

ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ВЫЯВЛЕНИЯ, КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКИ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА VARICELLA-ZOSTER

Ф.Г. Нагиева, Е.П. Баркова, А.Н. Лисаков, А.В. Сидоров, В.В. Зверев,
О.В. Осокина, А.Д. Строева

ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

Резюме. До настоящего времени принято считать, что инфекционность вируса varicella-zoster (VZV — varicella-zoster virus) остается тесно связанной с клеткой, и вновь сформированный вирус не высвобождается в культуральную среду. Известно также, что VZV трудно выращивать в клеточных культурах, поскольку он медленно реплицируется, имеет ограниченный спектр чувствительных клеточных культур. Кроме того, изоляция VZV зависит от вида использованных клеточных культур, характера клинического материала, наличия жизнеспособного вируса и времени транспортировки. Цель работы: изучение продукции инфекционного внеклеточного VZV с использованием различных клеточных культур. *Материалы и методы.* В работе использовали 8 различных клеточных культур, включая диплоидные клетки легких эмбриона человека и кожно-мышечную ткань эмбриона человека (КМ-27), а также перевиваемые клеточные линии человека и обезьян. В качестве клинических изолятов были использованы корочки от везикулярной сыпи, которые помещали в криопробирки с транспортной средой и транспортировали в жидком азоте. Инфекционность VZV оценивали на инфицированных клеточных культурах по реакции гемадсорбции со взвесью эритроцитов морских свинок или человека с нулевой группой крови и подтверждали в реакции непрямой иммунофлуоресценции с поликлональными сыворотками от людей, переболевших опоясывающим герпесом. *Результаты.* В работе было исследовано 27 клинических образцов в виде корочек от везикулярной сыпи от пациентов, заболевших ветряной оспой, и один образец от пациента в возрасте 63 лет в фазе обострения рецидивирующего опоясывающего герпеса. Первичное заражение клиническими изолятами проводили на штаммах диплоидных клеток легких эмбриона человека (ЛЭЧ-3) при низких температурах. Было установлено, что корочки от везикулярной сыпи, взятые от пациентов с 1 по 18 сут включительно с момента появления сыпи, вызывали на монослое клеток ЛЭЧ-3 цитопатическое действие в виде цитолиза клеток вокруг корочки. Специфичность ЦПД подтверждали ПЦР-РВ. Для оценки иммунных сывороток были приготовлены вирусные антигены на 7 клеточных линиях, зараженных лабораторным штаммом «Ellen» VZV (США). Была обнаружена высокая специфическая анти-VZV активность мышинных сывороток в ИФА при использовании в качестве твердофазного сорбента всех использованных лизатов инфицированных клеточных линий. В экспериментах по репродукции VZV было установлено, что внеклеточный вирус высвобождается в культуральную среду с 1 суток с момента инфицирования чувствительных клеток, и инфекционность вирусосодержащей жидкости увеличивается в процессе дальнейшего культивирования.

Ключевые слова: varicella-zoster, herpes zoster, культура клеток, клинический изолят, репродукция вируса, реакция гемадсорбции, иммунофлуоресцентный анализ, моноклональные антитела, ПЦР в реальном времени, индивидуальные вирусные сборы.

Адрес для переписки:

Нагиева Фирая Галиевна
115088, Россия, Москва, ул. 1-я Дубровская, 15, стр. 1,
ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова.
Тел.: 8 (495) 674-76-45 (служебн.); 8 916 272-79-01 (моб.).
E-mail: fgn42@yandex.ru

Contacts:

Firaya G. Nagieva
115088, Russian Federation, Moscow, 1st Dubrovskaya str., 15/1,
Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera.
Phone: +7 (495) 674-76-45 (office); +7 916 272-79-01 (mobile).
E-mail: fgn42@yandex.ru

Библиографическое описание:

Нагиева Ф.Г., Баркова Е.П., Лисаков А.Н., Сидоров А.В., Зверев В.В.,
Осокина О.В., Строева А.Д. Практические аспекты выявления,
культивирования и характеристики клинических изолятов вируса
varicella-zoster // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 2. С. 387–396.
doi: 10.15789/2220-7619-PAO-1211

Citation:

Nagieva F.G., Barkova E.P., Lisakov A.N., Sidorov A.V., Zverev V.V.,
Osokina O.V., Stroeveva A.D. Practical aspects on identification, cultivation
and characteristics of varicella-zoster virus isolates // Russian Journal
of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2020, vol. 10, no. 2,
pp. 387–396. doi: 10.15789/2220-7619-PAO-1211

PRACTICAL ASPECTS ON IDENTIFICATION, CULTIVATION AND CHARACTERISTICS OF VARICELLA-ZOSTER VIRUS ISOLATES

Nagieva F.G., Barkova E.P., Lisakov A.N., Sidorov A.V., Zverev V.V., Osokina O.V., Stroeva A.D.

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation. Anjaparidze Virology Branch

Abstract. Until now, it has been considered that infectivity of the varicella-zoster virus (VZV) is closely related to target cell, and newly formed virus is not released into the culture medium. It is also known that it is hard to grow VZV in cell cultures, due to its slow replication rate and a limited range of sensitive cell cultures. In addition, VZV isolation depends on type of cell culture used, nature of clinical material, presence of viable virus and transport time. Objectives. To study production of infectious extracellular VZV in various cell cultures. *Materials and methods.* Eight cell cultures were used, including human embryonic diploid lung cells and human embryonic dermomuscular tissue (KM-27), as well as continuous human and monkey cell lines. Crusts detached from vesicular lesions were used as clinical isolates, which were placed into cryo-vials added with transport medium and transferred in liquid nitrogen. VZV infectivity was assessed in cell cultures by using hemo-adsorption assay with erythrocyte suspension isolated from guinea pig or human zero group blood and confirmed by indirect immunofluorescence with polyclonal sera from varicella or herpes zoster convalescents. Results. There were examined 27 clinical samples consisting of crusts from vesicular lesions isolated from patients with chickenpox, as well as one sample from 63-year old patient with exacerbated recurrent herpes zoster. Primary infection with clinical isolates was performed on diploid human lung embryo cells (HLEC) at low temperature. It was found that clinical samples collected within day 1–18 inclusive after the onset of skin eruption were able to induce cytopathic effects in HLEC cell monolayer such as cytolysis around dermal crusts. Specificity of cytopathic effect was confirmed by using real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). Viral antigens were prepared on 7 cell lines infected with the laboratory strain Ellen VZV (USA) to assess the immune sera. A high anti-VZV specificity of mouse sera was detected by ELISA while all the lysates of infected cell lines were used as the solid-phase sorbent. In experiments on VZV reproduction demonstrated that extracellular virus was released into the culture medium starting from day 1 after infection of target cells, and infectivity of the virus-containing fluid ascends during further cultivation.

Key words: *Varicella-zoster virus, cell culture, clinical isolate, virus reproduction, hemo-adsorption reaction, immunofluorescent analysis, monoclonal antibodies, real-time PCR assay, individual virus collecting.*

Введение

Varicella-zoster virus (VZV) является этиологическим агентом ветряной оспы и опоясывающего герпеса (Herpes zoster — HZ) и может вызывать тяжелые системные инфекции центральной нервной системы и респираторного тракта у пациентов с иммунодефицитами. Последние могут также страдать от диссеминированных заболеваний многочисленных органов систем [2, 7, 8, 9, 13, 17]. Инфицирование VZV серонегативной беременной женщины в первом триместре беременности может вызывать инфицирование плода в 1% случаев, что порой может привести к уродству плода. Инфицирование женщин во втором или третьем триместре беременности может распространиться на плод и вызвать реактивацию латентного вируса в сенсорных нервных ганглиях, приводя к HZ. Нет детального объяснения появления HZ у младенцев или у матери на поздних стадиях беременности [3].

