

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-320>



# Биологические свойства отечественного штамма vRub-Ant вируса краснухи

Нагиева Ф.Г.<sup>✉</sup>, Баркова Е.П., Строева А.Д., Аммура Ю.И., Сидоров А.В., Харченко О.С., Бахтояров Г.Н., Свитич О.А., Зверев В.В.

Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

### Аннотация

**Введение.** Краснуха — лёгкое инфекционное заболевание, поражающее преимущественно детей, вызывается вирусом краснухи (*Rubella virus* — RV), входящим в семейство *Matonaviridae*, род *Rubivirus*. Краснуха вызывает синдром врождённой краснухи (СВК) и является основной причиной аномалий развития, особенно слепоты и глухоты. Специфического лечения краснухи и СВК не существует. С целью избежать возможных осложнений от краснушной инфекции используется живая аттенуированная вакцина против краснухи на основе зарубежного штамма Wistar RA 27/3 RV. Однако актуальным, более эффективным и предпочтительным вакцинным штаммом RV для России считается вирусный штамм краснухи, циркулирующий на её территории. **Целью** исследования являлось изучение биологических свойств созданного отечественного холодоадаптированного штамма vRub-Ant, циркулирующего на территории России.

**Материалы и методы.** Использовали клеточные культуры — штамм диплоидных клеток лёгких эмбриона человека ЛЭЧ-3, перевиваемую клеточную линию Vero CCL-81 и Vero ECC из эмбриональных клеток почек зелёных мартышек, мезенхимальные стволовые клетки человека, мононуклеарные клетки периферической крови человека (МКПК). Клеточные культуры выращивали на питательной среде DMEM/F 12 с добавлением 5% эмбриональной телячьей сыворотки. В качестве клинического вирусного материала использовали мазки из зева и носовых ходов от ребёнка, больного краснухой. Для оценки уровня экспрессии  $\alpha/\beta$ - и  $\gamma$ -интерфероновых рецепторов (ИФН-Р) использовали моноклональные антиидиотипические антитела, имитирующие биологические эффекты  $\alpha/\beta$ - и  $\gamma$ -ИФН человека. В работе применяли культуральные, вирусологические, иммунохимические и серологические методы исследования.

**Результаты.** Аттенуацию клинического изолята pRub-Ant RV проводили на протяжении 20 последовательных пассажей на диплоидных клетках ЛЭЧ-3 при пониженной температуре 30°C. Определены основные биологические маркеры аттенуации: температурочувствительность и холодоадаптированность. Установлен более низкий уровень экспрессии  $\alpha/\beta$ - и  $\gamma$ -ИФН-Р на мембранах МКПК человека, индуцированных вакцинным штаммом vRub-Ant в сравнении с родительским диким вариантом RV. Этот признак характерен для аттенуированных вирусных штаммов. Показано, что вакцинный штамм vRub-Ant утратил нейротропизм и не связывается с мембранными рецепторами мозга эмбрионов морских свинок, в отличие от дикого родительского варианта RV. Высокая иммуногенность отечественного холодоадаптированного штамма vRub-Ant подтверждается высокими титрами нейтрализующих краснушных антител у морских свинок, привитых подкожно одной прививочной дозой вируса.

**Заключение.** Создан отечественный аттенуированный вакцинный штамм vRub-Ant RV, обладающий основными биологическими маркерами аттенуации. Вакцинный штамм vRub-Ant вызывает высокий уровень нейтрализующих антител в организме морских свинок при однократной иммунизации одной прививочной дозой вакцины. Вирусный штамм vRub-Ant утратил тропизм к мембранным рецепторам мозга эмбрионов морских свинок, в отличие от своего родительского варианта.

**Ключевые слова:** вирус краснухи, культура клеток, холодоадаптированный отечественный штамм вируса краснухи, биологические маркеры аттенуации вируса краснухи, инфекционность образца, иммуногенность, антигенность, нейротропность, препарат мембранного рецептора мозга морских свинок

**Этическое утверждение.** Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23.07.2010). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом НИИВС им. И.И. Мечникова (протокол № 6 от 07.06.2021). Исследование проводилось при добровольном информированном согласии законных представителей ребенка.

**Источник финансирования.** Авторы заявляют об отсутствии внешнего 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., Аммура Ю.И., Сидоров А.В., Харченко О.С., Бахтояров Г.Н., Свитич О.А., Зверев В.В. Биологические свойства отечественного штамма vRub-Ant вируса краснухи. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2022;99(5):505–513. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-320>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-320>

## Biological properties of domestic strain vRub-Ant of rubella virus

Firaya G. Nagieva<sup>✉</sup>, Elena P. Barkova, Alexandra D. Stroeveva, Yulia I. Ammour, Alexandr V. Sidorov, Olga S. Kharchenko, Georgy N. Bukhtoyarov, Oksana A. Svitich, Vitaly V. Zverev

Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia

### Abstract

**Introduction.** Rubella is a mild infectious disease affecting mainly children and is caused by the rubella virus, part of the *Matonaviridae* family, genus *Rubivirus*. Rubella causes congenital rubella syndrome (CRS) and is the main cause of developmental abnormalities, especially blindness and deafness.

There is no specific treatment for rubella and CRS. In order to avoid possible complications from rubella infection, a live attenuated rubella vaccine based on the foreign strain of Wistar RA 27/3 rubella virus is used. However, the actual, more effective and preferred vaccine strain the rubella virus for the Russian Federation is considered to be a viral strain of rubella circulating on its territory.

**The aim** of the study was to study the biological properties of the developed domestic cold-adapted strain vRub-Ant circulating in the territory of the Russian Federation.

