

УДК 57.083.2; 578.832.1

Детекция и субтипология дифференциация современных вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09 и А(Н3N2) микрокультуральным иммуноферментным анализом с использованием новых моноклональных антител

© 2018 В.З. КРИВИЦКАЯ^{1,*}, А.А. СОМИНИНА^{1,2}, В.Г. МАЙОРОВА¹, Е.В. СОРОКИН¹, Т.Р. ЦАРЕВА¹, Р.А. КАДЫРОВА¹, Н.И. КОНОВАЛОВА^{1,2}, П.А. ПЕТРОВА¹, М.М. ПИСАРЕВА^{1,2}, А.В. ФАДЕЕВ^{1,2}, В.А. ЕДЕР^{1,2}, А.А. ЕГОРОВА¹, Т.Д. МУСАЕВА¹, Е.Г. РОЖКОВА¹

¹ФГБУ Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева, Минздрав России, Санкт-Петербург, 197376 Россия

²Национальный центр по гриппу ВОЗ, Санкт-Петербург, 197376 Россия

*e-mail: vera.kriv@influenza.spb.ru

Поступила 06.08.2018 г.

Принята в печать 11.09.2018 г.

Для детекции и субтипологии идентификации в клинических материалах вирусов гриппа А(Н1N1) pdm09 и А(Н3N2), циркулировавших в России в период 2014–2017 гг., предложен вариант микрокультурального иммуноферментного анализа с использованием субтипоспецифичных моноклональных антител, обладающих широким спектром реагирования в пределах субтипа. По эффективности в отношении вирусов гриппа обоих субтипов данный метод сравним с методом изоляции вирусов. Преимуществом метода является возможность выявления современных вирусов гриппа А с низкой гемагглютинирующей активностью (<8 гемагглютинирующих единиц), которые невозможно идентифицировать реакцией торможения гемагглютинации.

Ключевые слова: вирус гриппа А, клинические материалы, микрокультуральный иммуноферментный анализ, моноклональные антитела, субтипология идентификация.

doi: 10.21519/0234-2758-2018-34-5-48-56

Поскольку клинические симптомы гриппа зачастую сходны с другими респираторными заболеваниями, требуется ранняя диагностика этого заболевания для назначения этиотропной терапии и исключения антибиотиков, не эффективных при вирусных инфекциях. Данные лабораторной расшифровки природы респираторных инфекций необходимы для проведения глобального надзора за гриппом, осуществля-

емого сетью из шести сотрудничающих референс-центров ВОЗ и 152 Национальных центров в 113 странах, два из которых функционируют в России [1]. На практике быстрая расшифровка природы эпидемических вспышек позволяет определить обоснованную тактику проведения противоэпидемических мероприятий и структуру экстренных превентивных мер в очагах заболеваний.

Список сокращений: АТ – антитела; ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения; ГА – гемагглютинин; ГА1 – тяжелая субъединица молекулы гемагглютинаина вирусов гриппа; ГАЕ – гемагглютинирующая единица; ИФА – иммуноферментный анализ; КЭ – куриные эмбрионы; мк-ИФА – микрокультуральный иммуноферментный анализ; моноАТ – моноклональные антитела; НМ – нитроцеллюлозная мембрана; ОК – очищенный концентрат; ПЦР – полимеразная цепная реакция; РГА – реакция гемагглютинации; РТГА – реакция торможения гемагглютинации; ТМБ – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин; ТРСК-трипсин – трипсин, обработанный L-(tosylamido-2-phenyl) ethyl chloromethyl ketone; ФСБ – фосфатно-солевой буфер; ФСБ-М – ФСБ с добавлением обезжиренного молока; ЭФ – электрофорез; IgG – иммуноглобулин класса G; MDCK – монослойные культуры клеток; NP – нуклеопротеин вируса гриппа; ОП₄₅₀ – оптическая плотность при длине волны 450 нм.

Молекулярные методы диагностики инфекционных заболеваний, такие как ПЦР, наиболее результативны. При диагностике гриппа чувствительность и специфичность коммерческих ПЦР-наборов, достигают 90–100% [2]. Однако ПЦР – достаточно дорогостоящий метод, требующий специального оборудования и хорошо обученного персонала, что не всегда имеется на практике. Так, по результатам анализа использования панелей внешнего контроля качества лишь 78% практических лабораторий дали точное определение субтипов включенных в панель вирусов¹.

Выделение респираторных вирусов в культуре клеток принято расценивать в качестве «золотого стандарта», несмотря на несколько уступающую молекулярным методам диагностики чувствительность и продолжительность самого анализа, включающего на конечном этапе идентификацию выделенного патогена. Детекция гриппозных антигенов с помощью быстрых коммерческих иммунофлуоресцентных и иммунохроматографических тестов занимает около 20–30 мин. Однако эти тест-системы недостаточно чувствительны [3].

Наиболее простым и доступным лабораторным методом идентификации вновь выделенных вирусов гриппа остается реакция торможения гемагглютинации (РТГА) с использованием противогриппозных иммунных сывороток животных. Вместе с тем, длительная аккумуляция мутаций в молекуле гемагглютинина (ГА) вирусов, циркулирующих в человеческой популяции, затрагивает структуру рецептор-связывающего сайта молекулы ГА и приводит к снижению аффинности связывания с рецепторами эритроцитов различной видовой принадлежности, как это показано для некоторых современных вирусов А(Н1N1) и, особенно часто – для вирусов А(Н3N2) [4, 5]. В результате снижения, вплоть до полного отсутствия агглютинирующей активности вирусов, возникли трудности в идентификации некоторых современных вирусов гриппа А в РТГА.

