



ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-169>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023

Использование вирусоподобных частиц на основе рекомбинантных вирусных белков VP2/VP6 ротавируса А для оценки гуморального иммунного ответа методом ИФА

Филатов И.Е.¹, Цибезов В.В.¹, Баландина М.В.¹, Норкина С.Н.¹, Латышев О.Е.¹, Елисеева О.В.¹, Черепушкин С.А.¹, Верховский О.А.², Гребенникова Т.В.¹

¹ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 123098, г. Москва, Россия;

²АНО «Научно-исследовательский институт диагностики и профилактики болезней человека и животных», 123098, г. Москва, Россия

Введение. Ротавирусная инфекция является одной из основных проблем инфекционной патологии человека, животных и птиц. Оценку иммуногенности и эффективности всех типов вакцин против ротавируса типа А (РВА) проводят на лабораторной модели животных, в качестве которой обычно используют грызунов или новорождённых поросят, при этом для их проведения необходимо наличие ИФА, позволяющего выявить вирусспецифические антитела определённого класса.

Цель – разработка непрямого ИФА с использованием вирусоподобных частиц (VLP), состоящих из белков VP2/VP6 РВА, в качестве антигена для выявления и оценки уровня ВГА-специфических антител классов IgG, IgM, IgA в иммунном ответе к ротавирусу А.

Материалы и методы. Получение и очистка VP2/VP6 VLP РВА, электронная микроскопия, электрофорез в ПААГ-ДСН, иммуноблоттинг, иммуноферментный анализ, реакция нейтрализации.

Результаты. В статье представлены результаты получения рекомбинантного бакуловируса, содержащего ген VP2/VP6 GFP РВА, определения его инфекционной активности и использования для наработки VLP. Показана морфология, определён структурный состав и установлена высокая антигенная активность VP2/VP6 VLP РВА. На его основе разработан ИФА и приведены результаты выявления специфических антител к РВА в сыворотке крови различных видов животных.

Заключение. Разработанный ИФА с использованием VP2/VP6 VLP РВА в качестве универсального антигена позволяет выявлять весь спектр IgG-, IgM-, IgA-антител в иммунном ответе к РВА, что имеет важное научно-практическое значение в оценке иммуногенности и эффективности традиционных и разрабатываемых вакцин против ротавирусной инфекции.

Ключевые слова: ротавирус А; VP2/VP6 VLP РВА; ИФА; специфические антитела; иммунный ответ

Для цитирования: Филатов И.Е., Цибезов В.В., Баландина М.В., Норкина С.Н., Латышев О.Е., Елисеева О.В., Черепушкин С.А., Верховский О.А., Гребенникова Т.В. Использование вирусоподобных частиц на основе рекомбинантных вирусных белков VP2/VP6 ротавируса А для оценки гуморального иммунного ответа методом ИФА. *Вопросы вирусологии.* 2023; 68(2): 161-171. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-169> EDN: <https://elibrary.ru/vmuibc>

Для корреспонденции: Гребенникова Татьяна Владимировна, д-р биол. наук, профессор, руководитель отдела молекулярной вакцинологии и иммунодиагностики, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, Россия. E-mail: t_grebennikova@mail.ru

Участие авторов: Филатов И.Е., Цибезов В.В. – проведение экспериментальных исследований, написание текста; Баландина М.В., Норкина С.Н., Латышев О.Е., Елисеева О.В., Черепушкин С.А. – проведение экспериментальных исследований; Верховский О.А. – сбор и обработка материалов, написание текста; Гребенникова Т.В. – написание резюме, заключения, общая редакция текста.

Финансирование. Работа финансирована государственной тематикой Министерства здравоохранения Российской Федерации «Разработка подходов для создания вакцины против инфекции, вызванной ротавирусом типа А» (регистрационный номер АААА-А18-118051490143-3).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus author guidelines for animal use (IAVES, July, 23 2010). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом организации ООО «Институт доклинических исследований» (Протокол № БЭК 4.25/21 от 02.06.2021).

Поступила 09.03.2023

Принята в печать 20.04.2023

Опубликована 30.04.2023

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-169>

Virus-like particles based on rotavirus A recombinant VP2/VP6 proteins for assessment the antibody immune response by ELISA

Ilya E. Filatov¹, Valeriy V. Tsibezov¹, Marina V. Balandina¹, Svetlana N. Norkina¹, Oleg E. Latyshev¹, Olesya V. Eliseeva¹, Stanislav A. Cherepushkin¹, Oleg A. Verkhovsky², Tatyana V. Grebennikova¹

¹National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya of the Ministry of Health of the Russian Federation, 123098, Moscow, Russia;

²Diagnostic and Prevention Research Institute for human and animal diseases, 123098, Moscow, Russia

Introduction. Rotavirus infection is one of the main concerns in infectious pathology in humans, mammals and birds. Newborn piglets or rodents are usually being used as a laboratory model for the evaluation of immunogenicity and efficacy for all types of vaccines against rotavirus A (RVA), and the use of ELISA for the detection of virus-specific antibodies of specific isotype is an essential step of this evaluation.

Objective. Development of indirect solid-phase ELISA with VP2/VP6 rotavirus VLP as an antigen to detect and assess the distribution of RVA-specific IgG, IgM and IgA in the immune response to rotavirus A.

Materials and methods. VP2/VP6 rotavirus VLP production and purification, electron microscopy, PAGE, immunoblotting, ELISA, virus neutralization assay.

Results. The study presents the results of development of a recombinant baculovirus with RVA genes VP2-eGFP/VP6, assessment of its infectious activity and using it for VLP production. The morphology of the VP2/VP6 rotavirus VLPs was assessed, the structural composition was determined, and the high antigenic activity of the VLP was established. VLP-based ELISA assay was developed and here we report results for RVA-specific antibody detection in sera of different animals.

Conclusion. The developed ELISA based on VP2/VP6 rotavirus VLP as a universal antigen makes it possible to detect separately IgG, IgM and IgA antibodies to rotavirus A, outlining its scientific and practical importance for the evaluation of immunogenicity and efficacy of traditional vaccines against rotavirus A and those under development.

Keywords: rotavirus A; VP2/VP6 rotavirus VLP; ELISA; isotype-specific antibodies; immune response

For citation: Filatov I.E., Tsibezov V.V., Balandina M.V., Norkina S.N., Latyshev O.E., Eliseeva O.V., Cherepushkin S.A., Verkhovsky O.A., Grebennikova T.V. Virus-like particles based on rotavirus A recombinant VP2/VP6 proteins for assessment the antibody immune response by ELISA. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2023; 68(2): 161-171 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-169> EDN: <https://elibrary.ru/vmuibc>

For correspondence: Tatyana V. Grebennikova, Dr Sci. (Biol.), Professor, Head of the Department of Molecular Vaccinology and Immunodiagnostics, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya of the Ministry of Health of Russia, 123098, Moscow, Russia. E-mail: t_grebennikova@mail.ru

Information about the authors:

Filatov I.E., <https://orcid.org/0000-0001-5274-224X>

Tsibezov V.V., <https://orcid.org/0000-0003-2150-5764>

Balandina M.V., <https://orcid.org/0009-0002-8179-1379>

Norkina S.N., <https://orcid.org/0009-0006-9608-4713>

Latyshev O.E., <https://orcid.org/0000-0002-5757-3809>

Eliseeva O.V., <https://orcid.org/0000-0002-0723-9749>

Cherepushkin S.A., <https://orcid.org/0000-0002-1734-5369>

Verkhovsky O.A., <https://orcid.org/0000-0003-0784-9341>

Grebennikova T.V., <https://orcid.org/0000-0002-6141-9361>

Contribution: Filatov I.E., Tsibezov V.V. – performing the experiments, writing the text; Balandina M.V., Norkina S.N., Latyshev O.E., Eliseeva O.V., Cherepushkin S.A. – performing the experiments; Verkhovsky O.A. – material collection and processing, writing the text; Grebennikova T.V. – writing of the summary, conclusion, editing the text.

Acknowledgments. The study was supported by state task of the Ministry of Health of Russia “Development of approaches to create a vaccine against rotavirus type A infection” No. AAAA-A18-118051490143-3.

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

Ethics approval. Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with Consensus author guidelines for animal use (IAVES, July 23, 2010). The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Research and manufacturing centre «Home of pharmacy” (protocol No БЭК 4.25/21 dated 02 June 2021).