**Materials and methods.** Following cell cultures were used in the study — human embryo lung diploid cell strain LECH-3, transferable cell line from embryonic kidney cells of green monkeys Vero CCL-81 and Vero ECC, human mesenchymal stem cells, human peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Cell cultures were grown on a DMEM/F12 nutrient medium with the addition of 5% fetal bovine serum. Swabs from the pharynx and nasal passages from a child with rubella were used as clinical virus-containing material. Monoclonal anti-idiotypic antibodies m(anti-ID)Ab were used to assess the expression level of alpha/beta and gamma interferon receptors ( $\alpha/\beta$  and  $\gamma$ IFN-R)Ab, imitating the biological effects of alpha/beta and gamma interferons ( $\alpha/\beta$  and  $\gamma$ IFN) of humans. The cultural, virological, immunochemical and serological research methods were applied in the study.

**Results.** Attenuation of the vRub-Ant clinical isolate of rubella virus was carried out for 20 consecutive passages on LECH-3 diploid cells at a reduced temperature of 30°C. The main biological markers of attenuation were determined to be ts and ca phenotypes. The avirulence of the attenuated viral strain (att-phenotype) was assessed by the level of expression of  $\alpha/\beta$  and  $\gamma$ IFN-R. A lower level of  $\alpha/\beta$  and  $\gamma$ IFN-R expression was found on the membranes of human PBMC induced by the vaccine strain vRub-Ant in comparison with the parent wild variant of the rubella virus. This trait, the att phenotype, is characteristic of attenuated viral strains. It has been shown that the vaccine strain vRub-Ant has lost neurotropism and was unable to bind to the membrane receptors of the brain (MRB) of guinea pig embryos, unlike its parent rubella virus strain. The high immunogenicity of the domestic cold-adapted strain vRub-Ant was confirmed by high titers of neutralizing rubella antibodies observed in guinea pigs immunized subcutaneously with one vaccination dose of the virus.

**Conclusion.** A domestic attenuated vaccine strain vRub-Ant of the rubella virus that has the main biological markers of attenuation (ts-ca and att phenotypes) has been developed. The vaccine strain vRub-Ant induces a high levels of neutralizing antibodies in guinea pigs following the immunization with a single vaccination dose of the vaccine. The viral strain vRub-Ant has lost its tropism to the MRB of guinea pig embryos, unlike its parent variant.

**Keywords:** rubella virus, cell culture, cold-adapted domestic strain of rubella virus attenuation, infectivity of the sample, immunogenicity, antigenicity, neurotropicity, preparation of the membrane receptor of the brain of guinea pigs

**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, 23 July 2010). The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera (protocol No. 6, June 7, 2021). The study was conducted with the voluntary informed consent of the legal representatives of the child.

**Funding source.** This study was not supported by any external sources of funding.

**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., Stroeveva A.D., Ammour Yu.I., Sidorov A.V., Kharchenko O.S., Bukhtoyarov G.N., Svitich O.A., Zverev V.V. Biological properties of domestic strain vRub-Ant of rubella virus. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2022;99(5):505–513. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-320>

## Введение

Краснуха — это лёгкое инфекционное заболевание, которое поражает преимущественно детей и вызывается вирусом краснухи (*Rubellavirus* — RV), входящим в семейство *Matonaviridae*, род *Rubivirus* [1]. Краснуха остаётся социально-экономическим бременем из-за высокой заболеваемости синдромом врождённой краснухи (СВК). Если инфекция возникает у женщины в I триместре беременности, RV способен установить инфекцию у плода в 90% случаев в виде развития СВК. Специфического лечения краснухи и СВК не существует. В США в 1950-х гг. у 8–13% детей с СВК развился аутизм во время рубеолярной эпидемии. Считают, что СВК, вызванный в ранние сроки беременности, возникает вследствие дисфункции материнской печени, приводящей к гипервитаминозу А, который воздействует на развивающийся зародыш [2]. СВК, вызванный краснушной инфекцией, является основной причиной аномалий развития, особенно слепоты и глухоты. Системные осложнения включают сыпь при рождении, малый вес, сердечно-сосудистые дефекты, микроцефалию, психомоторное торможение, гепатит и др. Реже возникает фатальное нейродегенеративное расстройство, названное прогрессирующим краснушным панэнцефалитом. Инсулинзависимый сахарный диабет как осложнение СВК обнаруживается поздно [3–6].

Для предотвращения осложнений краснушной инфекции существует живая аттенуированная вакцина против краснухи. Большинство лицензированных вакцин против краснухи основаны на штаммах генотипа 1А, таких как Wistar RA 27/3. Другие вакцинные штаммы краснухи генотипа 1А включают штаммы Matsuura, Takahashi и TO-336, используемые главным образом в Японии [7]. Штаммы RV группируются в 2 клада и далее делятся на 13 генотипов (клада 1: 1а, 1В, 1С, 1D, 1Е, 1F, 1G, 1Н, 1I и 1J; клада 2: 2А, 2В и 2С) на основе 739 нуклеотидных последовательностей в гене *E1*.

Краснушная вакцина обеспечивает защиту от инфекции RV любого генотипа, за исключением лиц с ослабленным иммунитетом.

Разработана 4-компонентная вакцина на основе отечественных штаммов вирусов кори, эпидемического паротита и ветряной оспы и зарубежного штамма RV Wistar RA 27/3 [8]. Однако более актуальным, эффективным и предпочтительным вакцинным штаммом RV для России считается вирусный штамм краснухи, циркулирующий на её территории. Кроме того, известно, что зарубежный штамм RV Wistar RA 27/3, на основе которого изготавливается краснушная вакцина, обладает побочным эффектом, заключающимся в поражении суставов. Этот эффект может встречаться у 70% привитых женщин после полового созревания. Симптомы могут варьировать по степени тяжести

от преходящей скованности суставов до артрита с болью, отёком и ограничением движения [9].

