



## Характеристика связывания вакцинных штаммов вируса *Varicella zoster* с препаратами мембранных рецепторов мозга мышей

Нагиева Ф.Г.<sup>✉</sup>, Баркова Е.П., Строева А.Д., Сидоров А.В., Лотте В.Д., Зверев В.В.

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

**Цель** работы — охарактеризовать вакцинные штаммы vFiraVax (возбудитель ветряной оспы — VZV) и vZelVax (возбудитель опоясывающего герпеса — HZ) по их способности к связыванию с препаратами мембранных рецепторов мозга SPF мышей линии BALB/c.

**Материалы и методы.** В работе использовали разработанные авторами на основе дикого родительского вируса rFira VZV (возбудитель ветряной оспы) и латентного родительского вируса lpZe HZ (возбудитель опоясывающего герпеса) холодоадаптированные вакцинные вирусные штаммы vFiraVax VZV и vZelVax HZ; вакцинные штаммы vOka, выделенные из вакцин для профилактики VZV-инфекции двух производителей (Великобритания, США); штамм диплоидных клеток легких эмбриона человека ЛЭЧ-3; штамм диплоидных клеток кожно-мышечной ткани эмбриона человека КМ 27; первичные и диплоидные клетки фибробластов эмбрионов морских свинок.

Инфекционную активность VZV определяли методом предельных разведений вируса на клеточных культурах КМ 27 или фибробластов эмбрионов морских свинок. Титр вируса устанавливали по реакции гемадсорбции со взвесью эритроцитов морской свинки или человека «0» группы, резус плюс. Для исследования вирусного препарата в электронном микроскопе использовали метод негативного контрастирования. Иммуногенность вирусных штаммов vFiraVax VZV и vZelVax HZ сравнивали с иммуногенностью вирусных штаммов vOka VZV разных производителей в перекрестной реакции нейтрализации иммунных сывороток.

**Результаты.** Отечественные холодоадаптированные вакцинные штаммы vFiraVax VZV и vZelVax HZ, родительский латентный вирус lpZe HZ и вакцинный штамм vOka VZV (Великобритания) не связывались с препаратами нейрорецепторов мозга SPF мышей линии BALB/c в отличие от дикого родительского варианта rFira VZV и вакцинных штаммов vOka VZV (США); отсутствие нейротропности отечественных вакцинных штаммов vFiraVax VZV и vZelVax HZ не связано со снижением иммуногенности по отношению к зарубежным аналогам; в концентрате вирусосодержащей жидкости vFiraVax VZV при электронно-микроскопическом исследовании обнаружены нуклеокапсиды VZV.

**Выводы.** Существуют различия в способности VZV к связыванию с препаратами мембранных рецепторов мозга SPF мышей линии BALB/c, обусловленные различиями в технологиях создания вакцин, в том числе способами аттенуации, получения вакцинного штамма, особенностями родительского латентного вируса lpZe HZ. Доказано отсутствие связывания с препаратами нейрорецепторов мозга SPF мышей линии BALB/c отечественных вакцинных штаммов vFiraVax VZV и vZelVax HZ, не связанное со снижением их иммуногенности. Метод оценки связывающей способности вакцинных штаммов VZV может быть применен в качестве предварительной характеристики нейротропности вновь создаваемых вакцинных штаммов и вакцинных препаратов.

**Ключевые слова:** вирус ветряной оспы и опоясывающего герпеса; дикий родительский вирус; латентный родительский вирус; холодоадаптированный вакцинный вирусный штамм; аттенуированные вакцинные вирусные штаммы; препарат мембранного рецептора мозга мышей; инфекционность образца; нейротропность.

**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., Лотте В.Д., Зверев В.В. Характеристика связывания вакцинных штаммов вируса *Varicella zoster* с препаратами мембранных рецепторов мозга мышей. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2020; 97(2): 125–133.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-2-125-133>

Поступила 27.01.2020  
Принята в печать 20.02.2020

## Characterization of Binding of *Varicella Zoster* Virus Vaccine Strains to Preparations of Mouse Brain Membrane Receptors

Firaya G. Nagieva<sup>✉</sup>, Elena P. Barkova, Alexandra D. Stroevea, Alexandr V. Sidorov, Vera D. Lotte, Vitaly V. Zverev

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

**Purpose:** characterization of vFiraVax (the causative agent of chickenpox — VZV) and vZelVax (the causative agent of shingles — HZ) vaccine strains by their ability to bind to preparations of brain membrane receptors of SPF BALB/c mice.

**Materials and Methods.** The study was performed on cold-adapted vFiraVax VZV and vZelVax HZ vaccine strains developed by the authors on the basis of the wild-type parental pFira VZV virus (chickenpox causative agent) and the latent parental lpZel HZ virus (shingles causative agent); vOka vaccine strains isolated from vaccines against VZV infection from two manufactures (United Kingdom and USA); the HEL-3 strain of diploid cells from human embryonic lung tissue, the MC 27 strain of diploid cells from human embryonic musculocutaneous tissue, primary and diploid cells from guinea pig fetal fibroblasts. The VZV infectivity was estimated by the limiting dilution method using MC 27 cell cultures or guinea pig fetal fibroblasts. The virus titer was measured by the hemadsorption test performed with suspensions of red blood cells from guinea pig or human type 0 positive blood. Negative staining and electron microscopy were used to study the virus preparation. The immunogenicity of vFiraVax VZV and vZelVax HZ virus strains was compared with the immunogenicity of vOka VZV virus strains from different manufacturers by using a cross-neutralization test with immune sera.

**Results.** The Russian cold-adapted vFiraVax VZV and vZelVax HZ vaccine strains, the latent parental lpZel HZ virus and the vOka VZV vaccine strain (United Kingdom) did not bind to preparations of brain neuroreceptors of SPF BALB/c mice as distinct from the wild-type parental pFira VZV variant and vOka VZV vaccine strains (USA); the absent neurotropism of Russian vFiraVax VZV and vZelVax HZ vaccine strains is not connected with the decreased immunogenicity in relation to foreign counterparts; the electron microscope study of the vFiraVax VZV virus containing liquid concentrate detected VZV nucleocapsids.

