5 ± 0,2
разведение 1/4								
II	6,2 ± 0,2	6,32 ± 0,2	6,1 ± 0,27	6,9 ± 0,3	9 ± 0,21	5 ± 0,26	8,9 ± 0,24	9,2 ± 0,3
III	6,4 ± 0,1	5,7 ± 0,2	6,2 ± 0,24	6,6 ± 0,27	9,16 ± 0,2	5,3 ± 0,3	9,4 ± 0,28	9,5 ± 0,3
разведение 1/8								
II	6 ± 0,2	5,86 ± 0,2	5 ± 0,23	5,1 ± 0,19	8,08 ± 0,3	4,5 ± 0,2	8,08 ± 0,2	9,2 ± 0,2
III	6 ± 0,23	5 ± 0,2	5,3 ± 0,21	5,31 ± 0,27	8,9 ± 0,31	4,7 ± 0,24	8,75 ± 0,2	9,4 ± 0,3

* ВАК – вакцина на основе вируса Пуумала без адьювантов;

ö - титр нейтрализующих антител в \log_2

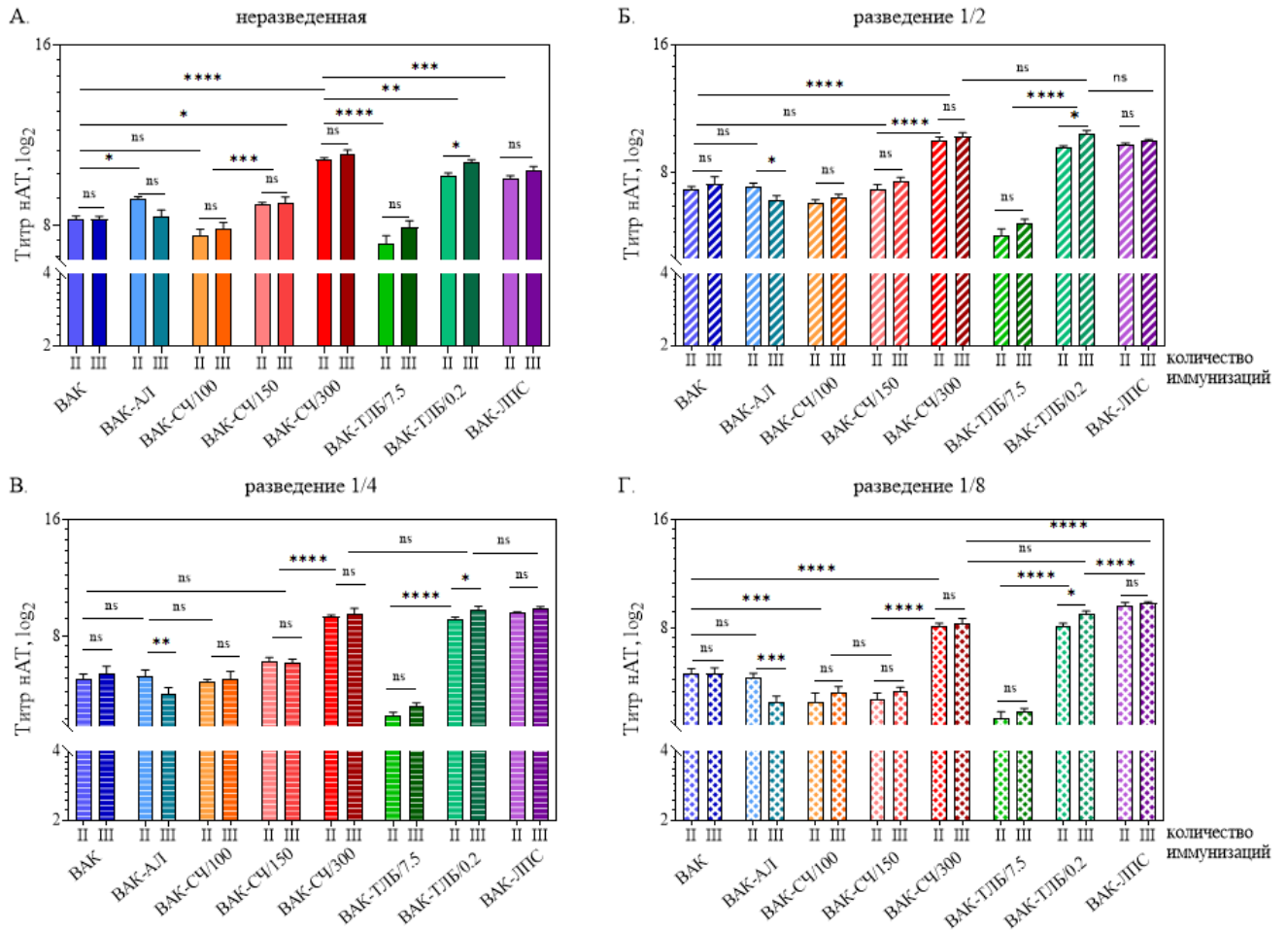


Рисунок 11 - Выявление нейтрализующих антител в сыворотках крови мышей BALB/c, иммунизированных образцами препарата ВАК, содержащими адъюванты разного происхождения

Из таблицы 8 и рисунка 11 следует, что наиболее высокие значения титров нейтрализующих антител относительно положительного контроля (ВАК без адъювантов) ($p < 0,0001$) были выявлены в результате иммунизации мышей BALB/c образцами препарата ВАК с адъювантами СЧ/300 (сферические частицы), ТЛБ/0.2 (термолабильный энтеротоксин Б) и ЛПС (липополисахарид).

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 статистически значимое ($p < 0,05$) увеличение титров нейтрализующих антител после трёх иммунизаций по сравнению с двумя.

Отмечен прямо пропорциональный дозозависимый эффект во всех группах ($p < 0,0001$), т.е. уменьшение дозы препарата приводило к снижению титра нейтрализующих антител исключая ВАК-ЛПС (Рисунок 12). Вместе с этим отмечены определенные особенности динамики нейтрализующих антител при разведении препаратов, содержащих испытываемые адъюванты.

Так, в неразведенном виде препарат, содержащий гидроксид алюминия, способствовал увеличению титра нейтрализующие антитела в сравнении с ВАК ($p < 0,01$). Однако, в последующих разведениях препарата иммуностимулирующего эффекта не определяли.

Иммунизация препаратом ВАК-ТЛБ в концентрации 7.5 мкг/дозу вызывала иммуносупрессию продуцирования нейтрализующих антител. Снижение уровня нейтрализующих антител по сравнению с таковым препарата ВАК было статистически значимо во всех разведениях препарата ВАК-ТЛБ ($p < 0,0001$).

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 адъюванта липополисахарида, в присутствии которого даже снижение концентрации иммуногена в 8 раз не вызывало статистически значимого

снижения иммуногенной активности экспериментального вакцинного препарата ВАК-ЛПС.

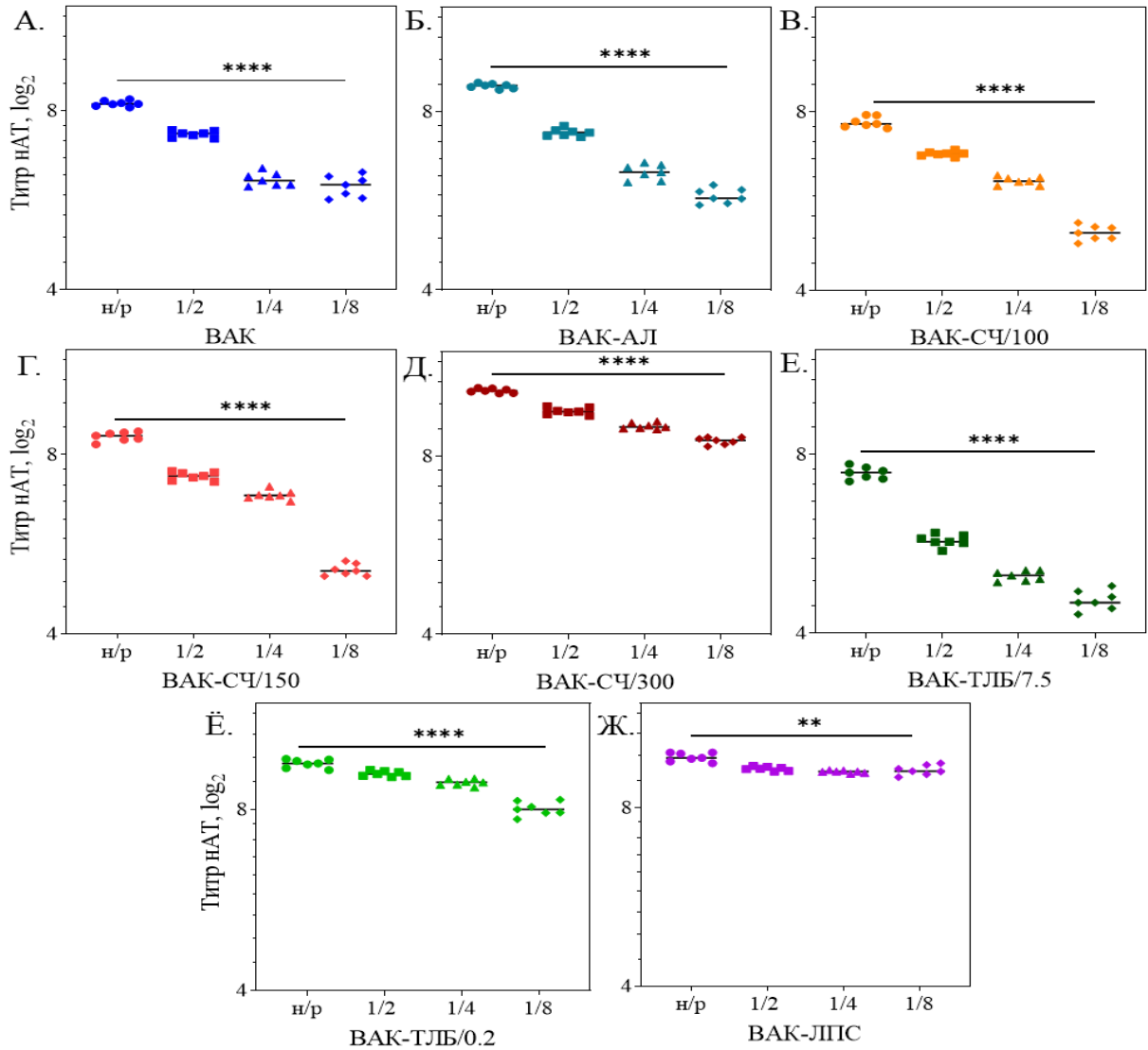


Рисунок 12 - Кинетика титров нейтрализующих антител в зависимости от разведений экспериментального вакцинного препарата ВАК.

5.3 Зависимость стабильности иммуногенной активности экспериментальных вакцинных препаратов от способов их приготовления и времени хранения

Известно, что на стабильность иммуногенной активности вакцинных препаратов могут влиять условия их 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. Уровни стабильности иммуногенной активности характеризовали по степени индукции нейтрализующих антител в ответ на иммунизацию мышей экспериментальными вакцинными препаратами, хранившимися в течение 6, 12 и 32 месяцев при температуре 6 ± 2 °С (Рисунок 13, Таблица 9).

После 2-х кратной иммунизации выше указанными экспериментальными препаратами нейтрализующие антитела были выявлены во всех случаях. В контрольных группах мышей нейтрализующие антитела не были обнаружены.

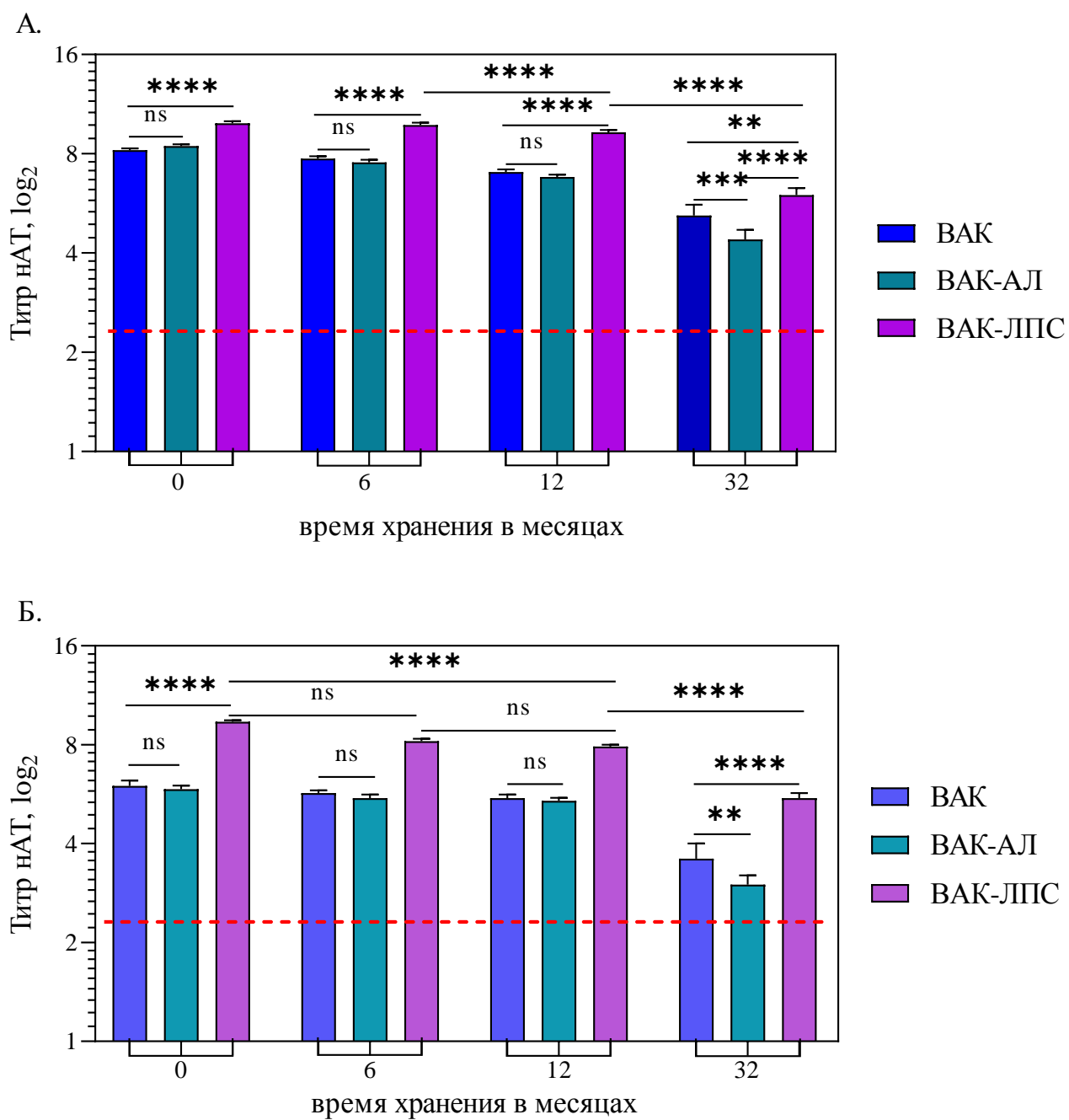


Рисунок 13 - Зависимость уровня иммуногенной активности вакцинных препаратов в зависимости от их концентрации и времени хранения: А - в неразведенном виде; Б - в разведении 1/8. Обозначения: ns = несущественные различия; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,0001$.

