



Разработка метода количественного определения вирусной РНК для контроля специфической активности вакцины против геморрагической лихорадки с почечным синдромом

Егорова М.С.¹, Курашова С.С.¹, Ишмухаметов А.А.^{1,2}, Баловнева М.В.¹, Девяткин А.А.³, Сафонова М.В.⁴, Ожерелков С.В.¹, Хапчаев Ю.Х.¹, Балкина А.С.¹, Белякова А.В.¹, Дзагурова Т.К.¹, Ткаченко Е.А.¹

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

²Институт трансляционной медицины и биотехнологии, ФГАОУ ВО Первый Московский государственный университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, 119991, Москва, Россия;

³Институт молекулярной медицины, ФГАОУ ВО Первый Московский государственный университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, 119991, Москва, Россия;

⁴ФКУЗ «Противочумный центр» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 119121, Москва, Россия

Введение. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) занимает ведущее место среди природно-очаговых болезней человека в Российской Федерации. Этиотропная терапия заболевания в настоящее время отсутствует. Наиболее действенным методом контроля этой инфекции может стать вакцинопрофилактика. Основными критериями оценки инактивированной вакцины являются её иммуногенность и специфическая активность.

Цель исследования – разработка чувствительной и специфичной методики проведения ПЦР в реальном времени с целью количественного определения вирусной РНК в инактивированной вакцине, а также установление корреляции между содержанием генетического материала вируса и выраженностью иммуногенности.

Материал и методы. В качестве диагностической мишени для олигонуклеотидов и флуоресцентных зондов выбраны фрагменты L-сегмента вакцинных штаммов вирусов ГЛПС Пуумала, Хантаан, Сочи. Иммуногенность экспериментальных вакцин контролировали по индукции нейтрализующих антител (нАТ) в ответ на иммунизацию мышей линии BALB/c.

Результаты. Разработана высокоспецифичная, чувствительная методика проведения ПЦР в реальном времени, имеющая высокий показатель воспроизводимости. Аналитическая чувствительность составила для вирусов Пуумала $1,24 \pm 1,5 \times 10^2$ копий/мл, Хантаан – $1,16 \pm 1,4 \times 10^2$ копий/мл, Сочи – $1,32 \pm 1,8 \times 10^2$ копий/мл при содержании вируса $1,5 \pm 0,5$, $1,8 \pm 0,5$ и $2,2 \pm 0,5$ Ig ФОЕ/мл соответственно. Показано, что количество вирусной РНК в составе экспериментальных вакцинных препаратов, инактивированных β-пропиолактоном (β-ПЛ), пропорционально титру нАТ в ответ на иммунизацию.

Обсуждение. Установлено, что способ инактивирования вируса влияет на выявляемое количество копий РНК, не оказывая при этом воздействия на иммуногенность, что указывает на равнозначное повреждение белков-иммуногенов при разной степени повреждения вирусной РНК. Прямая зависимость между содержанием копий нуклеиновой кислоты вируса и иммуногенностью позволяет использовать этот критерий для дозирования вакцинного препарата.

Заключение. Разработанная система оценки количественного содержания вирусной РНК делает перспективным её применение для контроля специфической активности вакцины против ГЛПС.

Ключевые слова: геморрагическая лихорадка с почечным синдромом; инактивированная вакцина; полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ); формалин; β-пропиолактон (β-ПЛ); ультрафиолет

Для цитирования: Егорова М.С., Курашова С.С., Ишмухаметов А.А., Баловнева М.В., Девяткин А.А., Сафонова М.В., Ожерелков С.В., Хапчаев Ю.Х., Балкина А.С., Белякова А.В., Дзагурова Т.К., Ткаченко Е.А. Разработка метода количественного определения вирусной РНК для контроля специфической активности вакцины против геморрагической лихорадки с почечным синдромом. *Вопросы вирусологии.* 2021; 66 (1): 65-73. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-30>

Для корреспонденции: Егорова Мария Сергеевна, канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории геморрагических лихорадок, ФГБНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН», 108819, Москва, Россия. E-mail: centrglps@yandex.ru

Участие авторов: Егорова М.С. – разработка концепции и дизайна исследования, анализ данных, эксперименты с животными, статистический анализ, написание текста; Курашова С.С. – разработка концепции и дизайна исследования, анализ данных, эксперименты с животными, статистический анализ, написание текста; Ишмухаметов А.А. – разработка концепции и утверждение окончательного варианта статьи; Баловнева М.В. – получение очищенного вирусного материала, анализ иммунного статуса; Девяткин А.А. – полногеномное секвенирование штаммов, подбор праймеров и зондов; Сафонова М.В. – подбор праймеров и зондов; Ожерелков С.В. – получение очищенного вирусного материала, анализ иммунного статуса; Хапчаев Ю.Х. – получение очищенного вирусного материала, анализ

иммунного статуса; Балкина А.С. – техническая поддержка и редактирование текста; Белякова А.В. – техническая поддержка и редактирование текста; Дзагурова Т.К. – разработка концепции и дизайна исследования, анализ данных, написание текста; Ткаченко Е.А. – разработка концепции и утверждение окончательного варианта статьи.

Финансирование. Исследование выполнено по теме Госзадания № 0837-2019-0006.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 12.11.2020

Принята в печать 18.02.2021

Real-time PCR assay development for the control of vaccine against hemorrhagic fever with renal syndrome

Maria S. Egorova¹, Svetlana S. Kurashova¹, Aydar A. Ishmukhametov^{1,2}, Maria V. Balovneva¹, Andrei A. Deviatkin³, Maria V. Safonova⁴, Sergei V. Ozherelkov¹ Yusuf Kh. Khapchaev¹, Alexandra S. Balkina¹, Alla V. Belyakova¹, Tamara K. Dzagurova¹, Evgeniy A. Tkachenko¹

¹FSBSI «M.I. Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences», 108819, Moscow, Russia;

²Institute for Translational Medicine and Biotechnology, FSAEI HE I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of the Health of Russia, 119991, Moscow, Russia;

³Institute of Molecular Medicine, FSAEI HE I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of the Health of Russia, 119991, Moscow, Russia;

⁴FSHI «Plague Control Center» of the Federal Service for Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rospotrebnadzor), 119121, Moscow, Russia

Introduction. Hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) holds a leading place among natural focal human diseases in Russian Federation. There is no etiotropic therapy for the disease now. The vaccine prophylaxis is the most effective method to control this infection. The main criteria for inactivated vaccines evaluation are its immunogenicity and specific activity.