До настоящего времени принято считать, что инфекционность VZV остается тесно связанной с клеткой, и вновь сформированный вирус не высвобождается в культуральную среду. Тесная ассоциация VZV с клеткой основывалась на экспериментальных данных. Было показано, что вновь сконструированные вирусные

частицы переходят в поздние эндосомы клетки, содержащие кислые энзимы, где они деградируют. Деградированные вирионы являются плеоморфными и неинфекционными [3, 4, 6, 11].

Цель работы: оптимизация способа выявления, культивирования и оценки репродукции *in vitro* внеклеточного инфекционного VZV с использованием различных клеточных культур.

Материалы и методы

Культуры клеток. В работе использовали штамм диплоидных клеток легких эмбриона человека (ЛЭЧ-3), штамм диплоидных клеток кожно-мышечной ткани эмбриона человека (KM-27), перевиваемые клеточные линии Hela, Hep-2, Л-41, Vero (клон Е6), Vero CCL-81, клетки меланомы человека (MeWo).

Диплоидные клеточные культуры выращивали на питательной среде ДМЕМ/F-12 (PanEco, США) с 10 мМ НЕРЕС, с 5% эмбриональной сыворотки коров (ЭСК) (HyClone, США) с добавлением 2 мМ L-глутамин и 40 мкг/мл гентамицина.

Перевиваемые клеточные линии выращивали на среде ДМЕМ с 5% ЭСК (PAA Laboratories GmbH, Австрия) с добавлением 2 мМ глутамин и 40 мкг/мл гентамицина.

Ферменты. В работе использовали Taq-полимеразу фирмы «Синтол» (Москва, Россия).

Получение клинических изолятов от пациентов с ветряной оспой и опоясывающим герпесом. Клинический материал от инфицированных пациентов в виде корочек от везикулярной сыпи был взят в различные сроки от первого дня появления сыпи. Корочки непосредственно переносили в жидкий азот в криопробирках с транспортной средой. Транспортная среда состояла из 1 мл питательной среды ДМЕМ/F12, с 10 мМ NERES, 5% ЭСК, 100 мкг/мл канамицина и 5 мкг/мл Micokill (противогрибковый препарат фирмы PAA Laboratories GmbH, Австрия).

Изоляция VZV в культуре клеток. Вирусы изолировали путем переноса корочек от везикулярной сыпи в транспортной среде на монослой диплоидных клеток ЛЭЧ-3, выращенных в культуральных флаконах площадью 25 см², вносили 4 мл поддерживающей питательной среды ДМЕМ с 2% ЭСК. Культивирование проводили в термостате при температуре 30°C до появления цитопатического действия (ЦПД) вируса вокруг корочки от везикул, в основном, от 2 до 12 сут. Культуральный флакон с инфицированными клетками двукратно замораживали при -70°C с последующим оттаиванием при +4°C. Клеточную взвесь центрифугировали при 1000 об./мин в течение 10 мин, отбিরали надосадочную жидкость в которую вносили стабилизатор, разливали надосадочную жидкость в ампулы по 0,5 мл и переносили на -70°C до использования.

Определение инфекционной активности VZV. Определение инфекционной активности вируса проводили на клеточной культуре КМ-27, выращенной на двух 24-луночных планшетах. Посевная концентрация клеток составляла 100×10^3 клеток на лунку. Вирусосодержащую жидкость (ВСЖ) разводили десятикратно с 10^{-1} до 10^{-10} , затем в лунки двух планшетов с клеточными тест-культурами вносили по 0,1 мл ВСЖ в разных разведениях. Контакт ВСЖ с клеточным монослоем продолжался 1,0–1,5 ч при 36,5°C в атмосфере с 5% CO₂. Один планшет с инфицированными клетками использовали для постановки реакции гемадсорбции, другой — для постановки реакции непрямой иммунофлуоресценции. Результаты титрования в реакции гемадсорбции с 0,25% взвесью эритроцитов морской свинки или эритроцитов человека группы крови 0 (I) (Rh+), учитывали на 7–9 сутки с момента инфицирования. За титр вируса принимали максимальное разведение вируса, вызывающее гемадсорбцию в 50% инфицированных культур, при отсутствии гемадсорбции в контрольных неинфицированных культурах. Титр вируса выражали в гемадсорбирующих единицах в 0,1 мл (ГАДЕ 50/0,1 мл). Реакцию гемадсорбции подтверждали в непрямой реакции иммунофлуоресценции с сыворотками от па-

циентов, переболевших опоясывающим герпесом. Титр вируса выражали в иммунофлуоресцирующих фокусах в 0,1 мл (ИФ₅₀/0,1 мл).

Постановка реакции гемадсорбции. Готовили 0,25% взвесь эритроцитов морской свинки или человека путем трехкратного отмывания эритроцитов 0,9% изотоническим раствором NaCl. По 0,3 мл взвеси эритроцитов вносили в лунки планшетов с инфицированными клетками. Клетки с эритроцитами выдерживали 30 мин при +4...+8°C и дополнительно выдерживали 30 мин при комнатной температуре. Затем лунки планшета трехкратно отмывали от эритроцитов 0,9% изотоническим раствором NaCl и регистрировали наличие или отсутствие гемадсорбции в световом микроскопе (увеличение $\times 70$).

Постановка реакции непрямой иммунофлуоресценции. Планшет с инфицированными клетками замораживали при -20°C. Из каждой лунки с инфицированными клетками готовили препарат на предметном стекле, высушивали при комнатной температуре и фиксировали 2% параформальдегидом, предварительно дважды фильтрованным через миллипоровый фильтр с размером пор 0,22 мкм (Millex-GV) Фиксированные клетки промывали дистиллированной водой, после легкого высушивания на препарат наносили по 30 мкл вирусспецифической сыворотки и выдерживали 45 мин во влажной камере при 37°C. Затем на препарат наносили конъюгат «белок А–ФИТЦ» (Sigma, США) в рабочем разведении с контрастирующей краской Эванс голубой (Biochem, Франция) и выдерживали 30 мин во влажной камере при 37°C. Учет реакции проводили под люминесцентным микроскопом «Optika» (Италия) при длине волны 510–550 нм (увеличение $\times 40$ или $\times 100$).

Дифференцирование VZV от вирусов герпеса простого типа 1 и 2 с помощью моноклональных антител (МКА). МКА-1Н-110 реагировали только с вирусом герпеса простого 1 типа и были направлены к гликопротеиду gB, а МКА-2Н-208 реагировали только с вирусом герпеса простого 2 типа и были направлены к гликопротеиду gD. МКА получали путем введения соответствующих мышинных лимфоцитарных гибридом в брюшную полость сингенных мышей линии BALB/c. Полученные асцитические жидкости концентрировали и очищали по методу, описанному ранее [14].