Одним из современных методов идентификации новых патогенов является микрокультуральный ИФА (мк-ИФА), основанный на выявлении вируса в инфицированной культуре клеток. Применение на стадии детекции высокоспеци-

фичных моноклональных антител (моноАТ), взаимодействующих со строго определенными вирусными белками, значительно увеличивает возможности метода. Ранее вариант мк-ИФА с использованием моноАТ, специфичных к белку нуклеопротеина (NP-белку) вируса гриппа (NP-мк-ИФА), был рекомендован ВОЗ для определения титров нейтрализующих антител по ингибированию репродукции вируса в клеточных культурах [6, 7]. В последние годы варианты NP-мк-ИФА с успехом используют также для детекции вирусов гриппа А с низкой гемагглютинирующей активностью [8, 9].

Однако, поскольку NP-белок высоко консервативен, NP-мк-ИФА не позволяет проводить субтипирование выявленных вирусов гриппа типа А.

Цель настоящей работы – разработка чувствительного варианта мк-ИФА для выявления и субтиповой дифференциации современных вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09 и А(Н3N2) с помощью новых моноклональных антител, направленных к субтипоспецифичным сайтам в молекуле ГА указанных вирусов.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Клинические образцы

В работе использовали назофарингеальные образцы от больных гриппом из различных регионов России, полученные Национальным центром по гриппу в 2014–2017 гг. Сбор клинических образцов и выделение из них вирусов гриппа А проводили согласно Методическим рекомендациям² [10].

Выделение вирусов гриппа

Вирусы гриппа А(Н3N2) выделяли в культуре клеток MDCK или MDCK-SIAT1 (Worldwide Influenza Centre, WHO CC, Francis Crick Institute, London, UK), вирусы А(Н1N1)pdm09 – в развивающихся куриных эмбрионах (КЭ) или культуре клеток MDCK. Референс-штаммы вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 (А/Калифорния/07/2009) и А(Н3N2) (А/Техас/50/2012, А/Швейцария/971593/13, А/Гонконг/5738/14) были получены из сотрудничающих центров ВОЗ в Атланте и Лондоне. Штаммы, выделенные в России

¹Письмо Роспотребнадзора от 09.06.2017 № 01/7567-17-27 «Об итогах эпидсезона по гриппу и ОРВИ 2016–2017 гг. <http://rospotrebnadzor.ru/region/zika/events.php>».

²Утверждено руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека 18.04.2006. № 0100/4430-06-34 <http://www.alppp.ru/law/hozjajstvennaja-dejatelnost/selskoe-hozjajstvo/18/vydelenie-virusov-grip-pa-v-kletochnyh-kulturah-i-kurinyh-embriolah-i-ih-identifikacija--me.html>

в 2014–2017 гг., были взяты из Коллекции вирусов гриппа и ОРЗ ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава России.

Молекулярно-генетическая характеристика вирусов гриппа

Выделение вирусной РНК проводили с использованием набора реагентов Qiagen RNeasy mini kit (Qiagen, Германия) в соответствии с рекомендациями производителя. Специфическую амплификацию последовательностей, кодирующих поверхностные антигены исследуемых вирусов, проводили методом одноступенчатой обратной транскрипции-полимеразной цепной реакции с использованием набора реагентов Ambion AgPath-ID (ThermoFisher Scientific, США) с оригинальными праймерами. Очистку продуктов ПЦР проводили с помощью набора реагентов Qiagen QiaQuick PCR Purification kit (Qiagen). Очищенная кДНК была разведена до концентрации 5 нг/мкл, после чего использована для проведения секвенирования с набором реагентов BigDye Terminator Cycle Sequencing kit v.3.1 (Life Technologies, США). Для очистки продуктов секвенирования использовали набор XTerminator Purification kit (Life Technologies). Определение генетических последовательностей поверхностных гликопротеинов вирусов гриппа А проводили методом капиллярного секвенирования на секвенаторе Applied Biosystems GA3130 (Life Technologies). Для сборки последовательностей по результатам капиллярного секвенирования использовали программное обеспечение Vector NTI Advance. Для филогенетического анализа применяли программное обеспечение Mega6.

МоноАТ

Все использованные моноАТ были получены в НИИ гриппа по методу Кёлера и Мильштейна [11]: панели новых моноАТ к ГА вируса гриппа А(Н1N1) pdm09 (1D11, 6H11, 6A11, 7E5, 10A1, 9C3), и А(Н3N2) (1B6, 5E2, 1A3, 4E4), а также уже охарактеризованные ранее моноАТ 6D11 к NP-белку вирусов гриппа типа А. Для иммунизации мышей использовали вирусы гриппа А/Калифорния/07/2009 (Н1N1) pdm09 и А/Техас/50/2012 (Н3N2).