**Conclusion.** The differences in the VZV ability to bind to preparations of brain membrane receptors of SPF BALB/c mice can be explained by the differences in the technology of vaccine manufacturing, including attenuation techniques, obtaining of the vaccine strain, specific characteristics of the latent parental lpZel HZ virus. The absence of the binding with brain neuroreceptors of SPF mice has been proved for the Russian vFiraVax VZV and vZelVax HZ vaccine strains which was is not connected with a decrease in their immunogenicity. The method of assessment of the binding ability of VZV vaccine strains can be used as a preliminary characteristic of neurotropism for newly created vaccine strains and for vaccine products.

**Keywords:** *varicella-zoster virus; wild-type parental virus; latent parental virus; cold-adapted vaccine strain; attenuated vaccine strains; preparation of mouse brain membrane receptors; infectivity of the sample; neurotropism.*

**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., Lotte V.D., Zverev V.V. Characterization of binding of *Varicella Zoster* virus vaccine strains to preparations of mouse brain membrane receptors. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(2): 125–133. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-2-125-133>

Received 27 January 2020

Accepted 20 February 2020

## Введение

Вирус ветряной оспы (VZV) является высоко клеточносвязанным нейротропным  $\alpha$ -герпесвирусом человека и возбудителем ветряной оспы и опоясывающего герпеса (HZ). После первичной инфекции VZV устанавливает продолжительную латентную инфекцию в чувствительных ганглиях периферической нервной системы и реактивируется позднее с индукцией неврологических расстройств. Первичные и рецидивирующие инфекции VZV более тяжелы у пациентов с ослабленным иммунитетом, поскольку исход заболевания зависит от эффективного клеточноопосредованного иммунного ответа. Реактивация VZV из латентности в чувствительных нервных ганглиях является прямым следствием его нейротропности [1–3].

Для изучения нейротропности, латентности и реактивации VZV разработано несколько моделей *in vivo* [4, 5]. Несмотря на информативность, эти модели *in vivo* не подходят для механистических исследований. Более того, они недоступны широкому научному сообществу, потому что технически сложны, дороги и не позволяют получить одобрение этических комиссий для некоторых из этих экспериментов в определенных странах [6].

Особую озабоченность у специалистов вызывает нейротропность вакцинных штаммов VZV. Существует полемика вокруг вакцинного штамма vOka VZV в отношении его способности защищать от реактивации характерной для него нейровирулентности [7].

Как правило, нейротропность вакцинных штаммов вирусов для живых культуральных вакцин исследуют заражением в мозг обезьян макака резус (*Macaca mulatta*), чувствительных к VZV.

В работе [8] предложен способ аттенуации вирусов в зависимости от их способности связываться или не связываться с мембранными рецепторами мозга (МРМ) человека, обезьян или грызунов. Авторы основывались на данных о том, что вирус не может заражать восприимчивую клетку, если его вирусный белок прикрепления не соединяется на клеточной поверхности с молекулой, служащей в качестве рецептора для данного вируса. Суть способа аттенуации вирусов авторы заключают в отборе кандидатов в живые вирусные вакцины путем селекции вирусных вариантов, которые не связываются с препаратами МРМ. Задачей авторов являлось выделение из общей смеси диких вирусов и препаратов МРМ человека, обезьяны или грызуна

нов вирусных вариантов, которые не связываются с препаратами МРМ, т.е. авторы предложили новый способ получения ослабленных вирусов.

Мы решили воспользоваться предложенным способом для характеристики связывающей способности в отношении препаратов нейрорецепторов мозга мышей уже аттенуированных классическим способом вакцинных штаммов VZV.

Нами получены 2 холодоадаптированных (ХА) штамма VZV: vFiraVax VZV и vZelVax HZ [9, 10]. Клинический изолят для аттенуации vFiraVax VZV выделен от здорового ребенка 6 лет, а для vZelVax HZ — от мужчины 63 лет в период реактивации опоясывающего герпеса. Для обоих ХА-вирусных штаммов подробно изучены биологическая активность в различных клеточных культурах, биологические маркеры аттенуации, а также иммуногенность *in vivo* в организме морских свинок. Отличием методики получения вакцинных препаратов являются особенности аттенуации штаммов при низких температурах и создание вакцины из внеклеточных вирусосодержащих материалов.

**Целью** работы являлась оценка способности к связыванию с препаратами МРМ SPF мышей линии BALB/c отечественных ХА-штаммов VZV и их зарубежных аналогов.

### Материалы и методы

В работе использовали штамм диплоидных клеток легкого эмбриона человека (ЛЭЧ-3), штамм диплоидных клеток кожно-мышечной ткани эмбриона человека (КМ 27), первичную культуру клеток фибробластов эмбриона морской свинки (пкФЭМС) и штамм диплоидных клеток фибробластов эмбриона морской свинки (дкФЭМС). Клеточные культуры выращивали на питательной среде DMEM/F12 («PanEco») с 10 мМ НЕРЕS, 5% эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС; «HyClone») с добавлением 2 мМ L-глутамин и 40 мкг/мл гентамицина.

Изучаемые вирусы:

- дикий вирусный родительский вариант pFira VZV — pFira VZV;
- ХА-вакцинный штамм vFiraVax VZV — vFiraVax VZV;
- латентный родительский вариант lpZel HZ — lpZel HZ;
- ХА-вакцинный вирусный штамм vZelVax HZ — vZelVax HZ;
- вакцинный вирусный штамм vOka VZV, выделенный из вакцины для профилактики VZV (США) — vOka VZV (USA);
- вакцинный вирусный штамм vOka VZV, выделенный из вакцины для профилактики VZV (Великобритания) — vOka VZV (UK).

Аттенуацию диких вирусных вариантов — pFira VZV и lpZel HZ — проводили классическим способом путем пассирования клинических изоля-

тов при пониженной температуре (30°C) в клеточных культурах: ЛЭЧ-3 — 12 пассажей, пкФЭМС — 6 пассажей, ЛЭЧ-3 — еще 2 пассажа. Продолжительность одного пассажа составляла 10 сут.