Received 09 March 2023

Accepted 20 April 2023

Published 30 April 2023

Введение

Ротавирусная инфекция (РВИ), характеризующаяся острым течением, диареей, рвотой, гастроэнтеритом, развитием общего интоксикационного синдрома, значительной степенью распространённости и летальности, является одной из основных проблем инфекционной патологии человека, животных и птиц во всём мире [1]. Ротавирус (РВ) типа А (РВА) – важнейший энтеропатоген неонатального периода человека, свиней, крупного рогатого скота, других видов млекопитающих. За счёт структурной особенности своей трёхслойной белковой оболочки, устойчивой к кислой среде желудка и пищеварительным ферментам, поражает эпителиальные клетки ворсинок тонкого отдела кишечника, вызывая их дегенерацию, некроз и десквамацию. Защита организма происходит за счёт иммунных реакций в лимфоидной ткани слизистых оболочек, в первую очередь экстравазкулярной продукции секреторного IgA (sIgA), являющегося основой иммунитета слизистых. IgG- и ранние IgM-антитела также выполняют важную эффекторную функцию в формировании как системного, так и местного иммунитета против РВИ [2].

Этиологическим агентом РВИ является икосаэдрический безоболочечный вирус рода *Rotavirus* семейства *Reoviridae*, в состав которого входят шесть структурных (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 и VP7) и пять неструктурных белков (NSP1 – NSP5/6), кодирующихся одиннадцатью сегментами двухцепочечной РНК в РВ-вирионе размером 18 555 н.р. [3]. На основе секвенирования гена белка внутреннего капсида VP6 и его молекулярных и антигенных свойств в пределах рода идентифицировано десять геногрупп/серогрупп вируса (РВА–РВJ).

Наиболее эффективной мерой борьбы с РВИ человека и животных является вакцинопрофилактика, снижающая уровень заболеваемости и предотвращающая развитие тяжёлых гастроэнтеритов и диарей. В настоящее время в мире используется несколько моно- и поливалентных вакцин, изготовленных из живых ослабленных штаммов РВА человеческого и (или) животного происхождения, однако имеется тенденция к разработке и внедрению в практику более безопасных и эффективных препаратов [4–6], в том числе и на основе нереплицирующихся вирусоподобных частиц (VLP). Предполагается, что VLP-вакцины могут снизить риск побочных эффектов, связанных с традиционными вакцинами, обеспечить повышенную защиту против родственных серотипов РВ [7–10]. Было показано, что вакцинация очищенными ротавирусными VLP вызывает иммунитет у млекопитающих против гетеротипичного РВ [11]. В нашей стране также были получены VLP, синтезированные к актуальным вирусным генотипам РВА, циркулирующим на территории Российской Федерации, и показана перспектива их использования в качестве основного компонента VLP-вакцины [12].

Оценку иммуногенности и эффективности всех типов РВА-вакцин повсеместно проводят на лабораторной модели животных, в качестве которой обычно

используют грызунов или новорождённых поросят. Ранее была экспериментально доказана эффективность использования именно поросят в качестве универсальной модели для оценки качества вакцинных препаратов против РВИ человека [13, 14].

Для проведения подобных исследований необходимым условием является наличие тест-системы на основе иммуноферментного анализа (ИФА), позволяющей в сжатые сроки выявить вирусспецифические антитела различных классов. Ранее нами был разработан ИФА для выявления РВА-специфических антител, относящихся к IgG-изотипу в сыворотке крови и молозиве свиней с использованием в качестве антигена рекомбинантного белка VP6 (рек-VP6), полученного в бакуловирусной системе экспрессии. Выбор VP6 был не случаен, поскольку известно, что он является основным высококонсервативным группоспецифическим белком вириона, обладает выраженной иммуногенной активностью и содержится в наибольшем количестве [15]. Метод был успешно апробирован в эксперименте на новорождённых поросятах породы вьетнамская вислобрюхая при воспроизведении РВ человека и оценки протективного эффекта клонированного штамма Wa РВА [16]. Вместе с тем за рубежом уже имеются разработки, касающиеся использования различных комбинаций антигенов VLP в непрямом ИФА (VLP ELISA), например, для выявления антител к РВ типа С (РВС) [7].

Целью настоящей работы была разработка непрямого ИФА с использованием вирусоподобных частиц (VLP), состоящих из белков VP2/VP6 РВА, в качестве антигена для выявления и оценки уровня ВГА-специфических антител классов IgG, IgM, IgA в иммунном ответе к РВА.

Материалы и методы

Для получения рекомбинантного бакуловируса, содержащего ген *VP2/VP6 GFP* РВА, использовали рекомбинантную бакмиду, содержащую белки РВА человека VP6 и VP2, слитую с зелёным флуоресцентным белком eGFP. Получение генно-инженерной конструкции, кодирующей белки VP2-eGFP и VP6 РВА, подробно описано ранее [12]. Трансфекцию перевиваемой линии клеток *Spodoptera frugiperda* Sf-9 проводили очищенными препаратами бакмидной ДНК с использованием катионного липосомного агента Cellfectin (Invitrogen, США) по методике производителя. После трансфекции проводили ещё два пассажа на клетках Sf-9 для накопления вируса.

Инфекционность рекомбинантного бакуловируса определяли методом титрования в монослойной культуре Sf-21 по методике, описанной в *Baculocomelete User Guide* с модификациями. Клетки Sf-21 с концентрацией посевной суспензии 5×10^5 клеток/см³ культивировали в двух 12-луночных планшетах в объёме 1 см³/луночка в течение 24 ч. В 24-луночном планшете готовили разведения вируса от 10^{-1} до 10^{-7} на питательной среде, содержащей 10% эмбриональную телячью сыворотку, в соотношении 0,2 см³ вируса к 1,8 см³ среды. Каждое разведение исследуе-

мого вируса (с 10^{-7} по 10^{-1}) в объёме $0,5 \text{ см}^3$ вносили в три лунки одного ряда. Три лунки последнего ряда оставляли незаражёнными в качестве контроля. Инфицированные клетки оставляли для контакта с вирусом на 1 ч при комнатной температуре, после чего последовательно из каждого ряда лунок, начиная с контрольного, удаляли по $0,5 \text{ см}^3$ разведения вируса и немедленно вносили по $1,0 \text{ см}^3$ тёплого рабочего раствора агарозы. Через 10–20 мин, после застывания слоя агарозы, на его поверхность наносили по $0,5 \text{ см}^3$ ростовой среды для предотвращения высыхания клеток. Инкубировали планшеты в термостате с температурой $27,0 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 4 суток. После инкубации удаляли из каждой лунки планшетов по $0,5 \text{ см}^3$ среды и добавляли по $0,5 \text{ см}^3$ приготовленного рабочего раствора нейтрального красного. Инкубировали планшеты в термостате с температурой $27,0 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 3–4 ч. По окончании срока инкубации удаляли оставшуюся жидкость и помещали планшеты в термостат с температурой $27,0 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ для полного проявления бляшек. Через сутки проводили учёт результатов титрования подсчётом бляшек в световом боксе. Бляшки имеют вид неокрашенных пятнышек на монослое клеток красного цвета. Подсчитывали бляшки в ряде лунок с их количеством в пределах 5–30 в лунке. Титр вируса выражают в бляшкообразующих единицах (БОЕ/ см^3). Высчитывали среднее количество бляшек в разведении по трём лункам и определяли титр вируса, используя формулу (1):

$$\text{Титр (БОЕ/см}^3\text{)} = A \times B \times 2, \quad (1)$$

где A – среднее количество бляшек в разведении; B – значение, обратное степени разведения вируса; 2 – коэффициент пересчёта на 1 см^3 (при объёме вносимого вируса в лунку $0,5 \text{ см}^3$).

Очистка VP2/VP6 VLP PBA. Культуральную жидкость, содержащую VP2/VP6 VLP PBA, центрифугировали 5 мин при 1000 об/мин, супернатант повторно центрифугировали 20 мин при 6000 об/мин ($4 \text{ }^\circ\text{C}$, ротор Sorval SS34, Thermo Scientific).

VLP из осветлённых суспензий очищали ультрацентрифугированием в течение 2 ч при 28 000 об/мин ($4 \text{ }^\circ\text{C}$; центрифуга Optima XE-100, бакетный ротор SW 32Ti, Beckman Coulter, США) на подушке из 35% (w/v) сахарозы, приготовленной на буфере TNC (10 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 10 mM CaCl_2 ; pH 7,4).

