



Характеристика маркеров холодовой адаптации кандидатных вакцинных штаммов для живых аттенуированных вакцин против ветряной оспы и опоясывающего герпеса

Нагиева Ф.Г.[✉], Баркова Е.П., Строева А.Д., Сидоров А.В., Зверев В.В.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт им. И.И. Мечникова», 115088, Москва, Россия

Введение. Значимость ветряной оспы обусловлена ее широкой распространенностью, значительной вероятностью тяжелого клинического течения, осложнений, которые могут приводить к летальным исходам. Вакцинация является единственным специфическим способом профилактики заболевания. **Цель** работы заключалась в оценке аттенуации холодоадаптированных (ХА) кандидатных вирусных штаммов *Varicella zoster* и *Herpes zoster* традиционными и новыми методами.

Материалы и методы. В работе использовали штаммы диплоидных клеток легких и кожно-мышечной ткани эмбриона человека, первичные и диплоидные клетки фибробластов эмбриона морской свинки. Были получены два клинических изолята вируса — от ребенка, больного ветряной оспой, и взрослого в период реактивации опоясывающего герпеса. В качестве контроля использовали вакцинный штамм vOка и лабораторный штамм Ellen. Инфекционную активность вирусов определяли методом предельных разведений вируса в чувствительных культурах. Вирулентность устанавливали при анализе инфицированных вирусом *Varicella zoster* хорион-аллантаисных оболочек развивающихся куриных эмбрионов.

Результаты. Клинические изоляты пассированы при пониженной температуре и исследованы в сравнительных экспериментах на наличие биологических маркеров аттенуации. Установлено, что штаммы вируса *Varicella zoster* vFiraVax и вируса *Herpes zoster* vZelVax обладали температурочувствительностью и холодоадаптируемостью, но не вирулентностью. Аттенуированные ХА вирусные штаммы индуцировали более низкий уровень экспрессии α - и γ -интерфероновых рецепторов на мононуклеарных клетках человека в отличие от их родительских вариантов.

Заключение. Нами созданы и охарактеризованы два кандидатных вакцинных штамма на основе аттенуации клинических изолятов.

Ключевые слова: вирус ветряной оспы; вирус опоясывающего герпеса; живой аттенуированный вирус ветряной оспы и опоясывающего герпеса; температурочувствительность; холодоадаптируемость; клеточный маркер; атт-фенотип; новые биологические маркеры аттенуации.

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Нагиева Ф.Г., Баркова Е.П., Строева А.Д., Сидоров А.В., Зверев В.В. Характеристика маркеров холодовой адаптации кандидатных вакцинных штаммов для живых аттенуированных вакцин против ветряной оспы и опоясывающего герпеса. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020; 97(4): 202–311.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-4-2>

Поступила 05.02.2020
Принята в печать 06.04.2020

Characterization of markers of cold-adapted candidate virus strains for live attenuated vaccines against chickenpox and shingles

Firaya G. Nagieva[✉], Elena P. Barkova, Alexandra D. Stroevea, Alexander V. Sidorov, Vitaly V. Zverev

I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, 115088, Moscow, Russia

Introduction. Chickenpox poses a significant public health concern due to its worldwide occurrence, a substantial probability of severe clinical progression, development of complications that can lead to a fatal outcome. Routine vaccination is the only way to prevent the disease. **The purpose** of this study was to assess the attenuation of cold-adapted (CA) candidate virus strains of *Varicella zoster* and *Herpes zoster* by using traditional and new methods.

Materials and methods. The study was performed on strains of diploid cells from human embryonic lung and musculoskeletal tissue, primary and diploid cells of guinea pig fetal fibroblasts. Two clinical isolates of the virus were obtained — from a child with chickenpox and from an adult during the reactivation of shingles. The vOka vaccine strain and Ellen strain, a laboratory strain, were used as a control. The viral infectivity was measured by using a sensitive limiting dilution assay. The virulence was measured through the analysis of chick embryo chorioallantoic membranes infected with the *Varicella zoster* virus.

Results. The clinical isolates were sub-cultured at lower temperatures, put through comparative tests and checked for presence of attenuation biomarkers. It was found that vFiraVax, a *Varicella zoster* virus strain, and vZelVax, a *Herpes zoster* virus strain were temperature-sensitive and cold-adaptable, but they lacked virulence. Attenuated CA virus strains induced lower expression of IFN- α and IFN- γ receptors on human mononuclear cells as compared to their parental variants.

Conclusion. We created and assessed two candidate vaccine strains through attenuation of clinical isolates.

Keywords: *varicella zoster virus; herpes zoster virus; live attenuated varicella zoster and herpes zoster virus; temperature-sensitive; cold-adapted; cell marker; att-phenotype; new attenuation biomarkers.*

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Nagieva F.G., Barkova E.P., Stroeva A.D., Sidorov A.V., Zverev V.V. [Characterization of markers of cold-adapted candidate virus strains for live attenuated vaccines against chickenpox and shingles]. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii.* 2020; 97(4): 303–311. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-4-2>

Received 5 February 2020

Accepted 6 April 2020

Введение

Вирус *Varicella zoster* (VZV) является человеческим α -герпесвирусом и тесно связан с вирусом герпеса простого 1-го и 2-го типов. VZV имеет типичную морфологию вируса герпеса, однако его геном является самым небольшим среди α -герпесвирусов и он кодирует более 70 генных продуктов [1].