Инфекционную активность VZV определяли на клеточной культуре КМ 27 или дкФЭМС, выращенных на 24-луночных планшетах. Посевная концентрация клеток составляла  $10^5$  клеток на лунку. Готовили десятикратные разведения вирусосодержащей жидкости (ВСЖ) с  $10^{-1}$  до  $10^{-10}$  и по 0,1 мл ВСЖ вносили в лунки планшета с клеточной тест-культурой. Контакт ВСЖ с клеточным монослоем продолжался 1,0–1,5 ч при 36,5°C. По завершении контакта во все лунки, включая контрольные неинфицированные клетки, вносили по 0,9 мл поддерживающей среды — DMEM с 2% ЭТС. Результаты титрования вируса учитывали на 7-е сутки с момента инфицирования в реакции гемадсорбции с 0,25% взвесью эритроцитов морской свинки или эритроцитов человека «0» группы, резус плюс. За титр вируса принимали максимальное разведение вируса, вызывающее гемадсорбцию в 50% инфицированных культур, при отсутствии гемадсорбции в контрольных неинфицированных культурах клеток.

Готовили 0,25% взвесь эритроцитов морской свинки или человека путем трехкратного отмывания эритроцитов 0,9% NaCl. По 0,3 мл взвеси эритроцитов вносили в лунки планшета с инфицированными и неинфицированными контрольными клетками, предварительно отмывыми фосфатно-солевым буфером (ФСБ). Клетки с эритроцитами выдерживали 30 мин при 4°C и дополнительно 30 мин при комнатной температуре. Затем лунки планшета трехкратно отмывали от эритроцитов 0,9% NaCl и регистрировали наличие или отсутствие гемадсорбции в световом микроскопе ( $\times 70$ ).

Морские свинки массой 300–400 г были иммунизированы подкожно одной прививочной дозой вакцинными штаммами: vFiraVax VZV, vZelVax HZ, vOka VZV (USA). Кардиальная пункция была сделана на 37-е и 80-е сутки с момента иммунизации. Полученные иммунные сыворотки были обработаны препаратом RDE 11 («Seiken») для удаления термоллабильных и термостабильных ингибиторов серологических реакций.

*Перекрестная реакция нейтрализации* поставлена на клеточной культуре КМ 27, выращенной на 24-луночных планшетах («Costar») в ростовой среде DMEM/F12 с 5% ЭТС, с 2 мМ глутамин и 40 мкг/мл гентамицина. Приготовили 10 разведений иммунной вирусспецифической сыворотки с двукратным шагом, начиная с 1 : 50. В каждое разведение иммунной сыворотки в объеме 0,2 мл добавляли 0,2 мл 1000 доз вируса (1 прививочная доза в 0,1 мл), смесь вортексировали и оставляли на контакте на 1 ч при 37°C, периодически вортексируя каждые 15 мин. После удаления ростовой среды из 24-лу-

ночных планшетов с выросшими клетками в каждые 2 лунки одного разведения вносили по 0,1 мл смеси и оставляли на контакте на 1 ч в инкубаторе при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. После завершения контакта в каждую лунку вносили по 0,8 мл поддерживающей среды DMEM с 2% ЭТС и культивирование продолжали в течение 7 сут. На каждом планшете ставили контроль дозы вируса и контроль клеток.

Клеточную культуру дкФЭМС выращивали в 3 культуральных флаконах площадью 175 см<sup>2</sup>. После формирования сплошного монослоя клеток ростовую среду из флаконов удаляли, клеточный монослой дважды отмывали ФСБ, содержащим ионы Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup>, и на клеточный монослой вносили по 5 мл клеточной суспензии ЛЭЧ-3, инфицированной vFiraVax VZV. Контакт инфицированных клеток на клеточном монослое продолжался 2 ч при 30°C. После завершения контакта в инфицированные культуральные флаконы вносили по 35 мл поддерживающей питательной среды DMEM без сыворотки и культивирование при 30°C продолжали в течение 14 сут. Затем культуральные флаконы с инфицированными клетками трижды замораживали при -70°C с последующим оттаиванием. Инфицированную клеточную суспензию в объеме 100 см<sup>3</sup> центрифугировали при 4000 об/мин («Gouan») в течение 15 мин при 4°C. Полученный надосажок переносили в центрифужные пробирки для ультрацентрифугирования на центрифуге «Optima», ротор SW 32 Ti при 25 000 об/мин в течение 3 ч. Собранный в трис-буфере осадок после определения инфекционности передали для электронной микроскопии.

*Электронная микроскопия.* Для исследования препаратов в электронном микроскопе был использован метод негативного контрастирования. В соответствии с указанным методом производилась неизбирательная адсорбция содержащихся во взвеси структур на электронно-микроскопическую сеточку, покрытую формваровой пленкой, стабилизированной углеродом. Для увеличения содержания на пленке вирусспецифических структур был применен один из методов иммуноэлектронной микроскопии. Согласно этому методу адсорбцию материала осуществляли на формварово-углеродную пленку, предварительно сенсibilизированную иммунной сывороткой к VZV. Все препараты фиксировали 4% параформальдегидом pH 7,0, промывали ФСБ и контрастировали 1% раствором фосфорно-вольфрамовой кислоты pH 7,0.

Препараты исследовали в электронном микроскопе «GEM-100 CX» при инструментальном увеличении 58 000 и фотографировали на пленку «AQFA».

*Выделение тотальной ДНК.* Вирусную ДНК из образцов выделяли стандартным методом фенол-хлороформной экстракции [8] с некоторыми модификациями, а именно: образцы после осаждения спиртом были дополнительно очищены от при-

месей с помощью микродиализа с использованием фильтров «Centrifugal Filter Units» Ultra 0,5 ml 3K membrane («Millipore»). Очистка проводилась 5 раз с добавлением 480 мкл Tris 10 mM к 20 мкл образца с последующим центрифугированием.

*Неспецифическую амплификацию ДНК* для увеличения содержания в образцах вирусной ДНК проводили с помощью набора реактивов Ready-To-Go GenomiPhi V3 DNA Amplification Kit, используя протокол производителя.

*ПЦР в реальном времени* проводили по методике [11]. Реакционную смесь для ПЦР готовили непосредственно перед ПЦР (на 1 реакцию необходимо: 10 мкл 2,5x буфера с Taq-полимеразой, 1 мкл TaqMan зонда VZV 29 концентрацией 10 мкМ, 2 мкл прямого и обратного праймеров концентрацией 5 мкМ, 7 мкл воды). ПЦР проводили на приборе DT Prime 95 («ДНК-технология») по следующему протоколу: исходное плавление при 95°C 120 с, затем 45 циклов при 95°C 15 с и 55°C 60 с. Результаты реакций учитывали по пороговому циклу, используя программное обеспечение производителя прибора.