Также для получения VLP из осветлённых суспензий использовали проточное центрифугирование (центрифуга Optima XE-100, проточный ротор CF-32, Beckman Coulter, США) 28 000 об/мин на подушке из 35% (w/v) сахарозы на буфере TNC. Осадок VLP смывали со стенок ротора буфером TNC, и полученную суспензию VLP наслаивали на 6 мл 35% (w/v) сахарозы, приготовленной на буфере TNC, центрифугировали в течение 2 ч при 28 000 об/мин ($4 \text{ }^\circ\text{C}$; центрифуга Optima XE-100, бакетный ротор SW 32Ti, Beckman Coulter, США). Полученные осадки, содержащие VLP, ресуспендировали в буфере TNC и хранили при $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

Электронная микроскопия. 3 мкл препарата с концентрацией 12–30 мг/мл наносили на медную сетку,

покрытую углеродной подложкой (Ted Pella, США) и обработанную в атмосфере тлеющего разряда, инкубировали 30 сек при комнатной температуре. Затем на сетку наносили каплю 2% раствора ацетата урана, выдерживали 30 сек, излишки раствора удаляли с сетки фильтровальной бумагой. Окрашенные сетки хранили в пластиковых контейнерах до использования. Исследование образцов производили в просвечивающем электронном микроскопе JEOL JEM-2100 (JEOL, Япония), оборудованном катодом из гексаборита лантана, при ускоряющем напряжении 200 кВ. Изображения получали с увеличением $\times 25\,000$ с помощью ПЗС-камеры Gatan X100 с размером матрицы 2000×2000 пикселей (Gatan, США).

Концентрацию белка в образцах определяли с использованием коммерческого набора Micro BCA Protein Assay Kit (Thermo, США).

Чистоту и специфичность продуктов оценивали методами электрофореза в 12% полиакриламидном геле (ПААГ) на приборе Mini-PROTEAN II (Bio-Rad, США) в восстанавливающих условиях при постоянном напряжении 200 В.

Экспериментальная вакцина «VLP-рота» представляет смесь VLP, состоящих из четырех рекомбинантных белков: VP2, VP4, VP6 и VP7 [12].

В качестве *испытуемых проб* использовали сыворотку крови мышей, морских свинок, свиней. Предварительно все испытуемые пробы были протестированы в реакции нейтрализации (РН) и по её результатам в зависимости от наличия и титра антител к РВА дифференцированы на положительные и отрицательные.

Получение РВА-специфических сывороток мышей. Для исследования использовали самок мышей линии BALB/c 3–4-недельного возраста массой 16–18 г (питомник лабораторных животных филиала «Столбовая» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий» Федерального медико-биологического агентства, Россия). Проводили двукратную иммунизацию экспериментальной вакциной «VLP-рота» с интервалом 14 суток. При интраназальном введении применяли лёгкий эфирный наркоз. Сформировали 7 опытных групп:

- группа 1 – внутримышечное введение с адьювантом в объёме $0,2 \text{ мл/мышь}$;
- группа 2 – внутримышечное введение без адьюванта в объёме $0,2 \text{ мл/мышь}$;
- группа 3 – внутрибрюшинное введение с адьювантом в объёме $0,2 \text{ мл/мышь}$;
- группа 4 – внутрибрюшинное введение без адьюванта в объёме $0,2 \text{ мл/мышь}$;
- группа 5 – интраназальное введение с адьювантом в объёме $0,05 \text{ мл/мышь}$;
- группа 6 – интраназальное введение без адьюванта в объёме $0,05 \text{ мл/мышь}$;
- группа 7 – контроль.

Через 7 суток после второй иммунизации от всех животных получали сыворотку крови и определяли уровень антител к РВА методом непрямого ИФА с использованием в качестве сорбированного антигена рек-VP6 и VP2/VP6 VLP PBA. Сыворотки тестировали с двой-

ным шагом в разведениях от 1/200 до 1/25 600. Использовали пероксидазные конъюгаты анти-IgG, анти-IgM и анти-IgA мыши (Sigma) в разведении 1/2000.

Получение РВА-специфических сывороток свиней. Для исследования использовали сыворотку крови карликовых свиней после трёхкратной иммунизации с интервалом 9–10 суток экспериментальной вакциной «VLP-рота» в дозах 30, 120 мкг белка/доза. Контрольным животным вводили 0,9% NaCl. Уровень РВА-специфических антител классов IgG и IgA определяли методом непрямого ИФА с использованием в качестве сорбированного антигена VP2/VP6 VLP РВА и пероксидазные конъюгаты анти-IgG, анти-IgM и анти-IgA свиньи (Sigma).

Все испытуемые пробы сывороток также исследовали на наличие антител к РВА в коммерческом наборе Ingezim Rotavirus Porcino (Ingenasa, Испания) по методике производителя.

Получение РВА-специфических сывороток морских свинок. Морских свинок иммунизировали двукратно с интервалом 14 дней вакциной «VLP-рота» в дозах 60, 120 мкг белка/доза. Контрольным животным вводили 0,9% NaCl. Уровень РВА-специфических антител IgG-изотипа определяли методом непрямого ИФА с использованием в качестве сорбированного антигена VP2/VP6 VLP РВА и пероксидазного конъюгата анти-IgG морской свинки (Sigma).

Реакцию нейтрализации РВА с испытуемыми пробами проводили микрометодом в 96-луночных полистироловых культуральных планшетах (Costar, США) на перевиваемой культуре клеток MARC-145, выращенной на питательной среде MEM с глутамином с добавлением 5% эмбриональной сыворотки телёнка по стандартной методике с рабочей дозой РВА, содержащей 100 ТЦИД₅₀/100 мкл. Разведения вируса готовили в питательной среде, содержащей 10 мкг/мл трипсина. Испытуемые пробы прогревали на водяной бане при температуре 56 °С в течение 30 мин с целью инактивации неспецифических ингибиторов. Далее готовили их разведения от 1 : 10 до 1 : 1280 и вносили по 100 мкл в лунки 96-луночного планшета. К разведениям сывороток добавляли по 100 мкл вирусосодержащей суспензии и инкубировали смесь в течение 1 ч при 37 °С. Затем смесь переносили в 96-луночные планшеты с монослоем клеток MARC-145. Через 4–5 суток инкубации при 37 °С и 5% CO₂ проводили учёт результатов путём микроскопирования монослоя с целью определения цитопатических изменений в клетках. Вируснейтрализующий титр испытуемой пробы выражали как её предельное разведение, ингибирующее развитие цитопатического действия вируса.

Непрямой ИФА. В лунки иммунологического планшета (Greiner, Германия) вносили 0,1 мл рек-VP6 или VP2/VP6 VLP РВА (10 мкг/мл) в 0,1 М карбонатно-бикарбонатном буфере, pH 9,5. Планшет инкубировали 18 ч при 4 °С, после чего удаляли избыток антигена пятикратной отмывкой ФСБТ (0,01 М фосфатный буфер, 170 mM NaCl, 0,1% твин-20, pH 7,4). Свободные участки пластика блокировали 1% желатином (Gerbu, Германия) в ФСБТ (1 ч при 37 °С), уда-

ляли блокирующий раствор и вносили в лунки 0,1 мл РВА-специфических или нейтральных испытуемых сывороток в ФСБТ и 0,5% бычьего сывороточного альбумина. Планшет инкубировали 1 ч при 37 °С, промывали ФСБТ и добавляли 0,1 мл меченых пероксидазой соответствующего конъюгата в рабочем разведении. Через 1 ч инкубации при 37 °С отмывали планшет ФСБТ и вносили в лунки 100 мкл субстратного раствора с тетраметилбензидином (ООО «Хема», Россия). Инкубировали 15 мин при комнатной температуре и останавливали реакцию добавлением 0,1 мл 1M H₂SO₄. Интенсивность окраски в лунках определяли на спектрофотометре с вертикальным лучом (Multiscan FC, Thermo, США) при 450 нм (A₄₅₀).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием компьютерных программ Microsoft Office Excel 2007–2016 и статистических онлайн-калькуляторов (<https://math.semestr.ru>, <https://medstatistic.ru>).

Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus author guidelines for animal use (IAVES, July, 23 2010). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом организации ООО «Институт доклинических исследований» (Протокол № БЭК 4.25/21 от 02.06.2021).

Результаты

На первом этапе работы был получен рекомбинантный бакуловирус, содержащий ген *VP2/VP6 GFP* РВА. Результат трансфекции линии клеток Sf-9 бакмидной ДНК, содержащей гены белков РВА VP6 и VP2-eGFP, представлен на **рис. 1**, по данным которого видно, что флуоресценция, свидетельствующая об успешной трансфекции клеток, наблюдается в 1-м пассаже и усиливается в 3-м. Для оценки бляшкообразования непосредственно перед окраской монослоя нейтральным красным проводили контроль инфицированных клеток методом флуоресцентной микроскопии (**рис. 2**). Титр полученного рекомбинантного бакуловируса, содержащего ген *VP2/VP6 GFP* РВА, в 3-м пассаже составил $2,3 \times 10^6$ БОЕ/см³.