Таблица 9 – Зависимость иммуногенной активности вакцинных препаратов от их концентрации, кратности иммунизации и времени хранения

Вакцинные препараты	Иммунизации	0 мес	6 мес	12 мес	32 мес
ВАК		введение в неразведенном виде			
	II	8,2 ± 0,13	7,66 ± 0,2	7 ± 0,19	5,6 ± 0,27
	III	8,2 ± 0,2	7,74 ± 0,2	7,05 ± 0,2	н/и
		введение в разведение 1/8			
	II	6 ± 0,2	5,73 ± 0,2	5,41 ± 0,3	3,6 ± 0,35
	III	6 ± 0,23	5,7 ± 0,3	5,5 ± 0,2	н/и
ВАК/лио		введение в неразведенном виде			
	II	н/и	н/и	7,1 ± 0,12	5,5 ± 0,3
	III	н/и	н/и	7 ± 0,17	н/и
		введение в разведение 1/8			
	II	н/и	н/и	5,39 ± 0,2	3,5 ± 0,2
	III	н/и	н/и	5,45 ± 0,16	н/и
ВАК-AL		введение в неразведенном виде			
	II	8,85 ± 0,1	7,75 ± 0,24	7,3 ± 0,27	4,7 ± 0,26
	III	8,3 ± 0,3	7,53 ± 0,27	6,8 ± 0,3	н/и
		введение в разведение 1/8			
	II	5,86 ± 0,2	5,63 ± 0,2	5,5 ± 0,17	3 ± 0,28
	III	5 ± 0,2	5,5 ± 0,21	5,4 ± 0,27	н/и
ВАК-ЛПС		введение в неразведенном виде			
	II	9,5 ± 0,2	9,8 ± 0,36	9,2 ± 0,13	6,3 ± 0,25
	III	9,9 ± 0,2	9,78 ± 0,3	9,3 ± 0,2	н/и
		введение в разведение 1/8			
	II	9,21 ± 0,2	8,04 ± 0,2	7,76 ± 0,25	5,5 ± 0,37
	III	9,4 ± 0,3	8,2 ± 0,24	7,9 ± 0,3	н/и
ВАК-ЛПС/лио		введение в неразведенном виде			
	II	н/и	н/и	9,1 ± 0,17	5,6 ± 0,3
	III	н/и	н/и	9,2 ± 0,23	н/и
		введение в разведение 1/8			
	II	н/и	н/и	7,7 ± 0,26	4,8 ± 0,3
	III	н/и	н/и	7,99 ± 0,2	н/и

* - титр нейтрализующих антител в \log_2

**н/и – не исследовали

Данные, представленные на рисунке 12 и в таблице 9, свидетельствуют о достаточно высокой стабильности иммуногенной активности экспериментальных вакцинных препаратов, хранившихся в течение 6 и 12 месяцев при температуре 6 ± 2 °С. Вместе с тем через 32 месяца хранения и последующего введения препаратов мышам BALB/c было зарегистрировано снижение значений титров нейтрализующих антител в сыворотках крови животных. На фоне полученных результатов исследования экспериментальных вакцинных препаратов выделяются данные о наиболее высокой иммуногенной активности, индуцируемой вакцинным препаратом ВАК-ЛПС, в состав которого включён адъювант низкоэндогенный липополисахарид Ac3-S-LPS *Shigella sonnei*.

Препарат ВАК-ЛПС, хранившийся в течение 6, 12 и 32 месяцев, не терял иммуногенной активности. При этом между группами ВАК и ВАК-ЛПС разница в титрах нейтрализующих антител была более выраженной и статистически достоверной ($p < 0,001$).

Лиофилизация не влияла статистически значимо на сохранность иммуногенной активности вакцинных препаратов: в сыворотках крови мышей BALB/c наблюдали аналогичный уровень продукции нейтрализующих антител в соответствующих группах, иммунизированных препаратами, хранившимися в течение 32 месяцев как в жидкой, так и лиофилизированной формах.

При испытании стабильности вакцинных препаратов была исследована зависимость иммуногенной активности от разведения вводимых препаратов. С этой целью мыши были иммунизированы препаратами ВАК, ВАК-АЛ и ВАК-

ЛПС в неразведенном виде и в разведениях 1/4, 1/16, 1/64, 1/256. До иммунизации мышей препараты содержались в течение 32 месяцев при температуре 6 ± 2 °С.

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 1/4, для ВАК-АЛ – на препарат в неразведенном виде. 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. Титр нейтрализующих антител после двукратной иммунизации мышей препаратом ВАК-ЛПС в разведении 1/16 соответствовал такому же после иммунизации препаратом ВАК в неразведенном виде (Рисунок 14).

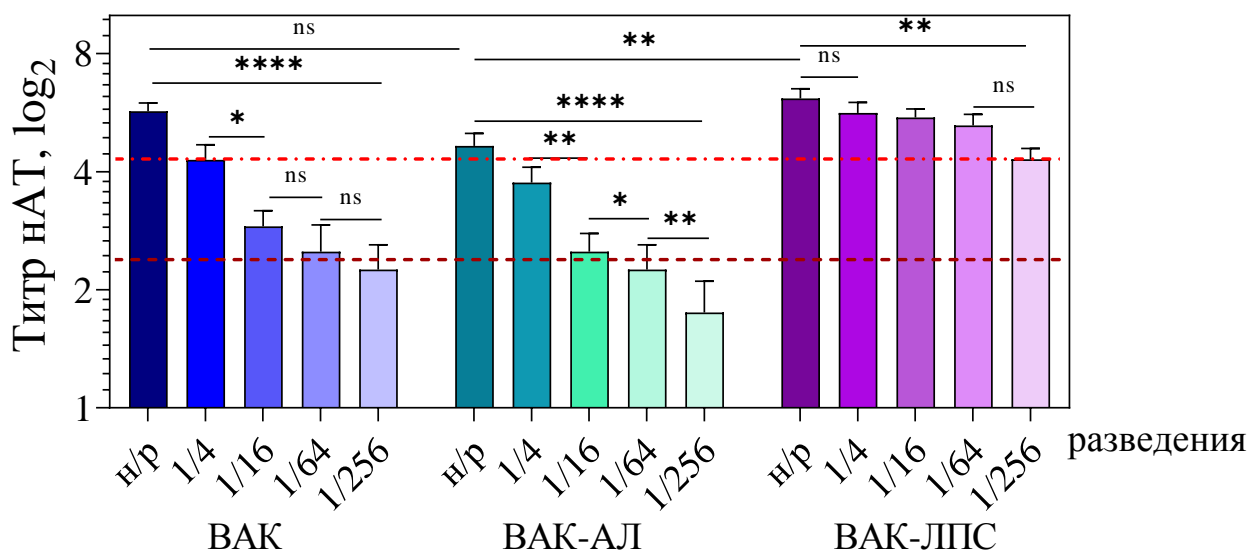


Рисунок 14 - Зависимость значений титра нейтрализующих антител от разведений

вакцинных препаратов, хранившихся 32 месяца. Обозначения: ns =

несущественные различия; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,0001$.

5.4 Иммуногенная активность поливалентных вакцинных препаратов

По результатам предыдущих исследований были отобраны два адъюванта: гидроксид алюминия (АЛ) и липополисахарид (ЛПС). Три варианта экспериментального поливалентного вакцинного препарата вводились мышам BALB/c в неразведенном виде и 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 статистически выше ($p < 0,05$) такового для препарата поли-ВАК, но после трех иммунизаций эта разница нивелировалась.

В результате иммунизации мышей BALB/c препаратом поли-ВАК-ЛПС значения титров нейтрализующих антител, выявляемых в сыворотке крови мышей к трем хантавирусам (Пуумала, Хантаан, Сочи), были статистически значимо выше, чем при введении мышам препарата поли-ВАК ($p < 0,0001$) (Рисунок 15 А, Б).

При разведении экспериментальных препаратов поли-ВАК и поли-ВАК-АЛ в 8 раз, вне зависимости от кратности иммунизации, отмечали снижение уровня нейтрализующих антител в сыворотке крови по отношению ко всем трем хантавирусам. Уровень нейтрализующих антител при иммунизации препаратом поли-ВАК-ЛПС был статистически выше, чем при иммунизации препаратами поли-ВАК и поли-ВАК-АЛ ($p < 0,0001$).

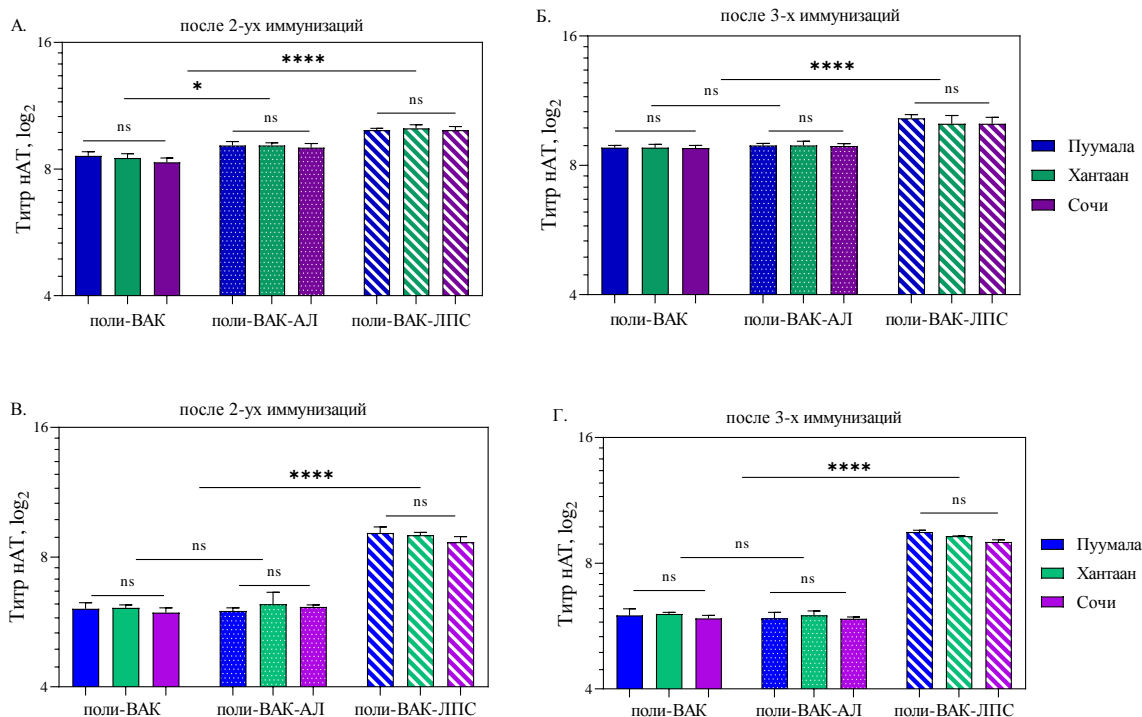


Рисунок 15 – Зависимость уровня иммуногенной активности поливалентного вакцинного препарата от адъювантов, включённых в его состав.

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. Обозначения: ns = несущественные различия;

**** $p < 0,0001$.

При двукратной иммунизации мышей BALB/c экспериментальными вакцинными препаратами поли-ВАК и поли-ВАК-АЛ, хранившимися в течение 12 месяцев при температуре 6 ± 2 °C как в неразведенном виде, так и в разведении 1/8, не было выявлено значимых различий между ними по титрам нейтрализующих антител к вирусам Пуумала, Хангаан и Сочи. Препарат поли-

ВАК-ЛПС индуцировал статистически более выраженный иммунный ответ ($p < 0,0001$) по сравнению с другими препаратами (Рисунок 16 А, Б).

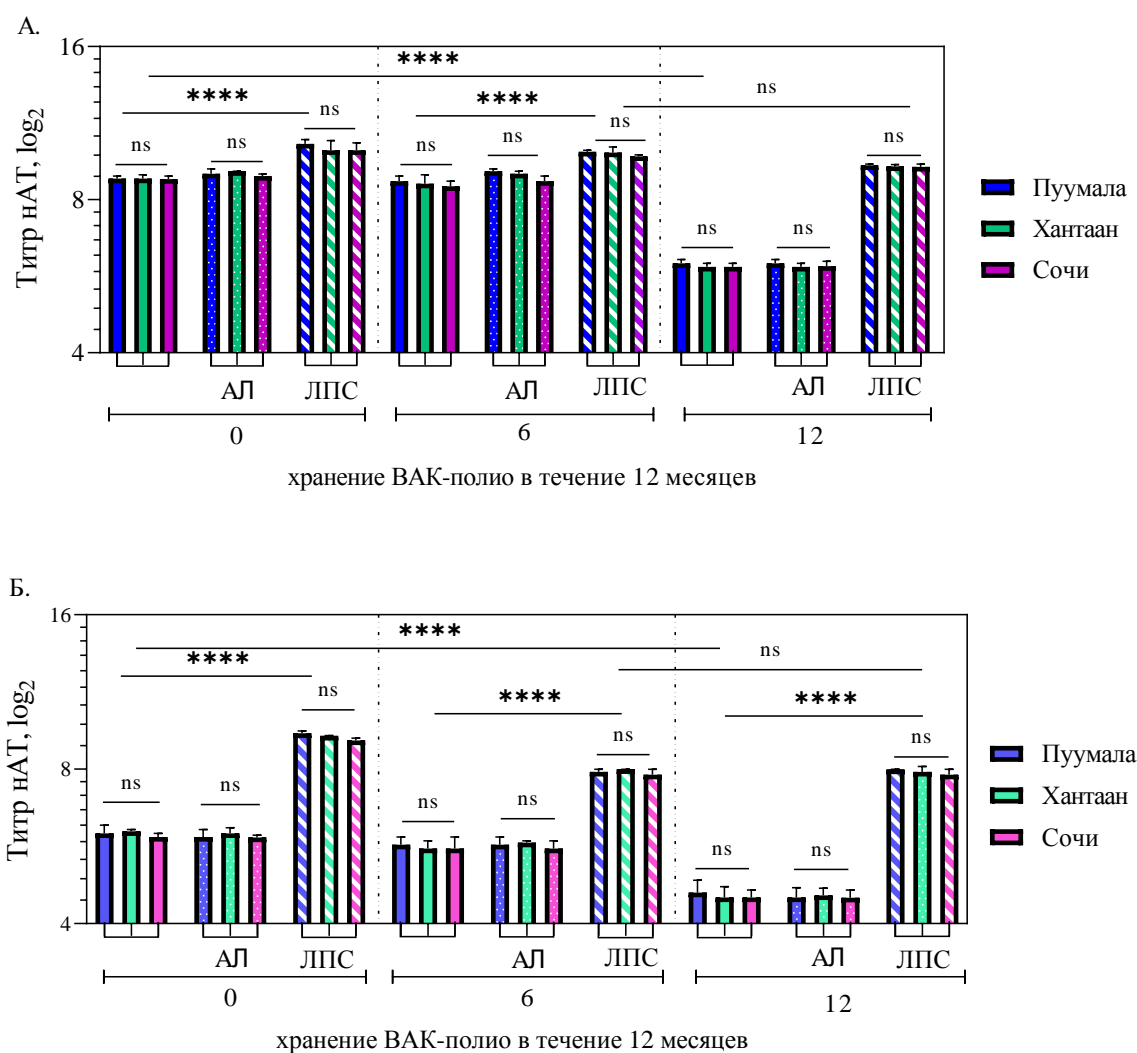


Рисунок 16 - Динамика уровня нейтрализующих антител, индуцируемых иммунизацией поливалентными вакцинными препаратами с адьювантами разного происхождения:

А - в неразведенном виде, Б - в разведении 1/8. Обозначения: ns = несущественные различия; **** $p < 0,0001$.

Глава 6 Анализ цитокинового профиля

С помощью метода ИФА определяли содержание интерлейкинов ИЛ-1 β , ИЛ-12 и ИФН- γ в сыворотках крови мышей BALB/c интактных и иммунизированных экспериментальными инактивированными вакцинными препаратами (моновалентная на основе вакцинного штамма вируса Пуумала и поливалентная на основе вакцинных штаммов вирусов Пуумала, Хантаан и Сочи). Исследования проводились совместно с к.б.н. Егоровой М. С.

За фоновый уровень был принят уровень цитокинов у интактных мышей до иммунизации.

Оценку иммуномодулирующего эффекта адьювантов определяли по содержанию цитокинов в сыворотках крови мышей после 2-х и 3-х иммунизаций. На графиках представлено количественное содержание исследуемых цитокинов после двукратной иммунизации неразведенными препаратами ВАК, ВАК-АЛ, ВАК-ЛПС, ВАК-СЧ/100, ВАК-СЧ/300, ВАК-ТЛБ/7.5, ВАК-ТЛБ/0.2 (Рисунок 16). Контрольные группы включали: К – интактные мыши; К-АЛ, К-ЛПС, К-СЧ/100, К-СЧ/300, К-ТЛБ/0.2, К-ТЛБ/7.5 (вводился адьювант в соответствующей дозе).

Статистически значимое превышение интерлейкина ИЛ-1 β ($p < 0,0001$) относительно интактных мышей определялось при введении К-СЧ/300, К-ТЛБ/0.2, К-ТЛБ/7.5 (в 1,9; 2,58 и 4,5 раз соответственно). При введении адьювантов АЛ, ЛПС и СЧ в дозе 100 мкг/мл статистически значимого превышения интерлейкина ИЛ-1 β относительно интактных мышей не было.

отмечено (Таблица 10, Рисунок 17 А), что свидетельствует об отсутствии провоспалительной реакции на эти компоненты.