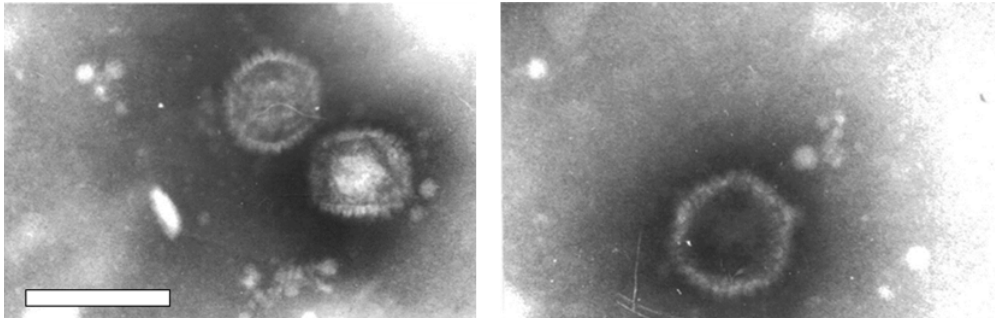
*Клонирование и определение нуклеотидных последовательностей (секвенирование) вирусной ДНК.* Образцы ДНК использовали в качестве матриц для амплификации фрагмента геномной вирусной ДНК, кодирующего открытые рамки считывания 0 и 1, длиной 815 пар нуклеотидных остатков, для чего были сконструированы праймеры CGC CAGCCTTTAACA AAAAC (прямой) и TATTTTGG GATCCGCAATG (обратный). ПЦР проводили на термоциклере «TProfessional Gradient» («Biometra») с использованием высокоточной полимеразы Phusion, следуя рекомендациям производителя.

Продукты ПЦР обрабатывали однократно Taq-полимеразой (для получения 3'-А-концов), затем вставляли в pAL2-T вектор («Евроген») с помощью T4 ДНК-лигазы с последующей трансформацией в штамм *E. coli* XL1-Blue и отбором клонов путем селекции с антибиотиком ампициллином, а также бело-голубой селекции с использованием хромогенного субстрата X-Gal.

Из отдельных клонов выделяли плазмидную ДНК, которую анализировали методом электрофореза в агарозных гелях в присутствии этидиума бромида, затем определяли нуклеотидные последовательности вставок. Синтез праймеров и секвенирование заказывали в фирмах «Евроген» и «Синтол».

Для конструирования праймеров и зондов, определения стратегии клонирования, а также анализа нуклеотидных последовательностей использовали пакет программ «Vector NTI».

*Получение МРМ мышей.* Иссекали мозги у 15–20 голов 4-недельных SPF мышей линии BALB/c, определяли вес (4,7–6,3 г), добавляли 50 mM трис-буфера pH 7,6 и гомогенизировали в гомогенизаторе Даунса. Гомогенат центрифугировали



**Рис. 1.** Данные электронной микроскопии (×150 000), масштабная линейка соответствует 100 нм.  
**Fig. 1.** Electronic microscopy (×150,000), the large-scale ruler corresponds to 100 nm.

при 14 000 об/мин в течение 15 мин при 4°C в настольной центрифуге. Соотношение вес : объем — 1 : 7. Надосадок декантировали, в осадок добавляли аналогичный объем буфера и этот процесс повторяли дважды. Между 2-м и 3-м центрифугированием гомогенат инкубировали при 37°C в течение 10 мин. Конечный осадок ресуспендировали в питательной среде DMEM с 2% ЭТС и влажный мозг хранили при -70°C до использования. Концентрацию белка в мозговой смеси определяли на спектрофотометре «NanoPhotometer NP 89-Touch». Концентрация белка в конечном осадке должна быть в пределах 20–40 мг/мл. В экспериментах использовали 38–40 мг/мл препарата MPM SPF мышей линии BALB/c.

*Определение остаточной инфекционной активности после связывания вируса с нейрорецепторами мозга мышей.* К 100 мкл ВСЖ штаммов pFira VZV (2-й пассаж), vFiraVax VZV (20-й пассаж), IpZel HZ (2-й пассаж), vZelVax HZ (20-й пассаж), vOka (USA), vOka (UK) добавляли по 900 мкл нейрорецепторов мозга SPF мышей линии BALB/c. К 100 мкл ВСЖ вышеперечисленных вариантов VZV добавляли по 900 мкл трис-буфера. Контроль: к 100 мкл трис-буфера добавляли 900 мкл нейрорецепторов мозга мышей. Все вышеперечисленные образцы инкубировали при 37°C в течение 30 мин с периодическим встряхиванием каждые 5 мин. Затем все образцы центрифугировали при 14 000 об/мин в течение 15 мин для удаления мембранного материала и связанного с ним вируса.

Определяли остаточную вирусную инфекционность образцов в супернатанте путем титрования методом предельных разведений на чувствительных к VZV клеточных культурах дкФЭМС. Инфекционность оценивали по реакции гемадсорбции с 0,25% взвесью эритроцитов морских свинок.

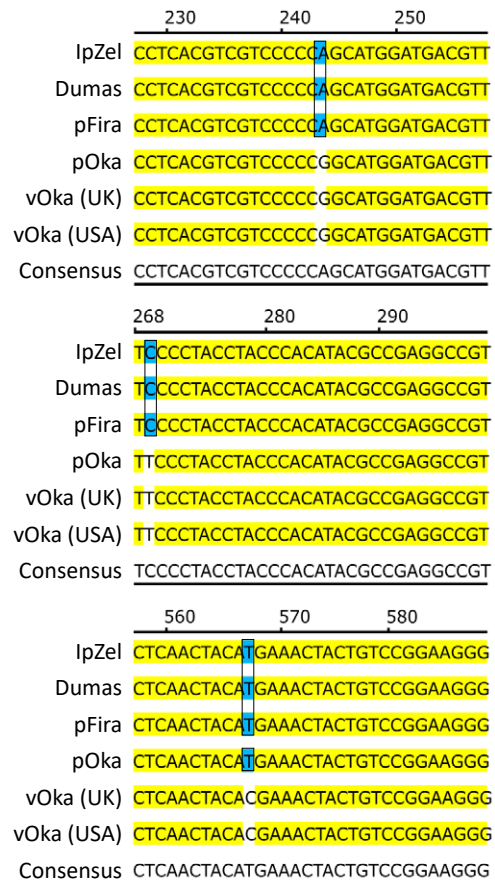
Анализ результатов проводили с использованием статистического пакета «Prism — GraphPad».