По результатам очистки установлено, что совместная экспрессия (коэкспрессия) VP2 и VP6 приводила к сборке двухслойных частиц, которые могут служить базовой структурой для всех остальных вариантов соответствующих рекомбинантных белков РВА, полученных ранее [12]. Результаты электронной микроскопии показали, что по морфологии и размеру VP2/VP6 VLP РВА соответствовали вириону нативного вируса и представляли собой трёхслойный колесообразный капсид размером 50–80 нм (**рис. 3**). При этом более 90% полученных частиц были собраны правильно и не разрушены, концентрация общего белка в растворе после проведённой очистки составила 10–20 мг/мл, что, вероятнее всего, и является количественным содержанием VP2/VP6 VLP РВА.

Результаты по определению структурного состава субстанции показали, что VP2/VP6 VLP РВА пред-

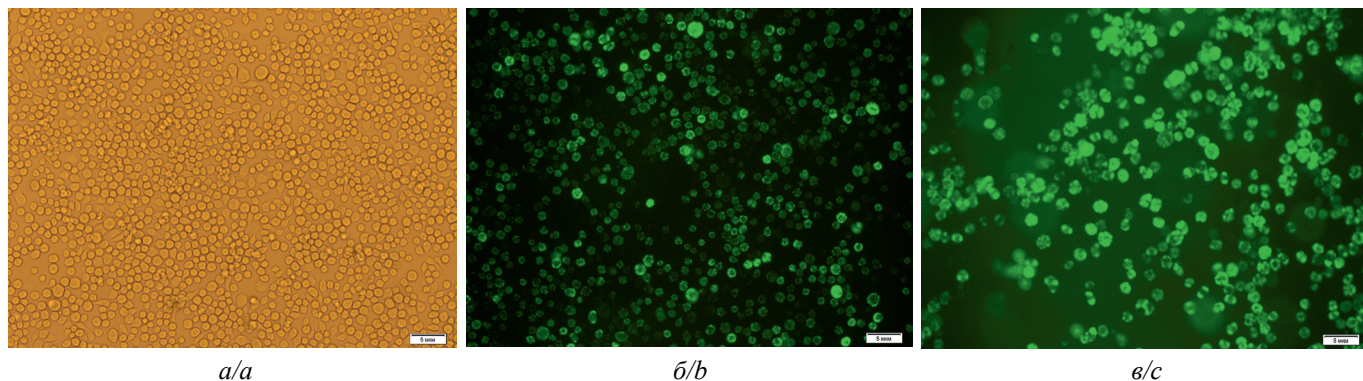


Рис. 1. Результат трансфекции линии клеток Sf-9 бакмидной ДНК, содержащей гены белков РВА VP6 и VP2-eGFP: *a* – незараженная культура клеток Sf-9 в проходящем свете; *б, в* – культура клеток Sf-9, зараженная рекомбинантным бакуловирусом 1-го (*б*) и 3-го (*в*) пассажа соответственно в флуоресцентном поле.

Fig. 1. The result of transfection of the Sf-9 cell line with bacmid DNA containing the genes of RVA proteins VP6 and VP2-eGFP: *a* – not infected Sf-9 cell line in transmitted light; *b, c* – Sf-9 cell line infected with baculovirus first (*b*) and third (*c*) passages in fluorescence field.

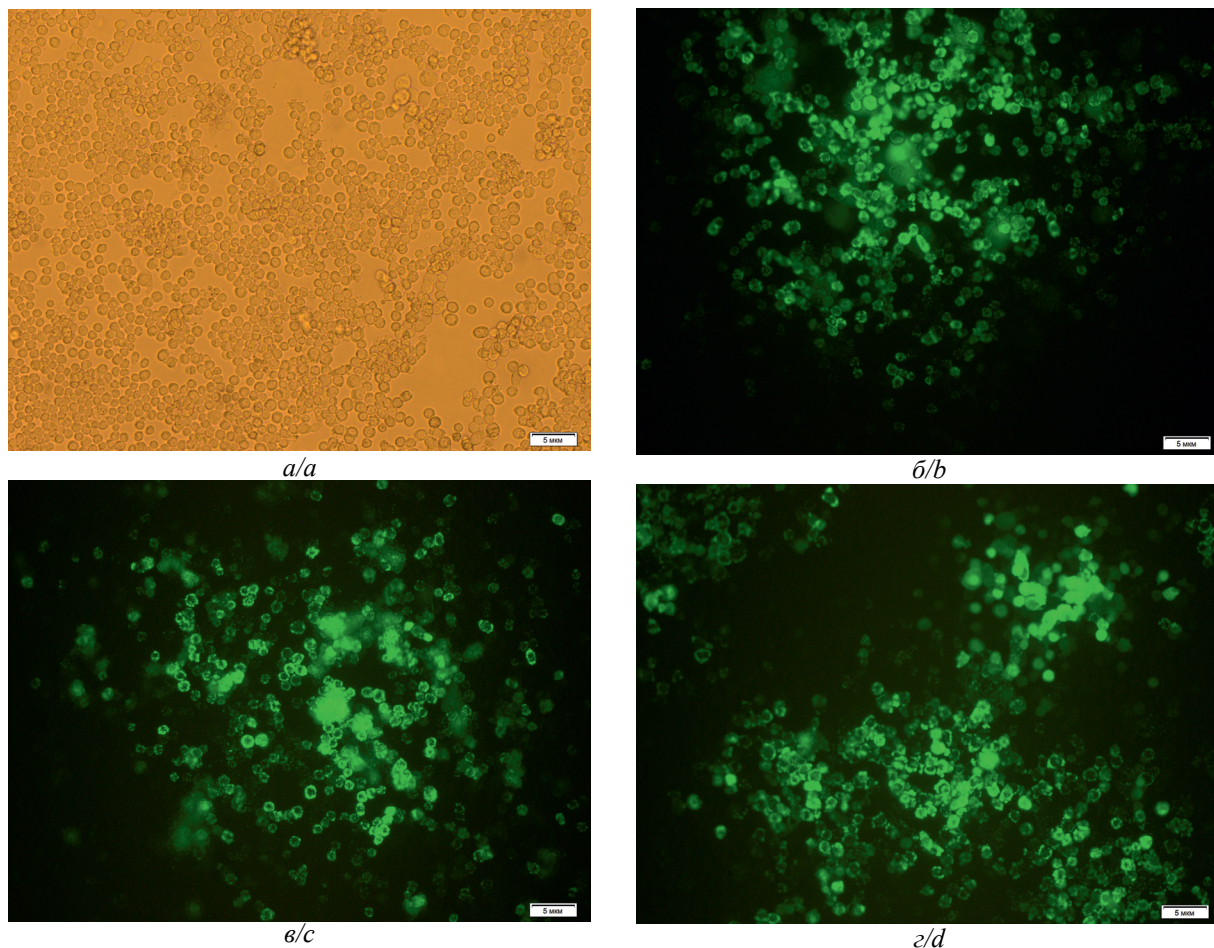


Рис. 2. Инокулированная культура клеток Sf-21, разведение вируса 10^{-4} : *a* – в проходящем свете; *б, в, г* – бляшки в флуоресцентном поле.

Fig. 2. Sf-21 cells infected with 10^{-4} virus dilution: *a* – in transmitted light; *b, c, d* – plaques in fluorescence field.

ставляют собой гомогенную смесь двух рекомбинантных белков VP2 и VP6 с молекулярной массой приблизительно 120 кД и 45 кД соответственно (**рис. 4**). Антигенная активность VP2/VP6 VLP РВА была подтверждена в иммуноблоттинге с РВА-по-

ложительными пробами сывороток крови свиньи и мыши.

