

БИОЛОГИЯ

МРНТИ 34.25.37

*Н.Г. Кливлеева¹, Т.И. Глебова¹, М.Г. Шаменова¹,
С.Б. Байсейіт¹, Г.В. Лукманова¹, Н.Т. Сактаганов¹,
М.Қ. Қалқожаева¹, Б.Б. Баймаханова¹*

¹Институт микробиологии и вирусологии, г. Алматы, Казахстан

НОВЫЙ ШТАММ ВИРУСА ГРИППА H1N1 A/Алматы/856/12, ИСПОЛЬЗУЕМЫЙ ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Аннотация. Приведены результаты изучения биологических и антигенных свойств нового штамма вируса гриппа H1N1 A/Алматы/856/12, отличающегося от эталонных и ранее выделенных вариантов этого подтипа. Результаты изучения биологических и антигенных свойств нового штамма вируса гриппа A/Алматы/856/12 (H1N1), указывают на возможность использования его в качестве диагностикума с целью выявления специфических антител в сыворотках крови больных людей, инфицированных современным вариантом вируса гриппа А подтипа H1, а также для проведения фундаментальных молекулярно-биологических исследований.

Ключевые слова: вирус гриппа, циркуляция, изолят, гемагглютинин, нейраминидаза, сыворотка иммунная, диагностикум.

• • •

Түйіндеме. Эталонды және алдыңғы белініп алынған тұмау вирустарынан ерекшеленетін A/Алматы/856/12 H1N1 жаңа тұмау вирусының биологиялық және молекулярлы-генетикалық құрамының зерттеу нәтижелері керсетілген. Жаңадан белініп алынған A/Алматы/856/12 (H1N1) тұмау вирусының биологиялық, антигендік және молекулярлы-генетикалық құрамының зерттеу нәтижелері, H1 түрінің А тұмау вирусын жұқтырған науқас адамдардың қан сарысуындағы спецификалық антиденелерін анықтау мақсатында диагностикум ретінде қолдануға, сондай-ақ іргелі молекулярлы-биологиялық зерттеулер жүргізу үшін қолдануға болатындығын керсетеді.

Түйінді сөздер: тұмау вирусы, айналым, изолят, гемагглютинин, нейраминидаза, иммунды қан сарысуы, диагностикум.

Abstract. The results of studying biological and molecular genetic properties of a new influenza virus H1N1 A/Almaty/856/12 strain differing from the reference and previously identified variants of this subtype are presented. Studies on biological, antigenic and molecular genetic properties of a new influenza virus A/Almaty/856/12 (H1N1) strain indicate the possibility of using it as a diagnosticum for the purpose of identifying specific antibodies in the sera of patients infected with a modern variant of influenza A virus subtype H1 as well as for carrying out fundamental molecular biological studies.

Keywords: influenza virus, circulation, isolate, hemagglutinin, neuraminidase, immune serum, diagnosticum.

Введение. Вирусы гриппа принадлежат к семейству Orthomyxoviridae, включающему 5 родов: вирусы гриппа А, В, С, Thogotovirus и Isavirus. К настоящему времени известны 18 разновидностей гемагглютинина (HA) и 11 нейраминидазы (NA), на основе которых классифицируются различные антигенные подтипы вирусов гриппа А [1, 2]. Вирусы гриппа А изолированы от широкого круга хозяев, включая более 100 видов птиц, из млекопитающих к нему восприимчивы человек и домашние животные (свиньи, лошади, кошки), а также грызуны, норки, тигры, тюлени, китообразные [3].

Известен эталонный вирус гриппа A/H1N1 A/New Jersey/18/76, циркулировавший среди новобранцев в Форт-Диксе в 1976 г. (шт. Нью Джерси, США), но не проявивший эпидемической активности [4]. Также известны референсные штаммы классического гриппа свиней A/Swine/Iowa/15/30 и A/swine/USA/1976/31.

Впервые заражение человека «свиным» гриппом было выявлено за три года до изоляции вируса [5]. Начиная с 1970 г. единичные случаи заражения людей вирусами гриппа свиней описывались неоднократно. За последние 35 лет в мире было выявлено 50 случаев инфекции людей вирусами гриппа свиней. Следует отметить, что в 11 случаях люди были инфицированы тройными реассортантами вирусов гриппа свиней H1N1 [6].

В марте 1982 г. от двух заболевших подростков в сельской местности Болгарии, имевших контакт как между собой, так и с животными на приусадебных участках, были выделены вирусы гриппа А с HA

Источник финансирования исследований: РГП на ПХВ «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, г. Алматы, ул. Богенбай батыра, 103.

Hsw1 [7]. В 1986 г. в Китае наблюдалась эпидемия гриппа A/H1N1 [8]. Вирусы H1N1 «swine-like» привели к сезонному подъему заболеваемости гриппом людей в Алма-Ате (Казахстан) в 1984 г. [9]. В 1988 г. в США выявлен вирус свиного гриппа A/H1N1 у ранее здоровой беременной женщины, которая вскоре умерла [10, 11]. Имеются сведения о спорадических случаях выделения классического вируса гриппа свиней от больных людей, не имевших контакт со свиньями в Швейцарии и Нидерландах [12].