### Результаты

Для получения подтверждения наличия VZV в исследуемом материале был проведен анализ концентрата ВСЖ штамма vFiraVax VZV в электронном

микроскопе. В препарате методом негативного контрастирования обнаружены только нуклеокапсиды ХА-штамма vFiraVax VZV на 20-м пассажном уровне (**рис. 1**). Вирионы внеклеточной ВСЖ VZV пока по невыясненной причине при электронной микроскопии не выявляются [12].

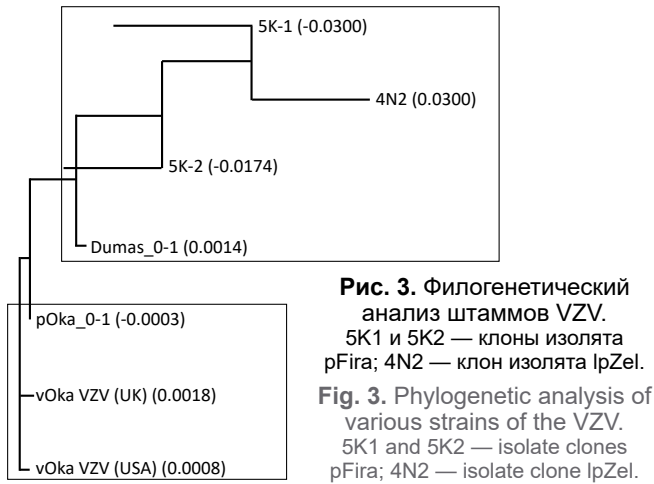
Идентичность вируса также подтверждали с помощью частичного секвенирования выделенных плазмидных фрагментов ДНК рамки *orf 0* штаммов pFira VZV и IpZel HZ на 8-м пассаже. Участок генома



**Рис. 2.** Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей вирусной ДНК штаммов VZV. Dumas — европейский дикий VZV.

**Fig. 2.** Comparative analysis (alignment) of the nucleotide sequences of the viral DNA of strains of VZV. Dumas — European wild VZV.





в размере 580 нуклеотидных последовательностей ДНК частично аттенуированных при пониженной температуре вирусных вариантов VZV сравнивали с европейским вирусным штаммом Dumas и с японскими штаммами pOka VZV и vOka VZV (рис. 2).

Предварительный филогенетический анализ показал, что частично аттенуированные варианты pFira VZV и lpZel HZ, используемые для создания отечественных ХА-вакцинных штаммов, являются ближайшими соседями штамма Dumas, что соответствует европейскому типу VZV, и несколько отличаются от японского генотипа (рис. 3).

Мутация в позиции 567 (T567C, Stop-Arg) (рис. 2) является одной из молекулярных детерминант ослабления вируса в вакцинных штаммах по сравнению с дикими. Сравнительный анализ вирусных нуклеотидных последовательностей показал, что штаммы pFira и lpZel на ранних пассажах являются частично аттенуированными и не содержат

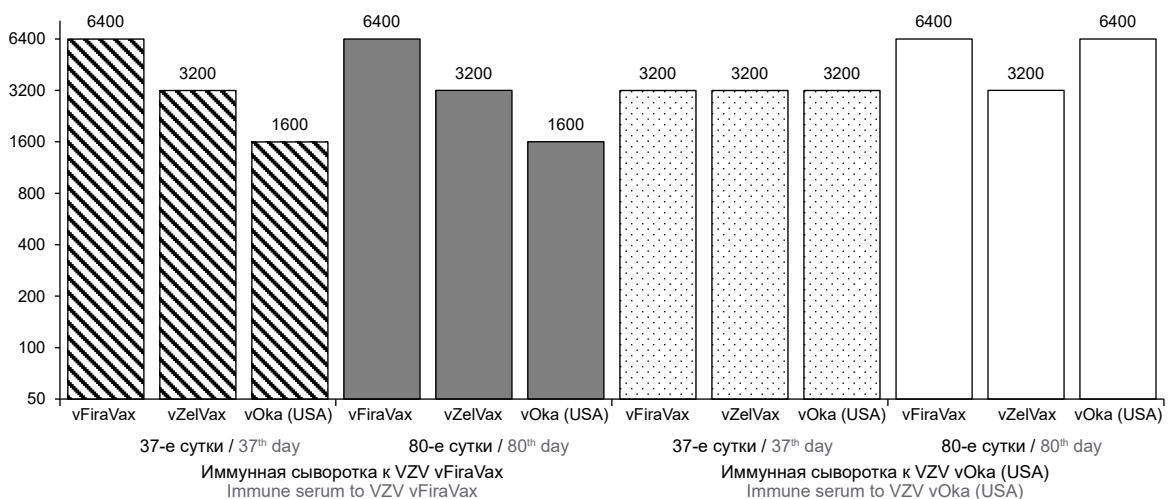
мутации, характерной для аттенуированных вакцинных штаммов [13–15].

Самым важным свойством живых аттенуированных вакцин является их более высокая эффективность по сравнению с инактивированными вакцинами, поскольку они способны вызывать более сильные врожденный и адаптивный гуморальный и клеточный иммунные ответы.

Иммунная сыворотка к ХА-вирусному штамму vFiraVax VZV, полученная на 37-е и 80-е сутки с момента иммунизации морских свинок, одинаково высоко нейтрализовала все 3 штамма VZV (рис. 4): наибольшая нейтрализующая активность отмечена с гомологичным штаммом и наименьшая — с вирусным вакцинным штаммом vOka VZV (USA). Иммунная сыворотка к вакцинному штамму vOka VZV (USA), полученная на 37-е сутки с момента иммунизации морских свинок, одинаково нейтрализовала все 3 штамма VZV, включая гомологичный вакцинный штамм vOka VZV (USA).

Несколько отличалась нейтрализующая активность иммунной сыворотки к штамму vOka VZV (USA), полученной на 80-е сутки с момента иммунизации. В высоком титре она нейтрализовала все 3 исследованных штамма VZV. Результаты, полученные в перекрестной реакции нейтрализации, четко продемонстрировали, что отечественные ХА-штаммы vFiraVax VZV и vZelVax HZ по иммуногенности *in vivo* на морских свинках не уступали штамму vOka VZV (USA).