Получение поликлональной мышинной анти-VZV-специфической иммунной сыворотки. Пятидневных самок мышей линии BALB/c, свободных от патогенной флоры (Spf), иммунизировали внутрибрюшинно вирусосодержащая жидкость (ВСЖ) лабораторного штамма «Ellen» (США) с титром 5,0 lg ГАДЕ₅₀/0,1 мл. Проводили

3 цикла иммунизации с интервалами 2–3 недели, каждый цикл включал внутрибрюшинное введение ВСЖ штамма «Ellen» по 0,5 мл 3 дня подряд.

Определение специфической активности мышечных иммунных сывороток в непрямой ИФА. ИФА тест-систему создавали по методу [15] в нашей модификации. Коротко: лизаты клеток, инфицированных лабораторным штаммом «Ellen» VZV разрушали ультразвуковым дезинтегратором, определяли концентрацию белка на спектрофотометре NanoPhotometer NP 80-Touch (Германия) и по 50 мкл лизата с концентрацией 100 мкг/мл вносили в лунки 96-луночных иммунологических планшет (Nunc, Дания). Планшеты с антигеном сушили в термостате при 37°C в течение 18–20 ч. В качестве конъюгата использовали антимышью козлиную сыворотку (Bio-Rad, США) в рабочем разведении.

В качестве VZV-иммуносорбентов для ИФА использовали лизаты клеток KM-27, HeLa, Her-2, L-41, Vero CCL-81, Vero (клон E6), MeWo, инфицированных штаммом «Ellen» VZV. В качестве отрицательного контроля применяли неиммунные сыворотки Spf мышей линии BALB/c. Постановку ИФА проводили общепринятым методом.

Выделение ДНК VZV. Тотальную ДНК выделяли из клеточных линий MeWo, инфицированных клиническими изолятами вируса, которые предварительно пассировали в диплоидных клетках легких эмбриона человека при низких температурах. Для получения образцов ДНК был использован набор для выделения тотальной ДНК «К-сорб» (Синтол, Москва). Выделение проводили по протоколу производителя с некоторыми модификациями, а именно: при обработке образцов протеиназой К время инкубации увеличивали до 16–20 часов. Полученные образцы, содержащие как вирусную, так и клеточную ДНК, использовали в дальнейшем в качестве матрицы в полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ).

Определение вирусной ДНК ПЦР-РВ с гибридно-флуоресцентным учетом результатов (вариант TaqMan зондов). Биоинформационный анализ нуклеотидных последовательностей, а также конструирование праймеров и проб для ПЦР-РВ проводили в программном обеспечении

«Vector NTI 11» с использованием материалов доступной нуклеотидной базы данных GenBank. Праймеры и пробы были синтезированы в фирме «Синтол» (Москва, Россия).

Дизайн и выбор вариантов проведения реакций амплификации для определения вирусной ДНК были проведены ранее [1], в дальнейших экспериментах использовали вариант амплификации фрагмента гена вируса *orf29* с TaqMan зондом [5], в котором появление сигнала обусловлено 5'-экзонуклеазной активностью Taq полимеразы, отщепляющей от зонда флуоресцентный маркер после его гибридизации на матрице вирусной ДНК. При этом флуоресценция самого зонда подавляется тушителем, расположенным на его 3'-конце. Последовательности праймеров и использованный зонд, а также локализация гена, из которых они получены, представлены в таблице 1.

В ходе ряда экспериментов были оптимизированы условия проведения реакции, а именно: объем реакционной смеси, составивший 25 мкл; состав реакционной смеси с содержанием нижеперечисленных компонентов в следующих конечных концентрациях: 0,5 мсМ каждого праймера, 1 мсМ флуоресцентного зонда, 1 ед. Taq-полимеразы, однократный буфер для проведения реакции от производителя полимеразы с содержанием 1,5 мМ MgCl₂ и 0,2 мМ дНТФ, а также 3 мкл ДНК матрицы. ПЦР-РВ проводили на амплификаторе ДТ-96 («ДНК-Технология», Россия) по следующей программе: предварительная денатурация 95°C — 2 мин; 45 циклов: 95°C — 15 с; 55°C — 60 с с учетом флуоресценции по каналу FAM при температуре 55°C во время каждого цикла.

Учет результатов реакции осуществляли с помощью программного обеспечения «Real-Time PCR» прибора «ДТ-96».

Результаты

От пациентов с ветряной оспой получили 27 клинических образцов и один образец от пациента с начальной фазой обострения рецидивирующего опоясывающего герпеса. В таблице 2 представлена информация о пациентах.

Большая часть клинических образцов изолирована от военнослужащих первого года

Таблица 1. Олигонуклеотидные праймеры и флуоресцентно-меченый гибридационный зонд для выявления ДНК VZV методом ПЦР-РВ

Table 1. Oligonucleotide primers and TaqMan probe for the detection of VZV DNA by real time PCR

| Название Name | Характеристика Characteristic | Нуклеотидная последовательность (5'→3') Nucleotide sequence (5'→3') | Мишень Target |
|------------------|---------------------------------------|--|------------------|
| VZV-29-F | Прямой/Forward | CAGGTATTTTCAGTCCTCTTCAAGTG | orf 29 |
| VZV-29-R | Обратный/Reverse | TTAGACGTGGAGTTGACATCGTT | |
| VZV-29-Z | Флуоресцентный зонд/Fluorescent probe | FAM-TACCGCCCGTGGAGCGCG-BHQ1 | |

службы, заболевших ветряной оспой в воинской части Московской области. Два клинических образца получены от детей, находившихся на лечении в детской клинике, один образец получен от школьницы 1-го класса и один образец получен от пациента с рецидивирующим опоясывающим герпесом.

Эпидемическая вспышка, возникшая в воинской части Московской области, включала 34 военнослужащих, заболевших ветряной оспой. Клинические образцы для исследования были взяты у 24 военнослужащих. Из них 79%

клинических образцов приходилось на заболевших в возрасте 19–21 год. Корочки от везикулярной сыпи были взяты от начала высыпания с 1-го по 18 сутки.

27 изолятов из 28 при первичном заражении индуцировали цитопатический эффект (ЦПД) в культуре клеток ЛЭЧ-3, а изолят под № 10 индуцировал ЦПД только на втором пассажном уровне.

При первичном заражении ЛЭЧ-3 (20–21 пассаж) на монослое вокруг корочки на вторые сутки с момента инфицирования наблю-

Таблица 2. Информация о пациентах с ветряной оспой и опоясывающим герпесом в г. Москве и в Московской области, у которых были взяты образцы корочек везикулярной сыпи

