



Разработка инактивированной культуральной вакцины против жёлтой лихорадки

Иванов А.П.¹, Клеблеева Т.Д.¹, Рогова Ю.В.¹, Иванова О.Е.^{1,2}

¹ ФГБНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН», 108819, Москва, Россия;

² ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 11999, Москва, Россия

Введение. Жёлтая лихорадка (ЖЛ) – одно из самых распространённых вирусных заболеваний человека. Единственная на сегодняшний день доступная живая вакцина против ЖЛ на основе куриных эмбрионов, инфицированных аттенуированным штаммом 17D вируса ЖЛ, относится к наиболее эффективным вакцинным препаратам. Однако живая вакцина ассоциирована с тяжёлыми поствакцинальными осложнениями, в том числе с висцеротропным синдромом (примерно 0,4 случая на 100 тыс. вакцинированных). В связи с этим разработка и внедрение высокоочищенной инактивированной вакцины против ЖЛ призвана обеспечить максимальную безопасность вакцинации.

Цель исследования – разработка и оценка иммуногенности культуральной инактивированной вакцины против ЖЛ на уровне лабораторной модели.

Материал и методы. В ходе исследования проведены адаптация штамма 17D вируса ЖЛ к культуре клеток Vero, культивирование, удаление клеточной ДНК, инактивация β-пропиолактоном, концентрирование, хроматографическая очистка, определение белка и антигена вируса ЖЛ, оценка иммуногенности на мышах параллельно с коммерческой живой вакциной.

Результаты и обсуждение. Определение специфических антител класса G (IgG) и вируснейтрализующих антител в сыворотках крови иммунизированных мышей показало высокий уровень антител, превышающий таковой при иммунизации коммерческой живой вакциной. Оптимальная доза антигена в вакцине по общему белку составила 50 мкг/мл (5 мкг/0,1 мл – доза и объём на 1 вакцинацию мышей). Таким образом, лабораторный вариант культуральной инактивированной вакцины против ЖЛ по эффективности не уступает коммерческой живой вакцине и даже превосходит её.

Заключение. Разработан лабораторный вариант культуральной инактивированной вакцины против ЖЛ, не уступающий по иммуногенности (на модели животных) коммерческой живой вакцине.

Ключевые слова: штамм 17D вируса жёлтой лихорадки; культуральная инактивированная вакцина против жёлтой лихорадки; живая вакцина против жёлтой лихорадки; культура клеток Vero; очистка вируса жёлтой лихорадки; иммуногенность; мыши BALB/c.

Для цитирования: Иванов А.П., Клеблеева Т.Д., Рогова Ю.В., Иванова О.Е. Разработка инактивированной культуральной вакцины против жёлтой лихорадки. *Вопросы вирусологии.* 2020; 65(4): 212-217. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-4-212-217>.

Для корреспонденции: Иванов Александр Петрович, д-р мед. наук, вед. науч. сотрудник лаб. молекулярной биологии вирусов ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН», 108819, Москва. E-mail: ivanovalexander1@gmail.com

Участие авторов: Иванов А.П. – концепция, эксперименты, анализ данных, написание статьи; Клеблеева Т.Д. – экспериментальная часть; Рогова Ю.В. – работа с животными; Иванова О.Е. – анализ данных, написание и редактирование текста.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 27.07.2020

Принята в печать 11.08.2020

Development of inactivated cultural yellow fever vaccine

Alexander P. Ivanov¹, Tatiana D. Klebleeva¹, Yulia V. Rogova¹, Olga E. Ivanova^{1,2}

¹ Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences, Moscow, 108819, Russia;

² I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, 11999, Russia

Introduction. The only currently available live vaccine against yellow fever (YF) based on chicken embryos infected with an attenuated 17D strain of the YF virus is one of the most effective vaccine preparations. However, the live vaccine is associated with “viscerotropic syndrome” (approximately 0.4 cases per 100 000 vaccinated). Therefore, the development and introduction of highly purified inactivated vaccine against YF is intended to ensure the maximum safety of vaccination against one of the most common human viral diseases.