Ветряная оспа (ВО) имеет общую этиологию и тесную патогенетическую связь с хронической формой инфекции — опоясывающим герпесом (ОГ), обусловленным вирусом *Herpes zoster* (HZV). ВО и ОГ являются разными клиническими формами одного инфекционного процесса. Риск развития ОГ у переболевших ВО составляет 10–30%. Среди лиц в возрасте 60–80 лет частота заболевания ОГ варьирует от 5 до 10 случаев на 1000 человек. У 15–40% больных ОГ развивается постгерпетическая невралгия, плохо поддающаяся лечению и приводящая к значительному снижению качества жизни. Другие осложнения реактивации включают энцефалиты, моторную слабость, миелопатию и др. Наиболее тяжелые осложнения возникают у иммунокомпрометированных индивидуумов [2–4].

За рубежом на протяжении многих лет применяется живая культуральная вакцина на основе аттенуированного вирусного штамма vOka (Япония). Эта вакцина создает длительный напряженный поствакцинальный иммунитет после двукратного цикла иммунизации (на 10–20 лет — период наблюдения) и предотвращает смертельные исходы у новорожденных и детей с ослабленным иммунитетом, а также частично предотвращает развитие ОГ у пожилых людей и людей с ослабленным иммунитетом [5].

На основе вакцинного штамма vOka производится вакцина для иммунизации детей и взрослых. Доза вируса VZV в вакцине для взрослых увеличивается на 2 порядка.

Отечественные аналоги вакцины против ВО в России отсутствуют. В нашей лаборатории созданы два отечественных аттенуированных вакцинных штамма VZV для конструирования живых культуральных отечественных вакцин, предназначенных для детей и взрослых.

Основной целью настоящей работы является оценка аттенуированных вакцинных штаммов по традиционным биологическим маркерам аттенуации и поиск новых маркеров аттенуации для более полного контроля свойств кандидатов в вакцинные вирусные штаммы для живой культуральной вакцины против ВО и ОГ.

Материалы и методы

Культуры клеток

В работе использовали штаммы диплоидных клеток легких эмбриона человека (ЛЭЧ-3 и MRC-5), штамм диплоидных клеток кожно-мышечной ткани эмбриона человека (КМ 27), первичные и диплоидные клетки фибробластов эмбрионов морской свинки (ФЭМС).

Диплоидные клеточные культуры выращивали на питательной среде DMEM/F12 («PanEco») с 10 мМ HEPES, 5% эмбриональной телячьей сыворотки («HyClone») с добавлением 2 мМ глутамина и 40 мкг/мл гентамицина.

Вирусы

Получили клинический изолят VZV и клинический изолят HZV от инфицированных пациентов

в виде корочек от везикул, сформировавшихся с начала появления сыпи. Один изолят получили от здоровой девочки 6 лет, заболевшей ВО в Москве, другой — от мужчины 63 лет в период реактивации рецидивирующего ОГ.

Аттенуация клинических изолятов

Вирусный изолят ВО и ОГ аттенуировали на клетках ЛЭЧ-3 при низкой температуре (30°C). Изоляты прошли 12 пассажей на диплоидных клетках ЛЭЧ-3, 6 пассажей на первичных клетках ФЭМС и дополнительно 2 пассажа на клетках ЛЭЧ-3. После завершения полного цикла холодовой адаптации изоляту VZV присвоили название vFiraVax VZV, а изоляту HZV — vZelVax HZV.

В качестве референс-вирусов VZV использовали аттенуированный вакцинный вирусный штамм vOKA/Merck VZV (США) и лабораторный вирусный штамм Ellen VZV (США).

Определение инфекционной активности вирусов VZV

Инфекционную активность вирусов определяли на клеточных культурах КМ-27 или ФЭМС, выращенных на 24-луночных планшетах. В поддерживающей питательной среде ДМЕМ с 2% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) готовили 10-кратные разведения вирусосодержащей жидкости (ВСЖ) с 10^{-1} до 10^{-10} . Из планшетов с выросшими клетками ростовую среду удаляли и монослой клеток однократно промывали фосфатно-буферным раствором (ФБР). По 0,1 мл каждого разведения ВСЖ вносили в центр лунки с клеточным монослоем и оставляли на контакт при 36,5°C и 5% CO₂ на 1 ч. После завершения контакта в каждую лунку, включая лунки с контрольными клетками, вносили по 1 мл поддерживающей среды ДМЕМ с 2% ЭТС. Результаты титрования учитывали на 6–7-е сутки с момента инфицирования в реакции гемадсорбции с 0,25% взвесью эритроцитов морской свинки или человека 0 группы Rh+. За титр вируса принимали максимальное разведение вируса, вызывающее гемадсорбцию в 50% инфицированных культур клеток, при отсутствии гемадсорбции в контрольных неинфицированных культурах клеток.

Заражение хорион-аллантаической оболочки (ХАО) развивающихся куриных эмбрионов

У 11–12-дневных куриных эмбрионов создавали искусственную воздушную полость, на нее наносили по 0,1 мл ВСЖ VZV. Ежедневно просматривали эмбрионы на жизнеспособность. В случае гибели эмбрионов на следующие сутки их уничтожали. Наблюдали за эмбрионами в течение не более 6 сут. После охлаждения инфицированных эмбрионов из них извлекали ХАО на чашку Петри, обо-

лочку отмывали ФБР и просматривали на наличие геморрагии или белых оспин.