Table 2. Information about patients with chickenpox and herpes zoster from Moscow urban area and suburban region provided vesicular rash crust samples

| № пациента № patient | Дата забора образца Sample date | Возраст Age | Пол Sex | Источник получения клинического образца Source for obtaining a clinical sample | День забора образца от начала появления сыпи Sampling day of the sample from the onset of rash | ЦПД Cytopathic effect | ПЦР-РВ Real-time PCR |
|-------------------------|---------------------------------------|--|------------|--|---|-----------------------------|----------------------------|
| 1 | 12.2013 | 63 | м/м | гос.учреждение state institution | 5 | + | + |
| 2 | 11.2014 | 6 | ж/ф | школа/school | 6 | + | + |
| 3 | 02.2015 | 20 | м/м | в/ч* м/у | 7 | + | – |
| 4 | 02.2015 | 21 | м/м | в/ч м/у | 12 | + | + |
| 5 | 02.2015 | 19 | м/м | в/ч м/у | 9 | + | + |
| 6 | 02.2015 | 21 | м/м | в/ч м/у | 5 | + | + |
| 7 | 02.2015 | 24 | м/м | в/ч м/у | 12 | + | – |
| 8 | 02.2015 | 21 | м/м | в/ч м/у | 10 | + | – |
| 9 | 02.2015 | 25 | м/м | в/ч м/у | 10 | + | – |
| 10 | 02.2015 | 20 | м/м | в/ч м/у | 9 | + | н.и./i.n. |
| 11 | 02.2015 | 20 | м/м | в/ч м/у | 10 | + | + |
| 12 | 02.2015 | 20 | м/м | в/ч м/у | 8 | + | + |
| 13 | 02.2015 | 24 | м/м | в/ч м/у | 8 | + | + |
| 14 | 02.2015 | 19 | м/м | в/ч м/у | 15 | + | + |
| 15 | 02.2015 | 21 | м/м | в/ч м/у | 13 | + | + |
| 16 | 02.2015 | 20 | м/м | в/ч м/у | 18 | + | + |
| 17 | 02.2015 | 21 | м/м | в/ч м/у | 4 | + | + |
| 18 | 02.2015 | 19 | м/м | в/ч м/у | 1 | + | + |
| 19 | 02.2015 | 19 | м/м | в/ч м/у | 3 | + | + |
| 20 | 02.2015 | 20 | м/м | в/ч м/у | 3 | + | + |
| 21 | 02.2015 | 21 | м/м | в/ч м/у | 5 | + | + |
| 22 | 02.2015 | 23 | м/м | в/ч м/у | 5 | + | + |
| 23 | 02.2015 | 19 | м/м | в/ч м/у | 6 | + | + |
| 24 | 02.2015 | 21 | м/м | в/ч м/у | 6 | + | + |
| 25 | 02.2015 | 19 | м/м | в/ч м/у | 5 | + | + |
| 26 | 02.2015 | 22 | м/м | в/ч м/у | 6 | + | + |
| 27 | 03.2015 | 1 год 10 месяцев 1 year 10 months | м/м | клиника/clinic | 1 | + | + |
| 28 | 03.2015 | 16 | ж/ф | клиника/clinic | 1 | + | + |

Примечание. * — воинская часть Московской области; ** — клинический изолят вызвал ЦПД на 2-м пассажном уровне; «+» — положительная реакция; «–» — отрицательная реакция; н.и. — не исследовали.

Note. * — military unit of the Moscow region; ** — clinical isolate caused cytopathic effect at the 2nd passage level; “+” — positive reaction; “–” — (negative reaction); i.n. — information is not available.

дали ЦПД в виде округлых цитолитических клеток и частичное разряжение клеточного монослоя. На третьи сутки с момента инфицирования на клеточном монослое ЛЭЧ-3 обнаруживали увеличенное количество плавающих открепленных округлых клеток. В этот момент культуральные флаконы с инфицированными клетками двукратно замораживали на -70°C с последующим размораживанием. После осаждения инфицированных клеток путем

центрифугирования внеклеточную ВСЖ использовали для последующего пассажа в клеточной культуре при низких температурах.

Как видно из таблицы 2 корочки от ветряночной сыпи, взятые от пациентов с ветряной оспой и опоясывающим герпесом с 1 по 18 сутки с момента высыпания, вызывали на монослое клеток ЛЭЧ-3 ЦПД. Из литературных источников известно и экспериментально установлено, что вирусы у пациентов с ветряной оспой может продолжаться в течение 18 и более суток [2].

Специфичность ЦПД подтверждали в ПЦР-РВ, результаты исследования представлены в таблицах 2 и 3. Корреляция ЦПД и ПЦР-РВ исследованных клинических изолятов на втором пассажном уровне составила 81,5%.

Специфическую активность мышиных иммунных сывороток оценивали в ИФА. На рисунках 1 и 2 представлены результаты исследования.

Было установлено, что анти-VZV-специфическая мышиная сыворотка от Spf мышей линии BALB/c (рис. 1), исследованная на двух сорбентах КМ-27 и Vero CCL-81, оказалась высокоиммунной и титры сывороток колебались в пределах 1:25 000–1:50 000. При этом значения показателей ОП₄₅₀ на иммуносорбенте КМ-27 были несколько выше в отличие от аналогичных показателей на иммуносорбенте Vero CCL-81.

Одновременное исследование указанной выше анти-VZV мышшиной сыворотки на шести сорбентах: КМ-27, HeLa, Hep-2, Л-41, MeWo, Vero (Клон Е6), также показало высокую специфическую анти-VZV активность сыворотки. Из этого эксперимента следует, что все 6 исследованных клеточных линий обеспечивают высокую репродуктивную активность VZV штамма «Ellen».

На рисунке 3 представлены результаты титрования в ИФА мышиных сывороток, полученных от SpF мышей линии BALB/c, иммунизированных ВСЖ от клинического изолята VZV № 1, который прошел 8 пассажей на клетках ЛЭЧ-3 (рис. 3А), и клинического изолята VZV № 2, на 10-м пассажном уровне на клетках ЛЭЧ-3 (рис. 3Б).

Анализ результатов исследования показывает, что оба изолята вызывали высокий уровень гуморальных вирусспецифических антител на всех шести сорбентах. При этом следует отметить, что уровень антител заметно выше на сорбенте из клеток КМ-27, инфицированных штаммом «Ellen» VZV.

Известно, что альфагерпесвирусы: вирус простого герпеса 1-го типа (HSV1), вирус простого герпеса 2-го типа (HSV2) и VZV (HSV3) обладают высокой гомологией геномов [10]. Для дифференцирования различных штаммов герпесвирусов была проведена непрямая реак-

Таблица 3. Выявление ДНК VZV в клинических образцах от пациентов с ветряной оспой и опоясывающим герпесом методом ПЦР-РВ

Table 3. Detection of VZV DNA in clinical samples from patients with chickenpox and herpes zoster by real time PCR

| N | Пороговый цикл Threshold cycle | Относительное количество копий ДНК Relative number of DNA copies | Количество пассажей в клетках ЛЭЧ/MeWo The number of passages in the cells HEL/MeWo |
|-------|-----------------------------------|---|--|
| 1 | 27,7 | 63 | 6/1 |
| 2 | 24,9 | 422 | 8/1 |
| 3 | > 55 | 0 | 4/1 |
| 4 | 28,9 | 27 | 4/1 |
| 5 | 30,0 | 123 | 2/1 |
| 6 | 24,9 | 426 | 2/1 |
| 7 | > 55 | 0 | 4/1 |
| 8 | > 55 | 0 | 2/1 |
| 9 | > 55 | 0 | 2/1 |
| 11 | 26,6 | 131 | 2/1 |
| 12 | 28,9 | 24,4 | 2/1 |
| 13 | 27,3 | 102 | 2/1 |
| 14 | 35,1 | 1,8 | 2/1 |
| 15 | 33,3 | 2,4 | 2/1 |
| 16 | 37,0 | 1,2 | 2,1 |
| 17 | 30,3 | 119 | 2,1 |
| 18 | 32,6 | 2 | 2/1 |
| 19 | 32,3 | 4,6 | 2/1 |
| 20 | 30,6 | 83 | 2/1 |
| 21 | 26,6 | 130 | 2/1 |
| 22 | 30,1 | 20,7 | 2/1 |
| 23 | 26,4 | 130 | 2/1 |
| 24 | 27,2 | 94 | 2 1 |
| 25 | 33,0 | 2,8 | 2/1 |
| 26 | 28,6 | 58,5 | 2/1 |
| 27 | 33,7 | 1 | 3/1 |
| 28 | 30,6 | 84 | 2/1 |
| MeWo | >55 | 0 | |
| KB/WC | >55 | 0 | |
| PC/RM | >55 | 0 | |

Примечание. KB — контроль воды; PC — реакционная смесь.
Note. WC — water control; RM — reaction mixture.