Goals and objectives. Development and evaluation of immunogenicity of the cultural inactivated vaccine against YF at the laboratory model level.

Material and methods. Adaptation of 17D strain of YF virus to *Vero* cell culture, cultivation, removal of cellular DNA, inactivation with β -propiolactone, concentration, chromatographic purification, determination of protein and antigen of YF virus, assessment of immunogenicity in mice in parallel with commercial live vaccine.

Results and discussion. Immunogenicity: the determination of specific antibodies of class G (IgG) and virus neutralizing antibodies in the sera of immunized mice showed high level of antibodies exceeding that of immunized with commercial live vaccine. The optimal dose of antigen in the vaccine (total protein) was 50 μ g/ml (5 μ g/0.1 ml – dose and volume per 1 vaccination of mice). Thus, the laboratory version of cultural inactivated vaccine against YF is as effective (and even superior) as the commercial live vaccine.

Conclusion. Laboratory version of cultural inactivated vaccine against YF, which is not inferior in immunogenicity (in animal model) to commercial live vaccine, has been developed.

Keywords: strain 17D of yellow fever virus; cultural inactivated vaccine against yellow fever; live vaccine against yellow fever; *Vero* cell culture; purification of yellow fever virus; immunogenicity; BALB/c mice.

For citation: Ivanov A.P., Klebleeva T.D., Rogova Yu.V., Ivanova O.E. Development of inactivated cultural yellow fever vaccine. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2020; 65(4): 212-217. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-4-212-217>

For correspondence: Alexander P. Ivanov, D. Sci. (Med.), Leading Researcher, Laboratory of molecular biology of viruses, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences, Moscow, 108819, Russia. E-mail: ivanovalexander1@gmail.com

Information about authors:

Ivanov A.P., <http://orcid.org/0000-0003-4576-7136>

Klebleeva T.D., <http://orcid.org/0000-0003-4288-6818>

Rogova Y.V., <http://orcid.org/0000-0002-4655-5330>

Ivanova O.E., <http://orcid.org/0000-0003-1784-4827>

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflicts of interest.

Contribution: Ivanov A.P. – concept, experiments, data analysis, writing; Klebleeva T.D. – experimental part; Rogova Yu.V. – work with animals; Ivanova O.E. – data analysis, writing, editing.

Received 27 July 2020

Accepted 11 August 2020

Введение

Жёлтая лихорадка (ЖЛ) – острое геморрагическое трансмиссивное заболевание вирусной этиологии (возбудитель – флавивирус; род *Flavivirus*, семейство *Flaviviridae*). ЖЛ является тропическим зооантропонозом Африки и Южной Америки. Вирус передаётся человеку через укусы комаров определённых видов, преимущественно *Aedes aegypti*, уровень летальности составляет 20–50% и выше. Поскольку большинство случаев ЖЛ остаётся вне регистрации, специалисты Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) определили, что истинный уровень заболеваемости в год может достигать 200 тыс. случаев [1].

Единственная на сегодняшний день доступная живая вакцина против ЖЛ на основе куриных эмбрионов, инфицированных аттенуированным штаммом 17D вируса ЖЛ, была разработана в 1936 г. М. Theiler и Н.Н. Smith [2]. Это один из наиболее эффективных вакцинных препаратов за всю историю вакцинологии – протективный иммунный ответ наблюдается у 99% вакцинированных [1]. Вакцину выпускают во Франции (Sanofi Pasteur), в Сенегале (Institut Pasteur de Dakar), Бразилии (Bio-Manguinhos) и в Российской Федерации (ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН»), она пользуется устойчивым спросом в эндемичных по ЖЛ регионах [3].