Для изучения антигенной активности полученного препарата и возможности его применения в качестве антигена в иммуноферментном методе для выявления

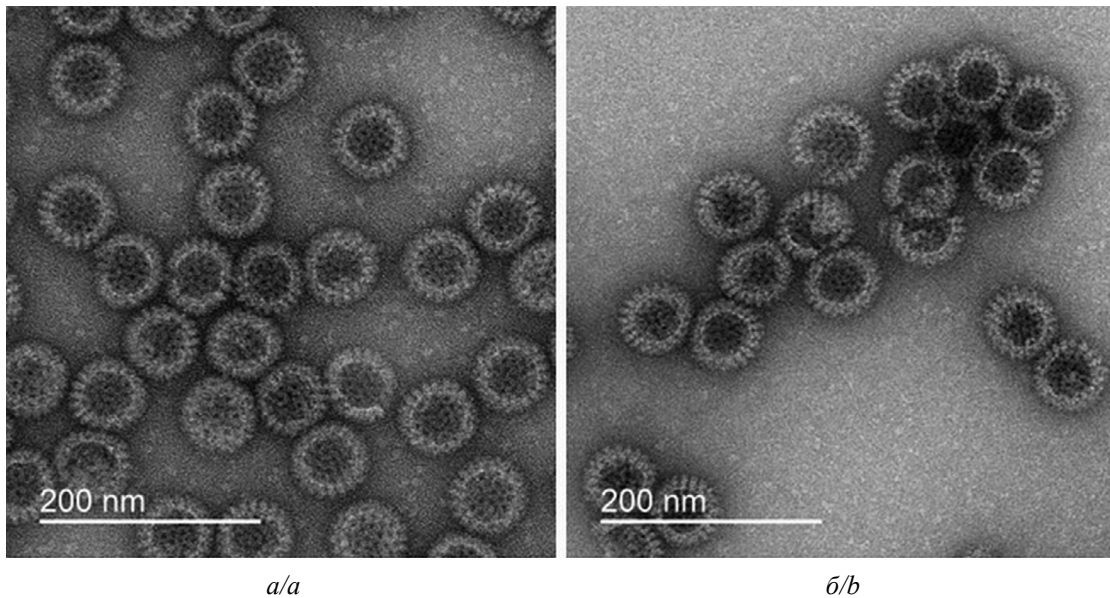


Рис. 3. Электронная микрофотография VP2/VP6 VLP PBA (а) и PBA (б). Увеличение $\times 25\,000$.

Fig. 3. Electron micrograph of RVA VP2/VP6 VLPs (a) and RVA (b). $\times 25,000$ magnification.

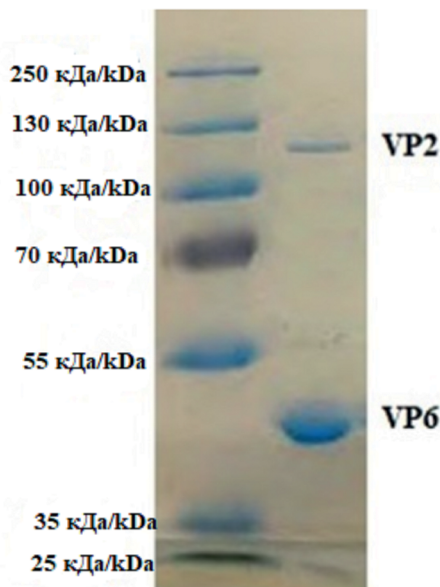


Рис. 4. Структурный анализ препарата VP2/VP6 VLP PBA методом электрофореза в 12% ПААГ-ДСН. На электрофореграмме видны две полосы, соответствующие по молекулярной массе структурным белкам VP2 и VP6 ротавируса А (120 and 45 kDa). Видимые дополнительные полосы отсутствуют.

Fig. 4. Protein analysis of RVA VP2/VP6 VLP by SDS-PAAGE. Two bands are visible in 12% gel that correspond to molecular weight of the RVA structural proteins VP2 and VP6 (120 and 45 kDa). No additional protein bands are present.

PBA-специфических антител использованы сыворотки крови мыши, свиньи и морской свинки.

При сравнении антигенной активности препаратов рекомбинантного VP6 и VP2/VP6 VLP PBA показано, что оба препарата позволяют эффективно выявлять PBA-специфические антитела IgG-, IgM-

и IgA-изотипов в сыворотках крови мышей, иммунизированных VP2/VP6 VLP PBA, причём при использовании в качестве сорбированного антигена VP2/VP6 VLP PBA чувствительность тест-системы на 15–30% выше, чем при использовании рек-VP6 (**рис. 5**).

В опыте на поросятах была установлена динамика содержания PBA-специфических антител, относящихся к IgG- и IgA-изотипам в сыворотке крови животных в процессе поствакцинального иммуногенеза (**рис. 6**). При этом статистически достоверное повышение их уровня отмечено у животных после третьей иммунизации ($r = 0,95$; $p < 0,05$). При параллельном исследовании этих же проб в РН и ИФА-наборе зарубежного производства положительная корреляция полученных результатов установлена между VLP ИФА / РН ($r = 0,9$, $p < 0,05$) и VLP ИФА / Ingezim Rotavirus Porcino ($r = 0,87$, $p < 0,05$), что свидетельствует о высокой эффективности разработанной тест-системы.

Установленная динамика содержания уровня IgG-специфических поствакцинальных антител к PBA в сыворотке крови морских свинок подтвердила высокую чувствительность и специфичность метода (**рис. 7**).

Обсуждение

Несмотря на значительные успехи в борьбе с РВИ человека и животных, проблема разработки новых средств диагностики и специфической профилактики остаётся весьма актуальной. Прежде всего это обусловлено биологией РВ, связанной с их реассортацией (обмен геномными фрагментами между вакцинным и вирулентным вирусом или между различными РВ после одномоментного заражения) и приводящей к появлению новых, зачастую более вирулентных и трудно диагностируемых штаммов РВ. Использование VLP в вакцине (VLP-вакцина) является альтернативным подходом к замене живого вируса на более безопас-

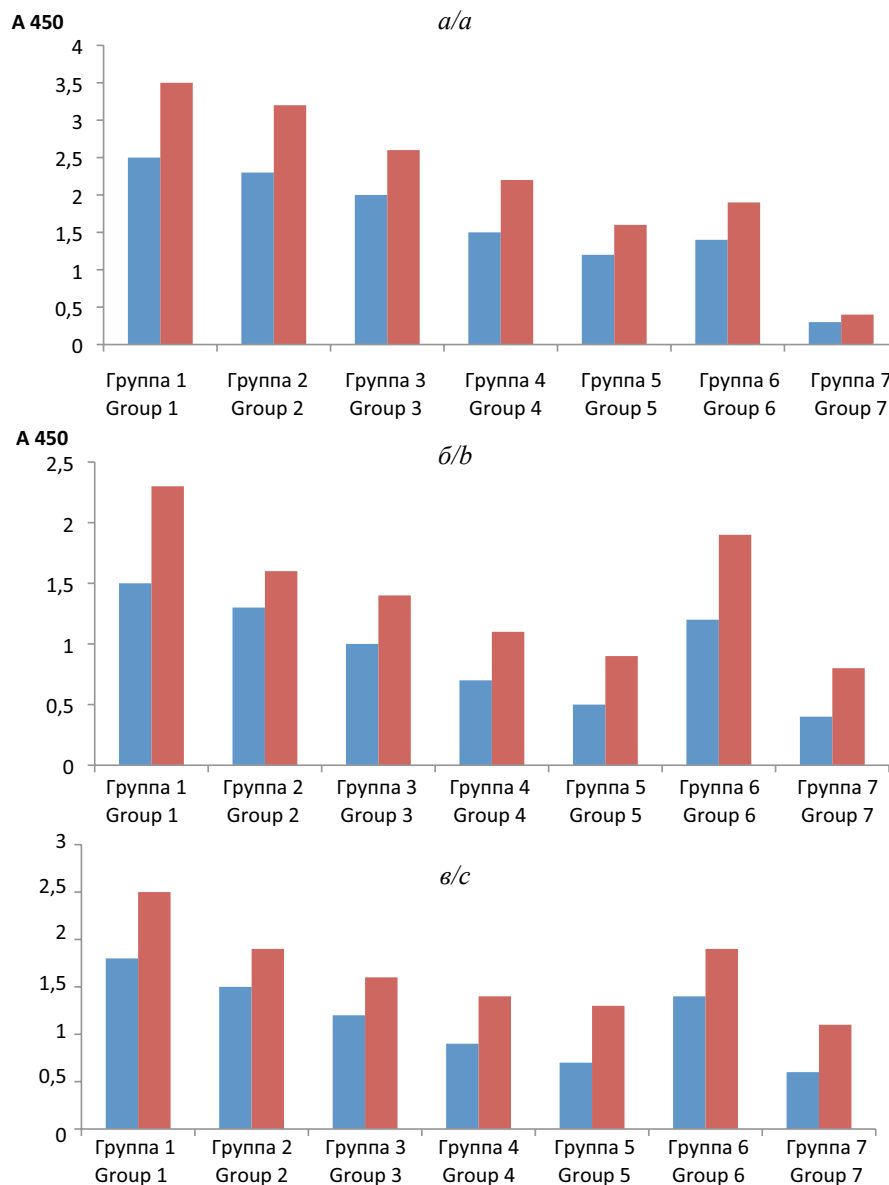


Рис. 5. Сравнительный анализ специфического связывания рек-VP6 (синие столбцы) и VP2/VP6 VLP PBA (красные столбцы) при их использовании в качестве антигена в непрямом ИФА для выявления IgG (а), IgM (б) и IgA (в) специфических антител в сыворотке крови мышей.