Таблица 10 – Уровень цитокинов в сыворотках крови мышей BALB/c после иммунизации экспериментальными контрольными препаратами

Цитокины	Иммунизации	К	К-АЛ	К-ЛПС	К-СЧ/100	К-СЧ/300	К-ТЛБ/0.2	К-ТБ/7.5
ИЛ-1 β	II	154 \pm 8	171 \pm 13	178 \pm 14	174 \pm 17	301 \pm 15	399 \pm 7	699 \pm 24
	III	160 \pm 13	167 \pm 10	184 \pm 12	191 \pm 18	317 \pm 18	405 \pm 20	721 \pm 19
ИЛ-12	II	132 \pm 6	136 \pm 8	151 \pm 11	164 \pm 15	219 \pm 21	249 \pm 7	292 \pm 22
	III	139 \pm 6	132 \pm 10	161 \pm 12	176 \pm 12	240 \pm 18	261 \pm 9	312 \pm 18
ИНФ- γ	II	214 \pm 12	261 \pm 13	252 \pm 7	252 \pm 12	384 \pm 23	399 \pm 11	767 \pm 22
	III	242 \pm 10	243 \pm 11	260 \pm 18	267 \pm 13	410 \pm 23	412 \pm 22	789 \pm 25

Результаты представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее арифметическое, m – стандартная ошибка среднего.

В группах мышей, иммунизированных экспериментальными вакцинными препаратами с адьювантами, уровень сывороточного интерлейкина 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 17 Б). Следовательно, можно предположить, что иммунизации как препаратом ВАК (без адьювантов), так и экспериментальными препаратами с адьювантами (гидроксид алюминия, липополисахарид и сферические частицы в дозе 100 мкг/мл) не вызывают провоспалительных реакций у мышей BALB/c.

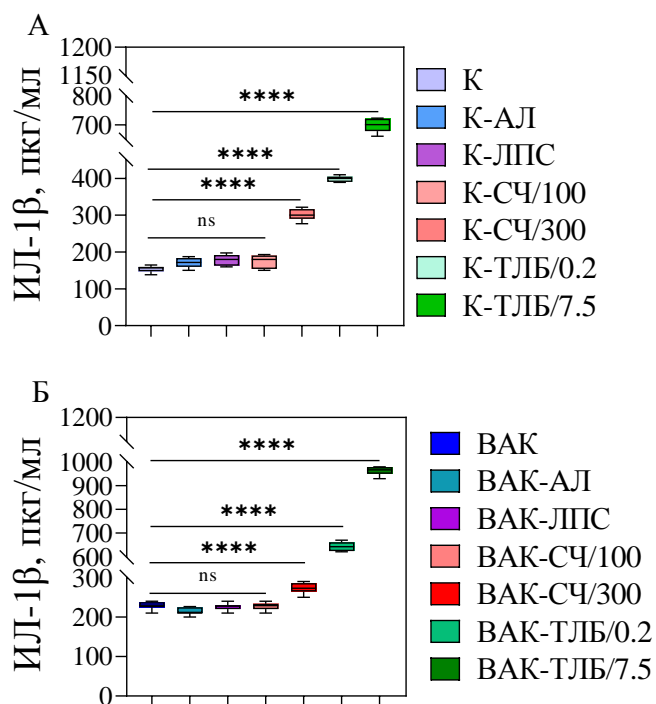


Рисунок 17 – Уровень содержания интерлейкина ИЛ-1 β в сыворотках крови мышей BALB/c.

Результаты представлены после двух иммунизаций. А - контрольные группы, Б – экспериментальные группы. Представленные данные являются совокупным результатом трех независимых экспериментов; ns = несущественные различия, **** $p < 0,0001$.

Следует отметить, что как введение только адьюванта термолабильного энтеротоксина Б мышам BALB/c в дозе 7.5 мкг/мл (ТЛБ/7.5), так и в составе экспериментального препарата ВАК-ТЛБ/7.5 сопровождалось, помимо повышения уровня провоспалительного цитокина ИЛ-1 β , токсическими проявлениями (Рисунок 18 А, Б, В). 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 (Рисунок 18 А, Б).

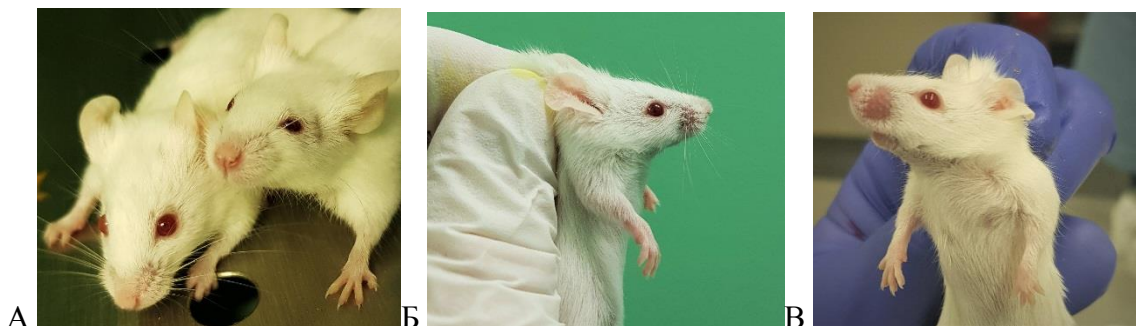


Рисунок 18 - Проявления токсичности адьюванта термолабильного энтеротоксина Б после иммунизации мышей BALB/c экспериментальной вакциной ВАК-ТЛБ/7,5. Токсический эффект наблюдался у экспериментальных животных в виде потери усов и частичного выпадения шерстного покрова. А - интактные мыши; Б - после 2-х иммунизаций; В - после 3-х иммунизаций.

Наиболее хорошо изученный цитокин ИФН- γ играет важную роль в формировании противовирусного иммунитета, активации макрофагов, врожденных и адаптивных иммунных реакциях (посредством увеличения маркеров главного комплекса гистосовместимости на клеточных поверхностях для презентации антигена), созревании Т-клеток, гуморальном и опухолевом иммунитете [283].

Уровень цитокина 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 19 А).

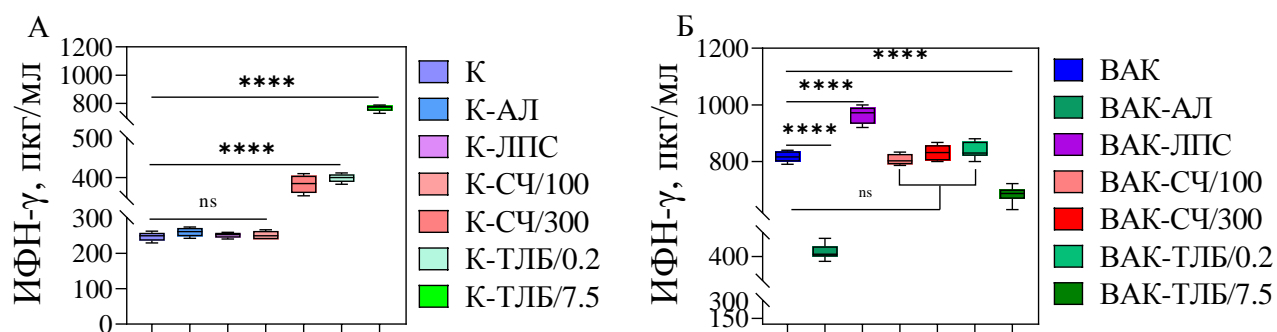


Рисунок 19 – Уровень цитокина ИФН- γ в сыворотках крови мышей BALB/c. Результаты представлены после двух иммунизаций. А - контрольные группы, Б – экспериментальные группы. Обозначения: ns = несущественные различия, **** $p < 0,0001$.

Уровень цитокина 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 19 А, Б). При этом следует подчеркнуть, что уровень цитокина в группах, включавших эти адьюванты, статистически значимо не отличался от уровня цитокина ИФН- γ в группе мышей ВАК, за исключением группы ВАК-ЛПС. Уровень ИФН- γ в этой группе был статистически выше, чем в остальных группах (Рисунок 19 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 цитокина 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 20 А).

Содержание цитокина ИЛ-12 так же, как и цитокина ИФН- γ в сыворотках крови мышей, иммунизированных экспериментальными вакцинными препаратами, значительно повышалось относительно такового у интактных мышей значимо в 5,37; 2,47; 5,35; 5,7; 5,09; 5,7 и 6,23 раза соответственно (Рисунок 20 Б). В экспериментальной группе ВАК-АЛ наблюдался наименьший подъем ИЛ-12. При этом только в группе ВАК-ЛПС уровень цитокина ИЛ-12 статистически значимо был выше, чем в остальных группах.

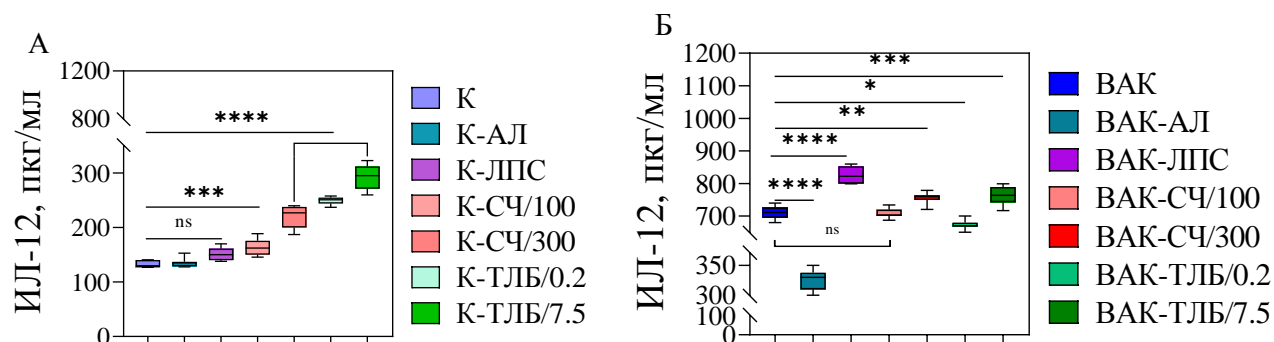


Рисунок 20 – Уровень цитокина ИЛ-12 в сыворотках крови мышей BALB/c после двух иммунизаций. А – контрольные группы, Б – экспериментальные группы.

Обозначения: ns = несущественные различия, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$,
**** $p < 0,0001$.

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

Таким образом, анализ профиля цитокинов ИЛ-12 и ИНФ- 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.

В результате исследования стабильности препаратов ВАК, ВАК-ЛПС (оба препарата в жидкой и лиофилизированной формах) и ВАК-АЛ, хранившихся при температуре 6 ± 2 °С в течение 12 месяцев, отмечали незначительное снижение уровня цитокинов (Рисунок 21, Таблица 11). Количество иммунизаций (2-кратная или 3-кратная) не влияли на уровень индукции исследуемых цитокинов.

Форма хранения вакцинных препаратов (жидкая или лиофилизированная) не повлияла на количественное содержание цитокинов ИЛ-1 β , ИНФ- γ и ИЛ-12 в экспериментальных группах ВАК, ВАК-ЛПС.

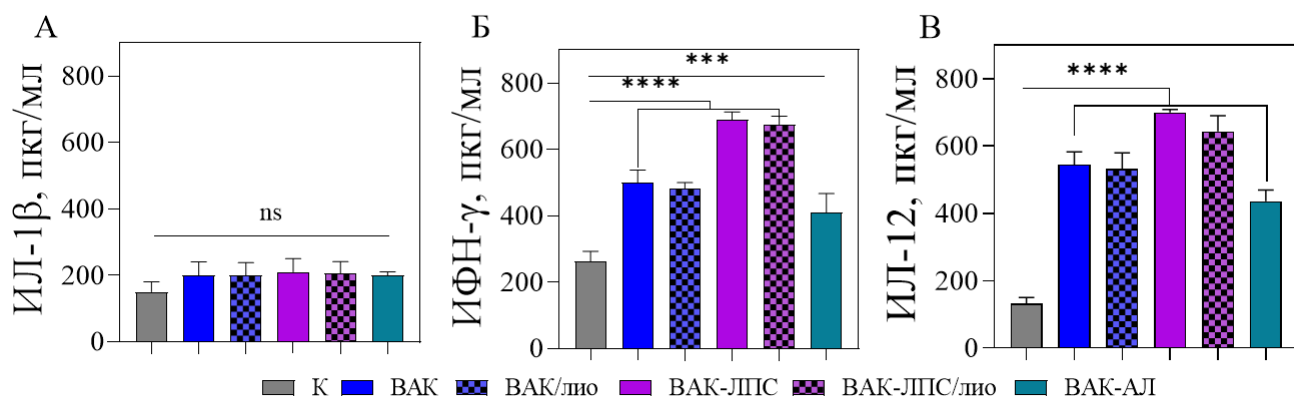


Рисунок 21 – Уровень цитокинов в сыворотке крови мышей BALB/c после двух иммунизаций. Препараты хранились в течение 12 месяцев при температуре 6 ± 2 °C. Обозначения: ns = несущественные различия, *** $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$.

Таблица 11 – Уровень цитокинов в сыворотках крови мышей BALB/c после иммунизации экспериментальным вакцинным препаратом на основе вакцинного штамма вируса Пуумала через 12 месяцев хранения при температуре 6 ± 2 °C.

Разведение	Цитокины	Иммунизации	BAK	BAK-AL	BAK-ЛПС	BAK/лио	BAK-ЛПС/лио
н/р	ИЛ-1β	II	200,4±21	172,5±22	210,3±27	200,5±22	205,2±24
		III	212,4±27	191,5±28	226,5±22	213,5±25	210,4±33
	ИЛ-12	II	542,7±31	436±27	695,3±30	537,4±28	685,4±23
		III	570,8±21	421,1±23	715,4±29	548,7±33	697,5±26
	ИНФ-γ	II	502,6±28	422±58	700±35	470,4±30	674,2±28
		III	553,2±27	430±36	699,4±30	486,5±24	670,4±36
1/8	ИЛ-1β	II	110,7±26	110±24	120±23	110±20	110,6±22
		III	176,8±27	125,3±28	153,2±30	152,3±22	160,2±21
	ИЛ-12	II	326,2±27	218,7±24	577,9±23	301,7±30	521,9±23
		III	354,3±26	242,6±23	622,3±21	332,5±27	529,2±37
	ИНФ-γ	II	317,6±20	211,5±23	511,5±25	300±24	411,8±29
		III	354,7±21	233,2±37	553,1±30	330,5±28	473,8±31

*Результаты представлены в виде $M \pm m$, где M – Среднее арифметическое, m – стандартная ошибка среднего.

При иммунизации мышей BALB/c поливалентными экспериментальными препаратами наблюдалась индукция ИЛ-12 и ИФН- γ в экспериментальных группах относительно интактных мышей на статистически достоверном уровне ($p < 0,0001$). Количество иммунизаций не повлияло на индукцию цитокинов (Таблица 12).

В группах поли-ВАК, поли-ВАК-АЛ и поли-ВАК-ЛПС уровень ИЛ-1 β независимо от разведения и количеств иммунизаций статистически значимо не отличался относительно интактных мышей.

Таблица 12 – Уровень цитокинов в сыворотках крови мышей BALB/c после иммунизации поливалентными экспериментальными препаратами через 12 месяцев хранения при температуре 6 ± 2 °С.

Разведения	Цитокины	Иммунизации	поли-ВАК	поли-ВАК-АЛ	поли-ВАК-ЛПС
н/р	ИЛ-1 β	II	217,8 \pm 30*	206,4 \pm 28	216,4 \pm 25
		III	230,5 \pm 31	223,6 \pm 25	235,3 \pm 30
	ИЛ-12	II	753,5 \pm 30	629,4 \pm 28	891,4 \pm 26
		III	790,5 \pm 28	669,6 \pm 25	896,5 \pm 27
	ИФН- γ	II	712,9 \pm 28	631,6 \pm 28	757,8 \pm 29
		III	729,7 \pm 31	677,4 \pm 28	798,7 \pm 31
1/8	ИЛ-1 β	II	139,1 \pm 23	125,7 \pm 29	126,6 \pm 22
		III	177,8 \pm 26	153,8 \pm 30	163,6 \pm 28
	ИЛ-12	II	522,6 \pm 27	422,8 \pm 24	622,8 \pm 28
		III	543,7 \pm 28	440,7 \pm 30	683,5 \pm 24
	ИФН- γ	II	510,9 \pm 31	476,2 \pm 28	603,8 \pm 24
		III	544,7 \pm 27	500,6 \pm 24	647,5 \pm 31

*Результаты представлены в виде $M \pm m$, где M – Среднее арифметическое, m – стандартная ошибка среднего.

Стоит отметить, что уровень цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-12 и ИФН- γ в сыворотках крови мышей BALB/c после двукратной иммунизации не имел

статистически значимых различий в зависимости от способа инактивации вакцинного препарата (Таблица 13).