За почти 80-летнюю историю применения данной вакцины число вакцинированных превысило 550 млн человек [1]. Однако применение живой вакцины ассоциировано с рядом тяжёлых поствакцинальных

осложнений – висцеротропным синдромом (примерно 0,4 случая на 100 тыс. вакцинированных), нейротропным синдромом и аллергическими реакциями на яичный белок [4, 5]. Учитывая тот факт, что вакцинации подлежат все лица с 9-месячного возраста (в случае эпидемии – с 6-месячного возраста), проживающие в регионах риска [1], а также лица, выезжающие в эти регионы (работа, туризм и т.д.), разработка и внедрение высокоочищенной инактивированной вакцины против ЖЛ призвана обеспечить максимальную безопасность вакцинации против одного из самых распространённых вирусных заболеваний человека. За последние 10 лет исследователями США и Бразилии опубликованы материалы по разработке принципиальных подходов к созданию инактивированной культуральной вакцины против ЖЛ [1, 6], которые наряду с собственными методическими приёмами использовали авторы данной статьи.

Цель исследования – разработка и оценка иммуногенности инактивированной культуральной вакцины против ЖЛ на уровне лабораторной модели.

Материал и методы

Вирус. Использовали штамм 17D вируса ЖЛ – рабочий посевной вирус, полученный из отделения вакцины жёлтой лихорадки ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН».

Клетки. Клетки *Vero* культивировали в среде DMEM с 5% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (Gibco, Великобритания).

Приготовление инактивированной вакцины вируса ЖЛ. Клетки *Vero* заражали вирусом ЖЛ, штамм 17D (оптимальная множественность заражения – 0,01 БОЕ/кл.). Культивировали в среде Игла MEM с L-глутамином, двойным набором аминокислот и витаминов (ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН») в культуральных флаконах с площадью рабочей поверхности 225 см². Кроме того использовали роллерное культивирование: ёмкость флаконов – 1,7 л, объём среды – 300 мл. Титр вируса по методу бляшек [6] составлял (\pm) 6,0 Ig БОЕ/мл. Вирусодержащую культуральную жидкость в количестве 4,5 л осветляли центрифугированием при 10 000 об/мин в течение 20 мин при температуре +4 °С, затем с помощью фильтра Sartobran® 300, 0,45 + 0,2 мкм (Sartorius, Германия). Для удаления клеточной ДНК обрабатывали нуклеазой Benzonase® (Novagen®, Дания): 50 ЕД/мл + 2 mM MgCl₂ в течение 24 ч при температуре 37 °С, перемешивая. Затем инактивировали 0,1% β -пропиолактоном (Serva, Германия) в течение 16 ч при комнатной температуре с периодическим перемешиванием и контролем pH, не допуская закисления в результате образования кислых продуктов гидролиза β -пропиолактона [1]. Остаточную инфекционность контролировали в соответствии с [6].

Инактивированную культуральную жидкость концентрировали в 200 раз методом ультрафильтрации в тангенциальном потоке с использованием установки Vivaflow 200 (Sartorius, Германия). В полученном концентрате определяли титр антигена вируса ЖЛ с помощью собственной системы иммуоферментного анализа (ИФА) по ранее опубликованной методике [7].

Для очистки инактивированного вируса ЖЛ использовали гель Capto™ Core 700 (GE Healthcare, Швеция), позволяющий проводить гель-фильтрацию с более высоким уровнем разделения за счёт связывания низкомолекулярных соединений с «ядром» геля. На колонку с гелем Capto™ Core 700 (30×1,5 см), уравновешенную 0,01 М фосфатно-солевым буфером (ФСБ), pH 7,2, наносили 5 мл концентрата инактивированного вируса ЖЛ, элюировали тем же буфером со скоростью 5–7 мл/мин, собирая фракции объёмом 5 мл. Измеряли оптическую плотность (ОП) фракций при 280 и 260 нм, а также определяли наличие антигена вируса ЖЛ с помощью ИФА, как указано выше [7]. Фракции с максимальным содержанием антигена вируса ЖЛ по данным ИФА представляли собой лабораторный вариант инактивированной вакцины против ЖЛ. Их стерилизовали фильтрацией (фильтры диаметром 0,45 мкм), определяли концентрацию белка по методу Бредфорда [8], хранили при +4 °С.