Анализ специфической направленности моноАТ методом вестерн-блот

Для оценки направленности моноАТ в качестве антигенов использовали очищенный концентрат (ОК) вирусов-иммуногенов. Вирусы культивировали в аллантоисной полости 11-дневных КЭ

48 ч при 37 °С. Очистку и концентрацию вирусов из аллантоисной жидкости проводили ультрацентрифугированием в 20–60% градиенте сахарозы («Химприбор», Россия). SDS-электрофорез (ЭФ) белков из вирусных ОК проводили в нередуцирующих условиях по методу Леммли [12] в 5–20%-ном градиентном полиакриламидном геле (Serva, Германия). После проведения ЭФ белки из геля переносили на нитроцеллюлозную мембрану (НМ) («Invitrogen Corporation», США). Реплику на НМ инкубировали с моноАТ (10–20 мкг/мл) в блокирующем буфере ФСБ-М (5%-ное обезжиренное молоко в 0,01 М фосфатно-солевом буфере, рН 7,2 («Биолот», Россия), а затем обрабатывали пероксидазным конъюгатом антител (АТ) к IgG мыши (Sigma, США), разведенным 1:5000 в ФСБ-М. После отмывания НМ инкубировали в 1%-ном растворе декстран-сульфата натрия (Fluka, США). После этого пероксидазную реакцию проявляли добавлением субстратной смеси, содержащей 0,1 мг/мл 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) (Sigma) и 0,02% H₂O₂ («Ленреактив», Россия) [13]. Молекулярные массы белков, с которыми взаимодействовали моноАТ, определяли по калибровочной кривой с помощью маркеров Kaleidoscope («Bio-Rad», Германия).

Реакции гемагглютинации (РГА) и торможения гемагглютинации (РТГА)

При работе с вирусами гриппа А(Н1N1) pdm09 реакции проводили общепринятым методом с куриными эритроцитами [10]. Для увеличения чувствительности методов при детекции вирусов гриппа А(Н3N2) вместо куриных использовали эритроциты человека (Rh+ группы 0).

Микрокультуральный ИФА (мк-ИФА) для субтиповой идентификации вирусов гриппа А в культуре клеток

Репродукцию вируса в клетках оценивали по содержанию внутриклеточных вирусных белков – ГА или NP-белка. Для этого в лунки 96-луночных планшетов для культивирования клеток (NUNC, Дания) с монослойными культурами клеток MDCK или MDCK-SIAT1 вносили по 100 мкл исследуемых вирусосодержащих материалов и культивировали в CO₂-термостате при 37 °С. В качестве культуральной среды использовали alpha-MEM («Биолот», Россия) с добавлением 7,5% бычьего сывороточного альбумина (фракция V) (Sigma) до конечной концентрации 0,2%; аргинина (Sigma) до конечной концентрации 0,05% и

ТРСК-трипсина (Sigma) в конечной концентрации 2 мкг/мл. Через 48–72 ч инкубации из лунок удаляли культуральную среду, клетки фиксировали 80%-ным холодным ацетоном («Химмед») в течение 20 мин. После промывания планшетов 0,01 М фосфатно-солевым буфером, pH 7,2 (ФСБ) («БиолоТ») на монослой наносили блокирующий раствор ФСБ-М и инкубировали при 37 °С в течение 1 ч с последующим внесением 100 мкл/лунку типоспецифичных моноАТ к NP-белку вирусов гриппа А, субтипоспецифичных моноАТ к ГА вирусов гриппа А(H1N1)pdm09 и А(H3N2) в концентрации 5–10 мкг/мл в ФСБ-М. После 2 ч инкубации при 37 °С и удаления несвязавшихся антител, в лунки добавляли пероксидазный конъюгат антител к IgG мыши (Sigma) в ФСБ-М (в разведении 1:5000), планшеты инкубировали в течение 1 ч при 37 °С, отмывали и добавляли раствор субстрата, содержащий 0,1 мг/мл ТМБ (Sigma) и 0,02% H₂O₂ («Ленреактив») в ацетат-цитратном буфере, pH 5,0 («Ленреактив»). После остановки реакции раствором 2N H₂SO₄ («Реактив», Россия) измеряли оптическую плотность растворов на фотометре Multiskan MS (Labsystems, Финляндия) при длине волны 450 нм (ОП₄₅₀).

Статистическая обработка результатов

Для сравнения двух выборок по частоте выявления признаков использовали точный критерий Фишера. Проверяемые критериями нулевые гипотезы отвергались при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследований для субтиповой идентификации вирусов гриппа А методом мк-ИФА были проанализированы панели моноАТ, полученные нами к вирусам гриппа А(H1N1)pdm09 и А(H3N2). Все моноАТ специфично реагировали в мк-ИФА с гомологичными референс-вирусами А/Калифорния/07/2009 или А/Техас/50/2012.

Учитывая продолжающийся антигенный дрейф возбудителей, было необходимо оценить уровень взаимодействия современных вирусов с моноАТ, полученными к ранее выделенным референс-штаммам. С этой целью из музейной коллекции вирусов гриппа и ОРЗ НИИ гриппа было получено 15 штаммов вируса гриппа А(H1N1)pdm09, а также 16 штаммов вируса гриппа А(H3N2) 2014–2017 гг. выделения, принадлежащих к различным генетическим подгруппам. Титры геммагглютинирующей активности полученных виру-

сов варьировали по данным РГА в пределах от 1/8 до 1/64. Для контроля репродукции вирусов в инфицированных клетках в мк-ИФА использовали моноАТ 6D11 к NP вируса гриппа А, эффективно реагирующие в традиционном непрямом ИФА с разными субтипами этого вируса.