The study **purposes** were to develop a sensitive and specific real-time PCR method for viral RNA quantification in the inactivated vaccine and to study the correlation between the viral RNA amount and vaccine immunogenicity.

Material and methods. L-segment fragments of the Puumala, Hantaan, and Sochi vaccine strains were selected as diagnostic targets for oligonucleotides and fluorescent probes. The immunogenicity of experimental vaccines was determined by the induction of neutralizing antibodies in BALB/c mice.

Results. A highly specific, sensitive and reproducible real-time PCR method has been developed. The analytical sensitivity was $1.24 \pm 1.5 \times 10^2$ copies/ml for Puumala virus; $1.16 \pm 1.4 \times 10^2$ copies/ml for Hantaan; $1.32 \pm 1.8 \times 10^2$ copies/ml for Sochi, with a virus content of 1.5 ± 0.5 lg FFU/ml; 1.8 ± 0.5 lg FFU/ml and 2.2 ± 0.5 lg FFU/ml, respectively. The viral RNA amount in experimental vaccine preparations inactivated with β -propiolactone was proportional to the neutralizing antibodies titer observed in mice following the immunization.

Discussion. It was found that different virus inactivators differently affects the detected viral RNA amount, but not the vaccine immunogenicity, which indicates the same degree of the immunogenic proteins damage. The direct relationship between the viral RNA copy number and vaccine immunogenicity makes it possible to use this criterion for vaccine dosage preparation.

Conclusion. The developed method for viral RNA quantification is a promising tool for the specific activity control of the HFRS vaccine.

Key words: *hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS); inactivated vaccine; real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR); formalin; β -propiolactone (β -PL); ultraviolet*

For citation: Egorova M.S., Kurashova S.S., Ishmukhametov A.A., Balovneva M.V., Deviatkin A.A., Safonova M.V., Ozherelkov S.V., Khapchaev Yu.Kh., Balkina A.S., Belyakova A.V., Dzagurova T.K., Tkachenko E.A. Real-time PCR assay development for the control of vaccine against hemorrhagic fever with renal syndrome. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2021; 66(1): 65-73 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-30>

For correspondence: Maria S. Egorova, Ph.D. (Biol.), Senior Researcher of the Laboratory of Hemorrhagic Fevers, FSBSI «M.I. Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences», 108819, Moscow, Russia. E-mail: centrglps@yandex.ru

Information about the authors:

Egorova M.S., <https://orcid.org/0000-0002-6416-2573>

Kurashova S.S., <https://orcid.org/0000-0001-9934-699X>

Ishmukhametov A.A., <https://orcid.org/0000-0001-6130-4145>

Balovneva M.V., <https://orcid.org/0000-0003-2198-7521>

Deviatkin A.A., <https://orcid.org/0000-0003-0789-4601>

Safonova M.V., <https://orcid.org/0000-0002-5579-5694>

Ozherelkov S.V., <https://orcid.org/0000-0001-9778-0485>

Khapchaev Yu.Kh., <https://orcid.org/0000-0003-1613-5228>

Balkina A.S., <https://orcid.org/0000-0002-9704-7774>

Belyakova A.V., <https://orcid.org/0000-0003-4363-6399>

Dzagurova T.K., <https://orcid.org/0000-0002-6656-1682>

Tkachenko E.A., <https://orcid.org/0000-0002-6829-1241>

Contribution: Egorova M.S. – concept and design of the study, data analysis, experiments with animals, statistical analysis, writing of the text; Kurashova S.S. – concept and design of the study, data analysis, experiments with animals, statistical analysis, writing of the text; Ishmukhametov A.A. – concept and approval of the final version of the article; Balovneva M.V. – purified viral material obtaining, analysis of the immune status; Deviatkin A.A. – full genome sequencing of the vaccine strains, selection of the primers and probes; Safonova M.V. – selection of the primers and probes; Ozherelkov S.V. – purified viral material obtaining, analysis of the immune status; Khapchaev Yu.Kh. – purified viral material obtaining, analysis of the immune status; Balkina A.S. – technical support and editing of the text; Belyakova A.V. – technical support and editing of the text; Dzagurova T.K. – concept and approval of the final version of the article; Tkachenko E.A. – concept and approval of the final version of the article.

Acknowledgment. The study was performed under the topic of Government Order No. 0837-2019-0006.

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

Received 12 November 2020

Accepted 18 February 2020

Введение

Возбудители геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС), относящиеся к роду *Orthohantavirus* (семейство *Hantaviridae*, отряд *Bunyavirales*), представляют собой группу оболочечных РНК-вирусов с негативным геномом. Они вызывают заболевание человека, известные как геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) в Европе и Азии и хантавирусный пульмональный синдром (ХПС) на территории Северной и Южной Америки [1–3].

Геном хантавирусов состоит из односпиральной 3-сегментированной РНК отрицательной полярности: большой L-сегмент кодирует вирусную РНК-полимеразу, средний (M-сегмент) кодирует 2 поверхностных гликопротеина Gn/Gc и малый S-сегмент – вирусный нуклеокапсидный белок (N) [4–6].

ГЛПС занимает ведущее место среди природно-очаговых болезней в Российской Федерации. Около 98% случаев ассоциировано с вирусом Пуумала (ПУУ), остальные – с вирусами Хантаан (ХТН), Сочи (СОЧИ), Амур, Сеул и Куркино [7].

Специфического лечения хантавирусных инфекций, способствующего эффективной элиминации возбудителя, на сегодняшний день нет; средства неспецифической профилактики часто малоэффективны [8]. В этой связи вакцинопрофилактика этих заболеваний остаётся актуальной задачей. К настоящему времени коммерческие инактивированные цельновирионные вакцины против ГЛПС производятся в Китайской Народной Республике (КНР) и Республике Корея на основе разновидностей Хантаан и Сеул [9], однако они не обладают перекрестной защитой против вируса Пуумала, ответственного за подавляющее большинство случаев болезни в Европе и России. Вследствие одновременной циркуляции на территории РФ хантавирусов ПУУ, ХТН и СОЧИ (генотип ортохантавируса Добрава/Белград) [7] наиболее эффективным может стать поливалентный инактивированный цельновирионный вакцинный препарат.