Оценка иммуногенности лабораторных серий инактивированной вакцины против вируса ЖЛ. Иммуногенность оценивали на модели мышей BALB/c (самки 4–6-недельного возраста) согласно T. Monath и соавт. [1]. Мышей (7 животных в группе) иммунизировали различными дозами вакцины (по концентрации общего белка – 12,5, 25 и 50 мкг/мл) без адьюванта внутримышечно (бедренные мышцы, по 0,05 мл в каждую конечность, всего 0,1 мл на иммунизацию) 3 раза с интервалом 2 нед. Через 2 нед после 3-й иммунизации

брали кровь из яремной вены. В качестве положительного контроля использовали коммерческую живую вакцину против ЖЛ производства ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» в дозе, предписанной для вакцинации людей (3,2 Ig БОЕ / 0,5 мл) по аналогичной схеме (0,1 мл на одну иммунизацию). В качестве негативного контроля животным вводили ФСБ.

Определение специфических антител (против вируса ЖЛ) класса G (IgG) в сыворотках крови иммунизированных мышей. Использовали собственный вариант ИФА: препарат инактивированной вакцины против вируса ЖЛ сорбировали в лунки иммунопанели (Costar, кат. № 9018, США) в концентрации 10 мкг/мл в карбонат-бикарбонатном буфере, pH 9,6 (Sigma, кат. № C3041-100 CAP) по 0,1 мл/лунка, инкубировали 18 ч при +4 °С. После 3-кратной отмывки 0,05% Tween-20 ФСБ (Т-ФСБ) и блокирования свободных сайтов 1% сывороткой крови телёнка (Gibco, Великобритания) по 0,2 мл/лунка в течение 1 ч при +4 °С и 3-кратной отмывки вносили (0,1 мл/лунка) разведения анализируемых сывороток мышей, начиная с 1 : 100 в Т-ФСБ.

Положительный контроль: референс-сыворотка крови зелёной мартышки, полученная из ВОЗ (WHO Reference Reagent, The 1st International Reference Preparation for Anti-Yellow Fever, Serum, Monkey, NIBSC code: YF, Великобритания).

Отрицательный контроль: сыворотки крови невакцинированных мышей линии BALB/c. Инкубировали 1 ч при +37 °С. После 5-кратной отмывки вносили (0,1 мл/лунка) соответствующий пероксидазный конъюгат – против IgG мыши (Sigma, кат. № A4416-1 ml, США) и против IgG обезьяны для референс-сыворотки (Sigma, кат. № A2054-1 ml, США) в оптимальном разведении (в Т-ФСБ), подобранном шахматным титрованием. Инкубировали 1 ч при +37 °С. После 5-кратной отмывки вносили (0,1 мл/лунка) субстрат ТМВ (Sigma, кат. № T0440-100 ml, США), инкубировали 30 мин в темноте при комнатной температуре. Реакцию останавливали 2М раствором серной кислоты (0,05 мл/лунка). ОП измеряли при 450 нм (Thermo Scientific Multiscan FC ELISA reader, Thermo LabSystems, Финляндия). Результат считали положительным при значении P/N (ОП опыта / ОП контроля в максимальных разведениях сыворотки крови) \geq 2,1 [9].

Определение специфических вирус-нейтрализующих антител (против вируса ЖЛ) в сыворотках крови иммунизированных мышей проводили методом редукции числа бляшек, согласно S. Mercier-Delague и соавт. [10]. Разрешающая доза вируса – 100 БОЕ / 0,1 мл. Параллельно тестировали анти-ВЖЛ референс-сыворотку обезьяны и сыворотки крови невакцинированных мышей линии BALB/c.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения Microsoft Excel.

Результаты

Всего изготовлено и охарактеризовано 8 лабораторных серий вакцины. На рисунке представлен

результат очистки ЖЛ – типичный профиль элюции инактивированного концентрата вируса ЖЛ на колонке с Capto™ Core 700. Из данных рисунка следует, что только фракции 3 и 4 первого пика содержат специфический антиген вируса ЖЛ по данным ИФА (450 нм). Фракции второго (7–13) и третьего пика (18) свободны от специфического антигена. Таким образом, объединённые фракции 3 и 4 представляют собой препарат инактивированной вакцины от ЖЛ. Концентрация общего белка в препаратах вакцины от ЖЛ после очистки на колонке с Capto™ Core 700 составляла в среднем 200 мкг/мл.