Специфичность связывания VZV с нейрорецепторами мозга SPF мышей линии BALB/c определяли с помощью сравнения вирусов дикого типа и аттенуированных вакцинных вирусных штаммов [16]. При сравнении ХА-штамма vFiraVax VZV на 20-м пасса-



**Рис. 4. Перекрестная реакция нейтрализации аттенуированных штаммов VZV (1000 доз) с иммунными сыворотками морских свинок, полученными на 37-е и 80-е сутки после иммунизации.**

По оси ординат — нейтрализующие титры иммунных сывороток со 100% защитой.

**Fig. 4. Cross-reaction of neutralization of attenuated strains of VZV (1000 doses) with immune sera of guinea pigs on the 37<sup>th</sup> and 80<sup>th</sup> days from the moment of immunization.**  
 Ordinate: Neutralization titers of immune sera: 100% protection.

## Обсуждение

же с его диким родительским вариантом на 2-м пассаже выявлено, что дикий вирусный вариант pFira VZV связывается с препаратом нейрорецепторов мозга SPF мышей линии BALB/c с индексом связывания 2,0 lg ГАДЕ<sub>50/0,1 мл</sub> (таблица), процент связывания составляет 25,03, в то время как vFiraVax VZV полностью утратил тропизм к нервной ткани.

Иная картина наблюдается с латентным родительским вирусом опоясывающего герпеса lpZel HZ, который находился более 50 лет в чувствительных нервных ганглиях пациента 63 лет, постоянно реактивируясь и вызывая постгерпетическую невралгию. Этот латентный родительский вирус lpZel HZ и его ХА-вакцинный вирусный штамм vZelVax HZ утратили тропизм к нервной ткани мозга SPF мышей линии BALB/c.

Обращает на себя внимание наличие связывания вакцинного штамма vOka VZV (USA) с препаратами нейрорецепторов мозга SPF мышей линии BALB/c. Индекс связывания составляет 1,0 lg ГАДЕ<sub>50/0,1 мл</sub>, процент связывания — 15,4. Однако вирусный штамм vOka VZV (UK) утратил тропизм к нейрорецепторам мозга SPF мышей линии BALB/c. Различная связывающая способность по отношению к нейрорецепторам мозга мышей одного и того же японского вакцинного вирусного штамма vOka VZV, на наш взгляд, объясняется различной историей пассажей в клеточных культурах у разных производителей.

Таким образом, используя относительно простой метод оценки связывающей способности вакцинных штаммов VZV к нейрорецепторам мозга SPF мышей линии BALB/c, можно получить предварительную характеристику нейротропности новых вакцинных штаммов.

В данных экспериментах четко продемонстрировано, что созданные нами отечественные ХА-штаммы vFiraVax VZV и vZelVax HZ не связываются с нейрорецепторами мозга грызунов, в отличие от диких родительских вариантов.

Современные вакцины против ветряной оспы, являясь существенно ослабленными, могут сохранять остаточную нейровирулентность и повреждать сенсорные ганглии. Факторы, участвующие в инвазии нейронов и установлении латентности, не ясны [7].

Изучение нейротропности VZV с использованием животных моделей является проблемой, поскольку вирус вызывает заболевания только у людей и обезьян макака резус (*Macaca mulatta*) [17]. Эти исследования сложны и дороги [18–20].

Целью исследования явилась характеристика вакцинных вирусных штаммов *Varicella zoster* — vFiraVax VZV и vZelVax HZ по их способности связываться с препаратами мембранных рецепторов мозга SPF мышей линии BALB/c.

До постановки основного эксперимента по оценке связывающей способности вакцинных штаммов VZV с нейрорецепторами мозга SPF мышей линии BALB/c мы определили по данным электронной микроскопии наличие нуклеокапсидов в концентрате ВСЖ вакцинного штамма — vFiraVax VZV и подтвердили по результатам частичного секвенирования выделенных плазмидных ДНК фрагментов рамки *orf 0* их аналогичность европейским штаммам VZV.

Далее мы сравнили основную и самую важную функцию вакцинных штаммов — иммуногенность *in vivo*. С этой целью была поставлена перекрестная реакция нейтрализации вакцинных штаммов vFiraVax VZV и vZelVax HZ в сравнении с зарубежным vOka VZV (USA) с сыворотками морских свинок, иммунизированных подкожно одной прививочной дозой. Иммуногенность всех исследованных штаммов была высокой, и отечественные вакцинные штаммы по иммуногенности не уступали зарубежному вакцинному штамму vOka VZV (USA).

В наших экспериментах дикий родительский вариант pFira VZV связывался с препаратом МРМ мышей в отличие от ХА-вакцинного штамма

### Сравнительная оценка связывания штаммов VZV с препаратами МРМ SPF мышей линии BALB/c Comparative assessment of the binding of VZV strains to BMR preparations SPF BALB/c mice

Вирусный штамм Viral strain	Инфекционность, lg ГАДЕ <sub>50/0,1 мл</sub> Infectivity, lg HAU <sub>50/0.1 ml</sub>		p	Индекс связывания, lg ГАДЕ <sub>50/0,1 мл</sub> The binding index, lg HAU <sub>50/0.1 ml</sub>	Связывание, % Binding, %
	вирус + буфер (n = 4) virus + buffer (n = 4)	вирус + МРМ (n = 4) virus + BMR (n = 4)			
vFiraVax VZV	7,5 ± 0,029	8,5 ± 0,036	<0,001	-1,0	0
pFira VZV	8,5 ± 0,051	6,5 ± 0,035	<0,001	2,0	25,03
vZelVax HZ	7,5 ± 0,041	7,5 ± 0,029	>0,05	0	0
lpZel HZ	8,0 ± 0,041	8,5 ± 0,046	<0,05	-0,5	0
vOka VZV (UK)	7,0 ± 0,034	7,5 ± 0,029	<0,05	-0,5	0
vOka VZV (USA)	6,5 ± 0,005	5,5 ± 0,055	<0,001	1,0	15,4

Примечание. ГАДЕ — гемадсорбирующая единица.