Специфическая активность и иммуногенность служат важнейшими критериями оценки инактивированной вакцины. В технологическом цикле производства после инактивирования возбудителя специфическую активность контролируют, как правило, по количественному содержанию целевого белка-иммуногена либо по числу копий РНК в единице объёма [10].

Цель исследования состояла в разработке чувствительного и специфичного количественного метода обнаружения РНК вакцинных штаммов в инактивированных вакцинах против ГЛПС, а также установлении корреляции между содержанием вирусного генетического материала и иммуногенностью.

Материал и методы

Характеристика вакцинного материала. Культура клеток и вирусы. Для получения вирусосодержащего субстрата использовали линию перевиваемых клеток почек зелёной мартышки (*Cercopithecus aethiops*) Vero, полученную из клеточного банка Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) (WHO Vero cell bank ECACC, Accession number 991042), аттестованную и рекомендованную ВОЗ и Государственным научно-исследовательским институтом стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича (ГИСК) ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России в качестве возможного субстрата для производства инактивированных цельновирионных вакцинных препаратов.

Разработку контроля вирусной РНК методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) осуществляли на препаратах экспериментальных моновакцин (далее – вакцин), приготовленных на основе вакцинных штаммов вирусов Пуумала (PUU-TKD/VERO) – ВАК-ПУУ, Хантаан (HTN-P88/VERO) – ВАК-ХТН и Сочи (DOB-SOCHI/VERO) – ВАК-СОЧИ по ранее описанной методике [11] с применением различных способов инактивирования: формалин (Ф) в конечном разведении 1 : 4000 в течение 35 сут; β-пропиолактон (β-ПЛ) в конечном разведении 1 : 6000 на протяжении 180 мин; ультрафиолетовое (УФ) излучение при толщине слоя 0,3 см на расстоянии 24 см от источника коротковолновых УФ-лучей с длиной волны 253,7 нм в течение 3 мин [12].

Полногеномные сиквенсы указанных штаммов зарегистрированы в базе данных GenBank под номерами: PUU-TKD/VERO: S – MH251331, M – MH251332, L – MH251333; HTN-P88/VERO: S – MH251328, M – MH251329, L – MH251330 и DOB-SOCHI/VERO: S – MH251334, M – MH251335, L – MH251336.

Оценку количественного содержания вирусного генетического материала выполняли на следующих этапах: 1-й – очищенный концентрат моновалентных препаратов до инактивирования, 2-й – аналогичный

концентрат после инактивирования и 3-й – полуфабрикат трёхвалентной вакцины.

Контроль содержания вирусной РНК методом ПЦР-РВ. В качестве диагностической мишени для олигонуклеотидов и флуоресцентных зондов выбраны фрагменты L-сегментов вакцинных штаммов вирусов ПУУ, ХТН и СОЧИ. При выборе праймеров и зондов проводили анализ полногеномных сиквенсов вакцинных штаммов, а также геномов вирусов ПУУ, ХТН и СОЧИ, представленных в GenBank NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), при помощи программы MEGA-X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) с применением стандартных требований. Параметры праймеров рассчитывали в онлайн-сервисе OligoCalc: Oligonucleotide Properties Calculator (<http://biotoools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>); термодинамические характеристики флуоресцентных зондов и их вторичные структуры оценивали с помощью The mfold Web Server (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold/DNA-Folding-Form>). Олигонуклеотиды содержали флуоресцентную метку карбоксифлуоресцеин (FAM) на 5'- и гаситель флуоресценции (BHQ2) – на 3'-конце.

Синтез праймеров и зондов проводили в ЗАО «Евроген» (Россия). Разработанные зонды и праймеры представлены в **табл. 1**.

Выделение РНК и проведение ПЦР-РВ. РНК выделяли из хроматографически очищенного вирусного концентрата до инактивирования (контроль), а также после инактивации (Ф, β-ПЛ, УФ) методом хлороформ-фенольной экстракции [13] с применением коммерческого препарата TRI Reagent® («Sigma-Aldrich», США). Комплементарную ДНК (кДНК) получали путём обратной транскрипции в общем объёме реакционной смеси 20 мкл, содержащей 5× Reverse Transcription (RT) Buffer («Thermo Fisher Scientific», США), 2,5 мМ смеси 4-х немодифицированных высокоочищенных 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфатов – dNTPs («СибЭнзим», Россия), 20 пМ праймера N6 Random («СибЭнзим»), 1 U обратной транскриптазы Maxima Reverse Transcriptase 200 е.а./мкл («Thermo Fisher Scientific») и 10 мкл раствора РНК. Реакцию проводили при следующих условиях: 10 мин при 25 °С, 30 мин при 42 °С и 6 мин – при 96 °С. Объём реакционной смеси для ПЦР-РВ был

равен 25 мкл и включал 10× Hot Start Buffer («Thermo Fisher Scientific»), 2,5 мМ dNTPs, 5 пМ каждого праймера и зонда («Евроген», Россия) (**табл. 1**), 2 е.а. ДНК-полимеразы HS Taq («Thermo Fisher Scientific»), 2 мкл кДНК и стерильную воду. Режим проведения реакции был следующим: 2 мин при 95 °С и затем 40 циклов по 15 с при 95 °С, 40 с при 55 °С и 30 с – при 72 °С. Амплификацию и детекцию в реальном времени выполняли на амплификаторе AriaMx 96 Bioanalyzer («Agilent Technologies», США).

Стандартная кривая. При постановке ПЦР-РВ осуществляли 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) (**рис. 1**). Данные кривые получены амплификацией серии 10-кратных серийных разведений стандарта со средними значениями C_q с учётом отрицательных и положительных контролей. Подобным же образом РНК из исходного материала серийно разводили для установления корреляции между C_q и концентрацией вируса, выраженной в фокусобразующих единицах (ФОЕ) на 1 мл. Стандарты готовились из предельных 10-кратных разведений генетического материала вакцинных штаммов ПУУ, ХТН и СОЧИ с известной концентрацией возбудителя (ФОЕ/мл). В ходе исследования определяли количество вирусной нуклеиновой кислоты в 1 мл разведённого препарата и соотносили с величиной ФОЕ/мл.