В табл. 1 представлены результаты (средние значения) оценки иммуногенности одной из экспериментальных серий инактивированной вакцины от ЖЛ (№ 4) на мышах BALB/c в зависимости от вводимой дозы – количества общего белка.

В качестве положительного контроля использовали референс-сыворотку ВОЗ (YF): титр специфического IgG 1 : 25 600, титр в реакции нейтрализации – 1 : 160. Средний титр вируснейтрализующих антител против коммерческой живой вакцины от ЖЛ составил 1 : 20. Сыворотки мышей линии BALB/c, которым вводили ФСБ в качестве негативного контроля, отрицательны: титры IgG < 1 : 100; титры в реакции нейтрализации < 1 : 10).

Как следует из данных табл. 1, максимальные титры IgG и вируснейтрализующих антител соответствуют дозе общего белка 5,0 мкг / 0,1 мл, т. е. 50,0 мкг/мл или 25 мкг / 0,5 мл (принятый вводимый объём коммерческой живой вакцины от ЖЛ). Протективный вируснейтрализующий титр против вируса ЖЛ ≥ 1 : 10 [10].

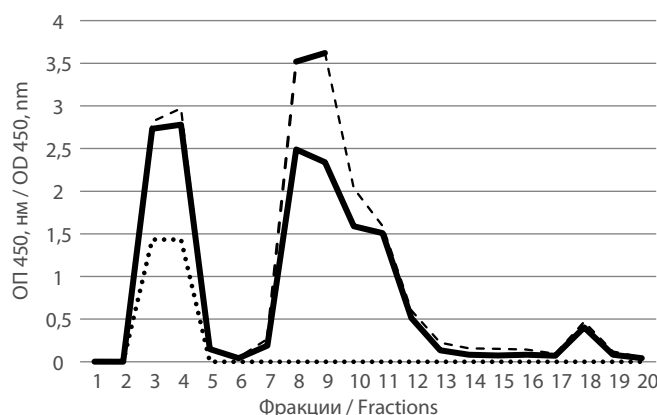
В табл. 2 представлены результаты параллельного титрования (определение специфического IgG в ИФА) сывороток крови мышей линии BALB/c, иммунизированных лабораторной серией № 5 инактивированной вакцины от ЖЛ (5,0 мкг / 0,1 мл) и коммерческой живой вакциной против ЖЛ в предписанной для иммунизации людей дозе (3,2 lg БОЕ / 0,5 мл), но в объёме 0,1 мл на одну иммунизацию (или по общему белку примерно 50 мкг / 0,1 мл).

Из данных табл. 2 следует, что средний уровень титров специфического IgG в сыворотках крови мышей линии BALB/c после иммунизации лабораторной серией инактивированной вакцины против ЖЛ более

чем в 2 раза выше титров IgG после иммунизации коммерческой живой вакциной против ЖЛ.

Обсуждение

Первые попытки создания инактивированной вакцины против ЖЛ были предприняты в 1928 г. (химически инактивированные суспензии селезёнки или печени обезьян, инфицированных диким типом вируса ЖЛ) и в 1935 г. (инактивированные нагреванием, ультрафиолетом или формалином суспензии мозга мышей, куриных эмбрионов, а также сыворотки мышей, инфицированных вирусом ЖЛ), однако они не увенчались успехом вследствие остаточной инфекционности либо низкой иммуногенности вакцинных препаратов [1]. С появлением живой вакцины на основе штамма 17D, которая широко используется до настоящего времени, интерес к разработке инактивированной вакцины резко снизился [1]. Достоинства и недостатки живой вакцины против ЖЛ хорошо изучены, однако новые исследования по разработке инактивированной вакцины против этого заболевания, причём на основе



Профиль элюции инактивированного концентрата вируса жёлтой лихорадки на колонке с гелем Capto™ Core 700.