Fig. 5. Comparative analysis of specific recognition of rec-VP6 (blue columns) and RVA VP2/VP6 VLP (red columns) which were utilized in ELISA as antigen for the detection of IgG (a), IgM (b) and IgA (c) antibodies in mouse serum samples.

ный и не менее эффективный белковый иммуноген. Поскольку VLP, образующиеся путём самосборки рекомбинантных белков, экспрессируемых в клетке, обладают морфологическими и структурными особенностями, сходными с таковыми у нативных вирусов, не содержат никаких инфекционных генетических материалов, они более безопасны, чем цельновирионные вакцины. Последние данные свидетельствуют о том, что VLP представляют собой технологию платформы для вакцинации с высоким потенциалом для использования против широкого спектра инфекционных вирусов, при этом технология получения рекомбинантных белков в клетках насекомых с использованием бакуло-

вирусной системы экспрессии достаточно подробно освещена в зарубежной и отечественной литературе [17–19]. В настоящем исследовании композиция VP2/VP6 VLP PBA, представляющая собой конформационную структуру двух рекомбинантных белков, помимо перспективы применения в качестве компонента вакцины, была использована в качестве антигена для ИФА. Методологически этот подход коррелирует с технологией разработки ИФА для выявления IgA- и IgG-антител к PBC в сыворотке крови и молоке свиней с использованием отдельных очищенных комбинаций VLP или коктейля из всех полученных VLP PBC, показавший свою практическую эффективность [7].

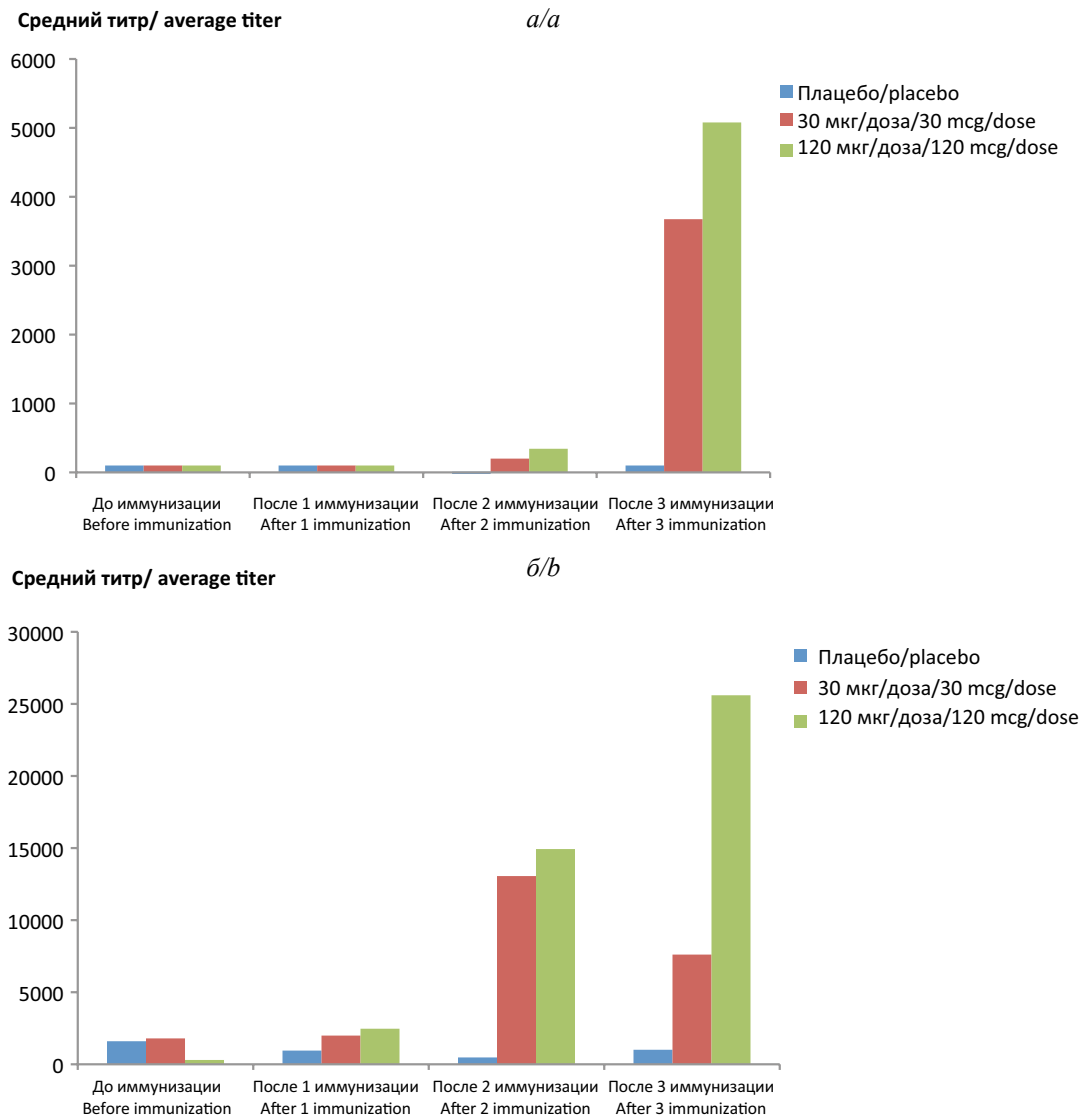


Рис. 6. Распределение сывороточных IgG (*a*) и IgA (*б*) антител в иммунном ответе к РВА в опыте на новорождённых карликовых поросятах. В качестве антигена использован VP2/VP6 VLP РВА, испытуемые пробы отобраны до, после первой, второй и третьей иммунизации (ось абсцисс) соответственно. Приведены среднегеометрические показатели значения обратного титра антител (ось ординат).

Fig. 6. Distribution of IgG (*a*) and IgA (*b*) antibodies to RVA in the serum samples of newborn dwarf piglets. RVA VP2/VP6 VLPs were used as antigen in ELISA, serum samples were collected before and after of each vaccination. The geometric mean values for reverse antibody titers are shown.

Помимо высокой консервативности и иммуногенности, особенностью VP6 является наличие нескольких других полезных свойств, которые могут позволить использовать их в качестве адъювантов, иммунологических носителей и средств доставки лекарств, а также выступать в качестве каркаса для производства ценных нанобиоматериалов [20, 21].

Известно, что с биологической точки зрения основу системного иммунитета составляют антитела IgG-класса, в то время как локальная продукция специфических sIgA-антител (димерная форма молекулы IgA, связанная с секреторным компонентом) в лимфоидных тканях желудочно-кишечного, респираторного

и мочеполового тракта обеспечивает местную систему защиты против вирусов. В формировании как системного иммунитета, так и иммунитета слизистых важную роль играют IgM-антитела, обеспечивающие вирусспецифическое связывание на ранней стадии иммунного ответа. Далее после изотипического переключения плазматические клетки начинают синтезировать антитела IgG и IgA. Этот процесс связан с реконструкцией ДНК В-клеток, реализуется CD4⁺-эффекторными Т-лимфоцитами и приводит к функциональному разнообразию гуморальный иммунный ответ. При энтеровирусных инфекциях изотипическое переключение с IgM на IgA происходит главным