Концентрацию стандарта (число копий/мл) устанавливали методом цифровой ПЦР (droplet-digital PCR, ddPCR) в системе QX200 Droplet Digital PCR System («Bio-Rad Laboratory», США), затем проводили пересчёт на количество копий/мл, полученное при ПЦР-РВ. Далее инактивированные образцы анализировали с помощью стандартных кривых для количественного определения целевой РНК вируса.

Специфичность системы. Специфичность выбранных зондов и праймеров оценивали посредством тестирования РНК, выделенной из исходного раствора моновакцины, с другими патогенными для человека хантавирусами: Пуумала (штаммы CG-Kazan-79, Halnaas 83-L20 и Sotkamo); Хантаан (штаммы Ли 83-

Таблица 1. Праймеры и зонды

Table 1. Primers and probes

Штамм Strain	Название праймера/зонда Name of the primer/probe	Последовательность 5'→3' 5'→3' sequence
PUU-TKD/VERO	Ufa_Z 3780	BHQ1-TGC TCC 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
DOB-SOCHI/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
HTN-P88/VERO	Hantaan_Z 3770	BHQ1-TAC AGC ACC AGG TAT GGT GAA CCA-FAM
	Hantaan_F 3750	GTG TAC TAG TAA AGT TGA ACG GTT GT
	Hantaan_R 3790	GTG TAT CAG CAT GCT TGA CTT GCA

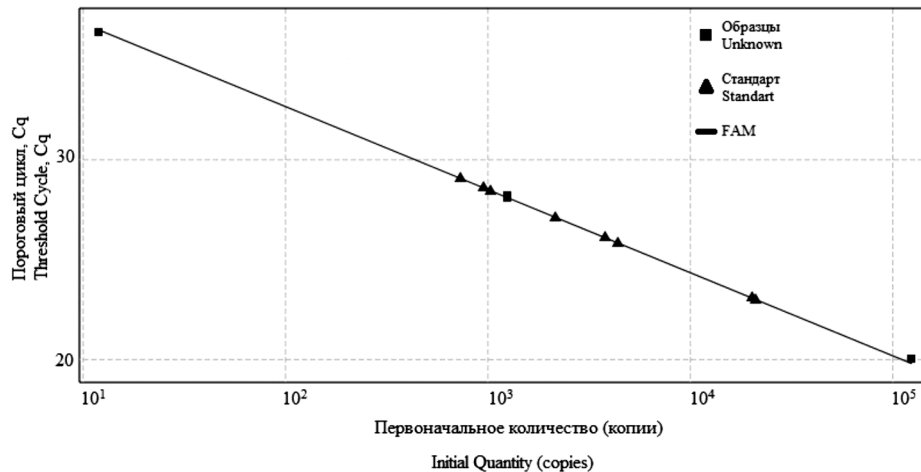


Рис. 1. Стандартная кривая зависимости порогового цикла от исходной концентрации РНК вируса Пуумала. Угол наклона (slope) $y = -3,44x + 39,59$, коэффициент корреляции (R^2) = 0,998, эффективность (E) = 110% линейной регрессии кривой. FAM – карбокси-флуоресцеин (флуоресцентная метка).

Fig. 1. Standard curve of the threshold cycle dependence on the initial concentration of Puumala virus RNA. The slope $y = -3.44x + 39.59$, correlation coefficient (R^2) = 0.998, and efficiency (E) = 110% of the linear regression curve. FAM is carboxyfluorescein (fluorescent tag).

61 и 76-118); Добрава (Белград-1); Сеул (SR-11 и A9); Sin Nombre (штамм CC/107), а также представителями других семейств: вирусами Крымской-Конго геморрагической лихорадки (штамм IbAg 10200); Денге (штаммы 8356/10, 4397/11, 3140/09 и 3274/09); японского энцефалита (Накаяма); клещевого энцефалита (Hochosterwitz); Западного Нила (MgAn 786/6/1995); Зика (MR766); Усуту (G39); жёлтой лихорадки (Asibi); Чикунгунья (23161) и Ласса (штамм Josiah).

Контроль специфической активности методом иммуноферментного анализа (ИФА). Для определения антигенов хантавирусов использовали тест-системы «ХАНТАГНОСТ» (ФГБНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН», ФНЦИРИП) в соответствии с инструкцией производителя, а также разработанную «in-house» ХАНТА-N [14].

Титрование фокусобразующих единиц вируса. ФОЕ выявляли на монослое клеток Vero E6 по описанному ранее методу [15]. Количество инфицированных колоний подсчитывали визуально и выражали титр вируса в lg ФОЕ/мл.

Контроль иммуногенности. Иммуногенность экспериментальных вакцинных препаратов против ГЛПС с разными способами инаktivирования контролировали в опытах на клинически здоровых половозрелых мышах-самках линии BALB/c массой тела 18–20 г, полученных из филиала «Андреевка» ФГБНУ «Научный центр биомедицинских технологий» Федерального медико-биологического агентства (ФМБА) России. Исследования на животных проводили в соответствии с этическими принципами, установленными Европейской конвенцией по защите позвоночных животных и этическим комитетом ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН.

Животным опытных групп вводили исследуемый препарат в дозе 0,5 мл готовой формы экспериментальных вакцин в неразведённом виде (н/р) и в раз-

дениях 3-кратно внутримышечно с 2-недельными интервалами. Животным контрольной группы вводили в том же объёме 0,9% раствор натрия хлорида (К-ФР).

Мыши BALB/c были распределены по группам в соответствии с вводимыми экспериментальными препаратами:

- 1 – ВАК-ПУУ-Ф, 2 – ВАК-ПУУ-β-ПЛ, 3 – ВАК-ПУУ-УФ;
- 4 – ВАК-ХТН-Ф, 5 – ВАК-ХТН-β-ПЛ, 6 – ВАК-ХТН-УФ;
- 7 – ВАК-СОЧИ-Ф, 8 – ВАК-СОЧИ-β-ПЛ, 9 – ВАК-СОЧИ-УФ.

Реакция нейтрализации (РН/ФОЕ₅₀). Нейтрализующие антитела (нАТ) определяли в реакции нейтрализации по 50%-ному подавлению фокусобразующих единиц (РН/ФОЕ₅₀) в клеточной культуре Vero E6 по описанной ранее методике [15].