Непрерывная линия – профиль при 280 нм; пунктирная линия – профиль при 260 нм; точечная линия – профиль при 450 нм (антиген вируса жёлтой лихорадки по данным ИФА).

Elution profile of inactivated yellow fever virus concentrate on Capto™ Core 700 column.

Continuous line – profile at 280 nm; dashed line – profile at 260 nm; dotted line – profile at 450 nm (yellow fever virus antigen according to ELISA).

Таблица 1. Средние значения специфических титров IgG (ИФА) и вируснейтрализующих антител в сыворотках крови мышей линии BALB/c в зависимости от дозы вакцины

Table 1. The average values of specific titers of IgG (ELISA) and virus-neutralizing antibodies in sera of BALB/c mice depending on the vaccine dose

Доза вакцины по белку на 0,1 мл Protein dose of the vaccine per 0.1 ml	Средняя геометрическая титра Geometric mean titer	
	ИФА, специфический IgG ELISA, specific IgG	реакция нейтрализации The neutralization test
5,0 мкг/0,1 мл 5.0 µg/0.1 ml	1 : 11 937	1 : 65,34
2,5 мкг/0,1 мл 2.5 µg/0.1 ml	1 : 5748	1 : 19,97
1,25 мкг/0,1 мл 1.25 µg/0.1 ml	1 : 2990	1 : 9,99

Таблица 2. Определение уровней специфических IgG (ИФА) в сыворотках крови мышей линии BALB/c, иммунизированных лабораторной серией инактивированной вакцины и коммерческой живой вакциной против жёлтой лихорадки (ЖЛ)

Table 2. Determination of specific IgG (ELISA) levels in sera of BALB/c mice immunized with laboratory series of inactivated vaccine and commercial live vaccine against yellow fever (YF)

Образец, № Sample #	Титр IgG: инактивированная вакцина против ЖЛ IgG titer: inactivated vaccine against YF	Образец, № Sample #	Титр IgG: коммерческая живая вакцина против ЖЛ IgG titer: commercial live vaccine against YF
1	1 : 25 600	1	1 : 6400
2	1 : 25 600	2	1 : 12 800
3	1 : 25 600	3	1 : 12 800
4	1 : 12 800	4	1 : 12 800
5	1 : 25 600	5	1 : 6400
6	1 : 25 600	6	1 : 3200
7	1 : 12 800	7	1 : 12 800
Средняя геометрическая титра Geometric mean titer	1 : 21 619	Средняя геометрическая титра Geometric mean titer	1 : 8192

культур клеток, начались относительно недавно, примерно 10 лет назад [1, 5, 6]. Основная цель данных разработок – создание максимально безопасного вакцинного препарата, свободного от побочных нежелательных явлений, которые могут превышать пользу от самой вакцинации, особенно для детей в возрасте до 1 года и людей старше 60 лет [11]. Тенденция к отказу от живых вакцин в пользу инактивированных характерна для современной вакцинопрофилактики. В качестве примера можно привести разработку и внедрение инактивированной полиовирусной вакцины на основе штаммов Сэбина (С-ИПВ) взамен пероральной живой полиовирусной вакцины на основе этих же штаммов, которая с начала 1960-х годов доказала свою эффективность практически во всём мире, но продемонстрировала крайне нежелательные побочные эффекты и создала ряд серьёзных проблем масштабного характера (случаи вакциноассоциированного полиомиелита, формирование нейровирулентных вакцинородственных штаммов) [12].