Note. BMR — brain membrane receptors; HAU — hemoadsorbition unit.

vFiraVax VZV. Однако латентный родительский вариант lpZel HZ и ХА-вакцинный штамм vZelVax HZ не связывались с препаратами МРМ мышей. Промонстрирована различная связывающая способность вакцинного штамма vOka VZV, полученного из вакцин разных производителей: так вакцинный штамм vOka VZV (UK) не связывался с МРМ мозга мышей, а индекс связывания для вакцинного штамма vOkaVZV (USA) был равен 1 lg ГАДЕ 50/0,1 мл.

Показанные отличия, на наш взгляд, связаны с различной технологией создания вакцин на основе вакцинного штамма vOka VZV (внутриклеточного вируса, связанного с клеточным материалом), использованием внеклеточного вирусосодержащего материала зарубежными и отечественными разработчиками, различными способами аттенуации [9] и получения вакцинного штамма, особенностями родительского вируса lpZel HZ, обусловленными длительным пребыванием латентного вируса в нервных ганглиях человека. В результате исследований было подтверждено отсутствие связывающей способности вакцинных штаммов VZV с нейрорецепторами мозга мышей отечественных вакцинных штаммов при иммуногенности, сопоставимой с зарубежными аналогами, а также возможность использования предложенного метода для предварительной оценки нейротропности VZV вновь создаваемых вакцинных штаммов и вакцинных препаратов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Zerboni L., Reichett M., Arvin A. Varicella zoster virus neurotropism in SCID mouse-human dorsal root ganglia xenografts. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* 2010; 342: 255-76. DOI: [http://doi.org/10.1007/82\\_2009\\_8](http://doi.org/10.1007/82_2009_8)
2. Reiss C.S. *Neurotropic Viral Infections. Volume 562.* Cambridge: Cambridge University Press; 2008. DOI: <http://doi.org/10.1017/CBO9780511541728>
3. Mahalingam R., Gershon A., Gershon M., Cohen J.I., Arvin A., Zerboni L., et al. Current *in vivo* models of Varicella zoster virus neurotropism. *Viruses.* 2019; 11(6): 502-27. DOI: <http://doi.org/10.3390/v11060502>
4. Cohen J.I. Rodent models of varicella zoster virus neurotropism. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2010; 342: 277-89. DOI: [http://doi.org/10.1007/82\\_2010\\_11](http://doi.org/10.1007/82_2010_11)
5. Depledge D.P., Sadaoka T., Ouwendijk W.D. Molecular aspects of varicella zoster virus latency. *Viruses.* 2018; 10(7): 349-70. DOI: <http://doi.org/10.3390/v10070349>
6. Baird N.L., Zhu S., Pearce C.M., Borbolla A.V. Current *in vitro* models to study varicella zoster virus latency and reactivation. *Viruses.* 2009; 11(2): 103-18. DOI: <http://doi.org/10.3390/v11020103>
7. Selariu A., Cheng T., Tang Q., Silver B., Yang L., Liu C., et al. ORF7 of Varicella zoster virus is a neurotropic factor. *J. Virol.* 2012; 86(16): 8614-24. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.00128-12>
8. Sinzger C., Knapp J., Schmidt K., Kahl M., Jahn G. A simple and rapid method for preparation of viral DNA from cell associated cytomegalovirus. *J. Virol. Methods.* 1999; 81(1-2): 115-22. DOI: [http://doi.org/10.1016/s0166-0934\(99\)00058-0](http://doi.org/10.1016/s0166-0934(99)00058-0)
9. Осокина О.В., Баркова Е.П., Нагиева Ф.Г., Зверев В.В. Штамм «vfiravax» для получения аттенуированной живой

культуральной вакцины для профилактики ветряной оспы. Патент РФ № 2693440; 2019.

10. Баркова Е.П., Зверев В.В., Нагиева Ф.Г., Осокина О.В. Способ получения живой культуральной аттенуированной вакцины для профилактики ветряной оспы. Патент РФ № 2637093; 2017.
11. Фам Х.Ф., Сидоров А.В., Милованова А.В., Антонова Т.П., Лисаков А.Н., Нагиева Ф.Г. и др. Новый подход к диагностике Varicella zoster – вирусной инфекции с использованием ПЦР в режиме реального времени. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2016; 15(5): 52-8. DOI: <http://doi.org/10.31631/2073-3046-2016-15-5-52-58>
12. Cohen J.I., Straus S.E., Arvin A.M., eds. Varicella zoster virus replication, pathogenesis and management. In: Knipe D.M., Howley P.M., eds. *Fields Virology.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007: 24-32.
13. Depledge D.P., Kundu S., Jensen N.J., Gray E.R., Jones M., Steinberg S., et al. Deep sequencing of viral genomes provides insight into the evolution and pathogenesis of varicella zoster virus and its vaccine in humans. *Mol. Biol. Evol.* 2014; 31(2): 397-409. DOI: <http://doi.org/10.1093/molbev/mst210>
14. Peters G.A., Tyler S.D., Carpenter J.E., Jackson W., Mori Y., Arvin A.M., et al. The attenuated genotype of varicella zoster virus includes an ORF0 transitional stop codon mutation. *J. Virol.* 2012; 86(19): 10695-703. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.01067-12>
15. Depledge D.P., Yamanishi K., Gomi Y., Gershon A.A., Breuer J. Deep sequencing of distinct preparations of the live attenuated varicella zoster virus vaccine reveals a conserved core of attenuating single-nucleotide polymorphisms. *J. Virol.* 2016; 90(19): 8698-704. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.00998-16>
16. Barrett A., Ryman K., Ni H. Method of attenuating viruses. Patent US EP0922092B1; 1999.
17. Sorel O., Messaoudi I. Varicella virus – host interactions during latency and reactivation: lessons from simian varicella virus. *Front. Microbiol.* 2018; 9: 3170-9. DOI: <http://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03170>
18. Baird N.L., Zhu S., Pearce C.M., Viejo-Borbolla A. Current *in vitro* models to study varicella zoster virus latency and reactivation. *Viruses.* 2019; 11(2): 103-18. DOI: <http://doi.org/10.3390/v11020103>
19. Gershon M., Gershon A. Varicella zoster virus and the enteric nervous system. *J. Infect. Dis.* 2018; 218(Suppl. 2): 113-9. DOI: <http://doi.org/10.1093/infdis/jiy407>
20. Takahashi M., Hayakawa Y., Shiraki K., Yamanishi K., Asano Y., Ozaki T. Attenuation and laboratory markers of the Okazaki strain varicella zoster virus. *Postgrad. Med. J.* 1985; 61(Suppl. 4): 37-46.