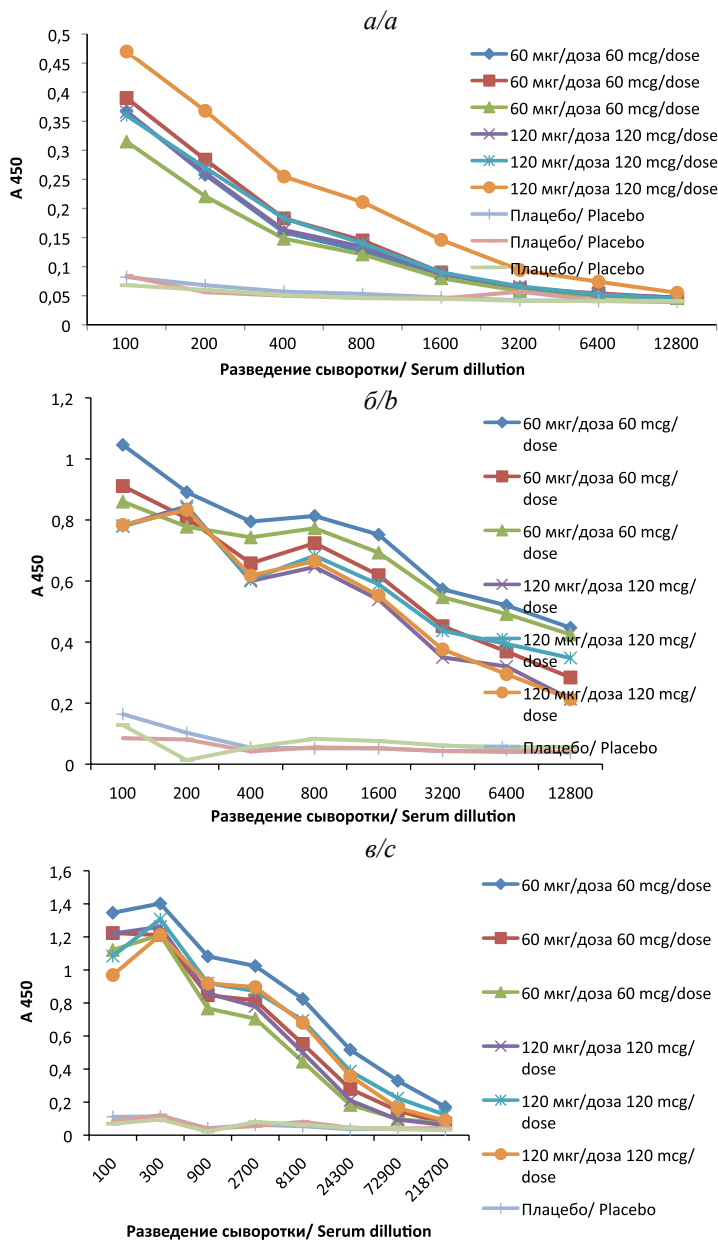


Рис. 7. Кривые титрования проб сыворотки крови морских свинок в VLP ИФА, отражающие уровень вирусспецифических антител IgG. В качестве антигена использован VP2/VP6 VLP РВА, испытуемые пробы отобраны после первой (а), второй (б) и третьей (в) иммунизации соответственно. В качестве отрицательного контроля использовали сыворотку крови неиммунных животных.

Fig. 7. Titration curves of guinea pigs serum samples obtained in VLP-based ELISA representing the levels of RVA-specific IgG antibodies. RVA VP2/VP6 VLPs were used as antigen in ELISA, serum samples were collected after first (a), second (b) and third (c) vaccination, respectively. Sera from non-vaccinated animals were used as negative controls.

образом в зародышевых центрах В-клеток лимфоидной ткани, ассоциированной с кишечником (GALT). В отличие от других иммуноглобулинов, молекулы sIgA устойчивы к протеолитическому расщеплению в желудочно-кишечном тракте, и поэтому по сравнению с IgG- или IgM-антителами они наиболее эффективны в связывании с энтеропатогенами [22, 23].

Ранее нами было показано, что появление IgG-антител к РВА в сыворотке крови является маркером формирования системного иммунитета против РВИ, обеспечивающего наряду с местным выживанием животных после экспериментального заражения [16].

Разработанная в настоящем исследовании тест-система позволяет выявлять не только IgG-, но и IgM- и IgA-антитела к РВА, что значительно расширяет показатели иммунного статуса организма животных (а в будущем, возможно, и человека), спектр исследуемого биологического материала и позволяет достоверно оценивать этапы формирования противовирусного иммунного ответа в доклинических исследованиях.

Заключение

Таким образом, можно сделать общий вывод о том, что разработанный ИФА с использованием VP2/VP6 VLP РВА в качестве универсального антигена выявляет весь спектр IgG-, IgM-, IgA-антител в иммунном ответе к РВА. Тест-система позволяет с высокой степенью достоверности определить уровень антител как в сыворотке крови, где IgG является основным изотипом, так и в секретах слизистых оболочек, где преобладают секреторные антитела класса IgA. Изучение распределения различных классов антител имеет важное значение в оценке иммуногенности и эффективности разрабатываемых вакцин против РВИ в доклинических исследованиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Львов Д.К., ред. *Руководство по вирусологии: Вирусы и вирусные инфекции человека и животных*. М.: МИА; 2013.
2. Saif L.J., Fernandez F.M. Group A rotavirus veterinary vaccines. *J. Infect. Dis.* 1996; 174(Suppl. 1): S98–106. https://doi.org/10.1093/infdis/174.supplement_1.s98
3. Kumar D., Anderson A.V., Pittman J., Springer N.L., Marthaler D.G., Mwangi W. Antibody response to rotavirus C pre-farrow natural planned exposure to gilts and their piglets. *Viruses*. 2022; 14(10): 2250. <https://doi.org/10.3390/v14102250>
4. Vetter V., Gardner R.C., Debrus S., Benninghoff B., Pereira P. Established and new rotavirus vaccines: a comprehensive review for healthcare professionals. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2022; 18(1): 1870395. <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1870395>
5. Folorusno O.S., Sebolai O.M. Overview of the development, impacts, and challenges of live-attenuated oral rotavirus vaccines. *Vaccines (Basel)*. 2020; 8(3): 341. <https://doi.org/10.3390/vaccines8030341>
6. Wang Y., Li J., Liu P., Zhu F. The performance of licensed rotavirus vaccines and the development of a new generation of rotavirus vaccines: a review. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2021; 17(3): 880–96. <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1801071>
7. Chepngeno J., Diaz A., Paim F.C., Saif L.J., Vlasova A.N. Rotavirus C: prevalence in suckling piglets and development of virus-like particles to assess the influence of maternal immunity on the disease development. *Vet. Res.* 2019; 50(1): 84. <https://doi.org/10.1186/s13567-019-0705-4>
8. Changotra H., Vij A. Rotavirus virus-like particles (RV-VLPs) vaccines: An update. *Rev. Med. Virol.* 2017; 27(6). <https://doi.org/10.1002/rmv.1954>
9. Jere K.C., O'Neill H.G., Potgieter A.C., van Dijk A.A. Chimeric virus-like particles derived from consensus genome sequences of human rotavirus strains co-circulating in Africa. *PLoS One*. 2014; 9(9): e105167. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105167>
10. Song J.M. Parenteral, non-live rotavirus vaccine: recent history and future perspective. *Clin. Exp. Vaccine Res.* 2021; 10(3): 203–10. <https://doi.org/10.7774/cevr.2021.10.3.203>