Получение мышинных сывороток, специфичных к VZV

Мышей линии BALB/c, свободных от патогенной флоры (SPF-мыши), иммунизировали ВСЖ по 0,5 мл с 6 lg ГАДЕ_{50/0,1мл} (ГАДЕ — гемадсорбирующая единица) внутривентрально трехкратно 3 дня подряд. Указанный цикл иммунизации повторяли трижды с 2-недельным интервалом.

Определение вирусспецифических антител в непрямом иммуноферментном анализе

В качестве VZV-сорбента на твердую фазу иммунологического 96-луночного планшета («Nunk») сорбировали лизаты клеток КМ 27, инфицированных лабораторным штаммом Ellen VZV. Лизаты инфицированных клеток получали путем заражения монослоя клеток КМ 27, выращенных на культуральных флаконах площадью 175 см² («Costar»). Для инфицирования клеточного монослоя из культурального флакона удаляли ростовую среду, монослой клеток дважды промывали ФБР и на клеточный монослой вносили по 5 мл ВСЖ Ellen VZV с множественностью инфицирования 0,2. Культивирование инфицированных клеток проводили в инкубаторе в течение 10 сут при 36,5°C и 5% CO₂. Затем из культуральных флаконов собирали ВСЖ, а в культуральный флакон с инфицированными клетками вносили по 5 мл ФБР, и культуральный флакон с инфицированными клетками трижды замораживали при –70°C и размораживали при 4°C. В полученном инфицированном лизате, содержащем клеточно-ассоциированный VZV, на аппарате «NanoPhotometer NP80-Touch» определяли концентрацию белка.

После вортексирования инфицированный клеточный лизат сорбировали на лунки 96-луночных планшетов по 50 мкл с концентрацией белка 5 мкг на лунку и высушивали в термостате при 36,5°C в течение 18–20 ч.

Постановку непрямого иммуноферментного анализа осуществляли по общепринятой методике: блокировка открытых связей 1% бычьим сывороточным альбумином на 0,01 М ФБР в термостате в течение 1,5 ч, удаление блокирующего раствора, титрование исследуемой сыворотки морской свинки с двукратным шагом в длинном ряду 96-луночного планшета, начиная с разведения 1 : 100 до 1 : 204 800. Связывание твердофазного антигена с иммунными сыворотками проходило в термостате в течение 1,5 ч. После завершения контакта планшеты промывали трижды по 200 мкл на лунку 0,01 М ФБР с 0,05% Твин-20. Иммунные комплексы выявляли с помощью конъюгата Protein A–Peroxidase («Sigma») в рабочем разведении 1 : 500 по 100 мкл на лунку в течение 1 ч в термостате. Далее план-

шеты отмывали пятикратно 0,01 М ФБР с 0,05% Твин-20 и детектировали иммунные комплексы субстратным раствором тетраметилбензида с перекисью водорода в течение 15 мин в темноте. Реакцию останавливали 4N H₂SO₄. Оптическую плотность измеряли на фотометре «Bio-Rad 680» при длине волны 450 нм.

Определение экспрессии рецепторов для α- и γ-интерферонов (ИФН) человека

Выделение лимфоцитов из венозной крови человека 0 группы Rh+ и пробоподготовка для прямой реакции иммунофлюоресценции подробно описаны в работах [6, 7]. Мононуклеарные клетки человека (МКЧ) выделяли из гепаринизированной крови в градиенте фиколла при плотности 1,077 г/см³ («PanEco»). Полученные МКЧ ресуспендировали в среде RPMI-1640 с 1% бычьего сывороточного альбумина, индуцировали антигенами VZV, культивировали в инкубаторе при 36,5°C и 5% CO₂ и в разные временные интервалы готовили образцы, индуцированные VZV МКЧ, для прямой реакции иммунофлюоресценции. Приготовленные образцы окрашивали ФИТЦ-конъюгатами на основе моноклональных антиидиотипических антител, структурно имитирующих α/β- и γ-ИФН человека. Эти антиидиотипические антитела являются антирецепторными для ИФН-α/β и ИФН-γ. После мечения маркерными препаратами их оценивали в люминесцентном микроскопе «Optika» при длине волны 510–550 нм.

Получение гемагглютинина VZV по E. Norrby [8]

Для постановки реакции торможения гемагглютинирующей активности (РТГА) специфических анти-VZV-иммунных сывороток [8] получили гемагглютинин из ВСЖ Ellen VZV.

ВСЖ получали путем инфицирования культуры клеток Vero-CCL 81 лабораторным штаммом Ellen VZV. ВСЖ осветляли центрифугированием при 1500 об/мин в течение 30 мин и обрабатывали Твин-80 и эфиром. Обработанный материал вновь центрифугировали при тех же условиях, в результате происходило расслаивание смеси. Гемагглютинирующий антиген находился в нижнем слое, который аккуратно отсасывали во флакон, закрывали стерильной марлевой салфеткой и оставляли на ночь для освобождения от паров эфира. Для определения титра вирусного гемагглютинина ставили реакцию гемагглютинации (РГА) со взвесью эритроцитов морской свинки.

РГА применяли для выбора рабочего разведения гемагглютинирующего антигена для постановки РТГА. В основе последней лежала задержка гемагглютинирующего действия вирусного антигена специфическими иммунными сыворотками.

РТГА. В реакции использовали рабочее разведение антигена, содержащее в 0,25 мл 2 единицы

антигена. До постановки реакции исследуемые сыворотки освобождали от термолабильных (прогревание при 56°C в течение 30 мин) и термостабильных (обработка фильтратом холерного вибриона) ингибиторов. Реакцию проводили по стандартной методике. За титр антител принимали предельное разведение сыворотки, полностью подавляющее гемагглютинирующую активность антигена.