Таблица 13 – Содержание цитокинов в сыворотках крови мышей BALB/c, иммунизированных вакцинами, инактивированными разными способами

Цитокины		ИЛ-1 β	ИЛ-12	ИНФ- γ
ВАК-ПУУ	Формальдегид	220 \pm 55*	836 \pm 48	785 \pm 29
	β -пропиолактон	224 \pm 32	879 \pm 20	821 \pm 22
	УФ-излучение	201 \pm 33	817 \pm 38	790 \pm 40
	Перекись водорода	198 \pm 42	861 \pm 29	800 \pm 44
ВАК-Сочи	Формальдегид	172 \pm 33	823 \pm 31	800 \pm 25
	β -пропиолактон	185 \pm 41	842 \pm 34	797 \pm 34
	УФ-излучение	163 \pm 35	800 \pm 27	769 \pm 27
	Перекись водорода	171 \pm 44	803 \pm 36	784 \pm 29
ВАК-ХТН	Формальдегид	205 \pm 40	819 \pm 20	800 \pm 40
	β -пропиолактон	230 \pm 48	837 \pm 29	817 \pm 34
	УФ-излучение	200 \pm 29	809 \pm 30	804 \pm 31
	Перекись водорода	197 \pm 40	822 \pm 33	811 \pm 42

*Результаты представлены в виде $M \pm m$, где M – Среднее арифметическое, m – стандартная ошибка среднего.

В целом анализ цитокинового профиля у мышей BALB/c показал, что независимо от добавления к хантавирусным вакцинным препаратам испытываемых адъювантов разного происхождения происходит активация эффекторов иммунной системы. Активация иммунного ответа на введение экспериментальных вакцинных препаратов приводит, в частности, к индукции синтеза регуляторных цитокинов ИЛ-12 и ИНФ- γ , наиболее выраженная в присутствии адъюванта липополисахарида, что является показателем поляризации иммунного ответа по типу Тх-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 примерно в 10 раз 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 адьюванта 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 адьювантов, 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 Th1 (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 (Hiseh 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 низкоэндогенного 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 °С титры нейтрализующих антител снижались после иммунизации как нативными препаратами, так и препаратами с добавлением гидроксида алюминия. В то же время при иммунизации препаратами с добавлением низкоэндогенного липополисахарида Ас3-S-LPS отмечали более высокую стабильность их иммуногенной активности, уровень которой не зависел от жидкой или лиофилизированной форм 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 неконцерогенных 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 °C 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 СОКРАЩЕНИЙ

АЛ – гидроксид алюминия

АПК – антиген-презентирующие клетки

β-ПЛ - β-пропиолактон

Вакцина против ГЛПС – прототип вакцины или вакцинный препарат, созданный на основе вакцинных штаммов по описанной ранее технологии

ГЛПС – геморрагическая лихорадка с почечным синдромом

ГЛПС-ПУУ – ГЛПС вызванная вирусом Пуумала

ГЛПС-Куркино - ГЛПС вызванная вирусом Куркино

ГЛПС-Сочи – ГЛПС вызванная вирусом Сочи

ДК – дендритные клетки

пДК – плазмоцитоидные дендритные клетки

мДК – миелоидные дендритные клетки

ИЛ – интерлейкин

ИНФ - интерферон

ИФА – иммуноферментный анализ

КЖ - вирусосодержащая культуральная жидкость

ЛПС - липополисахарид

нАТ- нейтрализующие антитела

мАТ – моноклональные антитела

МФА – метод флюоресцирующих антител

МНС – главный комплекс гистосовместимости

мРНК - информационная РНК

МПЛ – монофосфорил липид А

МИД - минимальная иммунизирующая доза

ОП – оптическая плотность

ПУУ – вирус Пуумала

РД - рабочая иммунизирующая доза

РН – реакция нейтрализации

РНК – рибонуклеиновая кислота

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени

СЕУ – Сеул вирус

СГТ – средний геометрический титр

СЧ – сферические частицы

ТНФ- α - фактор некроза опухолей альфа

ТЛБ – термолабильный белок

ТС – телячья сыворотка

ТФР - тромбоцитарный фактор роста

Тх - Т-лимфоциты, активирующие специфический иммунный ответ (Тх1, Тх2, Тх17)

фТх - фолликулярные Т хелперы

рТх - регуляторные Т хелперы

ФОЕ – фокусобразующие единицы

Хантавирусные вакцины – вакцины против хантавирусных инфекций (ГЛПС, ХПС)

ХТН – вирус Хантаан

ХПС – хантавирусный пульмональный синдром

CARD9 (Caspase recruitment domain-containing protein 9) - домен, рекрутирующий каспазу

CTL (cytolytic T lymphocyte) - цитотоксические Т-клетки

CLR (C-type lectin receptor) - рецепторы лектина С-типа

CD4+ - антигенный маркер хелперных Т-лимфоцитов

CD8+ - антигенный маркер супрессорных и цитотоксических Т-лимфоцитов

DAF/CD55 (Decay-accelerating-factor) - фактор, ускоряющим распад

ER-Golgi - мембранная структура эукариотической клетки

GPC - предшественник гликопротеина Gn, Gc

Gn и Gc - оболочечные гликопротеины хантавирусов

N - нуклеокапсидный белок

PAMP (pathogen-associated molecular pattern) - связанный с патоген-ассоциированными молекулярными паттернами

Parkin-PINK1 (PTEN-induced kinase 1) - белок, кодируемый одноименным геном и обладающий убиквитин-протеинлигазной активностью

RdRp (viral RNA-dependent RNA polymerase) - РНК-зависимая РНК-полимераза

PRR (pattern recognition receptor) - рецепторов распознавания образов

RIG-I (retinoic acid-inducible gene 1) – рецепторы, ретиноевой кислоты I

RLR - тип внутриклеточных рецепторов опознавания паттерна, участвующих в распознавании вирусов системой врождённого иммунитета

HLA (human leukocyte antigen) - (человеческий лейкоцитарный антиген) – группа антигенов главного комплекса гистосовместимости

LC-3B (autophagy protein LC3) - специфичный для аутофагии белок LC3

MAVS (mitochondrial antiviral signaling protein) - митохондриальный противовирусный сигнальный белок

MyD88 (Myeloid differentiation primary response gene (88)) - белок 88 первичного ответа миелоидной дифференцировки

NF-κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) - рецептор активатор фактора транскрипции каппа Б

NK-cells (клетки киллеры) – цитотоксические лимфоциты врожденной системы иммунитета

NLR (Nod-like-receptor) - класс цитоплазматических рецепторов, относящихся к т. н. образ-распознающим рецепторам PRR (NOD1, NOD2)

NLRP3 (cryopyrin) - криопирин

SNARE 29 (synaptosomal-associated protein 29) - синаптосомально-ассоциированный белок 29

TLR (Toll-like receptor) - Toll-подобные рецепторы

TRIF (TIR domain-containing adaptor inducing interferon-beta) - внутриклеточный адаптерный белок, относится к группе TIR домен-содержащих белков, участвующих в передаче сигнала от TLR

TUFM (mitochondrial elongation factor TUFM) - митохондриальный коэффициент удлинения трансляции Tu

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лещинская, Е. В. К вопросу о клинике геморрагической лихорадки с почечным синдромом в Тульской области / Е. В. Лещинская // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1960. - № 9. – С. 134-138.
2. Сиротин, Б. З. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом / Б. З. Сиротин, Ю. А. Клебанов // Ленинград: Изд-во Медицина, 1987. – 112 с.
3. Рощупкин, В. И. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом / В. И. Рощупкин, А. А. Суздальцев // Саратов: Изд-во Саратовского университета, Куйбышевский филиал, 1990. - 102 с.
4. Tkachenko, E. A. Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome: current status in Russia / Evgeniy A. Tkachenko, Aydar A. Ishmukhametov, Tamara K. Dzagurova [et al.]. // Emerging infectious diseases. – 2019. – Vol. 25. - № 12. - P. 2325 – 2328.
5. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Инфекционная заболеваемость в Российской Федерации : официальный сайт. – Москва. – Обновляется каждый месяц. - URL: <https://www.rospotrebnadzor.ru/activities/statistical-materials/> (дата обращения 15.04.2020).
6. Ткаченко, Е. А. Разработка экспериментально-промышленной технологии производства вакцины для профилактики геморрагической лихорадки с почечным синдромом / Е. А. Ткаченко, А. А. Ишмухаметов, Т. К. Дзагурова

- [и др.]. // Ремедиум. Журнал о российском рынке лекарств и медицинской технике. – 2015. – №. 6. – С. 47-53.
7. Ткаченко, Е. А. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом в России: успехи и актуальные проблемы на современном этапе / Е. А. Ткаченко, Т. К. Дзагурова, А. Д. Бернштейн [и др.]. // Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом: эпидемиология, профилактика и диагностика на современном этапе. – 2019. – С. 117-124.
 8. Дзагурова, Т. К. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом: этиология, специфическая лабораторная диагностика, разработка диагностических и вакцинных препаратов: специальность 03.02.02 вирусология: диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук / Т. К. Дзагурова; Ин-т полиомиелита и вирус. энцефалитов им. М. П. Чумакова РАМН. - Москва, 2014. – 235 с.
 9. Song, G. Preliminary human trial of inactivated golden hamster kidney cell vaccine against HFRS / G. Song, Y. C. Huang, C. S. Hang // Vaccine. - 1992. - № 10. – P. 214–216.
 10. Choi, Y. Inactivated Hantaan virus vaccine derived from suspension culture of Vero cells / Y. Choi, C. J. Ahn, K. M. Seong [et al.]. // Vaccine. - 2003. - № 21. – P. 1867–1873.
 11. Kim, R. J. The special prevention of HFRS in P.D.R of Korea. / R. J. Kim, C. Ru, G. M. Kim // Chin Clin Exp Virol. - 1991. - № 4. – P. 487–492.
 12. Schmaljohn, C. S. Vaccines for hantaviruses: progress and issues / C. S. Schmaljohn // Expert Rev Vaccines. - 2012. - Vol. 11. - № 5. – P. 511–513.

13. Чупрунова, С. В. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом: учебное пособие / С. В. Чупрунова, Е. С. Алешковская, Л. Е. Галицина [и др.], под редакцией проф. И. Г. Ситникова; Ярославль, ЯГМУ, 2015. – 59 с.
14. Astakhova, T. The elaboration of inactivated vaccine against HFRS / T. Astakhova, R. Slonova, L. Minscaya [et al.]. // Abstr. of 3rd Int. Conference on HFRS and Hantaviruses. Helsinki, Finland. – 1995. - P.62.
15. Lee, H. W. Vaccines against HFRS / H.W. Lee, Y. K. Chu, Y. D. Woo [et al.]. // Elsevier. – 1999. - P. 147-156.
16. Ткаченко, Е. А. Разработка экспериментальной вакцины против геморрагической лихорадки с почечным синдромом / Е. А. Ткаченко, Т. К. Дзагурова, П. А. Набатников [и др.]. // Медицинская вирусология. – 2009. - Том XXVI - С. 194-196.
17. Бархалёва, О. А. Вакцина против геморрагической лихорадки с почечным синдромом / О. А. Бархалёва, М. С. Воробьёва, И. П. Ладыженская [и др.]. // Биопрепараты. – 2011. - № 1. - С. 27-30.
18. Дзагурова, Т. К. Разработка технологии изготовления и методов контроля вакцины ГЛПС / Т. К. Дзагурова, А. А. Синюгина, С. С. Курашова [и др.]. // Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современная иммунопрофилактика: вызовы, возможности, перспективы». Москва. - 2019. - С. 15.
19. Dzagurova, T. K. Pre-Clinical Studies of Inactivated Polyvalent HFRS Vaccine / Tamara K. Dzagurova, Alexandra A. Siniugina, Aidar A. Ishmukhametov [et al.]. // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. - 2020. – Vol. 10.

20. Hjelle, B. Vaccines against hantaviruses / B. Hjelle // *Expert Rev Vaccines*. - 2002. – № 1. – P. 373–384.
21. Cho, H.W. Review of an inactivated vaccine against hantaviruses / H. W. Cho, C. R. Howard, H. W. Lee // *Intervirology*. - 2002. - № 45. – P. 328–333.
22. Синюгина, А. А. Вакцины для профилактики хантавирусных лихорадок / А. А. Синюгина, А. А. Ишмухаметов, Т. К. Дзагурова, [и др.]. // *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика*. – 2019. –Т. 18. - № 5. - С. 98-108.
23. Vaheri, A. Uncovering the mysteries of hantavirus infections / A. Vaheri, T. Strandin, J. Neponjoki [et al.]. // *Nature Reviews Microbiology*. – 2013. – Vol. 11. – № 8. – P. 539.
24. Nichol, S. T. Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness / S. T. Nichol, C. F. Spiropoulou, S. Morzunov [et al.]. // *Science*. – 1993. – Vol. 262. – № 5135. – P. 914-917.
25. Heyman, P. Hantavirus infections in Europe: from virus carriers to a major public-health problem / P. Heyman, A. Vaheri, Å. Lundkvist [et al.]. // *Expert review of anti-infective therapy*. – 2009. – Vol. 7. – № 2. – P. 205-217.
26. MacNeil, A. Hantavirus pulmonary syndrome / A. MacNeil, S. T. Nichol, C. F. Spiropoulou // *Virus research*. – 2011. – Vol. 162. – № 1-2. – P. 138-147.
27. Adams, M. J. Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses / M. J. Adams, E. J. Lefkowitz, A. M. King [et al.]. // *Archives of virology*. – 2017. – Vol. 162. – № 8. – P. 2505-2538.

28. Maes, P. Taxonomy of the family Arenaviridae and the order Bunyavirales: update 2018 / P. Maes, S. V. Alkhovsky, Y. Bào [et al.]. // Archives of virology. – 2018. – Vol. 163. – № 8. – P. 2295-2310.
29. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) : официальный сайт. – Обновляется в течение суток. - URL: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (дата обращения 20.04.2020).
30. Nuzum, E. O. Aerosol transmission of Hantaan and related viruses to laboratory rats / E. O. Nuzum, C. A. Rossi, E. H. Stephenson [et al.]. // The American journal of tropical medicine and hygiene. – 1988. – Vol. 38. – № 3. – P. 636-640.
31. Jiang, J. F. Soochong virus and Amur virus might be the same entities of hantavirus / J. F. Jiang, W. Y. Zhang, X. M. Wu [et al.]. // Journal of medical virology. – 2007. – Vol. 79. – № 11. – P. 1792-1795.
32. Klempa B. Central European Dobrava hantavirus isolate from a striped field mouse (*Apodemus agrarius*) / B. Klempa, M. Stanko, M. Labuda [et al.]. // Journal of clinical microbiology. – 2005. – Vol. 43. – № 6. – P. 2756-2763.
33. Klempa, B. Hemorrhagic fever with renal syndrome caused by 2 lineages of Dobrava hantavirus, Russia / B. Klempa, E. A. Tkachenko, T. K. Dzagurova [et al.]. // Emerging infectious diseases. – 2008. – Vol. 14. – № 4. – P. 617.
34. Klingström, J. Dobrava, but not Saaremaa, hantavirus is lethal and induces nitric oxide production in suckling mice / J. Klingström, J. Hardestam, Å Lundkvist // Microbes and infection. – 2006. – Vol. 8. – № 3. – P. 728-737.
35. Plyusnin, A. Dobrava hantavirus in Russia / A. Plyusnin, K. Nemirov, N. Apekina [et al.]. // The Lancet. – 1999. – Vol. 353. – № 9148. – P. 207.

36. Jonsson, C. B. A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease / C. B. Jonsson, L. T. M. Figueiredo, O. Vapalahti // *Clinical microbiology reviews*. – 2010. – Vol. 23. – № 2. – P. 412-441.
37. Figueiredo, L. T. M. Hantaviruses and cardiopulmonary syndrome in South America / L. T. M. Figueiredo, W. M. de Souza, M. Ferrés [et al.]. // *Virus research*. – 2014. – Vol. 187. – P. 43-54.
38. Ткаченко, Е. А. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (история, проблемы и перспективы изучения) / Е. А. Ткаченко, Т. К. Дзагурова, А. Д. Бернштейн [et al.]. // *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. – 2016. – Т. 15. – № 3 (88). – С. 23-34.
39. Krüger, D. H. Hantavirus infections and their prevention / D. H. Krüger, R. Ulrich, Å. Lundkvist // *Microbes and infection*. – 2001. – Vol. 3. – № 13. – P. 1129-1144.
40. Plyusnin, A. Virus evolution and genetic diversity of hantaviruses and their rodent hosts / A. Plyusnin, S. P. Morzunov // *Hantaviruses*. – Springer, Berlin, Heidelberg. 2001. – P. 47-75.
41. Ткаченко, Е. А. История изучения этиологии геморрагической лихорадки с почечным синдромом / Е. А. Ткаченко, А. А. Ишмухаметов // *Медицинский совет*. – 2017. – № 4. – С. 86-92.
42. Clement, J. The hantaviruses of Europe: from the bedside to the bench / J. Clement, P. Heyman, P. McKenna [et al.]. // *Emerging Infectious Diseases*. – 1997. – Vol. 3. – № 2. – P. 205.