**Целью** исследования являлось изучение биологических свойств созданного отечественного холодоадаптированного (ха) вакцинного штамма RV vRub-Ant, циркулирующего на территории России.

## Материалы и методы

При выполнении работы были использованы культуральные, вирусологические, иммунохимические и серологические методы исследования.

### Культура клеток

Штамм диплоидных клеток лёгких эмбриона человека (ЛЭЧ-3) — основной клеточный субстрат для размножения и накопления штаммов RV. Для приготовления антигена RV для серологических реакций использовали Vero CCL-81 и Vero EСС — перерываемые клеточные линии почки зелёных мартышек американской и европейской коллекций клеточных культур соответственно, для приготовления антигена RV для серологических реакций — мезенхимальные стволовые клетки костного мозга человека поздних пассажей и мононуклеарные клетки периферической крови человека (МКПК).

### Питательные среды

Культуры клеток выращивали в ростовой питательной среде DMEM/F12 с 5% эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС), 2 мМ глутамина, 10 мМ НЕPЕС, 40 мкг/мл гентамицина. Поддерживающей средой для репродукции вируса была среда DMEM с повышенным содержанием глюкозы и 40 мкг/мл гентамицина.

Моноклональные антиидиотипические антитела с подобными  $\alpha/\beta$ - и  $\gamma$ -интерферону (ИФН) человека свойствами получали из мышинных лимфоцитарных гибридом.

### Вирусы

Клинический материал для выделения вируса получен в 2008 г. во время эпидемической вспышки краснушной инфекции в г. Ивантеевке Московской области от здорового мальчика 7 лет, заболевшего краснухой. Законные представители ребёнка дали информированное добровольное согласие на участие в научных исследованиях. Клинический образец хранили в транспортной среде при  $-70^{\circ}\text{C}$  до марта 2020 г. в виде мазков из зева, правой и левой ноздрей. Клинические образцы раздельно перенесли на монослой штамма диплоидных клеток ЛЭЧ-3 и культивировали в инкубаторе при  $30^{\circ}\text{C}$  и 5%  $\text{CO}_2$ . На 4-е сутки культивирования на монослой клеток ЛЭЧ-3 все 3 изолята вызвали цитопатическое действие в виде цитолиза клеток. Аттенуацию клинического изолята проводили в течение 20 пассажей на штамме диплоидных клеток ЛЭЧ-3, выращенных в

культуральных флаконах с ростовой поверхностью 175 см<sup>2</sup>. Пассирование клинического изолята продолжали при 30°C. Интервалы между пассажами составляли 7–9 сут.

В качестве референс-штамма RV использовали вакцинный штамм Wistar RA 27/3 RV, выделенный в 1965 г. S.A. Plotkin в США от ребёнка с СВК [10].

#### *Оценка вирулентности вирусов*

МКПК выделяли из венозной гепаринизированной (20 ЕД/мл) крови человека 0 группы, резус плюс, в градиенте плотности фиколла 1,077 г/см<sup>3</sup> («PanEco») при центрифугировании в течение 25 мин при 1500 об/мин. Клеточную фракцию дважды промывали холодным фосфатно-буферным раствором (ФБР), осадок клеток ресуспендировали в питательной среде DMEM/F12 с 2% ЭТС с таким расчётом, чтобы в 1 мл было не менее 1 млн клеток. Лимфоциты по 1 мл распределяли в лунки 12-луночных планшетов. В лунки планшетов с лимфоцитами вносили по 0,1 мл вирусосодержащей жидкости разных пассажных уровней (3-й и 20-й пассажи) штаммов Rub-Ant. В определённые интервалы из лунок планшетов извлекали по 20 мкл суспензии лимфоцитов и наносили равномерно на предметные стекла с окнами, образцы клеток высушивали при комнатной температуре в течение ночи. Образцы фиксировали дважды фильтрованным 3% параформальдегидом с 0,2% бычьим сывороточным альбумином в течение 1 ч при комнатной температуре. Фиксатор дважды промывали ФБР, образцы слегка подсушивали и проводили блокировку 10% нормальной козлиной сывороткой в течение 1 ч. Затем на образцы наносили мышинные асцитические жидкости, содержащие моноклональные антиидиотипические антитела с «внутренним образом»  $\alpha/\beta$ - и  $\gamma$ -ИФН, т.е. антирецепторные антитела для ИФН. После 1 ч контакта образцов с антителами во влажной камере при 37°C предметные стекла с образцами дважды промывали ФБР, слегка подсушивали и на окна с образцами наносили анти-мышинный ФИТЦ-конъюгат («Bio-Rad») в рабочем разведении на 1 ч во влажной камере при 37°C. По завершении контакта с ФИТЦ-конъюгатом предметные стекла промывали в ФБР и подсушивали.

Экспрессию  $\alpha$ - и  $\gamma$ -ИФН-Р на МКПК оценивали под люминесцентным микроскопом «Optica» при увеличении 1000 по процентному соотношению светящихся лимфоцитов на 200 анализируемых клеток.

#### *Иммуноферментный анализ*

В качестве антигенов для твёрдой фазы на 96-луночные планшеты сорбировали лизаты мезенхимальных стволовых клеток, инфицированных вакцинным штаммом RV Wistar RA 27/3 или концентраты вирусосодержащей жидкости с клеток Vero-CCL-81, инфицированных вакцинным

холодоактивированным (ха) штаммом vRub-Ant RV на 20-м пассажном уровне. Остальные этапы иммуноферментного анализа (ИФА) проводили общепринятым методом. Концентрацию вирусосодержащей жидкости проводили на ультрацентрифуге ротор SW32 Ti при 25 или 26 тыс об/мин (75,0–87,5 тыс. G) в течение 6 ч.