Определение иммуногенности холодоадаптированных (ХА) вакцинных штаммов vFiraVax VZV и vZelVax HZV проводили на животной модели. Морским свинкам массой 300–400 г вводили подкожно одну прививочную дозу вакцины против ВО и ОГ. Через 2, 3 и 5 мес с момента иммунизации из сердца извлекали кровь для постановки реакции нейтрализации и РТГА.

Из иммунных сывороток были удалены термолабильные и термостабильные ингибиторы для реакции нейтрализации и РТГА. В качестве нейтрализующего вируса в реакции нейтрализации использовали вакцину VariVax (США), содержащую 1000 БОЕ_{50/0,5 мл} или 6 Ig ГАДЕ_{50/0,5 мл}.

Реакция нейтрализации была поставлена на клетках КМ 27. Реакцию нейтрализации учитывали на 7-е сутки с момента постановки, титр устанавливали на основе 100% защиты клеточных культур.

Статистическую обработку проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В процессе холодовой адаптации вирусы, как правило, приобретают мутации по температурочувствительности (ts-фенотип) и холодоадаптированности (са-фенотип). Эти два фенотипа являются основными лабораторными контролями кандидатов в вакцинные штаммы для живой вирусной вакцины, т.е. основными биологическими маркерами аттенуированных вирусных штаммов [9].

В табл. 1 и 2 представлены результаты титрования аттенуированных штаммов и диких родительских штаммов VZV и HZV на диплоидных клетках ФЭМС и MRC-5.

Представленные в табл. 1 и 2 результаты демонстрировали, что кандидаты в вакцинные вирусные штаммы vFiraVax VZV и vZelVax HZV не репродуцировались при непермиссивной температуре 39°C, т.е. обладали температурочувствительностью — ts-фенотипом, и репродуцировались более эффективно при субоптимальной температуре, т.е. обладали холодоадаптированностью — са-фенотипом.

Кандидаты в вакцинные штаммы должны также различаться по способности репродуцироваться в клеточной культуре ФЭМС. При этом аттенуированные штаммы VZV должны обладать более высокой репродуктивной активностью в этих клетках по сравнению с дикими вирусными изолятами.

Таблица 1. Определение ts- и ca-маркеров биологической аттенуации кандидатов в вакцинные штаммы VZV на клетках ФЭМС

Table 1. Identification of ts- and ca-markers of biological attenuation of candidate VZV vaccine strains on GPFF cells

Вирусный штамм Viral strain	Инфекционный титр VZV и HZV при различных температурных режимах, lg ГАДЕ _{50/0,1 мл} The VZV and HZV infectious titer at different temperatures, lg HAU _{50/0.1 ml}		
	30°C	36°C	39°C
vFiraVax VZV, 19-й пассаж, ВСЖ, 11 сут vFiraVax VZV, 19 th passage, vaccinated liquid, 11 days	9,0	7,75	0
vFiraVax VZV, 19-й пассаж, инфицированные клетки, 11 сут vFiraVax VZV, 19 th passage, infected cells, 11 days	12,8	11,8	0
pFira VZV, 2-й пассаж, ВСЖ, 11 сут pFira VZV, 2 nd passage, vaccinated liquid, 11 days	7,75	7,5	6,5
vZelVax HZV, 19-й пассаж, ВСЖ, 11 сут vZelVax HZV, 19 th passage, vaccinated liquid, 11 days	8,5	6,5	0
vZelVax HZV, 19-й пассаж, инфицированные клетки, 11 сут vZelVax HZV, 19 th passage, infected cells, 11 days	12,8	10,3	0
pZel HZV, 2-й пассаж, ВСЖ, 11 сут pZel HZV, 2 nd passage, vaccinated liquid, 11 days	7,5	7,5	6,5
vOKA/Merck (USA)	6,5	5,5	0

Примечание. Здесь и в табл. 2–6: v — вакцинный штамм, p — родительский штамм.
Note. Here and in Tables 2–6: v — a vaccine strain, p — a parental strain.

Таблица 2. Определение ts- и ca-маркеров биологической аттенуации кандидатов в вакцинные штаммы VZV на клетках MRC-5

Table 2. Identification of ts- and ca-markers of biological attenuation of candidate VZV vaccine strains on MRC-5 cells

Вирусный штамм Viral strain	Инфекционный титр VZV и HZV при различных температурных режимах, lg ГАДЕ _{50/0,1 мл} The VZV and HZV infectious titer at different temperatures, lg HAU _{50/0.1 ml}		
	30°C	36°C	39°C
vFiraVax VZV, 19-й пассаж, ВСЖ, 11 сут vFiraVax VZV, 19 th passage, vaccinated liquid, 11 days	9,5	7,75	0
vFiraVax VZV, 19-й пассаж, инфицированные клетки, 11 сут vFiraVax VZV, 19 th passage, infected cells, 11 days	12,8	10,8	0
pFira VZV, 2-й пассаж, ВСЖ, 11 сут pFira VZV, 2 nd passage, vaccinated liquid, 11 days	8,0	7,25	6,5
vZelVax HZV, 19-й пассаж, ВСЖ, 11 сут vZelVax HZV, 19 th passage, vaccinated liquid, 11 days	8,5	7,5	0
vZelVax HZV, 19-й пассаж, инфицированные клетки, 11 сут vZelVax HZV, 19 th passage, infected cells, 11 days	12,3	11,3	0
pZel HZV, 2-й пассаж, ВСЖ, 11 сут pZel HZV, 2 nd passage, vaccinated liquid, 11 days	8,0	8,0	6,5
vOKA/Merck (USA)	6,5	6,0	0

В табл. 3 представлены результаты определения титров аттенуированных и родительских вирусов VZV и HZV, репродуцирующихся в клетках ФЭМС и оцененных по реакции гемадсорбирующей активности на диплоидных клетках ФЭМС.