#### REFERENCES

1. Zerboni L., Reichett M., Arvin A. Varicella zoster virus neurotropism in SCID mouse-human dorsal root ganglia xenografts. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* 2010; 342: 255-76. DOI: [http://doi.org/10.1007/82\\_2009\\_8](http://doi.org/10.1007/82_2009_8)
2. Reiss C.S. *Neurotropic Viral Infections. Volume 562.* Cambridge: Cambridge University Press; 2008. DOI: <http://doi.org/10.1017/CBO9780511541728>
3. Mahalingam R., Gershon A., Gershon M., Cohen J.I., Arvin A., Zerboni L., et al. Current *in vivo* models of Varicella zoster virus neurotropism. *Viruses.* 2019; 11(6): 502-27. DOI: <http://doi.org/10.3390/v11060502>
4. Cohen J.I. Rodent models of varicella zoster virus neurotropism. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2010; 342: 277-89. DOI: [http://doi.org/10.1007/82\\_2010\\_11](http://doi.org/10.1007/82_2010_11)
5. Depledge D.P., Sadaoka T., Ouwendijk W.D. Molecular aspects of varicella zoster virus latency. *Viruses.* 2018; 10(7): 349-70. DOI: <http://doi.org/10.3390/v10070349>



6. Baird N.L., Zhu S., Pearce C.M., Borbolla A.V. Current in vitro models to study varicella zoster virus latency and reactivation. *Viruses*. 2009; 11(2): 103-18.  
DOI: <http://doi.org/10.3390/v11020103>
7. Selariu A., Cheng T., Tang Q., Silver B., Yang L., Liu C., et al. ORF7 of varicella zoster virus is a neurotropic factor. *J. Virol.* 2012; 86(16): 8614-24.  
DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.00128-12>
8. Sinzger C., Knapp J., Schmidt K., Kahl M., Jahn G. A simple and rapid method for preparation of viral DNA from cell associated cytomegalovirus. *J. Virol. Methods*. 1999; 81(1-2): 115-22.  
DOI: [http://doi.org/10.1016/S0166-0934\(99\)00058-0](http://doi.org/10.1016/S0166-0934(99)00058-0)
9. Osokina O.V., Barkova E.P., Nagieva F.G., Zverev V.V. The vFiraVax strain for producing an attenuated live culture vaccine for the prevention of chickenpox. Patent RF № 2693440; 2019.
10. Barkova E.P., Zverev V.V., Nagieva F.G., Osokina O.V. A method of obtaining a live culture vaccine for the prevention of chickenpox. Patent RF № 2637093; 2017.
11. Fam Kh.F., Sidorov A.V., Milovanova A.V., Antonova T.P., Lisakov A.N., Nagieva F.G., et al. New approach for diagnostics of VZV infection by using real-time PCR. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika*. 2016; 15(5): 52-8.  
DOI: <http://doi.org/10.31631/2073-3046-2016-15-5-52-58> (in Russian)
12. Cohen J.I., Straus S.E., Arvin A.M., eds. Varicella zoster virus replication, pathogenesis and management. In: Knipe D.M., Howley P.M., eds. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007: 24-32.
13. Depledge D.P., Kundu S., Jensen N.J., Gray E.R., Jones M., Steinberg S., et al. Deep sequencing of viral genomes provides insight into the evolution and pathogenesis of varicella zoster virus and its vaccine in humans. *Mol. Biol. Evol.* 2014; 31(2): 397-409.  
DOI: <http://doi.org/10.1093/molbev/mst210>
14. Peters G.A., Tyler S.D., Carpenter J.E., Jackson W., Mori Y., Arvin A.M., et al. The attenuated genotype of varicella zoster virus includes an ORF0 transitional stop codon mutation. *J. Virol.* 2012; 86(19): 10695-703.  
DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.01067-12>
15. Depledge D.P., Yamanishi K., Gomi Y., Gershon A.A., Breuer J. Deep sequencing of distinct preparations of the live attenuated varicella zoster virus vaccine reveals a conserved core of attenuating single-nucleotide polymorphisms. *J. Virol.* 2016; 90(19): 8698-704.  
DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.00998-16>
16. Barrett A., Ryman K., Ni H. Method of attenuating viruses. Patent US EP0922092B1; 1999.
17. Sorel O., Messaoudi I. Varicella virus — host interactions during latency and reactivation: lessons from simian varicella virus. *Front. Microbiol.* 2018; 9: 3170-9.  
DOI: <http://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03170>
18. Baird N.L., Zhu S., Pearce C.M., Viejo-Borbolla A. Current in vitro models to study varicella zoster virus latency and reactivation. *Viruses*. 2019; 11(2): 103-18.  
DOI: <http://doi.org/10.3390/v11020103>
19. Gershon M., Gershon A. Varicella zoster virus and the enteric nervous system. *J. Infect. Dis.* 2018; 218(Suppl. 2): 113-9.  
DOI: <http://doi.org/10.1093/infdis/jiy407>
20. Takahashi M., Hayakawa Y., Shiraki K., Yamanishi K., Asano Y., Ozaki T. Attenuation and laboratory markers of the Oka-strain varicella zoster virus. *Postgrad. Med. J.* 1985; 61(Suppl. 4): 37-46.

#### 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](mailto: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>

**Лотте Вера Даниловна** — к.б.н., зав. межлабораторной группой электронно-микроскопических исследований отдела вирусологии ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова», 115088, Москва, Россия.  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8922-0306>

**Зверев Виталий Васильевич** — д.б.н., проф., академик РАН, зав. лабораторией молекулярной биотехнологии 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](mailto: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. Stroeva** — 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>

**Alexandr 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>

**Vera D. Lotte** — PhD (Biol.), Head, Inter-laboratory group of electron microscopic studies, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 115088, Moscow, Russia.  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8922-0306>

**Vitaly V. Zverev** — Doct. Sci. (Biol.), prof., Academician of RAS, Head, Laboratory of molecular biotechnology, Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, 105064, Moscow, Russia.  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5808-2246>

**Contribution:** the authors contributed equally to this article.