43. Golovljova, I. Puumala and Dobrava hantaviruses causing hemorrhagic fever with renal syndrome in Estonia / I. Golovljova, V. Vasilenko, T. Prükk [et al.]. // *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. – 2000. – Vol. 19. – № 12. – P. 968-969.
44. Bi, Z. Hantavirus infection: a review and global update / Z. Bi, P. B. H. Formenty, C. E. Roth // *The Journal of Infection in Developing Countries*. – 2008. – Vol. 2. – № 01. – P. 003-023.
45. Морозов, В. Г. Клинические особенности геморрагической лихорадки с почечным синдромом в России / В. Г. Морозов, А. А. Ишмухаметов, Т. К. Дзагурова, Е. А. Ткаченко // *Медицинский совет*. – 2017. – № 5. – С. 156-161.
46. Martin, M. L. Distinction between Bunyaviridae genera by surface structure and comparison with Hantaan virus using negative stain electron microscopy / M. L. Martin, H. Lindsey-Regnery, D. R. Sasso [et al.]. // *Archives of virology*. – 1985. – Vol. 86. – № 1-2. – P. 17-28.
47. Parvate, A. Diverse Morphology and Structural Features of Old and New World Hantaviruses / A. Parvate, E. P. Williams, M. K. Taylor [et al.]. // *Viruses*. – 2019. – Vol. 11. - № 9. - P. 862.
48. Battisti, A. J. Structural studies of Hantaan virus / A. J. Battisti, Y. K. Chu, P. R. Chipman [et al.]. // *Journal of virology*. – 2011. – Vol. 85. – № 2. – P. 835-841.
49. Schamlljohn, C. S. Bunyaviridae: the viruses and their replication / C. S. Schamlljohn, S. T. Nichol; *Fields Virology*. - Philadelphia : Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, – 5th Ed. 2007. - Vol. 2. - P. 1741-1789.

50. Hepojoki, J. Hantavirus structure–molecular interactions behind the scene / J. Hepojoki, T. Strandin, H. Lankinen, A. Vaheri // *Journal of General Virology*. – 2012. – Vol. 93. – № 8. – P. 1631-1644.
51. Guardado-Calvo, P. The envelope proteins of the Bunyavirales / P. Guardado-Calvo, F. A. Rey // *Advances in virus research*. – Academic Press. - 2017. – Vol. 98. – P. 83-118.
52. Hjelle, B. Hantaviruses: clinical, microbiologic, and epidemiologic aspects / B. Hjelle, S. A. Jenison, D. E. Goade [et al.]. // *Critical reviews in clinical laboratory sciences*. – 1995. – Vol. 32. – № 5-6. – P. 469-508.
53. Gavrilovskaya, I. N. Cellular entry of hantaviruses which cause hemorrhagic fever with renal syndrome is mediated by $\beta 3$ integrins / I. N. Gavrilovskaya, E. J. Brown, M. H. Ginsberg, E. R. Mackow // *Journal of virology*. – 1999. – Vol. 73. – № 5. – P. 3951-3959.
54. Boehlke, C. Hantavirus infection with severe proteinuria and podocyte foot-process effacement / C. Boehlke, B. Hartleben, T. B. Huber [et al.]. // *American Journal of Kidney Diseases*. – 2014. – Vol. 64. – № 3. – P. 452-456.
55. Markotić, A. et al. Pathogenic hantaviruses elicit different immunoreactions in THP-1 cells and primary monocytes and induce differentiation of human monocytes to dendritic-like cells / A. Markotić, L. Hensley, K. Daddario [et al.]. // *Collegium antropologicum*. – 2007. – Vol. 31. – №. 4 – P. 1159-1167.
56. Krautkrämer, E. Pathogenic old world hantaviruses infect renal glomerular and tubular cells and induce disassembling of cell-to-cell contacts / E. Krautkrämer,

- S. Grouls, N. Stein [et al.]. // *Journal of virology*. – 2011. – Vol. 85. – № 19. – P. 9811-9823.
57. Taylor, S. L. Inhibition of TNF- α induced Activation of NF- κ B by Hantavirus Nucleocapsid Proteins / S. L. Taylor, R. L. Krempel, C. S. Schmaljohn // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2009. – Vol. 1171. – P. E86-E93.
58. Ramanathan, H. N. Dynein-dependent transport of the hantaan virus nucleocapsid protein to the endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment / H. N. Ramanathan, D. H. Chung, S. J. Plane [et al.]. // *Journal of virology*. – 2007. – Vol. 81. – № 16. – P. 8634-8647.
59. Schmauohn, C. S. Hantaan virus mRNA: coding strategy, nucleotide sequence, and gene order / C. S. Schmauohn, A. L. Schmauohn, J. M. Dalrymple // *Virology*. – 1987. – Vol. 157. – № 1. – P. 31-39.
60. Löber, C. The Hantaan virus glycoprotein precursor is cleaved at the conserved pentapeptide WAASA / C. Löber, B. Anheier, S. Lindow [et al.]. // *Virology*. – 2001. – Vol. 289. – № 2. – P. 224-229.
61. Arikawa, J. Protective role of antigenic sites on the envelope protein of Hantaan virus defined by monoclonal antibodies / J. Arikawa, J. S. Yao, K. Yoshimatsu [et al.]. // *Archives of virology*. – 1992. – Vol. 126. – № 1-4. – P. 271-281.
62. Dantas, Jr J. R. Characterization of glycoproteins of viruses causing hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) using monoclonal antibodies / J. R. Dantas Jr, Y. Okuno, H. Asada [et al.]. // *Virology*. – 1986. – Vol. 151. – № 2. – P. 379-384.

63. Tsai, T. F. Hemagglutination-inhibiting antibody in hemorrhagic fever with renal syndrome / T. F. Tsai, Y. W. Tang, S. L. Hu [et al.]. // *Journal of Infectious Diseases*. – 1984. – Vol. 150. – № 6. – P. 895-898.
64. Jin, M. Hantaan virus enters cells by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis / M. Jin, J. Park, S. Lee [et al.]. // *Virology*. – 2002. – Vol. 294. – № 1. – P. 60-69.
65. Schmaljohn, C. S. Antigenic subunits of Hantaan virus expressed by baculovirus and vaccinia virus recombinants / C. S. Schmaljohn, Y. K. Chu, A. L. Schmaljohn, J. M. Dalrymple // *Journal of Virology*. – 1990. – Vol. 64. – № 7. – P. 3162-3170.
66. de Carvalho Nicacio, C. Immunoglobulin A responses to Puumala hantavirus / C. de Carvalho Nicacio, E. Björling, A. Lundkvist // *Journal of general virology*. – 2000. – Vol. 81. – № 6. – P. 1453-1461.
67. Liang, M. Generation of an HFRS patient-derived neutralizing recombinant antibody to Hantaan virus G1 protein and definition of the neutralizing domain / M. Liang, M. Mahler, J. Koch [et al.]. // *Journal of medical virology*. – 2003. – Vol. 69. – № 1. – P. 99-107.
68. Mir, M. A. The hantavirus nucleocapsid protein recognizes specific features of the viral RNA panhandle and is altered in conformation upon RNA binding / M. A. Mir, A. T. Panganiban // *Journal of virology*. – 2005. – Vol. 79. – № 3. – P. 1824-1835.

69. Chu, Y. K. Serological relationships among viruses in the Hantavirus genus, family Bunyaviridae / Y. K. Chu, C. Rossi, J. W. Leduc [et al.]. // *Virology*. – 1994. – Vol. 198. – № 1. – P. 196-204.
70. Coffman, R. L. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work / R. L. Coffman, A. Sher, R. A. Seder // *Immunity*. – 2010. – Vol. 33. – № 4. – P. 492-503.
71. Steinman, R. M. Dendritic cells in vivo: a key target for a new vaccine science / R. M. Steinman // *Immunity*. – 2008. – Vol. 29. – № 3. – P 319-324.
72. Kawai, T. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors / T. Kawai, S. Akira // *Nature immunology*. – 2010. – Vol. 11. – № 5. – P. 373.
73. Geijtenbeek, T. B. H. Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses / T. B. H. Geijtenbeek, S. I. Gringhuis // *Nature Reviews Immunology*. – 2009. – Vol. 9. – № 7. – P 465.
74. Ting, J. P. Y. How the noninflammasome NLRs function in the innate immune system / J. P. Y. Ting, J. A. Duncan, Y. Lei // *Science*. – 2010. – Vol. 327. – № 5963. – P. 286-290.
75. Wilkins, C. Recognition of viruses by cytoplasmic sensors / C. Wilkins, M. Gale Jr // *Current opinion in immunology*. – 2010. – Vol. 22. – № 1. – P. 41-47.
76. Mackow, E. R. Hantavirus regulation of endothelial cell functions / E. R. Mackow, I. N Gavrilovskaya // *Thrombosis and haemostasis*. – 2009. – Vol. 102. – № 12. – P. 1030-1041.

77. Schönrich, G. Hantavirus-induced immunity in rodent reservoirs and humans / G. Schönrich, A. Rang, N. Lütke [et al.]. // Immunological reviews. – 2008. – Vol. 225. – № 1. – P. 163-189.
78. Klingström, J. Innate and adaptive immune responses against human Puumala virus infection: immunopathogenesis and suggestions for novel treatment strategies for severe hantavirus-associated syndromes / J. Klingström, A. Smed-Sörensen, K. T. Maleki [et al.]. // Journal of internal medicine. – 2019. – Vol. 285. – № 5. – P. 510-523.
79. Heyman, P. Situation of hantavirus infections and haemorrhagic fever with renal syndrome in European countries as of December 2006 / P. Heyman, A. Vaheri // Eurosurveillance. – 2008. – Vol. 13. – № 28. – P. 18925.
80. Kilpatrick, E. D. Role of specific CD8+ T cells in the severity of a fulminant zoonotic viral hemorrhagic fever, hantavirus pulmonary syndrome / E. D. Kilpatrick, M. Terajima, F. T. Koster [et al.]. // The Journal of Immunology. – 2004. – Vol. 172. – № 5. – P. 3297-3304.
81. Webster, B. Cell-cell sensing of viral infection by plasmacytoid dendritic cells / B. Webster, S. Assil, M. Dreux // Journal of virology. – 2016. – Vol. 90. – № 22. – P. 10050-10053.
82. Reizis, B. Plasmacytoid dendritic cells: Development, regulation, and function / B. Reizis // Immunity. – 2019. – Vol. 50. – № 1. – P. 37-50.
83. Hasskamp, J. H. Dendritic cell counts in the peripheral blood of healthy adults / J. H. Hasskamp, J. L. Zapas, E. G. Elias // American journal of hematology. – 2005. – Vol. 78. – № 4. – P. 314-315.

84. Dzopalic, T. et al. The response of human dendritic cells to co-ligation of pattern-recognition receptors / T. Dzopalic, I. Rajkovic, A. Dragicevic, M. Colic // *Immunologic research*. – 2012. – Vol. 52. – № 1-2. – P. 20-33.
85. León, B. Compartmentalization of dendritic cell and T-cell interactions in the lymph node: Anatomy of T-cell fate decisions / B. León, F. E. Lund // *Immunological reviews*. – 2019. – Vol. 289. – № 1. – P. 84-100.
86. Cruz, F. M. The biology and underlying mechanisms of cross-presentation of exogenous antigens on MHC-I molecules / F. M. Cruz, J. D. Colbert, E. Merino [et al.]. // *Annual review of immunology*. – 2017. – Vol. 35. – P. 149-176.
87. Joffre, O. P. Cross-presentation by dendritic cells / O. P. Joffre, E. Segura, A. Savina, S. Amigorena // *Nature Reviews Immunology*. – 2012. – Vol. 12. – № 8. – P. 557
88. O'Garra A. Development and function of T helper 1 cells / A. O'Garra, D. Robinson // *Advances in immunology*. – 2004. – Vol. 83. Academic Press – P. 133-162.
89. Mowen, K. A. Signaling pathways in Th2 development / K. A. Mowen, L. H. Glimcher // *Immunological reviews*. – 2004. – Vol. 202. – № 1. – P. 203-222.
90. Groeneveld, P. H. Increased production of nitric oxide in patients infected with the European variant of hantavirus / P. H. Groeneveld, P. Colson, K. M. Kwappenberg, J. Clement // *Scandinavian journal of infectious diseases*. – 1995. – Vol. 27. – № 5. – P. 453-456
91. Linderholm, M. Increased production of nitric oxide in patients with hemorrhagic fever with renal syndrome—relation to arterial hypotension and

- tumor necrosis factor / M. Linderholm, C. Ahlm, B. Settergren [et al.]. // *Infection*. – 1996. – Vol. 24. – № 5. – P. 337-340.
92. Chen, L. Abnormalities of T cell immunoregulation in hemorrhagic fever with renal syndrome / L. Chen, W. Yang // *Journal of Infectious Diseases*. – 1990. – Vol. 161. – № 5. – P. 1016-1019.
93. Huang, C. Hemorrhagic fever with renal syndrome: relationship between pathogenesis and cellular immunity / C. Huang, B. Jin, M. Wang [et al.]. // *Journal of Infectious Diseases*. – 1994. – Vol. 169. – № 4. – P. 868-870.
94. Khaiboullina, S. F. Hantaviruses: molecular biology, evolution and pathogenesis / S. F. Khaiboullina, S. P. Morzunov, S. C. St Jeor // *Current molecular medicine*. – 2005. – Vol. 5. – № 8. – P. 773-790.
95. Lin, J. T. TGF- β 1 uses distinct mechanisms to inhibit IFN- γ expression in CD4+ T cells at priming and at recall: differential involvement of Stat4 and T-bet / J. T. Lin, S. L. Martin, L. Xia, J. D. Gorham // *The Journal of Immunology*. – 2005. – Vol. 174. – № 10. – P. 5950-5958.
96. Nakao, A. Blockade of transforming growth factor β /Smad signaling in T cells by overexpression of Smad7 enhances antigen-induced airway inflammation and airway reactivity / A. Nakao, S. Miike, M. Hatano [et al.]. // *Journal of Experimental Medicine*. – 2000. – Vol. 192. – № 2. – P. 151-158.
97. Alff, P. J. The pathogenic NY-1 hantavirus G1 cytoplasmic tail inhibits RIG-I-and TBK-1-directed interferon responses / P. J. Alff, I. N. Gavrillovskaya, E. Gorbunova [et al.]. // *Journal of virology*. – 2006. – Vol. 80. – № 19. – P. 9676-9686.

98. Alff, P. J. The NY-1 hantavirus Gn cytoplasmic tail coprecipitates TRAF3 and inhibits cellular interferon responses by disrupting TBK1-TRAF3 complex formation / P. J. Alff, N. Sen, E. Gorbunova [et al.]. // *Journal of virology*. – 2008. – Vol. 82. – № 18. – P. 9115-9122.
99. Geimonen, E. Pathogenic and nonpathogenic hantaviruses differentially regulate endothelial cell responses / E. Geimonen, S. Neff, T. Raymond [et al.]. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2002. – Vol. 99. – № 21. – P. 13837-13842.
100. Wang, K. The Glycoprotein and Nucleocapsid Protein of Hantaviruses Manipulate Autophagy Flux to Restrain Host Innate Immune Responses / K. Wang, H. Ma, H. Liu [et al.]. // *Cell reports*. – 2019. – Vol. 27. – № 7. – P. 2075-2091.
101. Padula, P. J. Genetic diversity, distribution, and serological features of hantavirus infection in five countries in South America / P. J. Padula, S. B. Colavecchia, V. P. Martínez [et al.]. // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2000. – Vol. 38. – № 8. – P. 3029-3035.
102. Lundkvist, Å. The humoral response to Puumala virus infection (nephropathia epidemica) investigated by viral protein specific immunoassays / Å. Lundkvist, J. Hörling, B. Niklasson // *Archives of virology*. – 1993. – Vol. 130. – № 1-2. – P. 121-130.
103. Lundkvist, Å. et al. Puumala and Dobrava viruses cause hemorrhagic fever with renal syndrome in Bosnia-Herzegovina: Evidence of highly cross-neutralizing antibody responses in early patient sera / Å. Lundkvist, M. Hukic, J.