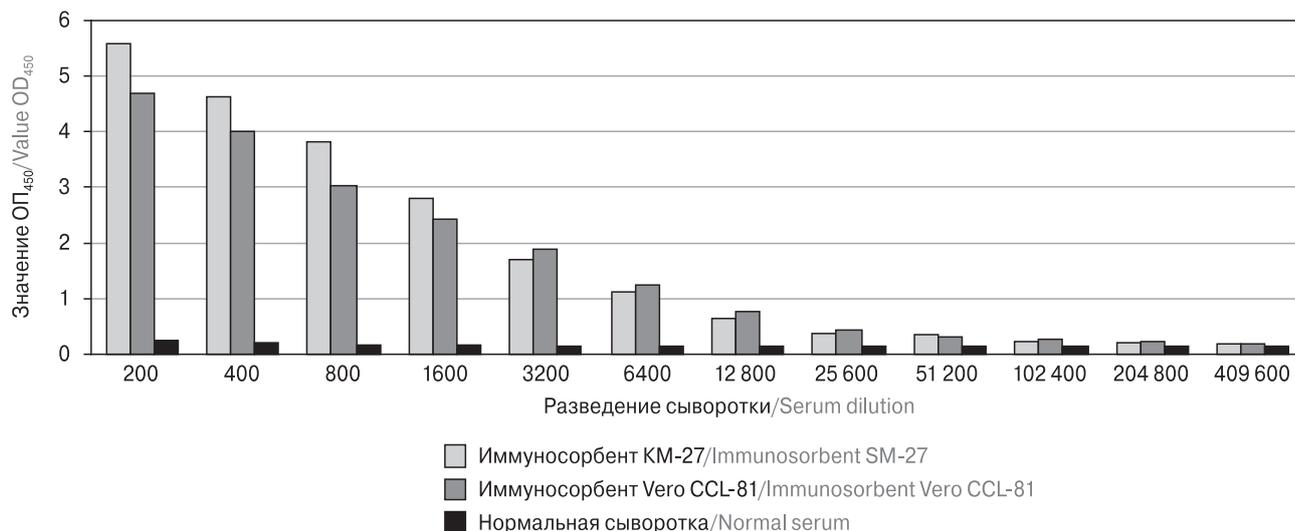


Рисунок 1. Иммуноферментный анализ: значения OP_{450} анти-VZV специфичной мышинной сыворотки (Spf), исследованной на двух сорбентах

Figure 1. ELISA: OD₄₅₀ values of anti-VZV specific mouse serum (Spf) tested on two sorbents

Примечание. Показатели оценены на фотометре Thermo Scientific Varioskan Flash.

Note. Indicators evaluated on a photometer Thermo Scientific Varioskan Flash.

ция иммунофлуоресценции, результаты которой представлены на рисунке 4.

С целью дифференцирования VZV вирусного штамма № 1 и вирусного штамма № 2 — альфагерпесвирусов типа 3 от альфагерпесвирусов типа 1 и типа 2, препараты из клеточной культуры ЛЭЧ-3, инфицированные VZV вирусным штаммом № 1 и вирусным штаммом № 2 на 12 пассажном уровне, окрасили иммунной сывороткой от переболевшего опоясывающим герпесом (рис. 4, III обложка, верхний и нижний снимки 1-го левого ряда), мышинными МКА к вирусу гер-

песа 1 типа (МКА 1Н-110) к гликопротеиду gB (рис. 4, верхние и нижние снимки среднего ряда) и МКА к вирусу герпеса 2-го типа (МКА 2Н-208) к гликопротеиду gD (рис. 4, верхний и нижний снимки правого ряда). В качестве конъюгата использовали белок А-ФИТЦ (Sigma, США).

Как видно из полученных данных, диплоидные клетки ЛЭЧ-3, инфицированные VZV вирусными штаммами № 1 и № 2, вызывают флуоресценцию только в случае окрашивания иммунной сывороткой от переболевшего опоясывающим герпесом и не вызывают флуорес-

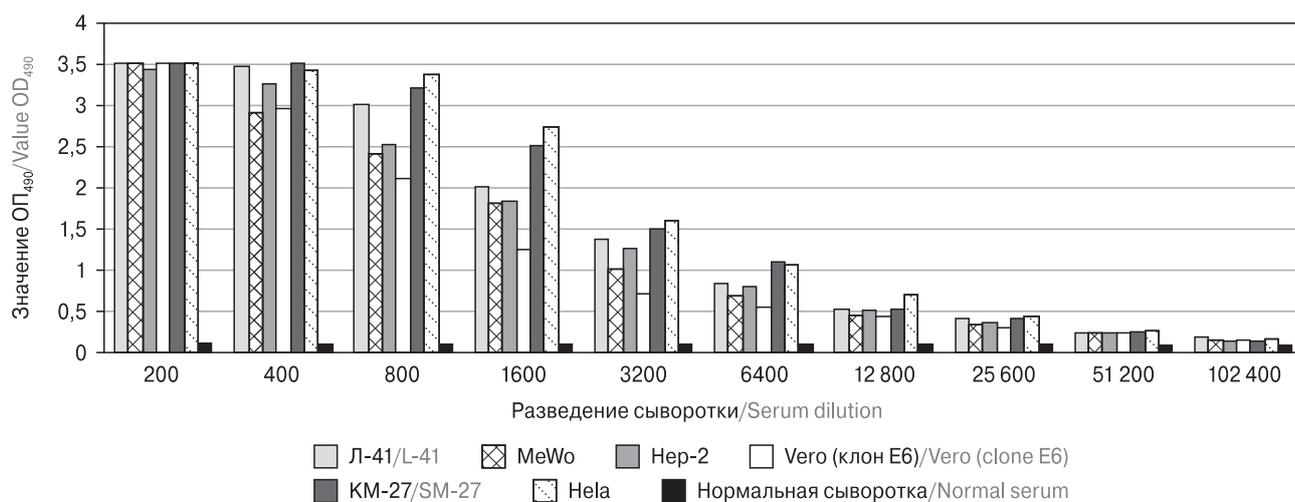


Рисунок 2. Иммуноферментный анализ: значения OP_{490} анти-VZV-специфичной мышинной сыворотки (SpF), исследованной на шести сорбентах

Figure 2. ELISA: the values of the OP_{490} anti-VZV-specific mouse serum (SpF) tested on 6 sorbents

Примечание. Показатели оценены на фотометре Bio-Rad Model 680.

Note. Indicators evaluated on a photometer Bio-Rad Model 680.