Статистический анализ. Достоверность результатов исследования оценивали в 3-х сериях экспериментов в идентичных условиях. Все данные проанализированы в программе GraphPad Prism v. 8.2.0. Статистическую значимость определяли с использованием одностороннего дисперсионного анализа (ANalysis Of VAriance, ANOVA) при помощи теста множественных сравнений Тьюка для сравнения средних значений каждого набора данных, при этом величины $p < 0,05$ были отнесены к категории значимых. Статистическая достоверность указывалась как ns (несущественно); $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,005$ и $p < 0,0001$.

Результаты

Флуоресценция по FAM регистрировалась только при исследовании РНК вакцинных штаммов ПУУ, ХТН и СОЧИ. При тестировании остальных возбудителей (включая другие штаммы ПУУ, ХТН и СОЧИ) зафиксирован отрицательный результат, что свидетельствует об отсутствии ложноположительных результатов и высокой специфичности метода.

Для сравнения чувствительности ПЦР-РВ и ИФА использованы образцы последовательных разведений вакцинных штаммов вирусов ПУУ, ХТН и СОЧИ. Чувствительность ПЦР-РВ составила для ПУУ – $1,2 \pm 1,5 \times 10^2$ копий/мл, что соответствует $1,5 \pm 0,5$ lg

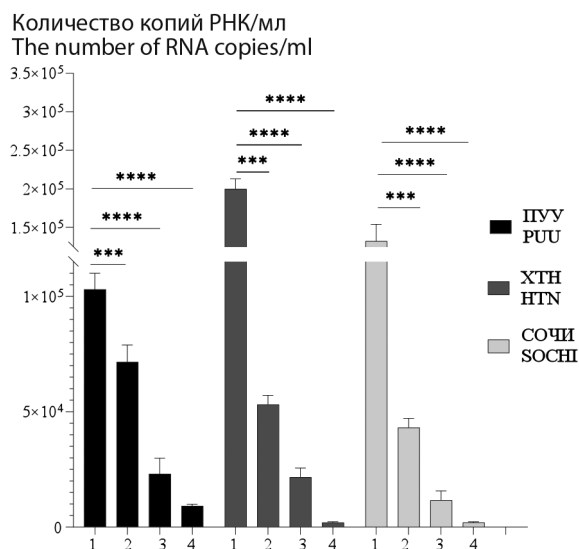


Рис. 2. Анализ зависимости количества копий РНК от инактивирующего агента/мл. Представлены совокупные результаты 3-х независимых экспериментов с использованием одностороннего дисперсионного анализа (ANOVA) с тестом множественных сравнений Тьюка. 1 – контроль; 2 – β-пропиолактон; 3 – формалин; 4 – УФ-излучение.

Примечание. *** – $p < 0,005$, **** – $p < 0,0001$.

Fig. 2. Analysis of the dependence of the number of RNA copies on the inactivating agent/ml. The combined results of 3 independent experiments using a one-sided analysis of variance (ANOVA) with Tukey’s multiple comparisons test are shown. 1 – control; 2 – β-propiolactone; 3 – formalin; 4 – UV radiation.

Note. *** – $p < 0.005$, **** – $p < 0.0001$.

ФОЕ/мл; для ХТН – $1,16 \pm 1,4 \times 10^2$ копий/мл, что соответствует $1,8 \pm 0,5$ lg ФОЕ/мл и для СОЧИ – $1,32 \pm 1,8 \times 10^2$ копий/мл ($2,2 \pm 0,5$ lg ФОЕ/мл). Чувствительность метода ИФА была существенно ниже: для вируса ПУУ – 1 : 256, соответствуюя 3,5 lg ФОЕ/мл, для ХТН – 1 : 128, соответствуюя 2,8 lg ФОЕ/мл, и для СОЧИ – 1 : 128 (3,2 lg ФОЕ/мл) (табл. 2). Показатели C_q были линейными и коррелировали с концентрацией РНК вирусов ПУУ, ХТН и СОЧИ; значение коэффициента корреляции $R^2 = 0,99$. Сравнение результатов ПЦР-РВ, ИФА и ФОЕ продемонстрировало, что разработанный метод молекулярно-генетического определения присутствия вируса обладает большей чувствительностью относительно ИФА. Эксперимент выполняли в 3-х повторах с соответствующими отрицательными контролями, измеряя величину стандартного отклонения ($M \pm m$, где M – среднее арифметическое, m – стандартная ошибка среднего). На основании этих данных выявлена корреляция между количеством ФОЕ/мл и числом копий РНК/мл.

Количественный контроль содержания вирусной РНК в инактивированной вакцине методом ПЦР-РВ. Результаты оценки количественного содержания РНК вирусов ПУУ, ХТН и СОЧИ показали совпадение концентрации возбудителя в образцах со стандартами, содержащими известное количество РНК этих агентов (рис. 1). Данная кривая использована для определения уровня количества копий РНК в вакцинном полуфабрикате после инактивирования (табл. 3).

На фоне воздействия инактиваторов на РНК вирусов ПУУ, ХТН и СОЧИ была выявлена статистически значимая разница между контрольными образцами (до инактивирования) и образцами, инактивированными разными способами ($p < 0,0001$) (рис. 2). Максимальные потери РНК наблюдались после воздействия УФ, минимальные – после β-ПЛ. Следует отметить, что данные потери неизбежны и обусловлены механизмом действия инактивирующих агентов.

Таблица 2. Сравнение чувствительности методов ПЦР-РВ и ИФА

Table 2. Comparison of sensitivity of real-time qPCR and ELISA

Пуумала Puumala			Хантаан Hantaan			Сочи Sochi		
Титр вируса, lg ФОЕ/мл Virus titer, lg FFU/ml	ИФА ELISA	ПЦР-РВ qPCR	Титр вируса, lg ФОЕ/мл Virus titer, lg FFU/ml	ИФА ELISA	ПЦР-РВ qPCR	Титр вируса, lg ФОЕ/мл Virus titer, lg FFU/ml	ИФА ELISA	ПЦР-РВ qPCR
	Титр антигена* Antigen titer	копии/мл copies/ml		Титр антигена** Antigen titer	копии/мл copies/ml		Титр антигена** Antigen titer	копии/мл copies/ml
5,5	1 : 2048	$1,24 \times 10^5$	5,8	1 : 4096	$3,06 \times 10^5$	5,2	1 : 2048	$1,01 \times 10^5$
4,5	1 : 1024	$3,55 \times 10^4$	4,8	1 : 1024	$2,16 \times 10^4$	4,2	1 : 1024	$2,25 \times 10^4$
3,5	1 : 256	$6,91 \times 10^3$	3,8	1 : 1024	$9,53 \times 10^3$	3,2	1 : 128	$5,01 \times 10^3$
2,5	н.о. n.d.	$8,58 \times 10^2$	2,8	1 : 128	$3,39 \times 10^2$	2,2	н.о. n.d.	$1,32 \times 10^2$
1,5	н.о. n.d.	$1,24 \times 10^2$	1,8	н.о. n.d.	$1,16 \times 10^2$	1,2	н.о. n.d.	n.s.
0,5	н.о. n.d.	n.s.	0,8	н.о. n.d.	n.s.	0,2	н.о. n.d.	n.s.