- Hörling [et al.]. // Journal of medical virology. – 1997. – Vol. 53. – № 1. – P. 51-59.
104. Zöller, L. G. A novel mu-capture enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant proteins for sensitive and specific diagnosis of hemorrhagic fever with renal syndrome / L. G. Zöller, S. Yang, P. Gött [et al.]. // Journal of clinical microbiology. – 1993. – T. 31. – № 5. – С. 1194-1199.
105. Bostik, P. Sin nombre virus (SNV) Ig isotype antibody response during acute and convalescent phases of hantavirus pulmonary syndrome / P. Bostik, J. Winter, T. G. Ksiazek [et al.]. // Emerging infectious diseases. – 2000. – Vol. 6. – № 2. – P. 184.
106. Forthal, D. N. Measles virus-specific functional antibody responses and viremia during acute measles / D. N. Forthal, G. Landucci, A. Habis [et al.]. // Journal of Infectious Diseases. – 1994. – Vol. 169. – № 6. – P. 1377-1380.
107. Hashido, M. Differentiation of primary from nonprimary genital herpes infections by a herpes simplex virus-specific immunoglobulin G avidity assay / M. Hashido, S. Inouye, T. Kawana // Journal of clinical microbiology. – 1997. – Vol. 35. – № 7. – P. 1766-1768.
108. Torfason, E. G. Subclass restriction of human enterovirus antibodies / E. G. Torfason, C. B. Reimer, H. L. Keyserling // Journal of clinical microbiology. – 1987. – Vol. 25. – № 8. – P. 1376-1379.
109. Мясников, Ю. А. О сроках сохранения антител у реконвалесцентов ГЛПС в Европейских очагах инфекций / Ю. А. Мясников, Т. К. Дзагурова, Е. А.

- Ткаченко // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1986. – № 6. – С. 78.
110. Alexeyev, O. A. Elevated levels of total and Puumala virus-specific immunoglobulin E in the Scandinavian type of hemorrhagic fever with renal syndrome / O. A. Alexeyev, C. Ahlm, J. Billheden [et al.]. // *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. – 1994. – Vol. 1. – № 3. – P. 269-272.
111. Yao, Z. Q. The distribution and duration of Hantaan virus in the body fluids of patients with hemorrhagic fever with renal syndrome / Z. Q. Yao, W. S. Yang, W. B. Zhang, X. F. Bai // *Journal of Infectious diseases*. – 1989. – Vol. 160. – № 2. – P. 218-224.
112. Yao, Z. Q. Identification of epidemic hemorrhagic fever virus in human leukocytes / Z. Q. Yao // *Zhonghua yi xue za zhi*. – 1987. – Vol. 67. – № 9. – P. 497-498.
113. Ennis, F. A. Hantavirus pulmonary syndrome: CD8⁺ and CD4⁺ cytotoxic T lymphocytes to epitopes on Sin Nombre virus nucleocapsid protein isolated during acute illness / F. A. Ennis, J. Cruz, C. F. Spiropoulou [et al.]. // *Virology*. – 1997. – Vol. 238. – № 2. – P. 380-390.
114. Mustonen, J. Genetic susceptibility to severe course of nephropathia epidemica caused by Puumala hantavirus / J. Mustonen, J. Partanen, M. Kanerva [et al.]. // *Kidney international*. – 1996. – Vol. 49. – № 1. – P. 217-221.
115. Plyusnin, A. Puumala hantavirus genome in patients with nephropathia epidemica: correlation of PCR positivity with HLA haplotype and link to viral

- sequences in local rodents / A. Plyusnin, J. Hörling, M. Kanerva [et al.]. // Journal of clinical microbiology. – 1997. – Vol. 35. – № 5. – P. 1090-1096.
116. Korva, M. et al. HLA-associated hemorrhagic fever with renal syndrome disease progression in Slovenian patients / M. Korva, A. Saksida, S. Kunilo [et al.]. // Clin. Vaccine Immunol. – 2011. – Vol. 18. – № 9. – P. 1435-1440.
117. Yamanishi, K. Development of inactivated vaccine against virus causing haemorrhagic fever with renal syndrome / K. Yamanishi, O. Tanishita, M. Tamura [et al.]. // Vaccine. – 1988. – Vol. 6. – № 3. – P. 278-282.
118. Song, J. Y. Long-term immunogenicity and safety of inactivated Hantaan virus vaccine (Hantavax™) in healthy adults / J. Y. Song, H. J. Woo, H. J. Cheong [et al.]. // Vaccine. – 2016. – Vol. 34. – № 10. – P. 1289-1295.
119. Lee, H. W. Vaccines against hemorrhagic fever with renal syndrome / H. W. Lee, Y. K. Chu, Y. D. Woo [et al.]. // Factors in the emergence and control of rodent-borne diseases. Elsevier, Paris. – 1999. – P. 267-272.
120. Cho, H. W. Antibody responses in humans to an inactivated hantavirus vaccine (Hantavax®) / H. W. Cho, C. R. Howard // Vaccine. – 1999. – Vol. 17. – № 20-21. – P. 2569-2575.
121. Lee, H. W. Immune reaction of the vaccinated hamsters with combined Hantaan-Puumala vaccine / H. W. Lee, Y. K. Chu, L. Z. Cui [et al.]. // The Journal of Korean Society of Virology. – 1997. – Vol. 27. – № 1. – P. 39-47.
122. Ким, Р. Специфическая профилактика ГЛПС в КНДР / Р. Ким, Ч. Ру, Г.М. Ким // Тезисы международного симпозиума по ГЛПС. Ленинград, СССР – 1991. - С. 16–17.

123. Kim, R. Antibody formation and epidemiological preventive effect after vaccination with the inactivated vaccine against HFRS / R. Kim, C. Ryu, G. Kim // Abstract of 2nd symposium on arboviruses in the Mediterranean countries, Dubrovnik. – 1989. – Vol. 58.
124. Sun, Z. Studies on the purified inactivated epidemic hemorrhagic fever vaccine. Clinical trial of type 1 EHF vaccine in volunteers / Z. Sun, Y. Yu, W. Wang, D. Wang // Abstract of 2nd international conference on HFRS, Beijing. – 1992. – P. 109-110.
125. Yu, Y. X. Antibody response of inactivated HFRS vaccine to homologous and heterologous types of the virus / Y. X. Yu, X. J. Yao, G. M. Dong [et al.]. // Chin J Biol. – 1990. – Vol. 3. – P. 14-16.
126. Dong, G. Efficacy of a chicken embryo tissue culture inactivated HFRS vaccine used in a clinical trial / G. Dong, Q. An, Y. Zhihue, L. Wenxue // Abstract of 5th international conference on HFRS, HPS and hantaviruses. – 2001. – P. 239.
127. Егорова, М. С. и др. Влияние инактивирующих вирус агентов на иммуногенность вакцин против геморрагической лихорадки с почечным синдромом / М. С. Егорова, С. С. Курашова, Т. К. Дзагурова [и др.]. // Биотехнология. – 2020. – Т. 36. – № 2. – С. 64-73.
128. Jung, J. Protective effectiveness of inactivated hantavirus vaccine against hemorrhagic fever with renal syndrome / J. Jung, S. J. Ko, H. S. Oh [et al.]. // The Journal of infectious diseases. – 2018. – Vol. 217. – № 9. – P. 1417-1420.

129. Li, Z. The assessment of Hantaan virus-specific antibody responses after the immunization program for hemorrhagic fever with renal syndrome in northwest China / Z. Li, H. Zeng, Y. Wang [et al.]. // *Human vaccines & immunotherapeutics*. – 2017. – Vol. 13. – № 4. – P. 802-807
130. Lundkvist, Å. K. Characterization of Puumala virus nucleocapsid protein: identification of B-cell epitopes and domains involved in protective immunity / Å. Lundkvist, H. A. N. N. I. M. A. R. I. Kallio-Kokko, K. B. Sjölander [et al.]. // *Virology*. – 1996. – Vol. 216. – № 2. – P. 397-406.
131. de Carvalho Nicacio, C. Cross-protection against challenge with Puumala virus after immunization with nucleocapsid proteins from different hantaviruses / C. de Carvalho Nicacio, M. Gonzalez Delia Valle, P. Padula [et al.]. // *J Virol*. – 2002. – Vol. 76. – P. 6669-77.
132. Terajima, M. Generation of recombinant vaccinia viruses expressing Puumala virus proteins and use in isolating cytotoxic T cells specific for Puumala virus / M. Terajima, H. L. Van Epps, D. Li [et al.]. // *Virus research*. – 2002. – Vol. 84. – № 1-2. – P. 67-77.
133. Johansson, P. Complete gene sequence of a human Puumala hantavirus isolate, Puumala Umeå/hu: sequence comparison and characterisation of encoded gene products / P. Johansson, M. Olsson, L. Lindgren [et al.]. // *Virus research*. – 2004. – Vol. 105. – № 2. – P. 147-155.
134. Dargeviciute, A. Yeast-expressed Puumala hantavirus nucleocapsid protein induces protection in a bank vole model / A. Dargeviciute, K. B. Sjölander, K. Sasnauskas [et al.]. // *Vaccine*. – 2002. – Vol. 20. – № 29-30. – P. 3523-3531.

135. Razanskiene, A. High yields of stable and highly pure nucleocapsid proteins of different hantaviruses can be generated in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* / A. Razanskiene, J. Schmidt, A. Geldmacher [et al.]. // *Journal of biotechnology*. – 2004. – Vol. 111. – № 3. – P. 319-333.
136. Geldmacher, A. Yeast-expressed hantavirus Dobrava nucleocapsid protein induces a strong, long-lasting, and highly cross-reactive immune response in mice / A. Geldmacher, M. Schmalzer, D. H. Krüger, R. Ulrich // *Viral immunology*. – 2004. – Vol. 17. – № 1. – P. 115-122.
137. Schmidt, J. Nucleocapsid protein of cell culture-adapted Seoul virus strain 80–39: Analysis of its encoding sequence, expression in yeast and immunoreactivity / J. Schmidt, B. Jandrig, B. Klempa [et al.]. // *Virus Genes*. – 2005. – Vol. 30. – № 1. – P. 37-48.
138. Hooper, J. W. A Phase 1 clinical trial of Hantaan virus and Puumala virus M-segment DNA vaccines for haemorrhagic fever with renal syndrome delivered by intramuscular electroporation / J. W. Hooper, J. E. Moon, K. M. Paolino [et al.]. // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2014. – Vol. 20. – P. 110-117.
139. Maes, P. Truncated recombinant Dobrava hantavirus nucleocapsid proteins induce strong, long-lasting immune responses in mice / P. Maes, E. Keyaerts, V. Bonnet [et al.]. // *Intervirology*. – 2006. – Vol. 49. – № 5. – P. 253-260.
140. Maes, P. Truncated recombinant Puumala virus nucleocapsid proteins protect mice against challenge in vivo / P. Maes, J. Clement, B. Cauwe [et al.]. // *Viral immunology*. – 2008. – Vol. 21. – № 1. – P. 49-60.

141. Hooper, J. W. DNA vaccination with hantavirus M segment elicits neutralizing antibodies and protects against Seoul virus infection / J. W. Hooper, K. I. Kamrud, F. Elgh [et al.]. // *Virology*. – 1999. – Vol. 255. – № 2. – P. 269-278.
142. Bucht, G. et al. Modifying the cellular transport of DNA-based vaccines alters the immune response to hantavirus nucleocapsid protein / G. Bucht, K. B. Sjölander, S. Eriksson [et al.]. // *Vaccine*. – 2001. – Vol. 19. – № 28-29. – P. 3820-3829.
143. Hooper, J. W. DNA vaccination with the Hantaan virus M gene protects Hamsters against three of four HFRS hantaviruses and elicits a high-titer neutralizing antibody response in Rhesus monkeys / J. W. Hooper, D. M. Custer, E. Thompson, C. S. Schmaljohn // *Journal of Virology*. – 2001. – Vol. 75. – № 18. – P. 8469-8477.
144. Custer, D. M. Active and passive vaccination against hantavirus pulmonary syndrome with Andes virus M genome segment-based DNA vaccine / D. M. Custer, E. Thompson, C. S. Schmaljohn [et al.]. // *Journal of virology*. – 2003. – Vol. 77. – № 18. – P. 9894-9905.
145. Hooper, J. W. Hantaan/Andes virus DNA vaccine elicits a broadly cross-reactive neutralizing antibody response in nonhuman primates / J. W. Hooper, D. M. Custer, J. Smith, V. Wahl-Jensen // *Virology*. – 2006. – Vol. 347. – № 1. – P. 208-216.
146. Hooper, J. W. Immune serum produced by DNA vaccination protects hamsters against lethal respiratory challenge with Andes virus / J. W. Hooper, A. M.

- Ferro, V. Wahl-Jensen // *Journal of virology*. – 2008. – Vol. 82. – № 3. – P. 1332-1338.
147. Spik, K. W. Mixing of M segment DNA vaccines to Hantaan virus and Puumala virus reduces their immunogenicity in hamsters / K. W. Spik, C. Badger, I. Mathiessen [et al.]. // *Vaccine*. – 2008. – Vol. 26. – № 40. – P. 5177-5181.
148. Brocato, R. DNA vaccine-generated duck polyclonal antibodies as a postexposure prophylactic to prevent hantavirus pulmonary syndrome (HPS) / R. Brocato, M. Josleyn, J. Ballantyne [et al.]. // *PloS one*. – 2012. – Vol. 7. – № 4. – P. e35996.
149. Hooper, J. W. A novel Sin Nombre virus DNA vaccine and its inclusion in a candidate pan-hantavirus vaccine against hantavirus pulmonary syndrome (HPS) and hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) / J. W. Hooper, M. Josleyn, J. Ballantyne, R. Brocato // *Vaccine*. – 2013. – Vol. 31. – № 40. – P. 4314-4321.
150. Kwilas, S. A hantavirus pulmonary syndrome (HPS) DNA vaccine delivered using a spring-powered jet injector elicits a potent neutralizing antibody response in rabbits and nonhuman primates / S. Kwilas, J. M Kishimori, M. Josleyn [et al.]. // *Current gene therapy*. – 2014. – Vol. 14. – № 3. – P. 200-210.
151. Hooper, J. W. A Phase 1 clinical trial of H antaan virus and P uumala virus M-segment DNA vaccines for haemorrhagic fever with renal syndrome delivered by intramuscular electroporation / J. W. Hooper, J. E. Moon, K. M. Paolino [et al.]. // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2014. – Vol. 20. – P. 110-117.
152. Haese, N. Antiviral biologic produced in DNA vaccine/goose platform protects hamsters against hantavirus pulmonary syndrome when administered post-

- exposure / N. Haese, R. L. Brocato, T. Henderson [et al.]. // PLoS neglected tropical diseases. – 2015. – Vol. 9. – № 6. – P. e0003803.
153. Zhao, C. Immunogenicity of a multi-epitope DNA vaccine against hantavirus / C. Zhao, Y. Sun, Y. Zhao [et al.]. // Human vaccines & immunotherapeutics. – 2012. – Vol. 8. – № 2. – P. 208-215.
154. Jiang, D. B. Construction and evaluation of DNA vaccine encoding Hantavirus glycoprotein N-terminal fused with lysosome-associated membrane protein / D. B. Jiang, Y. J. Sun, L. F. Cheng [et al.]. // Vaccine. – 2015. – Vol. 33. – № 29. – P. 3367-3376.
155. Jiang, F. Meteorological factors affect the epidemiology of hemorrhagic fever with renal syndrome via altering the breeding and hantavirus-carrying states of rodents and mites: a 9 years' longitudinal study / F. Jiang, L. Wang, S. Wang, [et al.]. // Emerging microbes & infections. – 2017. – Vol. 6. – № 1. – P. 1-9.
156. Schmaljohn, C. Vaccines for hantaviruses / C. Schmaljohn // Vaccine. – 2009. – Vol. 27. – P. D61-D64.
157. Brocato, R. L. Progress on the prevention and treatment of hantavirus disease / R. L. Brocato, J. W. Hooper // Viruses. – 2019. – Vol. 11. – № 7. – P. 610.
158. Hills, S. L. Japanese encephalitis vaccine: recommendations of the advisory committee on immunization practices / S. L. Hills, E. B. Walter, R. L. Atmar, M. Fischer // MMWR Recommendations and Reports. – 2019. – T. 68. – № 2. – C. 1-40.