#### *Иммунизация морских свинок*

Морским свинкам массой 300–400 г вводили подкожно в холку по 0,5 мл одну прививочную дозу вакцинных штаммов vRub-Ant и Wistar RA 27/3. Через 2 мес после иммунизации делали кардиальную пункцию. Полученные иммунные сыворотки были обработаны препаратом RDE 2 («Seiken») для удаления термолабильных и термостабильных ингибиторов для постановки реакции нейтрализации на клеточной культуре и ИФА.

Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23.07.2010). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом НИИВС им. И.И. Мечникова (протокол № 6 от 07.06.2021).

#### *Постановка перекрёстной реакции нейтрализации*

Реакция нейтрализации поставлена на клеточной культуре Vero-ECS, выращенной на 24-луночных планшетах («Costar») в ростовой питательной среде. Приготовлены двукратные разведения иммунных вирусспецифических сывороток морских свинок к вакцинным штаммам vRub-Ant и Wistar RA 27/3, а также разведения моноклональных антител (МКА) к штамму Chendehill-C 74 [11] RV. В каждое разведение иммунных сывороток и МКА-C-74 в объёме 0,1 или 0,2 мл вносили равный объём 1000 доз RV, смесь вортиксировали и оставляли на контакт на 1,5 ч при 36,5°C в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub>, периодически вортиксируя каждые 15 мин. В 24-луночные планшеты с выросшими клетками и с предварительно удалённой ростовой средой вносили в каждые 2 лунки по 0,1 мл разведений смеси вируса и сыворотки и вируса с МКА и оставляли на контакт на 1,5 ч в инкубаторе. После завершения контакта в лунки вносили по 0,9 или 0,8 мл поддерживающей среды. На планшете в 2 лунках ставили контроль дозы вируса и контроль клеток, культивирование продолжали в течение 7 сут. Результат реакции нейтрализации учитывали при 100% защите клеток.

#### *Получение мембранного рецептора мозга*

Иссекали мозги 5 эмбрионов морских свинок, определяли вес, ткань мозга промывали ФБР от крови, добавляли к мозговой ткани 50 мМ трис-буфера pH 7,6 и гомогенизировали в гомогене-

низаторе Даунса. Гомогенат центрифугировали при 14 000 об/мин при 4°C в настольной центрифуге. Соотношение мозговой ткани масса : объём составляло 1 : 7. Надосадок декантировали, добавляли в него аналогичный объём 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. Концентрация белка в эксперименте была 40 мг/мл препарата мембранного рецептора мозга (МРМ) эмбрионов морских свинок.

#### Определение остаточной инфекционной активности

К 100 мл вирусосодержащей жидкости дикого варианта RV pRub-Ant (3-й пассаж), вакцинного ха-штамма vRub-Ant (20-й пассаж) RV, референс-штамма RA 27/3 RV и Трис-буфера добавляли по 900 мкл нейрорецепторов мозга морских свинок. 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 путём титрования методом предельных разведений на чувствительных к RV клеточных культурах. Инфекционную активность оценивали по реакции гемадсорбции с 0,25% взвесью эритроцитов морских свинок.

Анализ результатов проводили с использованием статистического пакета «Prism-GfaphPad».

## Результаты

На рис. 1 представлены результаты оценки феноменов температурочувствительности (ts-мутация) и холодоадаптированности (ха-мутация) аттенуированного вирусного штамма vRub-Ant на 20-м пассажном уровне в сравнении с диким родительским вариантом pRub-Ant на 2-м пассажном уровне. Аттенуированный ха-штамм не размножился при высокой температуре, в отличие от родительского дикого варианта, т.е. этот штамм обладает ts-мутацией. Репродуктивная активность аттенуированного вакцинного штамма была на 2 Ig выше при 30°C, чем при 36,5°C, что свидетельствует о ха-мутации.

В табл. 1 представлены результаты сравнительной оценки уровней экспрессии  $\alpha/\beta$ - и  $\gamma$ -ИФН-Р на МКПК человека, индуцированных диким вариантом RV pRub-Ant (3-й пассажный уровень) и вакцинный ха-штамм vRub-Ant (20-й пассажный уровень).

Ранее нами был предложен новый биологический маркер аттенуации кандидатных вирусных штаммов [8]. В эксперименте по сравнительной оценке показателей экспрессии  $\alpha/\beta$ - и  $\gamma$ -ИФН-Р на МКПК человека, индуцированных дикими вариантами RV и их аттенуированными вакцинными ха-штаммами, было чётко продемонстрировано, что дикие варианты родительских вирусов вызывали более высокую экспрессию  $\alpha/\beta$ - и  $\gamma$ -ИФН-Р, чем их аттенуированные вирусные штаммы. Этот признак характеризует вирулентность (att-фенотип) диких вариантов вирусов в отличие от аттенуированных вирусных штаммов.