Результаты, представленные в табл. 3, показывали, что инфекционная активность родительских вариантов VZV, установленная на клетках ФЭМС,

на 1,5–2,0 lg ГАДЕ_{50/0,1 мл} ниже по сравнению с аттенуированными штаммами VZV. Это указывало на другой биологический маркер аттенуации кандидатных вакцинных штаммов для живых культуральных вакцин.

Нами разработаны новые маркеры биологической аттенуации кандидатных вакцинных штаммов VZV.

Таблица 3. Сравнительная репродуктивная активность аттенуированных и родительских вирусных штаммов VZV в клетках ФЭМС

Table 3. Comparative reproductive activity of attenuated and parental VZV virus strains in GPFF cells

Вирусный штамм Viral strain	Инфекционный титр VZV и HZV, Ig ГАДЕ _{50/0,1 мл} Infectious titer VZV and HZV, Ig HAU _{50/0,1 ml}
vFiraVax VZV, 19-й пассаж, ВСЖ, 14 сут vFiraVax VZV, 19 th passage, vaccinated liquid, 14 days	8,5
pFira VZV, 2-й пассаж, ВСЖ, 14 сут pFira VZV, 2 nd passage, vaccinated liquid, 14 days	6,5
vZelVax HZV, 19-й пассаж, ВСЖ, 14 сут vZelVax HZV, 19 th passage, vaccinated liquid, 14 days	8,0
pZel HZV, 2-й пассаж, ВСЖ, 14 сут pZel HZV, 2 nd passage, vaccinated liquid, 14 days	6,5

Антиидиотипические моноклональные антитела, направленные к рецепторам ИФН- α/β и ИФН- γ на иммунокомпетентных клетках человека, индуцированных *in vitro* VZV, использовали для оценки количественных показателей уровня экспрессии ИФН-рецепторов [6, 7]. Ранее на модели различных штаммов вируса кори нами показано, что уровень и продолжительность экспрессии ИФН-рецепторов находились в обратной зависимости от степени аттенуации вируса кори [10].

Таблица 4. Сравнительная экспрессия рецепторов для ИФН- α/β (в %) на МКЧ, индуцированных *in vitro* аттенуированными и родительскими штаммами VZV на разных пассажных уровнях

Table 4. Comparative expression of IFN- α/β receptors (%) on HMC induced *in vitro* by attenuated and parental VZV strains at different passage levels

Вирусный штамм Viral strain	Экспрессия рецепторов для ИФН- α/β на МКЧ в различные временные интервалы (в часах) Expression of IFN- α/β receptors on HMC at different time intervals (hours)			
	3	24	48	72
pFira VZV, 3-й пассаж pFira VZV, 3 rd passage	14,8 ± 0,9	23,9 ± 1,3	20,0 ± 0,6	6,6 ± 0,7
vFiraVax VZV, 17-й пассаж vFiraVax VZV, 17 th passage	3,6 ± 0,5*	8,1 ± 0,4**	4,5 ± 0,4**	1,6 ± 0,3**
pZel HZV, 3-й пассаж pZel HZV, 3 rd passage	13,5 ± 0,9	13,4 ± 1,0	17,8 ± 0,8	6,4 ± 0,5
vZelVax HZV 17-й пассаж vZelVax HZV, 17 th passage	4,3 ± 0,7**	9,4 ± 1,0*	9,0 ± 0,3**	4,3 ± 0,7*
Ellen# VZV	27,8 ± 3,2	18,8 ± 1,4	15,8 ± 2,3	11,6 ± 1,5

Примечание. Здесь и в табл. 5: уровень экспрессии ИФН-рецепторов определяли путем вычисления процентного соотношения светящихся клеток из общего числа 2000 клеток, подсчитанных на 4 образцах МКЧ для каждого временного интервала. # Вирус сконцентрирован ультрацентрифугированием и очищен в сахарозном градиенте.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ по сравнению с родительским штаммом.

Note. Here and in Table 5: The expression of IFN-receptors was estimated through calculating the percentage of light-producing cells in the total number of 2,000 cells, using 4 HMC samples for each time interval. # The virus was concentrated by ultracentrifugation and purified in sucrose density gradient.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ as compared to the parental strains.

Проведена сравнительная оценка показателей экспрессии рецепторов ИФН- α/β и ИФН- γ на МКЧ периферической крови, индуцированных кандидатными ХАО-штаммами vFiraVax VZV и vZelVax HZV на ранних и поздних пассажных уровнях. В табл. 4 и 5 представлены результаты этого исследования. Полученные данные показали, что оба вирусных ХАО-штамма VZV индуцировали более низкий уровень экспрессии рецепторов для ИФН- α/β и ИФН- γ в сравнении с их родительскими вариантами. Данный биологический маркер аттенуации кандидатных штаммов VZV назвали экспресс-ИФН-фенотипом. Этот фенотип может быть использован и для других аттенуированных вирусных вакцинных штаммов.