Результаты взаимодействия в мк-ИФА различных моноАТ со штаммами вирусов гриппа А, циркулировавшими на территории России в 2014–2017 гг, показали, что уровень реагирования варьировал в зависимости от введенного в реакцию моноАТ. Наиболее высокие значения ОП₄₅₀ (с небольшим разбросом между отдельными штаммами) при идентификации вирусов гриппа А(H1N1)pdm09 были достигнуты с моноАТ 1D11 и 9C3, тогда как при использовании других моноАТ сигнал был в 2–5 раз ниже, хотя и превышал показатели в контрольных пробах (рис. 1).

При детекции вирусов гриппа А(H3N2) наибольшую активность проявили моноАТ 1B6,

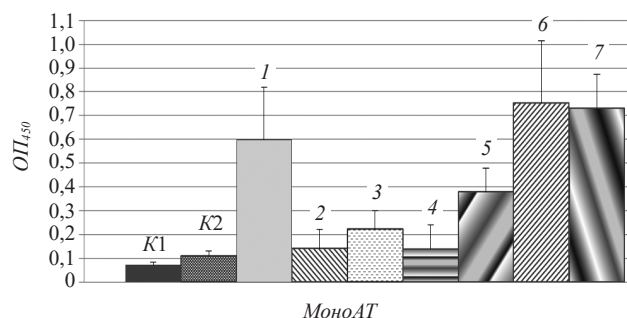


Рис. 1. Взаимодействие моноАТ к геммагглютинуину вируса А/Калифорния/07/2009 (1D11 (1), 6H11 (2), 6A11 (3), 7E5 (4), 10A1 (5), 9C3 (6)) со штаммами А(H1N1)pdm09 ($n=15$, 2014–2016 гг. выделения). K1 – средняя значений ОП₄₅₀, полученных при добавлении моноАТ к лункам с незараженной культурой клеток. K2 – средняя значений ОП₄₅₀, полученных при добавлении моноАТ к лункам с клетками, зараженными гетерологичными вирусами А(H3N2). 7 – моноАТ к NP-белку вирусов гриппа типа А. Здесь и на рис. 2 и 3 результаты представлены для рабочих концентраций моноАТ 5–10 мкг/мл.

Fig. 1. Interaction of monoAbs specific to hemagglutinin of A/California /07/2009 virus with A(H1N1)pdm09 strains ($n = 15$, isolated in 2014–2016). K1 – the average OD₄₅₀ values obtained when monoAbs were added to wells with an uninfected cell culture. K2 – the average OD₄₅₀ values obtained when monoAbs were added to wells with cells infected with heterologous viruses A(H3N2). MonoAbs to hemagglutinin of influenza A(H1N1)pdm09 virus: 1D11 (1), 6H11 (2), 6A11 (3), 7E5 (4), 10A1 (5), 9C3 (6). (7), monoAbs to NP-protein of influenza A viruses. Here and in Fig. 2 and 3 the results are presented for monoAbs working concentrations 5–10 µg/mL.

при использовании которых сигнал мк-ИФА был сопоставим с регистрируемым в позитивной контрольной пробе с NP-специфичными моноАТ 6D11 (рис. 2).

Следует отметить, что все использованные моноАТ реагировали строго специфично только с гомологичным субтипом без какой-либо кросс-реактивности с тестируемыми вирусами других субтипов.

По результатам первичного отбора наиболее перспективных моноАТ, в дальнейшем для субтиповой идентификации вирусов непосредственно из клинических материалов в мк-ИФА использовали моноАТ 9С3 и 1В6 в рабочих концентрациях 5–10 мкг/мл. Для контроля репродукции тестируемых вирусов одновременно использовали моноАТ 6D11 к NP-белку вирусов гриппа типа А.

Отобранные моноАТ были охарактеризованы методом вестерн-блот и РТГА с использованием референс-вирусов А/Калифорния/07/2009 (штамм А(Н1N1)pdm09) и А/Техас/50/2012 (штамм А(Н3N2)). Все они взаимодействовали в иммуноблоттинге с молекулой ГА1. МоноАТ 1В6 и 9С3 показали в РТГА высокую (до концентраций 0,3–1,0 мкг/мл) субтипоспецифичную антигемагглютинирующую активность с вирусами-иммуногенами. МоноАТ 6D11 к вирусному NP-белку, как и следовало ожидать, в РТГА не реагировали.

Для оценки результатов мк-ИФА с вновь выделенными штаммами были установлены пороговые значения $ОП_{450}$ для клинических проб, положительных по содержанию антигенов анализируемого вируса гриппа. С этой целью для каждого вируса были определены параметры отрицательных контролей ($Котр.$) по результатам оценки 15 проб, содержащих вирусы гетерологичного субтипа. В данном исследовании использовали уже выделенные и охарактеризованные штаммы. Средние значения $ОП_{450}$ и стандартное отклонение для ряда отрицательных проб ($Котр. \pm SD$) составили $0,076 \pm 0,016$ и $0,085 \pm 0,015$ для вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09 и А(Н3N2), соответственно. Исходя из этого были приняты пороговые значения для положительных проб, равные двукратному превышению показателя $ОП_{450}$ $Котр.$, что составило 0,160–0,170. Для определения ошибки метода мк-ИФА был определен разброс значений $ОП_{450}$ в лунках с параллельными повторами проб, заведомо содержащих вирус. Величина разброса не превышала 25%.