159. Ciabattini, A. CD4+ T cell priming as biomarker to study immune response to preventive vaccines / A. Ciabattini, E. Pettini, D. Medaglini // *Frontiers in immunology*. – 2013. – Vol. 4. – P. 421.
160. Dy, M. General aspects of cytokine properties and functions in the cytokine network and immune functions / M. Dy, A. Vazquez, J. Bertoglio, J. Thèze // 1999. - P. 1-13.
161. Fjell, C. D. Cytokines and signaling molecules predict clinical outcomes in sepsis / C. D. Fjell, S. Thair, J. L. Hsu [et al.]. // *PloS one*. – 2013. – Vol. 8. – № 11. – P. e79207.
162. De Serres, S. A. Derivation and validation of a cytokine-based assay to screen for acute rejection in renal transplant recipients / S. A. De Serres, B. G. Mfarrej, M. Grafals [et al.]. // *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. – 2012. – Vol. 7. – № 6. – P. 1018-1025.
163. Hsieh, C. C. Cerebrospinal fluid levels of interleukin-6 and interleukin-12 in children with meningitis / C. C. Hsieh, J. H. Lu, S. J. Chen [et al.]. // *Child's Nervous System*. – 2009. – Vol. 25. – № 4. – P. 461-465.
164. Simpson, S. Thermal stability of cytokines: A review / S. Simpson, J. Kaislasuo, S. Guller, L. Pal // *Cytokine*. – 2020. – Vol. 125. – P. 154829.
165. Ellebedy, A. H. Defining antigen-specific plasmablast and memory B cell subsets in human blood after viral infection or vaccination / A. H. Ellebedy, K. J. Jackson, H. T. Kissick [et al.]. // *Nature immunology*. – 2016. – Vol. 17. – № 10. – P. 1226.

166. Pulendran, B. Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development / B. Pulendran, R. Ahmed // *Cell*. – 2006. – Vol. 124. – № 4. – P. 849-863.
167. Jelley-Gibbs, D. M. Influencing the fates of CD4 T cells on the path to memory: lessons from influenza / D. M. Jelley-Gibbs, T. M. Strutt, K. K. McKinstry, S. L. Swain // *Immunology and cell biology*. – 2008. – Vol. 86. – № 4. – P. 343-352.
168. Сергеев, В. А. Вирусы и вирусные вакцины / В. А. Сергеев, Е. А. Непоклонов, Т. И. Алипер – Москва : Библионика, 2007. – 524 с.
169. Moaaz, M. Th17/Treg cells imbalance and their related cytokines (IL-17, IL-10 and TGF- β) in children with autism spectrum disorder / M. Moaaz, S. Youssry, A. Elfatry, M. Abd El Rahman // *Journal of neuroimmunology*. – 2019. – Vol. 337. – P. 577071.
170. Sharma, A. K. Kinetics of Interferon gamma and Interleukin-21 response following foot and mouth disease virus infection / A. K. Sharma, M. Bhatt, M. Sankar [et al.]. // *Microbial pathogenesis*. – 2018. – Vol. 125. – P. 20-25.
171. Tighe, P. Utility, reliability and reproducibility of immunoassay multiplex kits / P. Tighe, O. Negm, I. Todd, L. Fairclough // *Methods*. – 2013. – Vol. 61. – № 1. – P. 23-29.
172. Keustermans, G. C. E. Cytokine assays: an assessment of the preparation and treatment of blood and tissue samples / G. C. Keustermans, S. B. Hoeks, J. M. Meerding [et al.]. // *Methods*. – 2013. – Vol. 61. – № 1. – P. 10-17.

173. de Jager, W. Prerequisites for cytokine measurements in clinical trials with multiplex immunoassays / W. de Jager, K. Bourcier, G. T. Rijkers [et al.]. // *BMC immunology*. – 2009. – Vol. 10. – № 1 – P. 1-11.
174. Richards, C. D. Role of Cytokines in acute-phase response / C. D. Richards, J. Gauldie, B. B. Aggarwal, K. R. Puri // In “Human Cytokines: Their Role in Disease and Therapy”. – 1995. – P. 7-8.
175. Mingala, C. N. Quantification of water buffalo (*Bubalus bubalis*) cytokine expression in response to inactivated foot-and-mouth disease (FMD) vaccine / C. N. Mingala, S. Konnai, F. A. Venturina [et al.]. // *Research in veterinary science*. – 2009. – Vol. 87. – № 2. – P. 213-217.
176. Gowane, G. R. The expression of IL6 and 21 in crossbred calves upregulated by inactivated trivalent FMD vaccine / G. R. Gowane, A. K. Sharma, M. Sankar [et al.]. // *Animal biotechnology*. – 2014. – Vol. 25. – № 2. – P. 108-118.
177. Jagannathan, S. Kinetics Analysis of Beta-propiolactone with Tangential Flow Filtration (TFF) / S. Jagannathan, P. R. Gandhi, R. Vijayakumar // *Journal of Biological Sciences*. – 2013. – Vol. 13. – № 6. – P. 521-527.
178. Martin. S. S. Comparison of the immunological responses and efficacy of gamma-irradiated V3526 vaccine formulations against subcutaneous and aerosol challenge with Venezuelan equine encephalitis virus subtype IAB / S. S. Martin, R. R. Bakken, C. M. Lind [et al.]. // *Vaccine*. – 2010. – Vol. 28. – № 4. – P. 1031-1040.

179. Budowsky, E. I. Principles of selective inactivation of viral genome / E. I. Budowsky, S. E. Bresler, E. A. Friedman, N. V. Zheleznova // Archives of virology. – 1981. – Vol. 68. – № 3-4. – P. 239-247.
180. Sanders, B. Inactivated viral vaccines / B. Sanders, M. Koldijk, H. Schuitemaker // Vaccine analysis: Strategies, principles, and control. – Springer, Berlin, Heidelberg. - 2015. – P. 45-80.
181. Abd-Elghaffar, A. A. Inactivation of rabies virus by hydrogen peroxide / A. A. Abd-Elghaffar, A. E. Ali, A. A. Boseila, M. A. Amin // Vaccine. – 2016. – Vol. 34. – № 6. – P. 798-802.
182. Vedhara, K. Psychological interventions as vaccine adjuvants: A systematic review / K. Vedhara, K. Ayling, K. Sunger [et al.]. // Vaccine. – 2019. – Vol. 37. – № 25. – P. 3255-3266.
183. Jackson, V. Studies on histone organization in the nucleosome using formaldehyde as a reversible cross-linking agent / V. Jackson // Cell. – 1978. – Vol. 15. – № 3. – P. 945-954.
184. Hartman, F. W. Beta-propiolactone in sterilization of vaccines, tissue grafts, and plasma / F. W. Hartman, G. A. LoGrippo // Journal of the American Medical Association. – 1957. – Vol. 164. – № 3. – P. 258-260.
185. King, A. M. Q. Biochemical identification of viruses causing the 1981 outbreaks of foot and mouth disease in the UK / A. M. Q. King, B. O. Underwood, D. McCahon [et al.]. // Nature. – 1981. – Vol. 293. – № 5832. – P. 479-480.

186. Brown, F. Review of accidents caused by incomplete inactivation of viruses / F. Brown // *Developments in biological standardization*. – 1993. – Vol. 81. – P. 103-107.
187. Polack, F. P. Atypical measles and enhanced respiratory syncytial virus disease (ERD) made simple / F. P. Polack // *Pediatric research*. – 2007. – Vol. 62. – № 1. – P. 111-115.
188. Hiatt, C. W. Kinetics of the inactivation of viruses / C. W. Hiatt // *Bacteriological reviews*. – 1964. – Vol. 28. – № 2. – C. 150.
189. Fiore, A. E. Hepatitis A vaccine / A. E. Fiore, S. M. Finestone, B. P. Bell [et al.]. // *Saunders/Elsevier, Philadelphia, Vaccines*. – 2008. – P. 177–203.
190. Reisler, R. B. Immunogenicity of an inactivated Japanese encephalitis vaccine (JE-VAX) in humans over 20 years at USAMRIID: using PRNT50 as an endpoint for immunogenicity / R. B. Reisler, D. K. Danner, P. H. Gibbs // *Vaccine*. – 2010. – Vol. 28. – № 12. – P. 2436-2441.
191. Srivastava, A. K. A purified inactivated Japanese encephalitis virus vaccine made in Vero cells / A. K. Srivastava, J. R. Putnak, S. H. Lee [et al.]. // *Vaccine*. – 2001. – Vol. 19. – № 31. – P. 4557-4565.
192. Jiang, J. J. Inactivation of hepatitis A virus with β -propiolactone / J. J. Jiang, F. C. Qi, Y. L. Hu [et al.]. // *Chin. J. Biol.* – 2012. – Vol. 25. – P. 529-530.
193. Shan, G. Z. Determination of residual β -propiolactone in inactivated rabies virus concentrate by gas chromatography / G. Z. Shan, X. Ma, J. I. Hong // *Chin. Pharm.* – 2014. – Vol. 25. – P. 2357-2359.

194. Maté, U. In vitro binding of β -propiolactone to calf thymus DNA and mouse liver DNA to form 1-(2-carboxyethyl) adenine / U. Maté, J. J. Solomon, A. Segal // *Chemico-biological interactions*. – 1977. – Vol. 18. – № 3. – P. 327-336.
195. Colburn, N. H. Studies of the reaction of β -propiolactone with deoxyguanosine and related compounds / N. H. Colburn, R. G. Richardson, R. K. Boutwell // *Biochemical pharmacology*. – 1965. – Vol. 14. – № 7. – P. 1113-1118.
196. Yang, J. Development of gas chromatography for determination of β -propiolactone (BPL) content and analysis of BPL hydrolysis / J. Yang, J. Gao, Q. Y. Zhang // *Chinese Journal of Biologicals*. – 2010. – Vol. 3. – P. 323-332.
197. Uittenbogaard, J. P. Reactions of β -propiolactone with nucleobase analogues, nucleosides, and peptides implications for the inactivation of viruses / J. P. Uittenbogaard, B. Zomer, P. Hoogerhout, B. Metz // *Journal of Biological Chemistry*. – 2011. – Vol. 286. – № 42. – P. 36198-36214.
198. Bonnafous, P. Treatment of influenza virus with beta-propiolactone alters viral membrane fusion / P. Bonnafous, M. C. Nicolai, J. C. Taveau [et al.]. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. – 2014. – Vol. 1838. – № 1. – P. 355-363.
199. Wigginton, K. R. Virus inactivation mechanisms: impact of disinfectants on virus function and structural integrity / K. R. Wigginton, B. M. Pecson, T. Sigstam [et al.]. // *Environmental science & technology*. – 2012. – Vol. 46. – № 21. – P. 12069-12078.
200. Perdiz, D. Distribution and repair of bipyrimidine photoproducts in solar UV-irradiated mammalian cells possible role of dewar photoproducts in solar

- mutagenesis / D. Perdiz, P. Gróf, M. Mezzina [et al.]. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2000. – Vol. 275. – № 35. – P 26732-26742.
201. Vaidya, V. Ultraviolet-C irradiation for inactivation of viruses in foetal bovine serum / V. Vaidya, R. Dhere, S. Agnihotri [et al.]. // *Vaccine*. – 2018. – Vol. 36. – № 29. – P. 4215-4221.
202. Delrue, I. Inactivated virus vaccines from chemistry to prophylaxis: merits, risks and challenges / I. Delrue, D. Verzele, A. Madder, H. J. Nauwynck // *Expert review of vaccines*. – 2012. – Vol. 11. – № 6. – P. 695-719.
203. Leo, G. Ultraviolet laser-induced cross-linking in peptides / G. Leo, C. Altucci, S. Bourgoin-Voillard [et al.]. // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. – 2013. – Vol. 27. – № 14. – P. 1660-1668.
204. Saito, I. Chemical aspects of UV-induced crosslinking of proteins to nucleic acids. Photoreactions with lysine and tryptophan / I. Saito, T. Matsuura // *Accounts of Chemical Research*. – 1985. – Vol. 18. – № 5. – P. 134-141.
205. Tanaka, T. Integrated molecular analysis of the inactivation of a non-enveloped virus, feline calicivirus, by UV-C radiation / T. Tanaka, O. Nogariya, N. Shionoiri [et al.]. // *Journal of bioscience and bioengineering*. – 2018. – Vol. 126. – № 1. – P. 63-68.
206. Buranda, T. Recognition of decay accelerating factor and $\alpha\beta 3$ by inactivated hantaviruses: toward the development of high-throughput screening flow cytometry assays / T. Buranda, Y. Wu, D. Perez [et al.]. // *Analytical biochemistry*. – 2010. – Vol. 402. – № 2. – P. 151-160.

207. Goldstein, M. A. Effect of formalin, β -propiolactone, merthiolate, and ultraviolet light upon influenza virus infectivity, chicken cell agglutination, hemagglutination, and antigenicity / M. A. Goldstein, N. M. Tauraso // *Applied Microbiology*. – 1970. – Vol. 19. – № 2. – P. 290-294.
208. Furuya, Y. Effect of inactivation method on the cross-protective immunity induced by whole ‘killed’ influenza A viruses and commercial vaccine preparations / Y. Furuya, M. Regner, M. Lobigs [et al.]. // *Journal of General Virology*. – 2010. – Vol. 91. – № 6. – P. 1450-1460.
209. Amanna, I. J. Development of a new hydrogen peroxide-based vaccine platform / I. J. Amanna, H. P. Raué, M. K. Slifka // *Nature medicine*. – 2012. – Vol. 18. – № 6. – P. 974-979.
210. Dembinski, J. L. Hydrogen peroxide inactivation of influenza virus preserves antigenic structure and immunogenicity / J. L. Dembinski, O. Hungnes, A. G. Hauge [et al.]. // *Journal of virological methods*. – 2014. – Vol. 207. – P. 232-237.
211. Yu, T. W. Reactive oxygen species-induced DNA damage and its modification: a chemical investigation / T. W. Yu, D. Anderson // *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. – 1997. – Vol. 379. – № 2. – P. 201-210.
212. Srivastava, A. K. A purified inactivated Japanese encephalitis virus vaccine made in Vero cells / A. K. Srivastava, J. R. Putnak, S. H. Lee [et al.]. // *Vaccine*. – 2001. – Vol. 19. – № 31. – P. 4557-4565.
213. Pinto, A. K. A hydrogen peroxide-inactivated virus vaccine elicits humoral and cellular immunity and protects against lethal West Nile virus infection in aged

- mice / A. K. Pinto, J. M. Richner, E. A. Poore [et al.]. // *Journal of virology*. – 2013. – Vol. 87. – № 4. – P. 1926-1936.
214. Marzi, A. An Ebola whole-virus vaccine is protective in nonhuman primates / A. Marzi, P. Halfmann, L. Hill-Batorski [et al.]. // *Science*. – 2015. – Vol. 348. – № 6233. – P. 439-442.
215. Slifka, M. K. Inactivating pathogens with oxidizing agents for vaccine production / M. K. Slifka, S. V. Carter, E. Hammarlund, P. Yoshihara // *S. Patent № 8,124,397*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office. - 2012.
216. McKee, A. S. Immune mechanisms of protection: can adjuvants rise to the challenge? / A. S. McKee, M. K. MacLeod, J. W. Kappler, P. Marrack // *BMC biology*. – 2010. – Vol. 8. – № 1. – P. 1-10.
217. Gupta, R. K. Adjuvants for human vaccines — current status, problems and future prospects / R. K. Gupta, G. R. Siber // *Vaccine*. – 1995. – Vol. 13. – № 14. – P. 1263-1276.
218. Ciabattini, A. Modulation of primary immune response by different vaccine adjuvants / A. Ciabattini, E. Pettini, F. Fiorino [et al.]. // *Frontiers in immunology*. – 2016. – Vol. 7. – P. 427.
219. Pulendran, B. Modulating vaccine responses with innate immunity / B. Pulendran, J. Powell, R. A. Flavell // *National Institutes of Health* - 2007. – P. 183-190.
220. Beran, J. Safety and immunogenicity of a new hepatitis B vaccine for the protection of patients with renal insufficiency including pre-haemodialysis and haemodialysis patients / J. Beran // *Expert opinion on biological therapy*. – 2008. – Vol. 8. – № 2. – P. 235-247.