Еще одним биологическим маркером аттенуации для вакцинных штаммов VZV является вирулентность аттенуированных штаммов (att-фенотип). Нами обнаружено, что при заражении ХАО развивающихся куриных эмбрионов ВСЖ от дикого вируса эмбрионы гибли, а если оставались живыми, то на ХАО появлялась обширная геморрагия кровеносных сосудов. При заражении ХАО ВСЖ от аттенуированных штаммов VZV на ХАО обнаруживали белые оспины.

Важным свойством аттенуированных вакцинных вирусных штаммов является их иммуногенность. В табл. 6 приведены результаты титрования иммунных сывороток в реакции нейтрализации и РТГА.

Результаты, представленные в табл. 6, показали, что нейтрализующая активность иммунных

Таблица 5. Сравнительная экспрессия рецепторов для ИФН-γ (в %) на МКЧ, индуцированных *in vitro* аттенуированными и родительскими штаммами VZV на разных пассажных уровнях

Table 5. Comparative expression of IFN-γ receptors (%) on HMC induced *in vitro* by attenuated and parental VZV strains at different passage levels

Вирусный штамм Viral strain	Экспрессия рецепторов ИФН-γ на МКЧ в различные временные интервалы (в часах) Expression of IFN-γ receptors on HMC at different time intervals (hours)			
	3	24	48	72
pFira VZV, 3-й пассаж pFira VZV, 3 rd passage	5,8 ± 1,0	14,9 ± 1,1	15,1 ± 0,9	12,0 ± 0,4
vFiraVax VZV, 17-й пассаж vFiraVax VZV, 17 th passage	3,6 ± 0,5*	8,1 ± 0,4**	4,5 ± 0,4**	6,0 ± 0,3**
pZel HZV, 3-й пассаж pZel HZV, 3 rd passage	7,9 ± 0,8	14,4 ± 0,9	14,3 ± 1,2	11,13 ± 0,5
vZelVax HZV, 17-й пассаж vZelVax HZV, 17 th passage	4,8 ± 0,9*	4,9 ± 0,9**	7,1 ± 0,9**	5,2 ± 0,02**
Ellen VZV	16,6 ± 1,6	12,5 ± 0,35	10,4 ± 0,6	9,0 ± 0,71

вируспецифических сывороток по отношению к кандидатным вакцинным штаммам vFiraVax VZV и vZelVax HZV как в реакции нейтрализации, так и в РТГА была высокой. При этом надо отметить, что титры иммунных сывороток в реакции нейтрализации оставались высокими на протяжении всех 5 мес исследования, в то время как титры иммунных сывороток в РТГА к этому сроку снизились почти в 4 раза. Известно, что вирусные гемагглютинины менее стабильны по сравнению с вирусными нейтрелинами.

Обсуждение

В данном исследовании мы изучали биологические маркеры аттенуации созданных нами ХА кандидатных штаммов VZV и HZV для создания живых культуральных вакцин против ВО у детей и ОГ у взрослых после 50 лет.

Экспериментально было установлено, что оба ХА-штамма обладали основными биологическими маркерами аттенуации: ts- и ca-фенотипом (табл. 1, 2). Для вирусных штаммов VZV характерен еще один дополнительный фенотип, названный нами cell-фенотипом, т.е. изменение тканевого тропизма. Дикие варианты клинических изолятов VZV, как правило, обладают более низкой репродуктивной активностью в первичных клетках эмбрионов морской свинки в сравнении с аттенуированными вирусными штаммами. Экспериментально установлено, что ХА-штаммы vFiraVax VZV и vZelVax HZV обладали cell-фенотипом (табл. 3).

В настоящее время не существует модельного объекта для оценки вирулентности VZV — att-фенотипа. Нами обнаружено, что подходящей моделью является ХАО развивающихся куриных эмбрионов. Установлено, что родительские варианты

Таблица 6. Иммуногенность аттенуированных вакцинных штаммов vFiraVax VZV и vZelVax HZV, установленная иммунизацией морских свинок с оценкой в реакции нейтрализации на культуре клеток и в РТГА в различные временные интервалы

Table 6. Immunogenicity of attenuated vFiraVax VZV and vZelVax HZV vaccine strains through immunization of guinea pigs and a neutralization test on cell culture and in HAI assay at different time intervals

Иммунные сыворотки к вакцинным штаммам VZV Immune sera for VZV vaccine strains	Реакция нейтрализации (со 100% защитой) Neutralization test (at 100% protection)			РТГА (гемагглютинин, штамм Ellen VZV) HAI assay (hemagglutinin, Ellen VZV strain)		
	срок с момента иммунизации, мес time since immunization, months					
	2	3	5	2	3	5
vFiraVax VZV, 20-й пассаж vFiraVax VZV, 20 th passage	1 : 1600	1 : 1600	1 : 1600	1 : 25600	1 : 12800	1 : 6400
vZelVax HZV, 20-й пассаж vZelVax HZV, 20 th passage	1 : 1600	1 : 1600	1 : 1600	1 : 25600	1 : 12800	1 : 6400
Нейтрализующий VZV-штамм vOka, 1000 доз Neutralizing VZV strain vOka, 1000 doses				6,0 Ig ГАДЕ _{50/0,1 мл} 6.0 Ig HAU _{50/0,1 ml}		

вирусов VZV вызывают гибель эмбрионов или обширную геморрагию ХАО, а ХА вирусные штаммы VZV вызывали образование белых оспин. Кандидатные ХА-штаммы vFiraVax VZV и vZelVax HZV оказались авирулентными и обладали att-фенотипом. Этот же метод можно использовать для оценки генетической стабильности вакцинных вирусных штаммов VZV.