В табл. 1 показано, что начиная с 3 ч с момента индукции на МКПК диким вариантом pRub-Ant RV и аттенуированным ха-штаммом vRub-Ant сни-

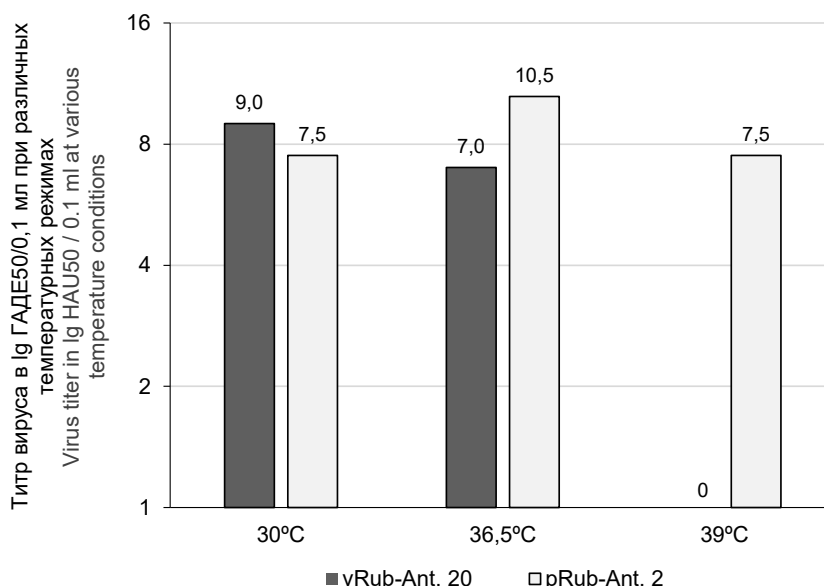


Рис. 1. Оценка маркеров биологической аттенуации (ха- и ts-фенотипы) вакцинного штамма vRub-Ant и дикого варианта RV.

Fig. 1. Evaluation of markers of biological attenuation (ca and ts phenotypes) of the «vRub-Ant» vaccine strain and the wild-type variant of RV.

**Таблица 1.** Уровень экспрессии  $\alpha/\beta$ - и  $\gamma$ -ИФН-Р на МКПК человека, индуцированных различными вариантами RV  
**Table 1.** The level of expression of  $\alpha/\beta$  and  $\gamma$  IFN-P on human PBMC induced by various variants of the RV

Временные интервалы, ч Time intervals, hours	Уровень экспрессии $\alpha/\beta$ - и $\gamma$ -ИФН-Р, %   Expression level of $\alpha/\beta$ - and $\gamma$ -IFN-R, %					
	$\alpha/\beta$ -ИФН-Р   $\alpha/\beta$ -IFN-R		% снижения $\alpha/\beta$ -ИФН-Р % decrease of $\alpha/\beta$ -IFN-P	$\gamma$ -ИФН-Р   $\gamma$ -IFN-R		% снижения $\gamma$ -ИФН-Р % decrease of $\gamma$ -IFN-P
	pRub-Ant, 3-й пассаж 3 <sup>rd</sup> passage	vRub-Ant, 20-й пассаж 20 <sup>th</sup> passage		pRub-Ant, 3-й пассаж 3 <sup>rd</sup> passage	vRub-Ant, 20-й пассаж 20 <sup>th</sup> passage	
0	0,2 ± 0,01	0,3 ± 0,01	0	0,4 ± 0,02	0,5 ± 0,03	0
3	1,6 ± 0,07	1,4 ± 0,05	12,5	1,6 ± 0,07	1,2 ± 0,03	25
6	4,0 ± 0,09	2,5 ± 0,07	37,5	5,0 ± 0,04	3,0 ± 0,07	40
21	5,9 ± 0,07	4,1 ± 0,03	30,5	6,3 ± 0,06	4,1 ± 0,05	34,9
24	5,2 ± 0,05	3,25 ± 0,01	37,5	5,6 ± 0,07	3,7 ± 0,04	33,9
27	6,0 ± 0,09	3,0 ± 0,05	50	5,0 ± 0,05	2,3 ± 0,06	54
30	4,0 ± 0,03	2,3 ± 0,07	42,5	3,5 ± 0,07	2,2 ± 0,03	37,1

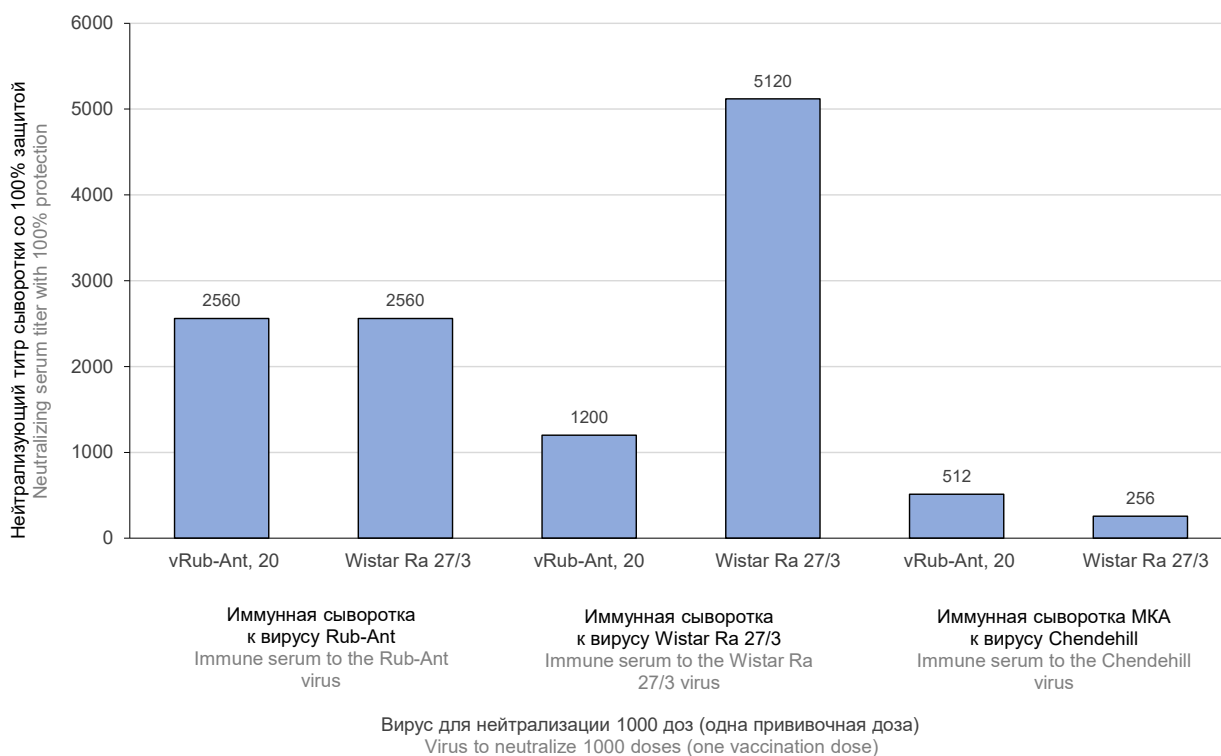
жается уровень экспрессии  $\alpha/\beta$ - и  $\gamma$ -ИФН-Р аттенуированным ха-штаммом vRub-Ant. Максимальное снижение уровня экспрессии  $\alpha/\beta$ - и  $\gamma$ -ИФН-Р аттенуированным вирусным штаммом наблюдается с 24 ч и позже с момента начала индукции.