Примечание. * – использована ИФА тест-система «ХАНТАГНОСТ»; ** – использована ИФА тест-система «ХАНТА-N»; н.о. – не определялось; n.s. – отсутствует сигнал флюоресценции

Note. * – ELISA test system «HANTAGNOST» was used; ** – ELISA test system «HANTA-N» was used; n.d. – not defined; n.s. – no fluorescence signal

Контроль иммуногенности. Для контроля иммуногенности экспериментальных вакцинных препаратов исходно использовали 1 пул вирусного сбора с известным титром, инактивированный различными способами.

После иммунизации мышей линии BALB/c препаратами вакцин, инактивированными формалином, β -ПЛ и УФ-лучами, побочных эффектов (как локальных, так и общих) не наблюдалось. При определении иммуногенности методом РН/ФОЕ₅₀ в группах отрицательного контроля титр нАТ не превышал 2,32 log₂ и был установлен в качестве предела отсечения. За приемлемый уровень индукции нАТ принимали показатель со средним геометрическим титром (СГТ) выше 4,32 log₂.

Не было статистически значимой разницы в титрах нАТ после иммунизации животных моновакцинами, инактивированными формалином, β -ПЛ и УФ-лучами (табл. 3). Несмотря на различное количество копий РНК, выявляемых в дозе инактивированной разными способами вакцины, иммунный ответ не имел существенных отличий (титры нАТ статистически значимо не различались), что свидетельствует о сохранности иммуногенных эпитопов при испытанных способах инактивирования.

С целью выявления корреляции между количеством копий РНК и иммуногенностью мыши BALB/c были иммунизированы ВАК-ПУУ, инактивированной β -ПЛ

(ВАК-ПУУ- β -ПЛ), в соответствующих разведениях. В каждом из них определяли количество копий генетического материала на 1 мл и соотносили с титром выявленных после иммунизации нАТ. Результаты опытов показали прямую зависимость между содержанием копий РНК и титром нАТ (табл. 4).

Обсуждение

Ранее контроль специфической активности вакцин осуществлялся посредством определения вирусных антигенов методом ИФА с использованием моноклональных антител к N- и/или G-белкам хантавирусов [14]. В данном исследовании представлена более чувствительная и технологичная методика оценки данной характеристики – ПЦР-РВ на основе полногеномного сиквенса вакцинных штаммов, которая продемонстрировала высокие показатели специфичности, чувствительности и повторяемости для количественного определения соответствующих штаммов в образцах инактивированного вакцинного препарата. В отличие от традиционных методов (ИФА) ПЦР-РВ обеспечивает высокую воспроизводимость количественного измерения.

Показана достоверная разница в числе копий РНК до и после инактивирования вакцинного полуфабриката различными способами, включая применение формалина, β -ПЛ и УФ-лучей. При этом иммуногенность этих препаратов не имела существенных разли-

Таблица 3. Контроль специфической активности вакцинного полуфабриката вирусов Пуумала, Хантаан и Сочи
 Table 3. Control specific activity of the vaccine prefabricated Puumala, Hantaan and Sochi viruses products

Вакцинный материал Vaccine material	Способ инактивирования Method of inactivation	Титр вируса, lg ФОЕ/мл Virus titer, lg FFU/ml	ПЦР-РВ ($M \pm m$), копии/мл qPCR ($M \pm m$), copies/ml	ИФА, титр антигена*** ELISA, antigen titer***	СГТ нАТ ($M \pm m$), log ₂ ** GMT nAb ($M \pm m$), log ₂ **
ВАК-ПУУ VAC-PUU	Контроль* Control*	5,50	$1,2 \pm 0,3 \times 10^5$	1:2048	–
	Формалин Formalin	–	$2,3 \pm 0,4 \times 10^4$	1:1024	$8,8 \pm 0,1$
	β -пропиолактон β -propiolactone	–	$7,0 \pm 0,3 \times 10^4$	1:2048	$8,8 \pm 0,1$
	УФ-излучение UV radiation	–	$9,2 \pm 0,4 \times 10^3$	1:2048	$8,8 \pm 0,1$
ВАК-ХТН VAC-HTN	Контроль* Control*	5,80	$3,0 \pm 0,3 \times 10^5$	1:4096	–
	Формалин Formalin	–	$2,2 \pm 0,4 \times 10^4$	1:2048	$9,4 \pm 0,1$
	β -пропиолактон β -propiolactone	–	$5,3 \pm 0,4 \times 10^4$	1:4096	$9,6 \pm 0,1$
	УФ-излучение UV radiation	–	$2,0 \pm 0,3 \times 10^3$	1:4096	$9,3 \pm 0,1$
ВАК-СОЧИ VAC-SOCHI	Контроль* Control*	5,20	$1,0 \pm 0,3 \times 10^5$	1:2048	–
	Формалин Formalin	–	$1,2 \pm 0,4 \times 10^4$	1:1024	$6,7 \pm 0,1$
	β -пропиолактон β -propiolactone	–	$4,3 \pm 0,4 \times 10^4$	1:2048	$6,9 \pm 0,1$
	УФ-излучение UV radiation	–	$2,0 \pm 0,3 \times 10^3$	1:2048	$6,8 \pm 0,1$

Примечание. *Контроль – исходный вакцинный полуфабрикат до инактивирования; **СГТ – средний геометрический титр нейтрализующих антител, log₂; *** – использованы ИФА тест-системы «ХАНТАГНОСТ» и «ХАНТА-N».

Note. *The control is the initial vaccine prefabricated product before inactivation; **GMT is geometric mean titer of neutralizing antibodies, log₂; *** – ELISA test systems «HANTAGNOST» and «HANTA-N» were used.