Молекулярно-генетический анализ по генам ГА и нейраминидазы вирусов гриппа А подтипа (Н1N1)pdm09, циркулировавших в России

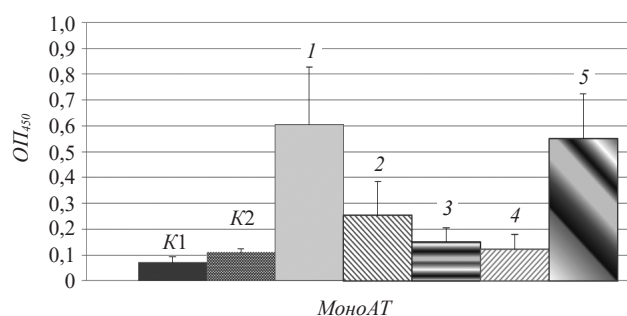


Рис. 2. Взаимодействие моноАТ к гемагглютинирующему вирусу А/Техас/50/2012 (1В6 (1), 5Е2 (2), 1А3 (3), 4Е4 (4)) со штаммами А(Н3N2) ($n=16$, 2014–2017 гг. выделения). К1 – средняя значений $ОП_{450}$, полученных при добавлении моноАТ к лункам с незараженной культурой клеток; К2 – средняя значений $ОП_{450}$, полученных при добавлении моноАТ к лункам с клетками, зараженными гетерологичными вирусами А(Н1N1)pdm09; 5 – моноАТ к NP-белку вирусов гриппа типа А.

Fig. 2. Interaction of monoAbs to hemagglutinin of influenza A/Texas/50/2012 virus with A(H3N2) strains ($n = 16$, isolated in 2014–2017). K1 – the average OD_{450} values obtained when monoAbs were added to wells with an uninfected cell culture; K2 – the average values of OD_{450} obtained by addition of monoAbs to wells with cells infected with heterologous viruses A(H1N1)pdm09. MonoAbs to hemagglutinin of influenza A(H3N2) virus: 1B6 (1), 5E2 (2), 1A3 (3), 4E4 (4). (5), monoAbs to NP-protein of influenza A viruses.

в 2014–2016 гг., показал, что все проанализированные вирусы были подобны референс-штамму А/Калифорния/07/09, относились к филогенетической группе 6В.1 (подобны штамму А/Южная Африка/3626/2013). В отличие от вирусов А(Н1N1)pdm09, характеризующихся медленным антигенным дрейфом с накоплением точечных мутаций в генах, вирусы А(Н3N2) отличались разнообразием генетических и антигенных свойств, что определило формирование ряда кластеров. Во время эпидемического сезона 2014–2015 гг. циркулировали вирусы гриппа А(Н3N2) двух генетических подгрупп: вирусы, подобные штамму А/Швейцария/971593/2013 (генетическая подгруппа 3С.3а) и доминирующая подгруппа 3С.2а (родственные штамму А/Гонконг/4801/2014). По результатам РТГА с использованием штаммо-специфичных иммунных сывороток животных, вирусы, относящиеся к этим подгруппам, существенно отличались по антигенным свойствам от своего предшественника – вируса гриппа А/Техас/50/2012 (генетическая группа 3С). Все вирусы гриппа А(Н3N2) эпидемического сезона 2015–2016 гг. принадлежали к генетической

подгруппе 3С.2а. В 2016–2017 гг. в России циркулировали вирусы гриппа А(Н3N2), относящиеся к подгруппам 3С.2а и 3С.2а1¹⁻³.

Результаты, представленные на рис. 1, свидетельствуют о том, что параллельное применение моноАТ к NP и ГА вируса обеспечивало возможности, соответственно, детекции и четкого субтипирования (с моноАТ 9С3) вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09, циркулировавших в сезоны 2014–2015 и 2015–2016 гг.

С учетом широкой антигенной изменчивости современных вирусов А(Н3N2), циркулировавших в последние годы в Европе и других странах мира, включая Россию, при оценке возможностей мк-ИФА особое внимание было уделено детекции вирусов разных субкладов (3С.2а, 3С.2а1, 3С.3а).

На рис. 3 показаны результаты детекции методом мк-ИФА с использованием моноАТ 1В6 вирусов гриппа А 2014–2017 гг. выделения, принадлежащих к субкладам 3С.2а, 3С.2а1 (референс-штамм А/Гонконг/4801/2014) и 3С.3а (референс-штамм А/Швейцария/9715293/2013).

В мк-ИФА были проанализированы, главным образом, штаммы, уже охарактеризованные секвенированием и РТГА после проведения 2-3 пассажей в культуре клеток MDCK или КЭ (только для А(Н1N1)). Несколько вирусов, отнесенных в последствии по результатам ПЦР к субкладам 3С.2а или 3С.2а1, были выявлены в мк-ИФА непосредственно при использовании для заражения клеток исходных клинических материалов.