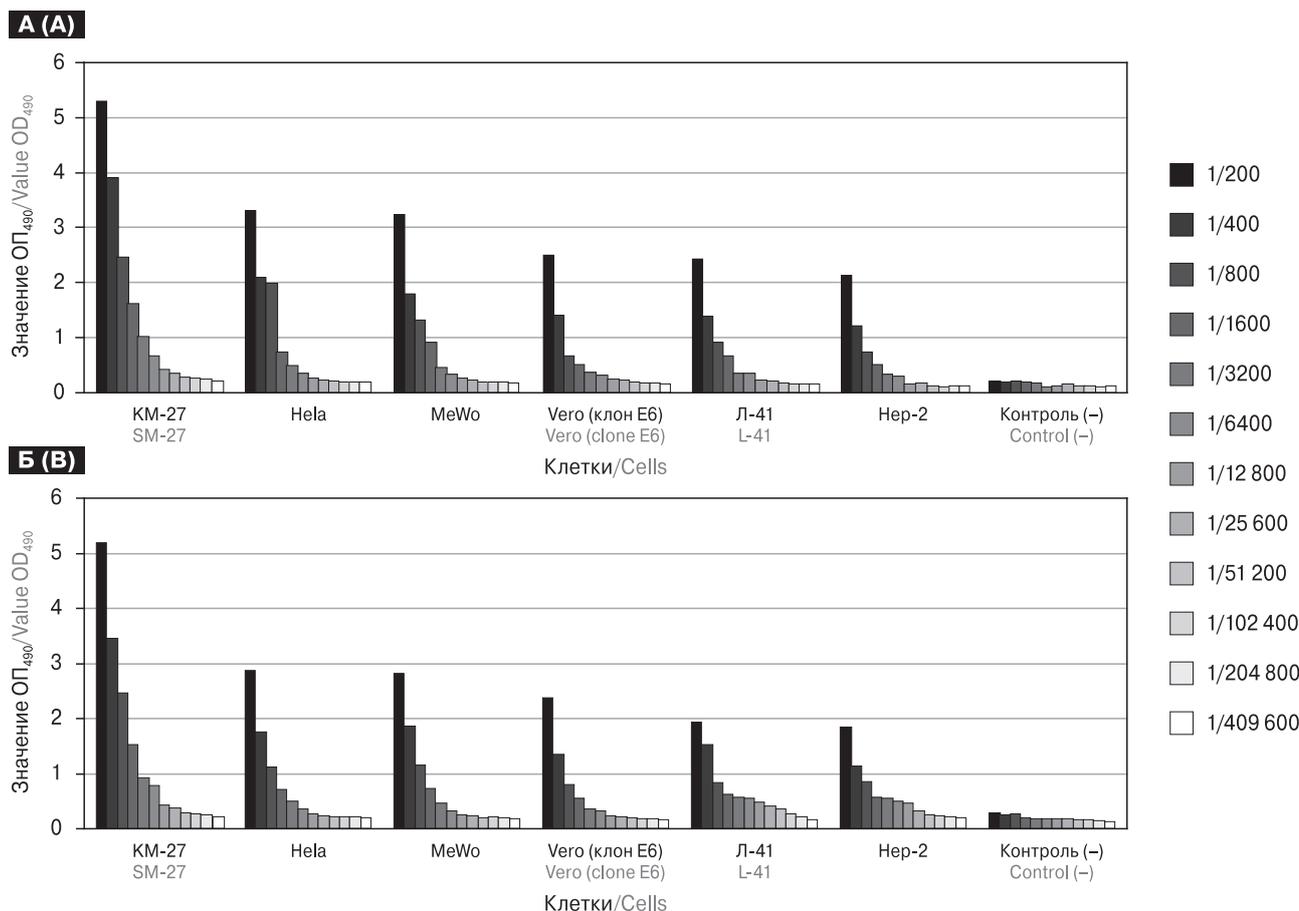


Рисунок 3. Титрование в ИФА сывороток от SpF мышей линии BALB/c, иммунизированных вирусосодержащими жидкостями от восьмого (А) и десятого (Б) пассажей на клетках ЛЭЧ-3

Figure 3. Titration in ELISA of serum from SpF of BALB/c mice, immunized with virus-containing fluids from the eighth (A) and tenth (B) passages on HEL-3 cells

ценции при окрашивании мышинными МКА к вирусу простого герпеса 1 и 2 типов, то есть мы наблюдаем отсутствие перекрестной реактивности между альфагерпесвирусами 1 и 2 типа и альфагерпесвирусом 3 типа.

Из литературы известно, что VZV в процессе репродукции тесно связывается с клеткой и, как считают исследователи, не выходит в культуральную среду. С целью опровержения этого утверждения был поставлен эксперимент по репродукции изолята VZV № 1 на диплоидных клетках ЛЭЧ-3 с ежедневным сбором культуральной среды и определением в ней инфекционного вируса в реакции гемадсорбции и непрямой иммунофлуоресценции. Культуру клеток ЛЭЧ-3 заражали с множественностью 0,02. Титрование индивидуальных вирусных сборов проводили на диплоидных клетках КМ-27. Из данных, представленных в таблице 4, становится ясно, что изолят VZV № 1 на клетках КМ-27 эффективно репродуцируется, и с первых суток с момента заражения вирус обнаруживается в культуральной среде. Ежедневный индивидуальный сбор позволял иметь ВСЖ с высокой инфекционной активностью. При этом необхо-

димо отметить, что наблюдалась прямая корреляция инфекционности в реакции гемадсорбции со взвесью эритроцитов морской свинки, с реакцией непрямой иммунофлуоресценции.

Обсуждение

В этом исследовании мы изучали характеристики клинических изолятов varicella-zoster, взятых от пациентов, заболевших ветряной оспой или опоясывающим герпесом. Были получены изоляты от 4-х категорий пациентов: 24 образца от военнослужащих 1-го года службы во время вспышки ветряной оспы в воинской части, 2 образца от пациентов, заболевших в детской клинике (внутрибольничная инфекция), один образец от здоровой школьницы шести лет, заболевшей ветряной оспой в домашних условиях и один образец от взрослого пациента 63 лет в момент реактивации рецидивирующего опоясывающего герпеса. Все 28 клинических изолятов были доставлены в лабораторию в жидком азоте в криобирках с транспортной средой и представляли собой корочки от везикулярной сыпи, взятые до 18 дня от начала сыпи (табл. 2).

Таблица 4. Инфекционная активность индивидуальных вирусных сборов в различные временные интервалы

Table 4. Infectious activity of individual viral harvests during various times

| Номер вирусного сбора Virus collection number | День после заражения Day after infection | Инфекционная активность в Ig гемадсорбирующих единиц 50/0,5 мл Infectious activity in Ig hemoadsorbition units 50/0,5 ml | Инфекционная активность в Ig нормализованных единиц иммунофлуоресценции 50/0,5 мл Infectious activity in Ig normalized immunofluorescent units 50/0,5 ml |
|--|---|---|---|
| 1 | 1 | 4,0 | 4,0 |
| 2 | 2 | 5,0 | 5,0 |
| 3 | 3 | 6,0 | 6,0 |
| 4 | 6 | 6,0 | 6,0 |
| 5 | 9 | 7,0 | 7,0 |
| 6 | 12 | 7,0 | 7,0 |
| 7 | 15 | 8,0 | 8,0 |
| 8 | 19 | 7,5 | 8,0 |
| 9 | 23 | 8,0 | 8,0 |
| 10 | 26 | 8,0 | 8,0 |
| Контроль: вакцина Varilrix Control: Varilrix vaccine | | 6,0 | |

Корочки до проведения экспериментов хранились в жидком азоте или при -70°C .