11. Crawford S.E., Estes M.K., Ciarlet M., Barone C., O'Neal C.M., Cohen J., et al. Heterotypic protection and induction of a broad heterotypic neutralization response by rotavirus-like particles. *J. Virol.* 1999; 73(6): 4813–22. <https://doi.org/10.1128/jvi.73.6.4813-4822.1999>
12. Черепушкин С.А., Цибезов В.В., Южаков А.Г., Лагышев О.Е., Алексеев К.П., Алтаева Э.Г. и др. Синтез и характеристика вирусоподобных частиц ротавируса А (Reoviridae: Sedoreovirinae: Rotavirus: Rotavirus A) человека. *Вопросы вирусологии.* 2021; 66(1): 55–64. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-27> EDN: <https://www.elibrary.ru/eersag>
13. Yuan L., Saif L.J. Induction of mucosal immune responses and protection against enteric viruses: rotavirus infection of gnotobiotic pigs as a model. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2002; 87(3–4): 147–60. [https://doi.org/10.1016/s0165-2427\(02\)00046-6](https://doi.org/10.1016/s0165-2427(02)00046-6)
14. Azevedo M.P., Vlasova A.N., Saif L.J. Human rotavirus virus-like particle vaccines evaluated in a neonatal gnotobiotic pig model of human rotavirus disease. *Expert. Rev. Vaccines.* 2013; 12(2): 169–81. <https://doi.org/10.1586/erv.13.3>
15. Shoja Z., Jalilvand S., Latifi T., Roohvand F. Rotavirus VP6: involvement in immunogenicity, adjuvant activity, and use as a vector for heterologous peptides, drug delivery, and production of nano-biomaterials. *Arch. Virol.* 2022; 167(4): 1013–23. <https://doi.org/10.1007/s00705-022-05407-9>
16. Лагышев О.Е., Елисеева О.В., Костина Л.В., Алексеев К.П., Хаметова К.М., Алтаева Е.Г. и др. Оценка иммуногенной активности клонированного штамма WA ротавируса А человека. *Вопросы вирусологии.* 2019; 64(4): 156–64. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-4-156-164> EDN: <https://www.elibrary.ru/sckbyy>
17. Lai C.C., Cheng Y.C., Chen P.W., Lin T.H., Tzeng T.T., Lu C.C., et al. Process development for pandemic influenza VLP vaccine production using a baculovirus expression system. *J. Biol. Eng.* 2019; 13: 78. <https://doi.org/10.1186/s13036-019-0206-z>
18. Белжеларская С.Н. Бакуловирусные системы экспрессии рекомбинантных белков в клетках насекомых и млекопитающих. *Молекулярная биология.* 2011; 45(1): 142–59. EDN: <https://www.elibrary.ru/ndjchz>
19. Changotra H., Vij A. Rotavirus virus-like particles (RV-VLPs) vaccines: An update. *Rev. Med. Virol.* 2017; 27(6). <https://doi.org/10.1002/rmv.1954>
20. Shoja Z., Jalilvand S., Latifi T., Roohvand F. Rotavirus VP6: involvement in immunogenicity, adjuvant activity, and use as a vector for heterologous peptides, drug delivery, and production of nano-biomaterials. *Arch. Virol.* 2022; 167(4): 1013–23. <https://doi.org/10.1007/s00705-022-05407-9>
21. Heinimäki S., Tamminen K., Hytönen V.P., Malm M., Blazevic V. Rotavirus inner capsid VP6 acts as an adjuvant in formulations with particulate antigens only. *Vaccines (Basel).* 2020; 8(3): 365. <https://doi.org/10.3390/vaccines8030365>
22. Macpherson A.J., McCoy K.D., Johansen F.E., Brandtzaeg P. The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunol.* 2008; 1(1): 11–22. <https://doi.org/10.1038/mi.2007.6>
23. Mantis N.J., Rol N., Corthesy B. Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut. *Mucosal Immunol.* 2011; 4(6): 603–11. <https://doi.org/10.1038/mi.2011.41>
6. Wang Y., Li J., Liu P., Zhu F. The performance of licensed rotavirus vaccines and the development of a new generation of rotavirus vaccines: a review. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2021; 17(3): 880–96. <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1801071>
7. Chepengeno J., Diaz A., Paim F.C., Saif L.J., Vlasova A.N. Rotavirus C: prevalence in suckling piglets and development of virus-like particles to assess the influence of maternal immunity on the disease development. *Vet. Res.* 2019; 50(1): 84. <https://doi.org/10.1186/s13567-019-0705-4>
8. Changotra H., Vij A. Rotavirus virus-like particles (RV-VLPs) vaccines: An update. *Rev. Med. Virol.* 2017; 27(6). <https://doi.org/10.1002/rmv.1954>
9. Jere K.C., O'Neill H.G., Potgieter A.C., van Dijk A.A. Chimeric virus-like particles derived from consensus genome sequences of human rotavirus strains co-circulating in Africa. *PLoS One.* 2014; 9(9): e105167. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105167>
10. Song J.M. Parenteral, non-live rotavirus vaccine: recent history and future perspective. *Clin. Exp. Vaccine Res.* 2021; 10(3): 203–10. <https://doi.org/10.7774/cevr.2021.10.3.203>
11. Crawford S.E., Estes M.K., Ciarlet M., Barone C., O'Neal C.M., Cohen J., et al. Heterotypic protection and induction of a broad heterotypic neutralization response by rotavirus-like particles. *J. Virol.* 1999; 73(6): 4813–22. <https://doi.org/10.1128/jvi.73.6.4813-4822.1999>
12. Cherepushkin S.A., Tsibezov V.V., Yuzhakov A.G., Latyshev O.E., Alekseev K.P., Altaeva E.G., et al. Synthesis and characterization of human rotavirus A (Reoviridae: Sedoreovirinae: Rotavirus: Rotavirus A) virus-like particles. *Voprosy virusologii.* 2021; 66(1): 55–64. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-27> EDN: <https://www.elibrary.ru/eersag> (in Russian)
13. Yuan L., Saif L.J. Induction of mucosal immune responses and protection against enteric viruses: rotavirus infection of gnotobiotic pigs as a model. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2002; 87(3–4): 147–60. [https://doi.org/10.1016/s0165-2427\(02\)00046-6](https://doi.org/10.1016/s0165-2427(02)00046-6)
14. Azevedo M.P., Vlasova A.N., Saif L.J. Human rotavirus virus-like particle vaccines evaluated in a neonatal gnotobiotic pig model of human rotavirus disease. *Expert. Rev. Vaccines.* 2013; 12(2): 169–81. <https://doi.org/10.1586/erv.13.3>
15. Shoja Z., Jalilvand S., Latifi T., Roohvand F. Rotavirus VP6: involvement in immunogenicity, adjuvant activity, and use as a vector for heterologous peptides, drug delivery, and production of nano-biomaterials. *Arch. Virol.* 2022; 167(4): 1013–23. <https://doi.org/10.1007/s00705-022-05407-9>
16. Latyshev O.E., Eliseeva O.V., Kostina L.V., Alekseev K.P., Khametova K.M., Altaeva E.G., et al. Assessment of immunogenic activity of the cloned human rotavirus A WA strain. *Voprosy virusologii.* 2019; 64(4): 156–64. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-4-156-164> EDN: <https://www.elibrary.ru/sckbyy> (in Russian)
17. Lai C.C., Cheng Y.C., Chen P.W., Lin T.H., Tzeng T.T., Lu C.C., et al. Process development for pandemic influenza VLP vaccine production using a baculovirus expression system. *J. Biol. Eng.* 2019; 13: 78. <https://doi.org/10.1186/s13036-019-0206-z>
18. Belzhelarskaya C.N. Baculovirus expression systems for recombinant protein production in insect and mammalian cells. *Moлекулярная биология.* 2011; 45(1): 142–59. EDN: <https://www.elibrary.ru/ndjchz> (in Russian)
19. Changotra H., Vij A. Rotavirus virus-like particles (RV-VLPs) vaccines: An update. *Rev. Med. Virol.* 2017; 27(6). <https://doi.org/10.1002/rmv.1954>
20. Shoja Z., Jalilvand S., Latifi T., Roohvand F. Rotavirus VP6: involvement in immunogenicity, adjuvant activity, and use as a vector for heterologous peptides, drug delivery, and production of nano-biomaterials. *Arch. Virol.* 2022; 167(4): 1013–23. <https://doi.org/10.1007/s00705-022-05407-9>
21. Heinimäki S., Tamminen K., Hytönen V.P., Malm M., Blazevic V. Rotavirus inner capsid VP6 acts as an adjuvant in formulations with particulate antigens only. *Vaccines (Basel).* 2020; 8(3): 365. <https://doi.org/10.3390/vaccines8030365>
22. Macpherson A.J., McCoy K.D., Johansen F.E., Brandtzaeg P. The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunol.* 2008; 1(1): 11–22. <https://doi.org/10.1038/mi.2007.6>
23. Mantis N.J., Rol N., Corthesy B. Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut. *Mucosal Immunol.* 2011; 4(6): 603–11. <https://doi.org/10.1038/mi.2011.41>

REFERENCES

1. L'vov D.K., ed. *Virology Guide: Human and Animal Viruses and Viral Infections [Rukovodstvo po virusologii: Virusy i virusnye infektsii cheloveka i zhivotnykh]*. Moscow: MIA; 2013. (in Russian)
2. Saif L.J., Fernandez F.M. Group A rotavirus veterinary vaccines. *J. Infect. Dis.* 1996; 174(Suppl. 1): S98–106. https://doi.org/10.1093/infdis/174.supplement_1.s98
3. Kumar D., Anderson A.V., Pittman J., Springer N.L., Marthaler D.G., Mwangi W. Antibody response to rotavirus C pre-farrow natural planned exposure to gilts and their piglets. *Viruses.* 2022; 14(10): 2250. <https://doi.org/10.3390/v14102250>
4. Vetter V., Gardner R.C., Debrus S., Benninghoff B., Pereira P. Established and new rotavirus vaccines: a comprehensive review for healthcare professionals. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2022; 18(1): 1870395. <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1870395>
5. Folorunso O.S., Sebolai O.M. Overview of the development, impacts, and challenges of live-attenuated oral rotavirus vaccines. *Vaccines (Basel).* 2020; 8(3): 341. <https://doi.org/10.3390/vaccines8030341>