В целом, полученные результаты свидетельствуют о том, что мк-ИФА на основе NP-специфичных моноАТ 6D11 может быть применен для детекции, а на основе моноАТ 9С3 и 1В6 к вирусным ГА – для субтиповой идентификации современных вирусов гриппа А, в том числе непосредственно из клинических материалов. Главным условием успешной постановки мк-ИФА является наличие живого вируса в образце и чувствительной к вирусу клеточной линии MDCK.

В настоящее время наблюдаются определенные трудности с выделением и идентификацией традиционными методами циркулирующих вирусов гриппа А, особенно А(Н3N2), что объясняется изменени-

ем их рецепторных свойств и утратой способности размножаться в КЭ. Кроме того, многие штаммы А(Н3N2) субкладов 3С.2а и 3С.3а слабо репродуцируются и в культуре клеток MDCK, традиционно используемой для выделения вирусов гриппа. Такие вирусы более эффективно выделяют в генно-модифицированной культуре клеток MDCK-SIAT1, экспрессирующей повышенное количество рецепторов α -2,6, свойственных клеткам человека [5].

Накопление мутаций в рецептор-связывающем сайте молекулы ГА привело к снижению аффинности связывания ряда современных вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09 и особенно А(Н3N2) (субклады 3С.2а и в меньшей степени 3С.3а) с рецепторами эритроцитов различной видовой принадлежности, что затрудняет или делает невозможной их идентификацию в РТГА [4, 5, 9]. В связи с этим для антигенной характеристики вируса гриппа А с низкой гемагглютинирующей активностью вместо РТГА используют реакцию микронеутрализации с применением иммунных противогриппозных штамм-специфичных сывороток [5, 14].

В табл. 1 приведены сравнительные результаты детекции вирусов гриппа с помощью мк-ИФА и традиционным методом выделения вирусов, а также результаты мк-ИФА и РТГА субтиповой идентификации вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09 и А(Н3N2) непосредственно из клинических образцов.

Частота детекции вирусов гриппа была сравнима при мк-ИФА и изоляции вирусов ($p > 0,05$). При этом оба метода выявляли вирусы гриппа А(Н3N2) менее эффективно, чем вирусы А(Н1N1)pdm09.

Следует отметить, что для метода выделения вирусов в табл. 1 приведены окончательные результаты, независимо от числа проведенных пассажей. Что касается вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09, то все 40 изолированных штаммов были выделены из клинических проб уже на первом пассаже в культуре клеток или КЭ. Для вирусов А(Н3N2) наблюдалась другая картина – из 51 изолированного штамма 13 были выделены только на втором пассаже (через 10–12 сут). При этом метод мк-ИФА вообще не предполагает повторного культивирования. Таким образом, сравнение методов при равных условиях (без повторного

¹Report prepared for the WHO annual consultation on the composition of influenza vaccine for the Northern Hemisphere 2017–2018. 27th February–01st March 2017. Worldwide Influenza Centre WHO CC for Reference & Research on Influenza. The Francis Crick Institute. London. https://www.crick.ac.uk/media/358671/crick_nh_vcm_report_feb_2017_v2.pdf

²Flu News Europe: Weekly influenza updates. <https://ecdc.europa.eu/en/seasonal-influenza/surveillance-and-disease-data/influenza-virus-characterisation>

³Официальный сайт Национального Центра по гриппу ВОЗ ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России. http://www.influenza.spb.ru/system/epidemic_situation/laboratory_diagnostics