Нами предложен новый маркер биологической аттенуации кандидатных вакцинных штаммов. Так, ранее нами был разработан новый методический подход к оценке функционального состояния системы ИФН [6, 7]. С этой целью использовали высокочувствительные и специфичные флюоресцирующие зонды на основе моноклональных антиидиотипических антител, имитирующих биологические эффекты ИФН- α/β и ИФН- γ человека. Обследование образцов крови доноров с различными группами крови не выявило на МКЧ экспрессии рецепторов для ИФН- α и ИФН- γ , что указывало на сбалансированное функционирование системы ИФН в организме [7]. При индукции *in vitro* МКЧ периферической крови доноров различными штаммами вирусов кори установлено, что уровень и продолжительность экспрессии рецепторов для различных типов ИФН находились в обратной зависимости от степени аттенуации вируса кори [10].

В наших экспериментах ХА-штаммы VZV и HZV экспрессировали на мембранах МКЧ более низкий уровень рецепторов для ИФН- α/β и ИФН- γ (табл. 4 и 5), и эти показатели были стабильными, что позволило нам считать этот экспресс-ИФН-фенотип характерным для всех аттенуированных вакцинных штаммов.

Самым важным свойством живых ХА-вакцин является их более высокая эффективность по сравнению с инактивированными вакцинами, поскольку они обладают способностью вызывать более эффективные врожденный и адаптивный гуморальный и клеточный иммунные ответы [11, 12].

Иммуногенность аттенуированных вакцинных штаммов vFiraVax и vZelVax изучали путем подкожной иммунизации морских свинок. Оценивали гуморальный иммунный ответ в реакциях нейтрализации против 1000 доз вируса, содержащихся в вакцине OkaVax/Merck (США), и в РТГА против 2-гемагглютинирующих единиц гемагглютинина, полученного из лабораторного вирусного штамма Ellen VZV. ХА-вакцинные штаммы vFiraVax VZV и vZelVax HZV обладали высокой иммуногенностью на протяжении 5 мес наблюдения (табл. 6).

Таким образом, нами созданы и охарактеризованы два ХА-вакцинных штамма: vFiraVax VZV и vZelVax HZV — кандидаты для создания живых культуральных вакцин для профилактики ВО у детей и ОГ у взрослых.

ЛИТЕРАТУРА

- Greenberg H.B., Arvin A.M. Live attenuated vaccines: influenza, rotavirus and varicella zoster virus. In: Dormitzer P., Mandl C., Rappuoli R., eds. *Replicating Vaccines. Birkhäuser Advances in Infectious Diseases*. Basel: Springer Basel; 2011. DOI: http://doi.org/10.1007/978-3-0346-0277-8_2
- Gould D. Varicella zoster virus: chickenpox and shingles. *Nurs. Stand.* 2014; 28(33): 52-8. DOI: <http://doi.org/10.7748/ns2014.04.28.33.52.e8249>
- Kennedy P.G.E., Gershon A.A. Clinical features of varicella – zoster virus infection. *Viruses*. 2018; 10(11): 609-20. DOI: <http://doi.org/10.3390/v10110609>
- Sadaoka T., Mori Y. Vaccine development for varicella – zoster virus. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2018; 1045: 123-42. DOI: http://doi.org/10.1007/978-981-10-7230-7_7
- Seward J.F., Marin M., Vázquez M. Varicella vaccine effectiveness in the US vaccination program: a review. *J. Infect. Dis.* 2008; 197(Suppl. 2): S82-9. DOI: <http://doi.org/10.1086/522145>
- Баркова Е.П., Нагиева Ф.Г., Кузнецов В.П., Беляев Д.Л., Никулина В.Г., Бабаянц А.А. и др. Экспрессия рецепторов для человеческих α - и γ -интерферонов на поверхности монукулеарных клеток периферической крови при вирусных инфекциях. *Вопросы вирусологии*. 1999; 44(1): 16-8.
- Баркова Е.П., Вдовина Е.Т., Нагиева Ф.Г., Ющук Н.В., Знойко О.О., Никулина В.Г. и др. Функциональная активность интерфероновых рецепторов монукулеаров периферической крови пациентов с вирусными гепатитами. *Биопрепараты*. 2001; (4): 18-21.
- Norrby E. Hemagglutination by measles virus. 4. A simple procedure for production of high potency antigen for hemagglutination-inhibition (HI) tests. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1962; 3(3): 814-8. DOI: <http://doi.org/10.3181/00379727-111-27930>
- Исакова И.Н., Киселева И.В., Ларионова Н.В., Олейник Е.С., Руденко Л.Г. Лабораторные маркеры аттенуации штаммов живой гриппозной вакцины. *Вопросы вирусологии*. 2007; 52(4): 22-6.
- Баркова Е.П., Нагиева Ф.Г., Лавров В.Ф., Никулина В.Г., Ляшенко В.А. Экспрессия интерфероновых рецепторов и мембраносвязанных интерферонов на поверхности иммунокомпетентных клеток, инфицированных различными штаммами вируса кори. *Актуальные вопросы эпидемиологии инфекционных болезней*. 2006; (8): 123-5.
- Badgett M.R., Auer A., Carmichael L.E., Parrish C.R., Bull J.J. Evolutionary dynamics of viral attenuation. *J. Virol.* 2002; 76(20): 10524-9. DOI: <http://doi.org/jvi.76.20.10524-10529.2002>
- Martínez-Sobrido L., Peersen O., Nogales A. Temperature sensitive mutations in influenza A viral ribonucleoprotein complex responsible for the attenuation of the live attenuated influenza vaccine. *Viruses*. 2018; 10(10): 560. DOI: <http://doi.org/10.3390/v10100560>