221. Banzhoff, A. Correction: MF59®-Adjuvanted H5N1 Vaccine Induces Immunologic Memory and Heterotypic Antibody Responses in Non-Elderly and Elderly Adults / A. Banzhoff, R. Gasparini, F. Laghi-Pasini [et al.]. // *PloS one*. – 2009. – Vol. 4. – № 3. – P. e4384.
222. Halperin, S. A. Comparison of the safety and immunogenicity of hepatitis B virus surface antigen co-administered with an immunostimulatory phosphorothioate oligonucleotide and a licensed hepatitis B vaccine in healthy young adults / S. A. Halperin, S. Dobson, S. McNeil [et al.]. // *Vaccine*. – 2006. – Vol. 24. – № 1. – P. 20-26.
223. Schwarz, T. F. Single dose vaccination with AS03-adjuvanted H5N1 vaccines in a randomized trial induces strong and broad immune responsiveness to booster vaccination in adults / T. F. Schwarz, T. Horacek, M. Knuf [et al.]. // *Vaccine*. – 2009. – Vol. 27. – № 45. – P. 6284-6290.
224. Galli, G. Adjuvanted H5N1 vaccine induces early CD4+ T cell response that predicts long-term persistence of protective antibody levels / G. Galli, D. Medini, E. Borgogni [et al.]. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2009. – Vol. 106. – № 10. – P. 3877-3882.
225. Leroux-Roels, I. Priming with AS03A-adjuvanted H5N1 influenza vaccine improves the kinetics, magnitude and durability of the immune response after a heterologous booster vaccination: an open non-randomised extension of a double-blind randomised primary study / I. Leroux-Roels, F. Roman, S. Forgas [et al.]. // *Vaccine*. – 2010. – Vol. 28. – № 3. – P. 849-857.

226. McAleer, J. P. Educating CD4 T cells with vaccine adjuvants: lessons from lipopolysaccharide / J. P. McAleer, A. T. Vella // Trends in immunology. – 2010. – Vol. 31. – № 11. – P. 429-435.
227. Beutler, B. A. TLRs and innate immunity / B. A. Beutler // Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2009. – Vol. 113. – № 7. – P. 1399-1407.
228. Iwasaki, A. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system / A. Iwasaki, R. Medzhitov // Science. – 2010. – Vol. 327. – № 5963. – P. 291-295.
229. Takeuchi, O. Pattern recognition receptors and inflammation / O. Takeuchi, S. Akira // Cell. – 2010. – Vol. 140. – № 6. – P. 805-820.
230. Marrack, P. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium / P. Marrack, A. S. McKee, M. W. Munks // Nature Reviews Immunology. – 2009. – Vol. 9. – № 4. – P. 287.
231. Hoebe, K. Upregulation of costimulatory molecules induced by lipopolysaccharide and double-stranded RNA occurs by Trif-dependent and Trif-independent pathways / K. Hoebe, E. M. Janssen, S. O. Kim [et al.]. // Nature immunology. – 2003. – Vol. 4. – № 12. – P. 1223-1229.
232. Lambrecht, B. N. et al. Mechanism of action of clinically approved adjuvants / B. N. Lambrecht, M. Kool, M. A. Willart, H. Hammad // Current opinion in immunology. – 2009. – Vol. 21. – № 1. – P. 23-29.
233. Savelkoul, H. F. J. Choice and design of adjuvants for parenteral and mucosal vaccines / H. F. Savelkoul, V. A. Ferro, M. M. Strioga, V. E. Schijns // Vaccines. – 2015. – Vol. 3. – № 1. – P. 148-171.

234. Козлов, В. Г. Адьюванты в современной медицине и ветеринарии / В. Г. Козлов, С. В. Ожерелков, А. В. Санин, Т. Н. Кожевникова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2014. – № 1. – С. 91-102.
235. Aguilar, J. C. Vaccine adjuvants revisited / J. C. Aguilar, E. G. Rodriguez // Vaccine. – 2007. – Vol. 25. – № 19. – P. 3752-3762.
236. Gavin, A. L. Adjuvant-enhanced antibody responses in the absence of toll-like receptor signaling / A. L. Gavin, K. Hoebe, B. Duong [et al.]. // Science. – 2006. – Vol. 314. – № 5807. – P. 1936-1938.
237. McKee, A. S. Old and new adjuvants / A. S. McKee, P. Murrack // Current opinion in immunology. – 2017. – Vol. 47. – P. 44-51.
238. Mori, A. The vaccine adjuvant alum inhibits IL- 12 by promoting PI 3 kinase signaling while chitosan does not inhibit IL- 12 and enhances T h1 and T h17 responses / A. Mori, E. Oleszycka, F. A. Sharp [et al.]. // European journal of immunology. – 2012. – Vol. 42. – № 10. – P. 2709-2719.
239. McKee, A. S. Alum induces innate immune responses through macrophage and mast cell sensors, but these sensors are not required for alum to act as an adjuvant for specific immunity / A. S. McKee, M. W. Munks, M. K. MacLeod [et al.]. // The Journal of Immunology. – 2009. – Vol. 183. – № 7. – P. 4403-4414.
240. Didierlaurent, A. M. AS04, an aluminum salt-and TLR4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptive immunity / A. M. Didierlaurent, S. Morel, L. Lockman [et al.]. // The Journal of immunology. – 2009. – Vol. 183. – № 10. – P. 6186-6197.

241. Kool, M. An unexpected role for uric acid as an inducer of T helper 2 cell immunity to inhaled antigens and inflammatory mediator of allergic asthma / M. Kool, M. A. Willart, M. van Nimwegen [et al.]. // *Immunity*. – 2011. – Vol. 34. – № 4. – P. 527-540.
242. Hornung, V. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization / V. Hornung, F. Bauernfeind, A. Halle [et al.]. // *Nature immunology*. – 2008. – Vol. 9. – № 8. – P. 847.
243. Bonam, S. R. An overview of novel adjuvants designed for improving vaccine efficacy / S. R. Bonam, C. D. Partidos, S. K. M. Halmuthur, S. Muller // *Trends in pharmacological sciences*. – 2017. – Vol. 38. – № 9. – P. 771-793.
244. Balke, I. Use of plant viruses and virus-like particles for the creation of novel vaccines / I. Balke, A. Zeltins // *Advanced drug delivery reviews*. – 2019. – Vol. 145. – P. 119-129.
245. Trifonova, E. Complexes assembled from TMV-derived spherical particles and entire virions of heterogeneous nature / E. Trifonova, N. Nikitin, A. Gmyl [et al.]. // *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. – 2014. – Vol. 32. – № 8. – P. 1193-1201.
246. Trifonova, E. A. Obtaining and characterization of spherical particles—new biogenic platforms / E. A. Trifonova, N. A. Nikitin, M. P. Kirpichnikov [et al.]. // *Moscow University biological sciences bulletin*. – 2015. – Vol. 70. – № 4. – P. 194-197.

247. Nikitin, N. A. Data in support of toxicity studies of structurally modified plant virus to safety assessment / N. A. Nikitin, V. A. Zenin, E. A. Trifonova [et al.]. // *Data in brief*. – 2018. – Vol. 21. – P. 1504-1507.
248. Qureshi, N. Purification and structural determination of nontoxic lipid A obtained from the lipopolysaccharide of *Salmonella typhimurium* / N. Qureshi, K. Takayama, E. Ribic // *Journal of Biological Chemistry*. – 1982. – Vol. 257. – № 19. – P. 11808-11815.
249. Casella, C. R. Putting endotoxin to work for us: monophosphoryl lipid A as a safe and effective vaccine adjuvant / C. R. Casella, T. C. Mitchell // *Cellular and molecular life sciences*. – 2008. – Vol. 65. – № 20. – P. 3231.
250. Di Paolo, D. One-year vaccination against hepatitis B virus with a MPL-vaccine in liver transplant patients for HBV-related cirrhosis / D. Di Paolo, I. Lenci, C. Cerocchi [et al.]. // *Transplant International*. – 2010. – Vol. 23. – № 11. – P. 1105-1112.
251. Vandepapelière, P. Vaccine adjuvant systems containing monophosphoryl lipid A and QS21 induce strong and persistent humoral and T cell responses against hepatitis B surface antigen in healthy adult volunteers / P. Vandepapelière, Y. Horsmans, P. Moris [et al.]. // *Vaccine*. – 2008. – Vol. 26. – № 10. – P. 1375-1386.
252. Ledov, V. A. Highly homogenous tri-acylated S-LPS acts as a novel clinically applicable vaccine against *Shigella flexneri* 2a infection / V. A. Ledov, M. E. Golovina, A. A. Markina [et al.]. // *Vaccine*. – 2019. – Vol. 37. – № 8. – P. 1062-1072.

253. Kawai, T. TLR signaling / T. Kawai, S. Akira // Cell Death & Differentiation. – 2006. – Vol. 13. – № 5. – P. 816-825.
254. Poltorak, A. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene / A. Poltorak, X. He, I. Smirnova [et al.]. // Science. – 1998. – Vol. 282. – № 5396. – P. 2085-2088.
255. Wang, H. Heat-stable enterotoxins of enterotoxigenic Escherichia coli and their impact on host immunity / H. Wang, Z. Zhong, Y. Luo [et al.]. // Toxins. – 2019. – Vol. 11. – № 1. – P. 24.
256. Longhi, M. P. Dendritic cells require a systemic type I interferon response to mature and induce CD4+ Th1 immunity with poly IC as adjuvant / M. P. Longhi, C. Trunpfheller, J. Idoyaga [et al.]. // Journal of Experimental Medicine. – 2009. – Vol. 206. – № 7. – P. 1589-1602.
257. Pizza, M. Mucosal vaccines: non toxic derivatives of LT and CT as mucosal adjuvants / M. Pizza, M. M. Giuliani, M. R. Fontana [et al.]. // Vaccine. – 2001. – Vol 19. – № 17-19. – P. 2534-2541.
258. Clements, J. D. Adjuvant activity of Escherichia coli heat-labile enterotoxin and effect on the induction of oral tolerance in mice to unrelated protein antigens / J. D. Clements, N. M. Hartzog, F. L. Lyon // Vaccine. – 1988. – Vol. 6. – № 3. – P. 269-277.
259. Sasaki, K. Adjuvant action of Escherichia coli enterotoxin for delayed-type hypersensitivity to Oka vaccine virus on pernasal co-administration in mice / K. Sasaki, Y. Asano, Y. Honma [et al.]. // Vaccine. – 2000. – Vol. 19. – № 7-8. – P. 931-936.

260. Liang, S. In vivo and in vitro adjuvant activities of the B subunit of Type IIb heat-labile enterotoxin (LT-IIb-B5) from *Escherichia coli* / S. Liang, K. B. Hosur, H. F. Nawar [et al.]. // *Vaccine*. – 2009. – Vol. 27. – № 32. – P. 4302-4308.
261. Dillon, S. Yeast zymosan, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces regulatory antigen-presenting cells and immunological tolerance / S. Dillon, S. Agrawal, K. Banerjee [et al.]. // *The Journal of clinical investigation*. – 2006. – Vol. 116. – № 4. – P. 916-928.
262. George-Chandy, A. Cholera toxin B subunit as a carrier molecule promotes antigen presentation and increases CD40 and CD86 expression on antigen-presenting cells / A. George-Chandy, K. Eriksson, M. Lebens [et al.]. // *Infection and immunity*. – 2001. – Vol. 69. – № 9. – P. 5716-5725.
263. Scharek, L. The porcine immune system--differences compared to man and mouse and possible consequences for infections by *Salmonella* serovars / L. Scharek, K. Tedin // *Berliner und Munchener tierarztliche Wochenschrift*. – 2007. – Vol. 120. – № 7-8. – P. 347.
264. Дзагурова, Т. К. Штамм вируса для изготовления вакцинных препаратов против геморрагической лихорадки с почечным синдромом (варианты) / Патент МПК С12N7/00 / Т. К. Дзагурова, Е. А. Ткаченко, А. А. Ишмухаметов, С. Е. Соцкова. - № 2683508С1; подан 23.05.2018; опубл. 23.03.2019.
265. Дзагурова, Т. К. Выделение и идентификация штаммов хантавирусов— возбудителей ГЛПС в европейской части России / Т. К. Дзагурова, Е. А.

- Ткаченко, В. Н. Башкирцев [и др.]. // Инфекция и иммунитет. – 2012. – Т. 2. – № 1-2. – С. 137.
266. Dzagurova, T. Antigenic relationships of hantavirus strains analysed by monoclonal antibodies / T. Dzagurova, E. Tkachenko, R. Slonova [et al.]. // Archives of virology. – 1995. – Vol. 140. – № 10. – P. 1763-1773.
267. Дзагурова, Т. К. Разработка иммуноферментной тест-системы на основе моноклональных антител для определения специфической активности вакцины против геморрагической лихорадки с почечным синдромом / Т. К. Дзагурова, О. Н. Солопова, П. Г. Свешников, [и др.]. // Вопросы вирусологии. – 2013. – Т. 58. – №. 1. – С. 40-44.
268. Епринцев, А. Т. Учебно-методическое пособие: Идентификация и исследование экспрессии генов / А. Т. Епринцев, В. Н. Попов, Д. Н. Федорин // Воронеж: Издательско-полиграфический центр Воронежского государственного университета, 2008. – 64 с.
269. 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 [и др.]. // Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы: сборник трудов XI Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням с международным участием, г. Москва, 1-3 апреля 2019 года / под ред. академика РАН В.И.Покровского – М: «Медицинское Маркетинговое Агентство», 2019. – 260 с.+ цветная вкладка. ISBN 978-5-9905908-4-7. - С. 55.

270. Karpova, O. Immunogenic compositions assembled from tobacco mosaic virus-generated spherical particle platforms and foreign antigens / O. Karpova, N. Nikitin, S. Chirkov [et al.]. // Journal of general virology. – 2012. – Vol. 93. – № 2. – P. 400-407.
271. Ставицкий, С. Б. Молекулярная бивалентная вакцина для профилактики бруцеллеза и диарей, вызванных энтеропатогенными бактериями / С. Б. Ставицкий, А. Н. Носков. // Патент принадлежащие Обществу с ограниченной ответственностью "БИОМЕДИЦИНСКИЙ ЦЕНТР" (RU) – № 2285539, 2006. <https://findpatent.ru/patent/228/2285539.html>
272. Европейская Конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 18 марта 1986 г.). [Электронный ресурс] - https://rm.coe.int/168007_aba8. (дата обращения 20.04.2020).
273. Директива 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях. [Электронный ресурс] - URL: <https://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:en:PDF>. (дата обращения 20.04.2020).
274. ГОСТ 33215-2014 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур. Электронный текст документа подготовлен АО «Кодекс» и сверен по: официальное издание. - М.: Стандартинформ, 2019. [Электронный ресурс] - URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200127789>

275. ГОСТ 33216-2014 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами. Электронный текст документа подготовлен АО «Кодекс» и сверен по: официальное издание. - М.: Стандартинформ, 2019. [Электронный ресурс] - URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200127506>
276. ГОСТ 33218-2014 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за нечеловекообразными приматами. Электронный текст документа подготовлен АО «Кодекс» и сверен по: официальное издание. - М.: Стандартинформ, 2016. [Электронный ресурс] - URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200127291>
277. ГОСТ 33044-2014 Принципы надлежащей лабораторной практики. Электронный текст документа подготовлен АО «Кодекс» и сверен по: официальное издание. - М.: Стандартинформ, 2019. [Электронный ресурс] - URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200115791>
278. ГОСТ Р 56699-2015 Лекарственные средства для медицинского применения. Доклинические исследования безопасности биотехнологических лекарственных препаратов. Общие рекомендации. Электронный текст документа подготовлен АО «Кодекс» и сверен по: официальное издание. - М.: Стандартинформ, 2019. [Электронный ресурс] - URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200126921>
279. ГОСТ Р 56701-2015 Лекарственные средства для медицинского применения. Руководство по планированию доклинических исследований безопасности с целью последующего проведения клинических

исследований и регистрации лекарственных средств. Электронный текст документа подготовлен АО «Кодекс» и сверен по: официальное издание. - М.: Стандартинформ, 2016. [Электронный ресурс] - URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200126923>

280. Mackay, I. M. Real-time PCR in virology / I. M. Mackay, K. E. Arden, A. Nitsche // *Nucleic acids research*. – 2002. – Vol. 30. – № 6. – P. 1292-1305.
281. Watzinger, F. Real-time quantitative PCR assays for detection and monitoring of pathogenic human viruses in immunosuppressed pediatric patients / F. Watzinger, M. Suda, S. Preuner [et al.]. // *Journal of clinical microbiology*. – 2004. – Vol. 42. – № 11. – P. 5189-5198.
282. Миронов, А. Н. Руководство по доклиническим исследованиям лекарственных средств / А. Н. Миронов // Москва: ФГБУ «НЦЭМСП», 2012. – 942 с.
283. Сафонова, М. В. Разработка ОТ-ПЦР тест-системы для определения РНК вирусов Добрава и Пуумала в формате ПЦР в режиме реального времени / М. В. Сафонова, Т. К. Дзагурова, А. А. Лопатин [и др.]. // ББК 55.1+ 56.9 я431 С23. – С. 111.
284. Holland, N. T. Biological sample collection and processing for molecular epidemiological studies / N. T. Holland, M. T. Smith, B. Eskenazi [et al.]. // *Reviews in Mutation Research*. – 2003. – Vol. 543. – № 3. – P. 217-234.