Корочки помещали на монослой диплоидных клеток ЛЭЧ-3 в ростовой питательной среде и культивировали при пониженной температуре. ЦПД вокруг корочек развивалось на клеточном монослое, начиная со вторых суток с момента инфицирования клеток. Все 28 образцов оказались положительными. Этот результат подтверждает известные данные литературы, что вирусы при ветряной оспе может продолжаться не менее чем 18 суток [2]. Кроме того, полученные результаты четко демонстрировали, что эффективным клиническим материалом для изоляции VZV являлась не только везикулярная жидкость [12, 16], но и корочки, сформированные после исчезновения жидкости из везикул.

Нами экспериментально показано, что VZV обладал широким спектром чувствительных клеток (рис. 1, 2 и 3), активно репродуцировался в них и высвобождался в культуральную среду с первых суток с момента инфицирования клеток (табл. 4).

Однако необходимо отметить, что внеклеточный вирус не выявлялся методом бляшек, и для его обнаружения мы использовали методы гемадсорбции на чувствительных клетках или реакцию непрямой иммунофлуоресценции.

С первых суток с момента заражения клеточного монослоя внеклеточный вирус обнаруживался, как в реакции гемадсорбции, так и в реакции непрямой иммунофлуоресценции, и к 5-м суткам с момента инфицирования инфекционность увеличивалась и в дальнейшем

достигала максимальных величин. При этом необходимо отметить, что явного цитопатического действия на клеточном монослое не наблюдали. Наиболее чувствительной клеточной линией для репликации VZV оказались клетки КМ-27 и MeWo. Однако неинфицированная клеточная линия MeWo обладала способностью связывать эритроциты морских свинок и человека и в связи с этим оказалась не пригодной для детекции инфекционной активности внеклеточного VZV.

В данном исследовании с помощью мышинных МКА к вирусам простого герпеса 1 и 2 типов и иммунной сыворотки от переболевшего опоясывающим герпесом в реакции непрямой иммунофлуоресценции (рис. 4) было показано отсутствие перекрестной реактивности между вышеуказанными альфа-герпесвирусами, несмотря на высокую гомологию их геномов [10].

Таким образом, нашими исследованиями мы четко продемонстрировали, что VZV и вирусы HZ обладали широким спектром клеточных культур, в которых они эффективно реплицировались. При этом нами показано, что внеклеточный VZV высвобождается в культуральную среду с первых суток с момента инфицирования. Кроме того, мы первыми предложили метод оценки инфекционной активности VZV по их гемадсорбирующей способности на клеточных культурах. Наиболее оптимальной клеточной линией для этих целей являлись клетки КМ-27 или любые клеточные линии из кожно-мышечной ткани эмбрионов человека или кожи взрослого человека.

Список литературы/References

1. Фам Х.Ф., Сидоров А.В., Милованова А.В., Антонова Т.П., Лисаков А.Н., Нагиева Ф.Г., Алаторцева Г.И., Свитич О.А., Казанова А.С., Лавров В.Ф., Зверев В.В. Новый подход к диагностике varicella-zoster-вирусной инфекции с использованием ПЦР в режиме реального времени // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2016. Т. 15, № 5. С. 52–58. [Pham H.P., Sidorov A.V., Milovanova A.V., Antonova T.P., Lisakov A.N., Nagieva F.G., Alatorceva G.I., Svitich O.A., Kasanova A.S., Lavrov V.F., Zverev V.V. New approach for diagnostics of VZV infection by using real-time PCR. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2016, vol. 15, no. 5, pp. 52–58. doi: 10.31631/2073-3046-2016-15-5-52-58 (In Russ.)]
2. Arvin A.M. Varicella-zoster virus. *Clin. Microb. Rev.*, 1996, vol. 9, no. 3, pp. 361–381.
3. Arvin A.M. Varicella vaccine: genesis, efficacy, and attenuation. *Virology*, 2001, vol. 284, no. 2, pp. 153–158. doi: 10.1006/viro.2001.0918
4. Baiker A., Fabel K., Cozzio A. Varicella-zoster virus infection of human neural cells in vivo. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2004, vol. 101, no. 29, pp. 10792–10797. doi: 10.1073/pnas.0404016101
5. Depledge D.P., Palser A.L., Watson S.J., Yi-Chun Lai I., Gray E.R., Grant P. Specific capture and whole-genome sequencing of viruses from clinical samples. *PLoS One*, 2011, vol. 6, no. 11, pp. 1–7. doi: 10.1371/journal.pone.0027805
6. Gershon A.A. Varicella-zoster vaccines and their implications for development of HSV vaccines. *Virology*, 2013, vol. 435, no. 1, pp. 29–36. doi: 10.1016/j.virol.2012.10.006
7. Gershon A.A., Sherman D.L., Zhu Z., Gabel C.A., Ambron R.T., Gershon M.D. Intracellular transport of newly synthesized varicella-zoster virus: final envelopment in the trans-Golgi network. *J. Virol*, 1994, vol. 68, no. 10, pp. 6372–6390.
8. Gershon A.A., Steinberg S.P., Gelb L. Clinical reinfection with varicella-zoster virus. *J. Infect. Dis.*, 1984, vol. 149, no. 2, pp. 137–142. doi: 10.1093/infdis/149.2.137
9. Gilden D.H. Varicella-zoster virus vasculopathy and disseminated encephalomyelitis. *J. Neurol. Sci.*, 2002, vol. 195, no. 2, pp. 99–101. doi: 10.1016/S0022-510X(02)00021-7
10. Goaster J.L., Conzalo S., Bouree P., Tangy F., Haenni A.L. Efficacy of the anti-VZV (anti-HSV3) vaccine in HSV1 and HSV2 recurrent herpes simplex disease: a prospective study. *Open Access Journal of Clinical Trials*, 2012, vol. 4, pp. 51–58. doi: 10.2147/OAJCT.S33292
11. Grose C., Ng T.I. Intracellular synthesis of varicella-zoster virus. *J. Infect. Dis.*, 1992, vol. 166, pp. 7–12. doi: 10.1093/infdis/166.supplement_1.s7
12. Habberthur K., Messaoudi I. Animal models of varicella-zoster virus infection. *Pathogens*, 2013, vol. 2, no. 2, pp. 364–382. doi: 10.3390/pathogens2020364
13. Levin M.J., Levental S., Masters H.A. Factors influencing quantitative isolation of varicella-zoster virus. *J. Clin. Microbiol.*, 1984, vol. 19, no. 6, pp. 880–883.
14. Reik L.M., Maines S.L., Levin W., Bandirra S., Thomas P.E. A simple, non-chromatographic purification procedure for monoclonal antibodies. Isolation of monoclonal antibodies against cytochrome P450 isozymes. *J. Immunol. Methods*, 1987, vol. 100, no. 1–2, pp. 123–130.
15. Rice G.P., Casali P., Oldstone M.B. A new solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay for specific antibodies to measles virus. *J. Infect. Dis.*, 1983, vol. 147, no. 6, pp. 1055–1059.
16. Sarkadi J. Varicella-zoster virus vaccine, successes and difficulties. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.*, 2013, vol. 60, no. 4, pp. 379–396. doi: 10.1556/AMicr.60.2013.4.1
17. Silver B., Hua Zhu. Varicella-zoster virus vaccines: potential complications and possible improvements. *Virologica Sinica*, 2014, vol. 29, no. 5, pp. 265–273. doi: 10.1007/s12250-014-3516-9

Авторы:

Нагиева Ф.Г., д.м.н., зав. лабораторией гибридных клеточных культур отдела вирусологии ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;
Баркова Е.П., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории гибридных клеточных культур отдела вирусологии ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;
Лисаков А.Н., научный сотрудник лаборатории гибридных клеточных культур отдела вирусологии ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;
Сидоров А.В., к.б.н., зав. лабораторией генетики ДНК-содержащих вирусов отдела вирусологии ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;
Зверев В.В., д.б.н., профессор, академик РАН, научный руководитель института ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;
Осокина О.В., к.м.н. зав. инновационным отделом ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;
Строева А.Д., младший научный сотрудник лаборатории гибридных клеточных культур отдела вирусологии ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия.