Для оценки сравнительной иммуногенности аттенуированных штаммов RV поставлена перекрёстная реакция нейтрализации указанных штаммов RV с сыворотками морских свинок, иммунизированных подкожно одной прививочной дозой, смесью 2 МКА к штамму Chendehill (С-74) RV. Высокая иммуногенность отечественного вакцинного

ха-штамма vRub-Ant подтверждается высокими титрами иммунных сывороток морской свинки в РН со 100% защитой против 1000 доз RV штаммов vRub-Ant и штамма Wistar RA 27/3, а также МКА к штамму С-74 RV (рис. 2).

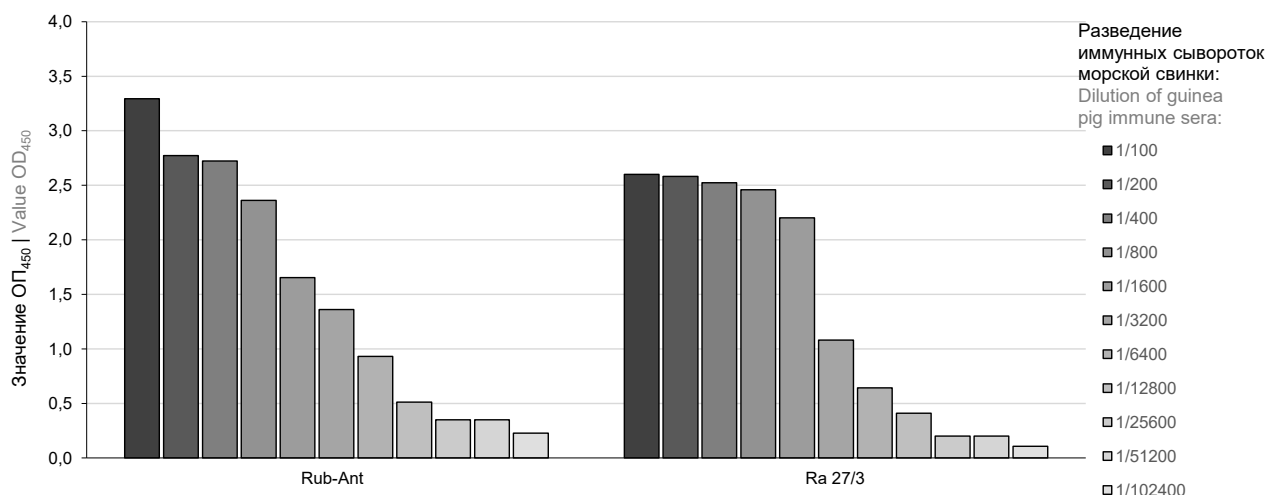
Антигенная активность сравниваемых вакцинных штаммов устанавливалась в ИФА (рис. 3). Оба вакцинных штамма обладают высокой антигенной активностью.

Специфичность связывания RV с МРМ мозга эмбрионов морских свинок определяли с помощью сравнения вирусов дикого типа и аттенуированных



**Рис. 2.** Перекрёстная реакция нейтрализации аттенуированных штаммов RV.

**Fig. 2.** Cross-neutralization reactivity of attenuated strains of RV.



**Рис. 3.** Значения оптической плотности при длине волны 450 нм ( $OP_{450}$ ) специфических сывороток морских свинок на 60-е сутки после иммунизации штаммами vRub-Ant и Wistar RA 27/3 RV.

**Fig. 3.** Diagram of  $OP_{450}$  values of specific guinea pig serums on the 60<sup>th</sup> day after immunization with vRub-Ant and Wistar RA 27/3 strains of RV.