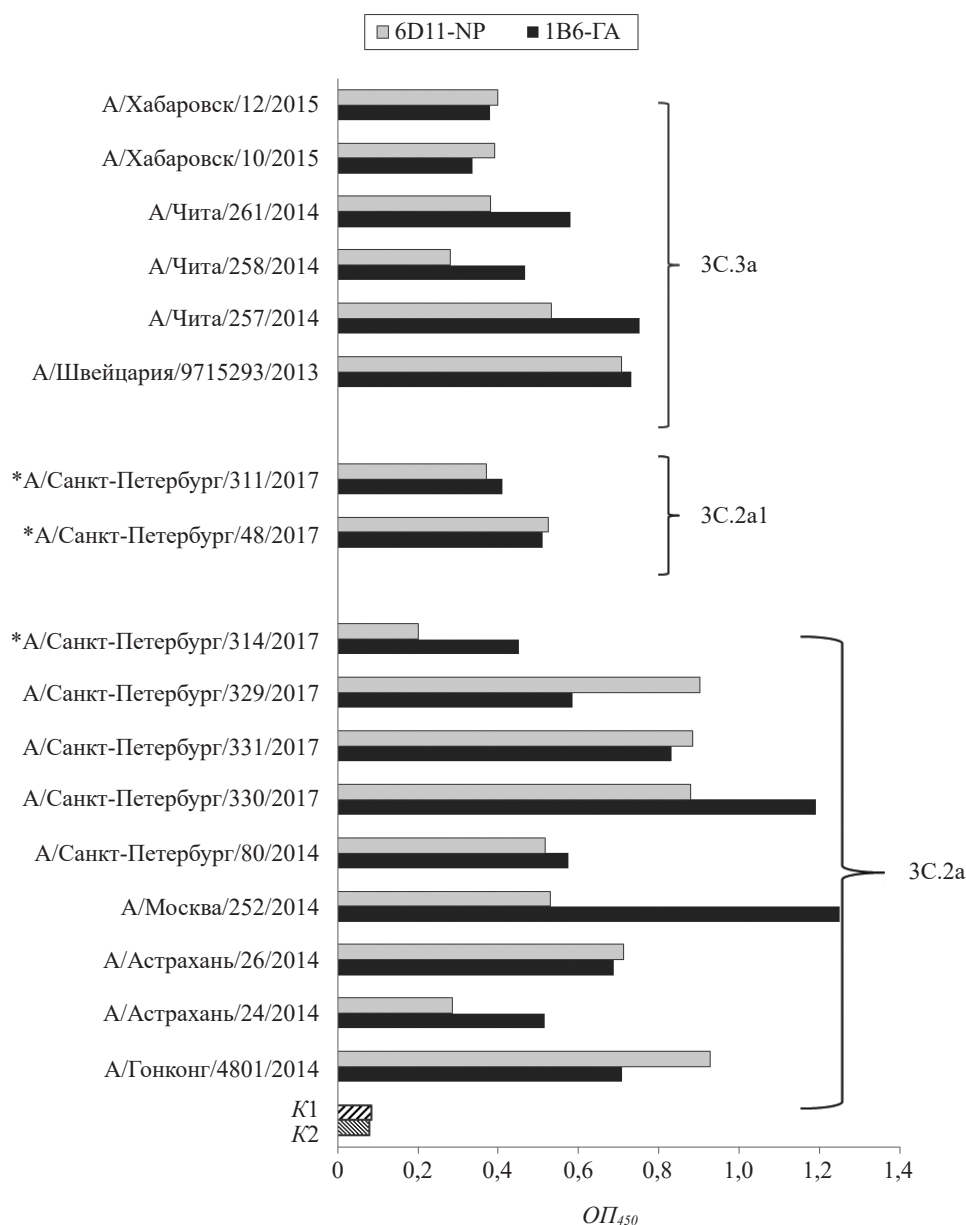


Рис. 3. Взаимодействие субтипоспецифичных моноАТ 1В6, полученных к ГА вируса гриппа А(Н3N2), с современными штаммами вируса гриппа А(Н3N2) различных субкладов (6D11 – контроль репродукции вирусов по взаимодействию с NP-специфичными моноАТ). K2 – средняя значений ОП₄₅₀, полученных при добавлении моноАТ к лункам с клетками, зараженными гетерологичным вирусом А/Калифорния/07/2009 (А(Н1N1)pdm09). Остальные обозначения как на рис. 1. *Вирусы были выявлены в мк-ИФА непосредственно при использовании для заражения клеток исходных клинических материалов

Fig. 3. Interaction of subtype-specific monoAbs 1B6 obtained to hemagglutinin of influenza A (H3N2) virus with modern influenza A(H3N2) viruses of various subclades (6D11, control of virus reproduction by interaction with NP-specific monoAbs). K2 is the average of OD₄₅₀ values obtained when monoAbs were added to wells with cells infected with heterologous virus A/California/07/2009 (A(H1N1)pdm09). Other notations as in Fig. 1.

*Viruses were detected in μ -ELISA directly when used to infect cells with the original clinical materials

пассажа) выявляет более низкую чувствительность метода выделения вирусов А(Н3N2), до 43,7% (38/87).

Метод мк-ИФА с использованием субтипоспецифичных моноАТ позволил не только детектировать вирусы гриппа, но одновременно определять также их субтип. Для идентификации вы-

деленных вирусов гриппа в РТГА необходимо их присутствие в культуральной среде или аллантоисной жидкости в дозе не ниже 8 гемагглютинирующих единиц (ГАЕ). Однако значительная часть (63–84%) выделенных вирусов (25/40 среди изолятов А(Н1N1)pdm09 и 43/51 среди вирусов А(Н3N2)) обладала низкой гемагглютинирующей

Результаты сравнительного анализа детекции и субтиповой идентификации вирусов гриппа А в клинических материалах**The results of a comparative analysis of detection and subtype identification of influenza A viruses in clinical samples**

Субтип вируса гриппа А	Частота детекции вирусных антигенов		Частота субтиповой идентификации вирусов гриппа	
	Выделение вирусов	мк-ИФА	РТГА	мк-ИФА
A(H1N1)pdm09	97,5% (40/41)	85,4% (35/41)	39,0%* (16/41)	85,4%* (35/41)
A(H3N2)	58,6% (51/87)	58,6% (51/87)	50,6% (44/87)	58,6% (51/87)

Примечание: Все проанализированные пробы были предварительно отобраны как положительные по данным ПЦР. В скобках – число выделенных штаммов / число исследованных образцов * $p < 0,0001$

Note: All analyzed samples were previously selected as PCR- positive. In parentheses – the number of isolated strains / number of samples examined.

активностью (1–4 ГАЕ), что исключало возможность идентификации таких штаммов в РТГА. При этом 56–80% вирусов, для которых после выделения были показаны низкие титры в РГА, были детектированы и субтипированы при постановке мк-ИФА уже через 48–72 ч после заражения клеток клиническими образцами (20/25 для изолятов A(H1N1)pdm09 и 24/43 для A(H3N2)).