Authors:

Nagieva F.G., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head of the Laboratory of Hybrid Cell Cultures, Department of Virology, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;
Barkova E.P., PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Hybrid Cell Cultures, Department of Virology, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;
Lisakov A.N., Junior Researcher, Laboratory of Hybrid Cell Cultures, Department of Virology, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;
Sidorov A.V., PhD (Biology), Head of the Laboratory of Genetics of DNA Containing Viruses, Virology Branch, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;
Zverev V.V., PhD, MD (Biology), Professor, RAS Full Member, Scientific Director, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;
Osokina O.V., PhD (Medicine), Head of Innovative Department, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;
Stroeva A.D., Junior Researcher, Laboratory of Hybrid Cell Cultures, Department of Virology, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 30.05.2019
 Отправлена на доработку 25.11.2019
 Принята к печати 11.03.2020

Received 30.05.2019
 Revision received 25.11.2019
 Accepted 11.03.2020

Иллюстрации к статье «Практические аспекты выявления, культивирования и характеристики изолятов вируса varicella-zoster» (авторы: Ф.Г. Нагиева, Е.П. Баркова, А.Н. Лисаков, А.В. Сидоров, В.В. Зверев, О.В. Осокина, А.Д. Строева) (с. 387–396)

Illustrations for the article “Practical aspects on identification, cultivation and characteristics of varicella-zoster virus isolates” (authors: Nagieva F.G., Barkova E.P., Lisakov A.N., Sidorov A.V., Zverev V. V., Osokina O.V., Stroeveva A.D.) (pp. 387–396)

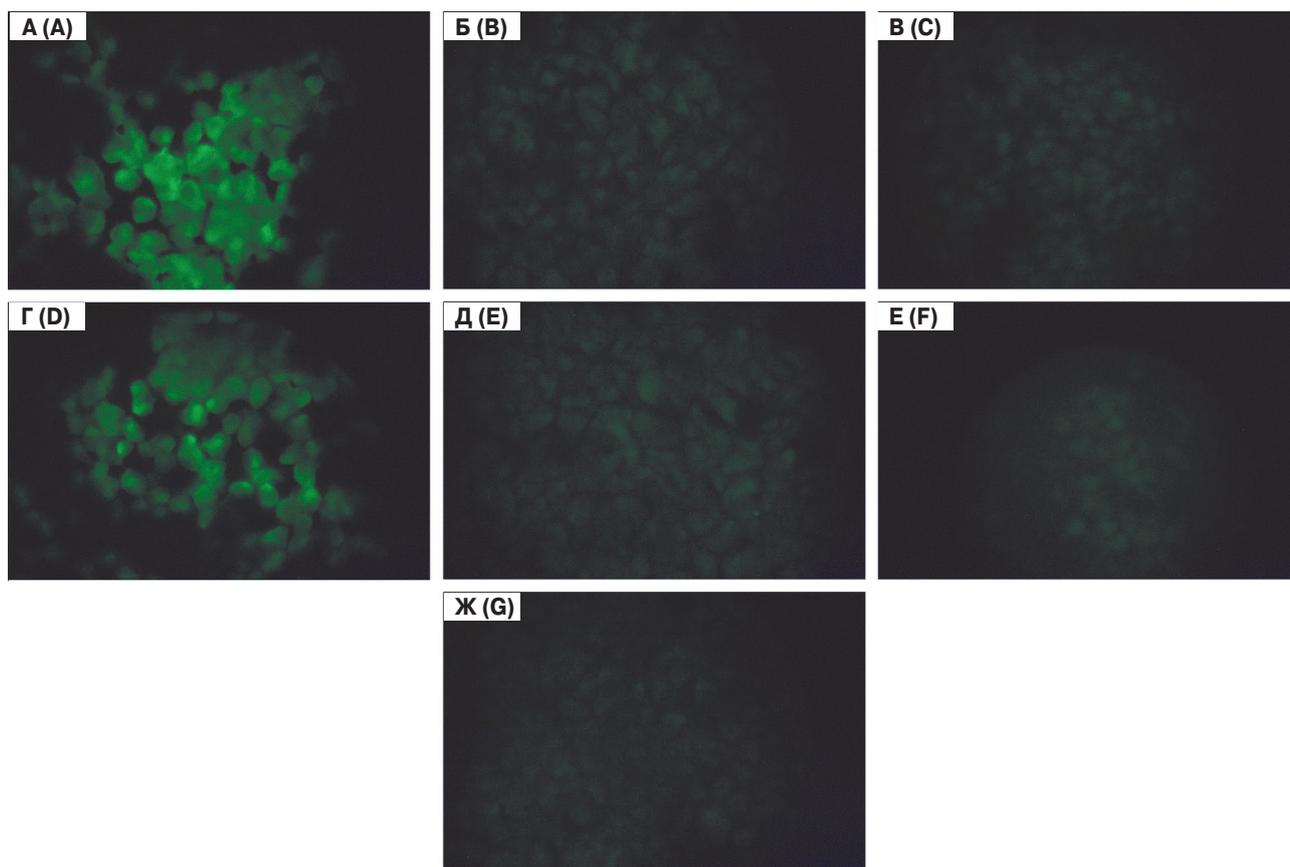


Рисунок 4. Реакция непрямой иммунофлуоресценции (×400)

Figure 4. The reaction of indirect immunofluorescence (×400)

A) VZV № 1, 12 пассаж + сыворотка пациента HZ; Б) VZV № 1, 12 пассаж + МКА HSV 1–1H 110; В) VZV № 1, 12 пассаж + МКА HSV 2 — 2H-208; Г) VZV № 2, 12 пассаж + сыворотка пациента HZ; Д) VZV № 2, 12 пассаж + МКА HSV 1–1H 110; Е) VZV № 2, 12 пассаж + МКА HSV 2 — 2H-208; Ж) Контроль, неинфицированные клетки ЛЭЧ-3.

A) VZV No. 1, 12 passage + patient serum HZ; B) VZV No. 1, 12 passage + Mab HSV 1–1H 110; C) VZV No. 1, 12 passage + Mab HSV 2 — 2H-208; D) VZV No. 2, 12 passage + patient serum HZ; E) VZV No. 2, 12 passage + Mab HSV 1–1H 110; F) VZV No. 2, 12 passage + Mab HSV 2 — 2H-208; G) Control, HEL-3.