**Таблица 2.** Сравнительная оценка связывания штаммов вируса краснухи с препаратами MPB эмбрионов морских свинок

**Table 2.** Comparative evaluation of binding of rubella virus strains with MRM preparations of guinea pig embryos

Вирусный штамм Viral strain	Инфекционность, Ig ГАДЕ <sub>50/0,1 мл</sub> Infectivity, Ig HAU <sub>50/0,1 ml</sub>		<i>p</i>	Индекс связывания, Ig ГАДЕ <sub>50/0,1 мл</sub> The binding index, Ig HAU <sub>50/0,1 ml</sub>	Связывание, % Binding, %
	RV + буфер RV + buffer ( <i>n</i> = 5)	RV + MPM RV + MRM ( <i>n</i> = 5)			
vRub-Ant	8,5 ± 0,08	8,5 ± 0,1	< 0,001	0	0
pRub-Ant	9,5 ± 0,1	8,5 ± 0,09	< 0,001	1,0	10,5
Wistar RA 27/3	6,5 ± 0,08	6,5 ± 0,06	< 0,001	0	0
Контроль (трис-буфер) Control (Tris buffer)	0	0		0	0

вакцинных вирусных штаммов [12]. При сравнении ха-штамма vRub-Ant вируса краснухи на 20-м пассажном уровне с его диким родительским вариантом на 3-м пассажном уровне выявлено, что дикий вариант связывается с препаратом нейрорецепторов мозга эмбрионов морской свинки с индексом связывания 1,0 Ig ГАДЕ<sub>50/0,1 мл</sub>, процент связывания составляет 10,5, в то время как вакцинный ха-штамм vRub-Ant полностью утратил тропизм к нервной ткани (табл. 2). Такая же картина наблюдается и со сравнимым зарубежным вакцинным штаммом RV Wistar RA 27/3.

### Обсуждение

В НИИВС им. И.И. Мечникова создана 4-компонентная живая культуральная вакцина vRub-Ant на основе 3 отечественных вакцинных штаммов вируса кори, эпидемического паротита и ветряной оспы [13, 14] и зарубежного вакцинного штамма Wistar RA 27/3 RV. Вакцинный штамм RV получен в США S.A. Plotkin от ребёнка с СВК [10].

Целью нашего исследования являлось создать отечественный вакцинный штамм RV, циркулирующий на территории России. Основными биологическими маркерами аттенуации являются температурочувствительность и холодоадаптированность вируса. Вакцинный штамм vRub-Ant обладает ts- и ха-фенотипами.

Как правило, вирулентность вирусов оценивается на животной модели. Однако для RV такой модели для оценки вирулентности вирусного штамма не существует, кроме обезьян.

Ранее нами на мембранах МКПК человека установлено, что уровень экспрессии  $\alpha/\beta$ - и  $\gamma$ -ИФН-Р дикого варианта RV выше, чем аттенуированного штамма vRub-Ant, т.е. вирулентность вакцинного штамма значительно ослаблена.

Основным свойством вакцины является её иммуногенность. Вирус-специфические сыворотки морских свинок в реакции нейтрализации с 1000 дозой гомологичных и гетерологичных RV показали высокие титры при 100% защите чувствитель-



ной клеточной культуры.

Другим важным свойством вакцинных штаммов является отсутствие нейротропности. Мы сравнили нейротропность вакцинного штамма vRub-Ant и дикого родительского варианта rRub-Ant с использованием МРМ эмбрионов морских свинок и установили, что родительский вариант RV связывается с МРМ эмбрионов морских свинок, а вакцинный ха-штамм утратил эту способность.

### Заклучение

Создан отечественный вакцинный штамм RV vRub-Ant, обладающий основными биологическими маркерами аттенуации. Вакцинный штамм RV vRub-Ant вызывает высокий уровень нейтрализующих антител в организме морских свинок при однократной иммунизации прививочной дозой. В процессе холодовой адаптации на диплоидных клетках лёгких эмбриона человека показано, что вакцинный штамм RV vRub-Ant утратил тропизм к рецепторам мозга эмбрионов морских свинок в отличие от своего родительского дикого варианта. Детально охарактеризованный отечественный вакцинный штамм vRub-Ant может быть использован при изготовлении краснушной моновакцины и включён в качестве компонента в тривакцину (корь, эпидемический паротит, краснуха) и в тетравакцину (корь, эпидемический паротит, краснуха и ветряная оспа).

### СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Gershon A.A. Rubella virus (German Meales). In: *Mandell, Douglas, and Bennet's Principles and Practice. Volume 2*. Elsevier; 2015: 1875–80. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4801-3.00154-5>
- Mawson A.R., Croft A.M. Rubella virus infection, the congenital rubella syndrome, and link to autism. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2019; 16(19): 3543–71. <https://doi.org/10.3390/ijerph16193543>
- Banatvala J.E., Brown D.W.G. Rubella. *Lancet*. 2004; 363(9415): 1127–37. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)15897-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)15897-2)
- George S.R., Viswanathan R., Sarkal G.N. Molecular aspects of the teratogenesis of rubella virus. *Biol. Res*. 2019; 52(1): 47. <https://doi.org/10.1186/s40659-019-0254-3>
- Lambert N., Strebel P., Orenstein W., Icenogle J., Poland G.A. Rubella. *Lancet*. 2015; 385(9984): 2297–307. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60539-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60539-0)
- Lee J.Y., Bowden D.S. Rubella virus replication and links to teratogenicity. *Clin. Microbiol. Rev*. 2000; 13(4): 571–87. <https://doi.org/10.1128/cmr.13.4.571-587.2000>
- Shishido A., Ohtawara V. Development of attenuated rubella virus vaccines in Japan. *Jpn J. Med. Sci. Biol*. 1976; 29(5): 227–53. <https://doi.org/10.7883/yoken.952.29/227>
- 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 иммунологии*. 2020; 97(2): 125–33. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-2-125-133>
- Best L.M., Banatvala J.E. Congenital virus infections. *BMJ*. 1990; 300(6733): 1151–2. <https://doi.org/10.1136/bmj.300.6733.1151>
- Plotkin S.A. The history of rubella and rubella vaccination

leading to elimination. *Clin. Infect. Dis*. 2006; 43(Suppl. 3): S164–68. <https://doi.org/10.1086/505950>