Таблица 4. Корреляция количества копий вирусной РНК с титром нАТ в сыворотках крови мышей линии BALB/c после иммунизации ВАК-ПУУ-β-ПЛ

Table 4. Correlation between RNA copy number and nAB titer in the blood of BALB/c mice following VAC-PUU-β-PL immunization

Разведение вакцины Vaccine dilution	ПЦР-РВ ($M \pm m$), копии/мл qPCR ($M \pm m$), copies/ml	Титр нАТ (СГТ), log ₂ nAB titer, log ₂
n/p* u/d*	$7,0 \pm 0,3 \times 10^4$	$8,8 \pm 0,1$
1/2	$4,3 \pm 0,4 \times 10^4$	$6,3 \pm 0,1$
1/8	$7,6 \pm 0,3 \times 10^3$	$5,4 \pm 0,1$

Примечание. *n/p – неразведённый вакцинный препарат

Note. *u/d – undiluted vaccine preparation

чий по количеству индуцируемых нАТ, что указывает на равнозначное повреждение белков-иммуногенов при разной степени разрушения вирусной РНК тестируемыми инактиваторами. В расширенных исследованиях по разработке контроля специфической активности вакцин методом ПЦР-РВ было решено остановиться на β-ПЛ-инактивированных вакцинных препаратах, основное преимущество которых по сравнению с инактивированными формалином и УФ-лучами заключается в снижении содержания балластных белков за счёт уменьшения их агрегации. Это ведёт к более эффективной очистке вируса на этапах осветляющей фильтрации и гель-фильтрации, а также снижению потерь целевого компонента вакцины в результате стерилизующей фильтрации. Полученные результаты корреляции количества копий РНК с титром нАТ в сыворотках крови мышей линии BALB/c после иммунизации позволяют рассчитать иммунизирующую дозу вакцины по количественному содержанию копий вирусной нуклеиновой кислоты в единице объёма. Согласно данным настоящей работы минимальная иммунизирующая доза инактивированного β-ПЛ вакцинного препарата, индуцирующая нАТ в титре $4,32 \log_2$ у 10 из 10 иммунизированных мышей BALB/c, соответствует $7,5 \pm 0,2 \times 10^2$ копий РНК/мл. Метод обладает высокой специфичностью и надёжной воспроизводимостью, что делает перспективным его применение для контроля специфической активности вакцин против ГЛПС.

Соблюдение этических стандартов. На момент начала исследования животные находились в одинаковых условиях содержания и кормления. Исследования на экспериментальных моделях проводили в соответствии с международными и национальными положениями по уходу за животными и их использованию. Указанные положения основаны на этических принципах, установленных Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей, принятой там же 18 марта 1986 г. и подтверждённой в Страсбурге 1 июня 2006 г. (ETS N 123), (https://www.coe.int/t/e/legal_affairs/legal_cooperation/biological_safety_and_use_of_animals/laboratory_animals/

GT123(2002)63%20E%20PART%20B%20Ferrets%20rev2.pdf), соответствующих принципам этического комитета ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН, а также правилах надлежащей лабораторной практики (Good Laboratory Practice, GLP) (<http://docs.cntd.ru/document/1200101144>, <https://www.nc3rs.org.uk/the-3rs>) (ГОСТ Р-53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики»).

Заключение

Вакцинопрофилактика любого инфекционного заболевания требует адекватного контроля качества вакцинных препаратов. Разработанная система определения количественного содержания вирусной РНК на основе ПЦР-РВ благодаря своим характеристикам представляется перспективной для применения с целью оценки специфической активности вакцины против ГЛПС.

ЛИТЕРАТУРА

- Kruger D.H., Figueiredo L.T., Song J.W., Klempa B. Hantaviruses – globally emerging pathogens. *J. Clin. Virol.* 2014; 64: 128–36. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.08.033>.
- Lähdevirta J. Nephropathia epidemica in Finland. A clinical, histological and epidemiological study. *Ann. Clin. Res.* 1971; 3(Suppl. 8): 1–154.
- Schmaljohn C., Hjelle B. Hantaviruses: a global disease problem. *Emerg. Infect. Dis.* 1997; 3(2): 95–104. <https://doi.org/10.3201/eid0302.970202>.
- Maes P., Li S., Verbeeck J., Keyaerts E., Clement J., Van Ranst M. Evaluation of the efficacy of disinfectants against Puumala hantavirus by real-time RT-PCR. *J. Virol. Methods.* 2007; 141(1): 111–5. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.11.037>.
- Plyusnin A., Vapalahti O., Vaheri A. Hantaviruses: genome structure, expression and evolution. *J. Gen. Virol.* 1996; 77(Pt. 11): 2677–87. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-77-11-2677>.
- Schmaljohn C.S., Dalrymple J.M. Analysis of Hantaan virus RNA: evidence for a new genus of Bunyaviridae. *Virology.* 1983; 131(2): 482–91. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(83\)90514-7](https://doi.org/10.1016/0042-6822(83)90514-7).
- Tkachenko E.A., Ishmukhametov A.A., Dzagurova T.K., Bernshstein A.D., Morozov V.G., Sinyugina A.A., et al. Hemorrhagic fever with renal syndrome, Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 2019; 25(12): 2325–8. <https://doi.org/10.3201/eid2512.181649>.
- Liu R., Ma H., Shu J., Zhang Q., Han M., Liu Z., et al. Vaccines and therapeutics against hantaviruses. *Front. Microbiol.* 2019; 10: 2989. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02989>.
- Бархалева О.А., Воробьева М.С., Ладьяженская И.П., Ткаченко Е.А., Дзагурова Т.К. Вакцина против геморрагической лихорадки с почечным синдромом. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2011; (1): 27–30.
- Jiang W., Ma N., Hui Q., Chen B., Qiu Y., Sun H., et al. Type inactivated bivalent hantavirus vaccines using dual fluorescence quantitative real time PCR: Establishment and evaluation. *J. Med. Virol.* 2017; 89(1): 10–6. <https://doi.org/10.1002/jmv.24599>.
- Ткаченко Е.А., Ишмухаметов А.А., Дзагурова Т.К., Сinyugina A.A., Коротина Н.А., Набаткина П.А., и др. Разработка экспериментально-промышленной технологии производства вакцины для профилактики геморрагической лихорадки с почечным синдромом. *Ремедиум. Журнал о российском рынке лекарств и медицинской технике.* 2015; (6): 47–53.
- Курашова С.С., Ишмухаметов А.А., Егорова М.С., Баловнева М.В., Дзагурова Т.К., Ткаченко Е.А. Сравнительная характеристика инактивирующих агентов для создания вакцины против геморрагической лихорадки с почечным синдромом. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2018; 17(4): 26–8. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2018-17-4-26-29>.
- Епринцев А.Т., Попов В.Н., Федорин Д.Н. *Идентификация и исследование экспрессии генов: Учебно-методическое пособие для вузов.* Воронеж; 2008: 14–5.
- Дзагурова Т.К., Солопова О.Н., Свешников П.Г., Коротина Н.А., Баловнева М.В., Леонович О.А., и др. Разработка иммунофер-