Таким образом, предложенный вариант мк-ИФА позволяет эффективно выявлять и идентифицировать вирусы A(H1N1)pdm09 и A(H3N2), циркулировавшие в России в период 2014–2017 гг. Большим преимуществом предложенного варианта мк-ИФА является возможность выявления современных вирусов гриппа А с низкой гемагглютинирующей активностью, которые невозможно идентифицировать в РТГА.

ЛИТЕРАТУРА

- Соминина А.А., Грудинин М.П., Еропкин М.Ю. и др. Развитие надзора за гриппом в России в системе Национального центра ВОЗ по гриппу. *Вопр. вирусологии*. 2012, 6, 17–21.
- Goldenberg S.D., Edgeworth J.D. The Enigma ML Flu-AB-RSV assay: a fully automated molecular test for the rapid detection of influenza A, B and respiratory syncytial viruses in respiratory specimens. *Expert. Rev. Mol. Diagn.*, 2015, 15, 23–32. doi: 10.1586/14737159.2015.983477.
- Ryu S.W., Lee J.H., Kim J., et al. Comparison of two new generation influenza rapid diagnostic tests with instrument-based digital readout systems for influenza virus detection. *Br. J. Biomed. Sci.*, 2016, 73(3), 115–120. doi: 10.1080/09674845.2016.1189026
- Obuchi M., Yokoyama M., Horimoto E., et al. Low hemagglutinin-titer strains of pandemic influenza A(H1N1)2009 virus circulated in Toyama Prefecture, Japan, during the 2009–2011 influenza seasons. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 2011, 64(5), 448–450. PMID:21937833
- Lin Y., Wharton S.A., Whittaker L., et al. The characteristics and antigenic properties of recently emerged subclade 3C.3a and 3C.2a human influenza A(H3N2) viruses passaged in MDCK cells. *Influenza Other Respir. Viruses*, 2017, 11(3), 263–274. doi: 10.1111/irv.12447
- Rowe T., Abernathy R.A., Hu-Primmer J. et al. Detection of antibody to avian influenza A (H5N1) virus in human serum by using a combination of serologic assays. *J. Clin. Microbiol.*, 1999, 37, 937–943. PMID: 10074505
- WHO. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. WHO Press, Geneva, Switzerland. – 2011. http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241548090_eng.pdf
- van Baalen C.A., Els C., Sprong L., et al. Detection of nonhemagglutinating influenza A(H3) viruses by enzyme-linked immunosorbent assay in quantitative influenza virus culture. *J. Clin. Microbiol.*, 2014, 52(5), 1672–1677. doi: 10.1128/JCM.03575-13
- van Baalen C.A., Jeeninga R.E., Penders G.H., et al. ViroSpot microneutralization assay for antigenic characterization of human influenza viruses. *Vaccine*, 2017, 35(1), 46–52. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.11.060.
- Соминина А.А. Выделение вирусов гриппа в клеточных культурах и куриных эмбрионах и их идентификация. Методические рекомендации. С.-Петербург, 2006.
- Kohler G., Milstein C. Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur. J. Immunol.* 1976, 6, 511–519. doi: 10.1002/eji.1830060713
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature*, 1970, 227 (5259), 680–685. PMID: 5432063

13. McKimm-Breschkm J.L. The use of tetramethylbenzidine for solid phase immunoassays. *J. Immunol.Methods*, 1990, 135(1), 277–280. PMID: 2273262
14. Lin Y, Gu Y, Wharton SA, et al. Optimization of a micro-neutralisation assay and its application in antigenic characterisation of influenza viruses. *Influenza Other Respir. Viruses*, 2015, 9(6), 331–340. doi: 10.1111/irv.12333.

Detection and Subtype Differentiation of Current Flu Viruses (H1N1)pdm09 and A(H3N2) by Microculture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using New Monoclonal Antibodies

V.Z. KRIVITSKAYA^{1,*}, A.A. SOMININA^{1,2}, V.G. MAYOROVA¹, E.V. SOROKIN¹, T.R. TSAREVA¹, R.A. KADYROVA¹, N.I. KONOVALOVA^{1,2}, P.A. PETROVA¹, M.M. PISAREVA^{1,2}, A.V. FADEEV^{1,2}, V.A. EDER^{1,2}, A.A. EGOROVA¹, T.D. MUSAEVA¹, and E.G. ROZHKOVA¹

¹Smorodintsev Research Institute of Influenza, Ministry of Health of the Russian Federation, 197376, St.-Petersburg Russia

²WHO National Influenza Centre of Russia, 197376, St.-Petersburg Russia

*e-mail: vera.kriv@influenza.spb.ru

Received August 6, 2018

Accepted September 11, 2018

Abstract—A variant of the microculture enzyme-linked immunosorbent assay using subtype-specific monoclonal antibodies with wide range of responses within the subtype has been suggested for the detection and subtype identification of the A(H1N1)pdm09 and A(H3N2) flu viruses circulating in Russia in 2014–2017. The efficiency of the method was shown to be comparable with that of the method of virus isolation in respect of both viruses. The capacity of detecting the current viruses of the A type with a low hemagglutinating activity (less than 8 hemagglutinating units) which are impossible to identify in the hemagglutination inhibition test is an advantage of the suggested method.

Key words: influenza A viruses, clinical materials, microculture enzyme-linked immunosorbent assay, monoclonal antibodies, subtype identification.

doi: 10.21519/0234-2758-2018-34-5-48-56