- Нагиева Ф.Г., Никулина В.Г., Баркова Е.П., Зубков А.В., Кузьмина Н.С., Десяткова Р.Г. и др. Моноклональные антитела к гликопротеину E1 вируса краснухи. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2011; 88(1): 61–7.
- Barrett F., Ryman K., Ni H. Method of attenuating viruses. Patent US EPO922092B1; 1999.
- 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.
- Зверев В.В., Нагиева Ф.Г., Баркова Е.П., Осокина О.В. Способ получения четырехкомпонентной культуральной живой вакцины против кори, ветряной оспы, эпидемического паротита, краснухи. Патент РФ №2693440; 2019.
- 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 иммунологии*. 2020; 97(4): 303–11. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-4-2>

### REFERENCES

- Gershon A.A. Rubella virus (German Meales). In: *Mandell, Douglas, and Bennet's Principles and Practice. Volume 2*. Elsevier; 2015: 1875–80. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4801-3.00154-5>
- Mawson A.R., Croft A.M. Rubella virus infection, the congenital rubella syndrome, and link to autism. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2019; 16(19): 3543–71. <https://doi.org/10.3390/ijerph16193543>
- Banatvala J.E., Brown D.W.G. Rubella. *Lancet*. 2004; 363(9415): 1127–37. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)15897-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)15897-2)
- George S.R., Viswanathan R., Sarkal G.N. Molecular aspects of the teratogenesis of rubella virus. *Biol. Res*. 2019; 52(1): 47. <https://doi.org/10.1186/s40659-019-0254-3>
- Lambert N., Strebel P., Orenstein W., Icenogle J., Poland G.A. Rubella. *Lancet*. 2015; 385(9984): 2297–307. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60539-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60539-0)
- Lee J.Y., Bowden D.S. Rubella virus replication and links to teratogenicity. *Clin. Microbiol. Rev*. 2000; 13(4): 571–87. <https://doi.org/10.1128/cmr.13.4.571-587.2000>
- Shishido A., Ohtawara V. Development of attenuated rubella virus vaccines in Japan. *Jpn J. Med. Sci. Biol*. 1976; 29(5): 227–53. <https://doi.org/10.7883/yoken.952.29/227>
- Nagieva F.G., Barkova E.P., Stroeveva A.D., Sidorov A.V., Lotte V.D., Zverev V.V., et al. Characterization of binding of *Varicella zoster* virus vaccine strains to preparations of mouse brain membrane receptors. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii*. 2020; 97(2): 125–33. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-2-125-133> (in Russian)
- Best L.M., Banatvala J.E. Congenital virus infections. *BMJ*. 1990; 300(6733): 1151–2. <https://doi.org/10.1136/bmj.300.6733.1151>
- Plotkin S.A. The history of rubella and rubella vaccination leading to elimination. *Clin. Infect. Dis*. 2006; 43(Suppl. 3): S164–68. <https://doi.org/10.1086/505950>
- Nagieva F.G., Nikulina V.G., Barkova E.P., Zubkov A.V., Kuz'mina N.S., Desyatkov R.G., et al. Monoclonal antibodies to rubella virus glycoprotein E1. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii*. 2011; 88(1): 61–7. (in Russian)
- Barrett F., Ryman K., Ni H. Method of attenuating viruses. Patent US EPO922092B1; 1999.
- 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. (in Russian)
14. Zverev V.V., Nagieva F.G., Barkova E.P., Osokina O.V. Method of obtaining a four-component cultured live vaccine against measles, chickenpox, mumps, rubella (NT). Patent RF 2693440; 2019. (in Russian)
  15. Nagieva F.G., Barkova E.P., Stroeveva A.D., Sidorov A.V., Zverev V.V. Characterization of markers of cold-adapted can-

#### Информация об авторах

**Нгиева Фирая Галиевна**<sup>✉</sup> — д.м.н., доцент, зав. лаб. гибридных клеточных культур отдела вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, [fgn42@yandex.ru](mailto:fgn42@yandex.ru), <https://orcid.org/0000-0001-8204-4899>

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

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

**Аммур Юлия Игоревна** — к.б.н., зав. лаб. экспериментальной иммунологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0223-5738>

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

**Харченко Ольга Сергеевна** — н.с. лаб. ДНК-содержащих вирусов отдела вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2169-9610>

**Бахтяров Георгий Николаевич** — к.б.н., н.с. лаб. генетики ДНК-содержащих вирусов отдела вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2169-9610>

**Свитич Оксана Анатольевна** — д.м.н., член-корр. РАН, директор НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1757-8389>

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

**Участие авторов.** Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 30.07.2022;  
принята к публикации 11.10.2022;  
опубликована 30.10.2022

didate virus strains for live attenuated vaccines against chickenpox and shingles. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(4): 303–11. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-4-2> (in Russian)

#### Information about the authors:

**Firaya G. Nagieva**<sup>✉</sup> — D. Sci. (Med.), Associate Professor, Head, Laboratory of hybrid cell cultures, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, [fgn42@yandex.ru](mailto:fgn42@yandex.ru), <https://orcid.org/0000-0001-8204-4899>

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

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

**Yulia I. Ammur** — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of experimental immunology, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0223-5738>

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

**Olga S. Kharchenko** — researcher, Laboratory of DNA viruses, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2169-9610>

**Georgy N. Bukhtoyarov** — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Laboratory of genetics of DNA-containing viruses, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2169-9610>

**Oksana A. Svitich** — D. Sci. (Med.), Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Director, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1757-8389>

**Vitaly V. Zverev** — D. Sci. (Biol.), Professor, RAS Full Member, Head, Laboratory of molecular biotechnology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5808-2246>

**Author contribution.** All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

The article was submitted 30.07.2022;  
accepted for publication 11.10.2022;  
published 30.10.2022