ментной тест-системы на основе моноклональных антител для определения специфической активности вакцины против геморрагической лихорадки с почечным синдромом. *Вопросы вирусологии*. 2013; 58(1): 40–4.

15. Дзагурова Т.К., Ткаченко Е.А., Башкирцев В.Н., Окулова Н.М., Апекина Н.С., Коротина Н.А., и др. Выделение и идентификация штаммов хантавирусов – возбудителей ГЛПС в Европейской части России. *Медицинская вирусология*. 2008; 25: 142–50.

REFERENCES

- Kruger D.H., Figueiredo L.T., Song J.W., Klempa B. Hantaviruses – globally emerging pathogens. *J. Clin. Virol.* 2014; 64: 128–36. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.08.033>.
- Lähdevirta J. Nephropathia epidemica in Finland. A clinical, histological and epidemiological study. *Ann. Clin. Res.* 1971; 3(Suppl. 8): 1–154.
- Schmaljohn C., Hjelle B. Hantaviruses: a global disease problem. *Emerg. Infect. Dis.* 1997; 3(2): 95–104. <https://doi.org/10.3201/eid0302.970202>.
- Maes P., Li S., Verbeeck J., Keyaerts E., Clement J., Van Ranst M. Evaluation of the efficacy of disinfectants against Puumala hantavirus by real-time RT-PCR. *J. Virol. Methods.* 2007; 141(1): 111–5. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.11.037>.
- Plyusnin A., Vapalahti O., Vaheri A. Hantaviruses: genome structure, expression and evolution. *J. Gen. Virol.* 1996; 77 (Pt. 11): 2677–87. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-77-11-2677>.
- Schmaljohn C.S., Dalrymple J.M. Analysis of Hantaan virus RNA: evidence for a new genus of Bunyaviridae. *Virology.* 1983; 131(2): 482–91. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(83\)90514-7](https://doi.org/10.1016/0042-6822(83)90514-7).
- Tkachenko E.A., Ishmukhametov A.A., Dzagurova T.K., Bernshstein A.D., Morozov V.G., Sinyugina A.A., et al. Hemorrhagic fever with renal syndrome, Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 2019; 25(12): 2325–8. <https://doi.org/10.3201/eid2512.181649>.
- Liu R., Ma H., Shu J., Zhang Q., Han M., Liu Z., et al. Vaccines and therapeutics against hantaviruses. *Front. Microbiol.* 2019; 10: 2989. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02989>.
- Barkhaleva O.A., Vorob'eva M.S., Ladyzhenskaya I.P., Tkachenko E.A., Dzagurova T.K. Vaccine against hemorrhagic fever with renal syndrome [Vaktsina protiv gemorragicheskoi likhoradki s pochechnym sindromom]. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie.* 2011; (1): 27–30 (in Russian).
- Jiang W., Ma N., Hui Q., Chen B., Qiu Y., Sun H., et al. Type inactivated bivalent hantavirus vaccines using dual fluorescence quantitative real time PCR: Establishment and evaluation. *J. Med. Virol.* 2017; 89(1): 10–6. <https://doi.org/10.1002/jmv.24599>.
- Tkachenko E.A., Ishmukhametov A.A., Dzagurova T.K., Sinyugina A.A., Korotina N.A., Nabatnikov P.A., et al. Manufacturing techniques and methods of control of the inactivated vero cell-derived vaccine against HFRS has been developed in Russia [Razrabotka eksperimental'no-promyshlennoi tekhnologii proizvodstva vaktsiny dlya profilaktiki gemorragicheskoi likhoradki s pochechnym sindromom]. *Remedium. Zhurnal o rossiyskom rynke lekarstv i meditsinskoi tekhnike.* 2015; (6): 47–53 (in Russian).
- Kurashova S.S., Ishmukhametov A.A., Egorova M.S., Balovneva M.V., Dzagurova T.K., Tkachenko E.A. Comparative characteristics of inactivation agents for HFRS vaccine development [Sravnitel'naya kharakteristika inaktiviruyushchikh agentov dlya sozdaniya vaktsiny protiv gemorragicheskoi likhoradki s pochechnym sindromom]. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika.* 2018; 17(4): 26–8. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2018-17-4-26-29> (in Russian).
- Eprintsev A.T., Popov V.N., Fedorin D.N. *Identification and Study of Gene Expression: A Teaching Aid for Universities [Identifikatsiya i issledovanie ekspressii genov: Uchebno-metodicheskoe posobie dlya vuzov]*. Voronezh; 2008: 14–5 (in Russian).
- Dzagurova T.K., Solopova O.N., Sveshnikov P.G., Korotina N.A., Balovneva M.V., Leonovich O.A., et al. Development of ELISA on the basis of monoclonal antibodies for detecting specific activity of the vaccine against hemorrhagic fever with renal syndrome [Razrabotka immunofermentnoi test-sistemy na osnove monoklonal'nykh antitel dlya opredeleniya specificheskoi aktivnosti vaktsiny protiv gemorragicheskoi likhoradki s pochechnym sindromom]. *Voprosy virusologii.* 2013; 58(1): 40–4 (in Russian).
- Dzagurova T.K., Tkachenko E.A., Bashkirtsev V.N., Okulova N.M., Apekina N.S., Korotina N.A., et al. Isolation and identification of strains of hantavirus-causative agents of HFRS in the European part of Russia [Vydelenie i identifikatsiya shtammov khantavirusov – vozбудitelei GLPS v Evropeiskoi chasti Rossii]. *Meditsinskaya virusologiya.* 2008; 25: 142–50 (in Russian).