Представленные в данном сообщении результаты по разработке инактивированной культуральной вакцины против ЖЛ демонстрируют эффективность данного препарата, по крайней мере на уровне оценки иммуногенности с использованием одной модели лабораторных животных – мышей BALB/c. Основываясь на работе Т. Monath и соавт. [1], мы использовали и собственные методические подходы: концентрирование и очистку вируса ЖЛ, определение уровня специфического IgG в сыворотках крови иммунизированных животных (мышей BALB/c) и т.д. Высокая иммуногенность, присущая штамму 17D, которая обеспечила эффективность применения живой вакцины против ЖЛ в эндемичных регионах мира, позволила создать вакцинный препарат на лабораторном уровне с удовлетворительной иммуногенностью. Сравнительный анализ иммуногенности показал, что лабораторный вариант инактивированной вакцины против ЖЛ превосходит коммерческую живую вакцину против ЖЛ как по уровню индуцированных специфических антител класса G (IgG по данным ИФА), так и по уровню вируснейтрализующих антител. Это связано с высокой

степенью очистки полученного вакцинного препарата по сравнению с коммерческой живой вакциной. Важно, что доза инактивированной вакцины по общему белку составляла не более 50 мкг/мл (или 5 мкг / 0,1 мл на одну иммунизацию), что в 10 раз меньше дозы по общему белку для живой коммерческой вакцины (примерно 50 мкг / 0,1 мл на одну иммунизацию) (см. табл. 1). Разумеется, одной лабораторной модели (мыши) недостаточно для завершения доклинических испытаний вакцины. Необходимы исследования иммуногенности с использованием других лабораторных животных, включая приматов [1, 6].

Важно отметить, что культуральная высокоочищенная инактивированная вакцина против ЖЛ даже на лабораторном уровне существенно дороже живой вакцины, поскольку для её производства используются затратные и тонкие технологические подходы – культивирование вируса в культуре клеток, осветление и концентрирование вирусосодержащей культуральной жидкости, инаktivация вируса, хроматографическая очистка и т.д. Технология производства живой вакцины против ЖЛ значительно проще, а следовательно существенно дешевле. Однако оправданная тенденция к замене живой вакцины против ЖЛ инактивированной вакциной требует поиска компромисса между стоимостью вакцинного препарата и его безопасностью (по аналогии с живой полиовирусной вакциной на основе штаммов Сэбина и инактивированной полиовирусной вакциной).

Заключение

Таким образом, представленные результаты по разработке лабораторного варианта инактивированной культуральной вакцины против ЖЛ и оценка её иммуногенности с использованием типичной лабораторной модели (мыши BALB/c) продемонстрировали эффективность полученного препарата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Monath T.P., Lee C.K., Julander J.G., Brown A., Beasley D.W., Watts D.M., et al. Inactivated yellow fever 17D vaccine: Development and nonclinical safety, immunogenicity and protective activity. *Vaccine*. 2010; 28(22): 3827-40.

- DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.03.023>
2. Theiler M., Smith H.H. The use of yellow fever virus modified by *in vitro* cultivation for human immunization. *J. Exp. Med.* 1937; 65(6): 787-800.
DOI: <http://doi.org/10.1084/jem.65.6.787>
 3. Yellow fever vaccine – current supply outlook. UNICEF Supply Division; 2016. Available at: <https://www.unicef.org/supply/sites/unicef.org/supply/files/2019-06/yellow-fever-vaccine-supply-outlook.pdf>
 4. Whittembury A., Ramirez G., Hernandez H., Ropero A.M., Waterman S., Ticona M., et al. Viscerotropic disease following yellow fever vaccination in Peru. *Vaccine.* 2009; 27(43): 5974-81.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.07.082>
 5. Hayes N.B. Is it time for a new yellow fever vaccine? *Vaccine.* 2010; 28(51): 8073-6. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.10.015>
 6. Pereira R.C., Silva A.N., Souza M.C., Silva M.V., Neves P.P., Silva A.A., et al. An inactivated yellow fever 17DD vaccine cultivated in Vero cell culture. *Vaccine.* 2015; 33(35): 4261-8.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.03.077>
 7. Иванов А.П., Клеблеева Т.Д., Иванова О.Е. Опыт применения IgY-технологии для лабораторной диагностики вирусных инфекций. *Вопросы вирусологии.* 2020; 65(1): 21-6.
DOI: <http://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-1-21-26>
 8. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72(1-2): 248-54.
DOI: <http://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
 9. Ivanov A.P., Bashkirtsev V.N., Tkachenko E.A. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of arenaviruses. *Arch. Virol.* 1981; 67(1): 71-4.
DOI: <http://doi.org/10.1007/BF01314603>
 10. Mercier-Delarue S., Durier C., Colin de Verdière N., Poveda J.D., Meiffredy V., Garcia MDF, et al. Screening test for neutralizing antibodies against yellow fever virus, based on flavivirus pseudotype. *PLoS One.* 2017; 12(5): e0177882.
DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0177882>
 11. Lindsey N.P., Schroeder B.A., Miller E.R., Braun M.M., Hinkley A.F., Marano N., et al. Adverse event reports following yellow fever vaccination. *Vaccine.* 2008; 26(48): 6077-82.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.09.009>
 12. Alexander L.N., Seward J.F., Santibanez T.A., Pallansch M.A., Kew O.M., Prevots D.R., et al. Vaccine policy changes and epidemiology of poliomyelitis in the United States. *JAMA.* 2004; 292(14): 1696-701.
DOI: <http://doi.org/10.1001/jama.292.14.1696>
- REFERENCES**
1. Monath T.P., Lee C.K., Julander J.G., Brown A., Beasley D.W., Watts D.M., et al. Inactivated yellow fever 17D vaccine: Development and nonclinical safety, immunogenicity and protective activity. *Vaccine.* 2010; 28(22): 3827-40.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.03.023>
 2. Theiler M., Smith H.H. The use of yellow fever virus modified by *in vitro* cultivation for human immunization. *J. Exp. Med.* 1937; 65(6): 787-800.
DOI: <http://doi.org/10.1084/jem.65.6.787>
 3. Yellow fever vaccine – current supply outlook. UNICEF Supply Division; 2016. Available at: <https://www.unicef.org/supply/sites/unicef.org/supply/files/2019-06/yellow-fever-vaccine-supply-outlook.pdf>
 4. Whittembury A., Ramirez G., Hernandez H., Ropero A.M., Waterman S., Ticona M., et al. Viscerotropic disease following yellow fever vaccination in Peru. *Vaccine.* 2009; 27(43): 5974-81.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.07.082>
 5. Hayes N.B. Is it time for a new yellow fever vaccine? *Vaccine.* 2010; 28(51): 8073-6. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.10.015>
 6. Pereira R.C., Silva A.N., Souza M.C., Silva M.V., Neves P.P., Silva A.A., et al. An inactivated yellow fever 17DD vaccine cultivated in Vero cell culture. *Vaccine.* 2015; 33(35): 4261-8.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.03.077>
 7. Ivanov A.P., Klebleeva T.D., Ivanova O.E. Experience of application of IgY-technology for laboratory diagnosis of viral infections. *Voprosy virusologii.* 2020; 65(1): 21-6.
DOI: <http://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-1-21-26> (in Russian)
 8. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72(1-2): 248-54.
DOI: <http://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
 9. Ivanov A.P., Bashkirtsev V.N., Tkachenko E.A. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of arenaviruses. *Arch. Virol.* 1981; 67(1): 71-4.
DOI: <http://doi.org/10.1007/BF01314603>
 10. Mercier-Delarue S., Durier C., Colin de Verdière N., Poveda J.D., Meiffredy V., Garcia MDF, et al. Screening test for neutralizing antibodies against yellow fever virus, based on flavivirus pseudotype. *PLoS One.* 2017; 12(5): e0177882.
DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0177882>
 11. Lindsey N.P., Schroeder B.A., Miller E.R., Braun M.M., Hinkley A.F., Marano N., et al. Adverse event reports following yellow fever vaccination. *Vaccine.* 2008; 26(48): 6077-82.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.09.009>
 12. Alexander L.N., Seward J.F., Santibanez T.A., Pallansch M.A., Kew O.M., Prevots D.R., et al. Vaccine policy changes and epidemiology of poliomyelitis in the United States. *JAMA.* 2004; 292(14): 1696-701.
DOI: <http://doi.org/10.1001/jama.292.14.1696>