REFERENCES

- Greenberg H.B., Arvin A.M. Live attenuated vaccines: influenza, rotavirus and varicella zoster virus. In: Dormitzer P., Mandl C., Rappuoli R., eds. *Replicating Vaccines. Birkhäuser Advances in Infectious Diseases*. Basel: Springer Basel; 2011. DOI: http://doi.org/10.1007/978-3-0346-0277-8_2
- Gould D. Varicella zoster virus: chickenpox and shingles. *Nurs. Stand.* 2014; 28(33): 52-8. DOI: <http://doi.org/10.7748/ns2014.04.28.33.52.e8249>
- Kennedy P.G.E., Gershon A.A. Clinical features of varicella – zoster virus infection. *Viruses*. 2018; 10(11): 609-20. DOI: <http://doi.org/10.3390/v10110609>
- Sadaoka T., Mori Y. Vaccine development for varicella – zoster virus. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2018; 1045: 123-42. DOI: http://doi.org/10.1007/978-981-10-7230-7_7

5. Seward J.F., Marin M., Vázquez M. Varicella vaccine effectiveness in the US vaccination program: a review. *J. Infect. Dis.* 2008; 197(Suppl. 2): S82-9.
DOI: <http://doi.org/10.1086/522145>
6. Barkova E.P., Nagieva F.G., Kuznetsov V.P., Belyaev D.L., Nikulina V.G., Babayants A.A., et al. Expression of receptors for human alpha- and gamma-interferons on the surface of peripheral blood mononuclear cells in viral infections. *Voprosy virusologii.* 1999; 44(1): 16-8. (in Russian)
7. Barkova E.P., Vdovina E.T., Nagieva F.G., Yushchuk N.V., Znoyko O.O., Nikulina V.G., et al. Functional activity (capacity) of interferon receptors of peripheral blood mononuclear cells of patients with viral hepatitis. *Biopreparaty.* 2001; (4): 18-21. (in Russian)
8. Norrby E. Hemagglutination by measles virus. 4. A simple procedure for production of high potency antigen for hemagglutination-inhibition (HI) tests. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1962; 3(3): 814-8. DOI: <http://doi.org/10.3181/00379727-111-27930>
9. Isakova I.N., Kiseleva I.V., Larionova N.V., Oleynik E.S., Rudenko L.G. Live influenza vaccine: laboratory markers of attenuation. *Voprosy virusologii.* 2007; 52(4): 22-6. (in Russian)
10. Barkova E.P., Nagieva F.G., Lavrov V.F., Nikulina V.G., Lyashenko V.A. Expression of interferon receptors and membrane-bound interferons on the surface of immunocompetent cells infected with various strains of the measles virus. *Aktual'nye voprosy epidemiologii infektionnykh bolezney.* 2006; (8): 123-5. (in Russian)
11. Badgett M.R., Auer A., Carmichael L.E., Parrish C.R., Bull J.J. Evolutionary dynamics of viral attenuation. *J. Virol.* 2002; 76(20): 10524-9.
DOI: <http://doi.org/jvi.76.20.10524-10529.2002>
12. Martínez-Sobrido L., Peersen O., Nogales A. Temperature sensitive mutations in influenza A viral ribonucleoprotein complex responsible for the attenuation of the live attenuated influenza vaccine. *Viruses.* 2018; 10(10): 560.
DOI: <http://doi.org/10.3390/v10100560>

Информация об авторах:

Нгиева Фирая Галиевна[✉] — д.м.н., доцент, зав. лаб. гибридных клеточных культур отдела вирусологии ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова», 115088, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8204-4899>.
E-mail: fgn42@yandex.ru

Баркова Елена Петровна — к.б.н., в.н.с. лаб. гибридных клеточных культур отдела вирусологии ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова», 115088, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3369-8869>.

Строева Александра Дмитриевна — м.н.с. лаб. гибридных клеточных культур отдела вирусологии ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова», 115088, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4179-931X>.

Сидоров Александр Викторович — к.б.н., зав. лаб. генетики ДНК-содержащих вирусов отдела вирусологии ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова», 115088, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3561-8295>.

Зверев Виталий Васильевич — д.б.н., проф., академик РАН, научный руководитель института ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова», 115088, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5808-2246>.

Участие авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Information about the authors:

Firaya G. Nagieva[✉] — D. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Head, Laboratory of hybrid cell cultures, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 115088, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8204-4899>.
E-mail: fgn42@yandex.ru

Elena P. Barkova — PhD (Biol.), leading researcher, Laboratory of hybrid cell cultures, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 115088, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3369-8869>.

Alexandra D. Stroevea — junior researcher, Laboratory of hybrid cell cultures, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 115088, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4179-931X>.

Alexander V. Sidorov — PhD (Biol.), Head, Laboratory of genetics of DNA-containing viruses, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 115088, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3561-8295>.

Vitaly V. Zverev — D. Sci. (Biol.), Prof., Academician of the Russian Academy of Sciences, Academic Adviser, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 115088, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5808-2246>.

Contribution: the authors contributed equally to this article.