В марте 2009 г. около г. Мехико возникла эпизоотия гриппа свиней, от которых был выделен вирус гриппа A/H1N1. Этот вирус оказался способным инфицировать людей и передаваться от зараженных лиц контактным путем и распространился в США, Канаду, а затем и в другие страны всех континентов. В России эпидемия захватила 49 городов и закончилась в конце января 2010 г. [13]. В это же время на территории Казахстана от больных людей были выделены свиные вирусы гриппа A/H1N1 [14]. Молекулярно-генетический анализ последовательностей нуклеотидов HA и NA показал, что идентичность выделенных изолятов со штаммом A/Калифорния/04/09 (H1N1)v составила 99,2-99,4%. В последние годы от людей выделяли как штаммы классического вируса гриппа свиней, так и тройные реассортанты этого вируса [15].

В 2012 г. из биологических проб, собранных в лечебных учреждениях г. Алматы, выделен штамм вируса гриппа A/H1N1. Изоляция вируса гриппа A/Алматы/856/12 (H1N1), по антигенной характеристике родственного с эталонами A/swine/USA/1976/31 и A/New Jersey/8/76 свидетельствует о потенциальной возможности циркуляции в РК эпидемически значимого свиного варианта вируса гриппа [16].

В настоящем сообщении приводятся результаты изучения биологических и антигенных свойств нового штамма вируса гриппа A/Алматы/856/12 (H1N1), позволяющего использовать его в качестве диагностикума при выявлении специфических антител в сыворотках крови больных людей, инфицированных современными вариантами вируса гриппа А подтипа H1, а также для проведения фундаментальных молекулярно-биологических исследований.

Методы исследования. Для вирусологических исследований сбор клинических образцов (назофарингеальные смывы) от больных осуществляли в поликлиниках и инфекционных больницах в эпиде-

мический период 2012 г. Пробы до вирусологических исследований хранили в жидком азоте (-196°C).

Первичный скрининг носоглоточных смывов в полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (РТ-ПЦР) осуществляли на амплификаторе RotorGen 6000 (CorbettResearch, Австралия) с применением наборов «РИБО – преп», «АмплиСенс® Influenzavirus A/B-FL» и «АмплиСенс® Influenzavirus A-тип -FL» (производства ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, г. Москва, РФ) [9].

Изоляцию и восстановительные пассажи вирусов проводили в двух системах традиционными методами: на 9-11-дневных куриных эмбрионах (КЭ) и культуре клеток MDCK с добавлением ТРСК - трипсина (2 мкг/мл). Для индикации вируса в реакции гемагглютинации (РГА) использовали 0,75% взвесь эритроцитов петуха и человека 0(1) группы крови.

Инфекционную активность изолятов определяли по общепринятому методу [10] и их титр выражали в Ig ЭИД₅₀/0.2мл и IgТЦИД₅₀/0.2мл.

Идентификацию изолятов проводили в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) и реакции ингибиции нейраминидазной активности (РИНА) с наборами поликлональных диагностических сывороток согласно рекомендации ВОЗ [11, 12].

Вирусосодержащую аллантаоисную жидкость осветляли центрифугированием при 5000 об/мин. в течение 10 мин. при 4°C. Затем вирус концентрировали путем центрифугирования при 29 000 об./мин. в течение 180 мин. при 4°C на центрифуге Beckman Coulter Optima Tm L-90K Ultracentrifuge. Полученный осадок вируса ресуспендировали в минимальном объеме буфера, после чего определяли гемагглютинирующую активность.

Изучение антигенных взаимосвязей проводили в перекрестной реакции торможения гемагглютинации (РТГА) по методике рекомендованной ВОЗ [17] с иммунными сыворотками, полученными путем 2-х кратной иммунизации кроликов очищенными и концентрированными вирусными материалами [18].

Результаты и обсуждение. При вирусологическом исследовании биологических проб, собранных в поликлиниках и инфекционных больницах г.Алматы в 2012 г., изолирован гемагглютинирующий агент.

Первичный скрининг изолята в РТ-ПЦР позволил отнести его к вирусу гриппа А/Н1N1. В результате первичного заражения КЭ и культуры клеток MDCK и проведения последующих пассажей выделен изолят А/Алматы/856/12.

Вирус идентифицирован в РТГА и РИНА с использованием набора диагностических сывороток.

Результаты идентификации в РТГА представлены в таблице 1. Как видно из таблицы гемагглютинирующая активность изолята от 1:160 до 1:320 подавлялась иммунными сыворотками A/Solomon Islands/03/06 и A/California/04/09 pdm с антигенной формулой А/Н1N1, что позволило отнести его к вирусу гриппа А с подтипом НА Н1.

Таблица 1 - Идентификация подтипа гемагглютинина казахстанского изолята вируса гриппа А/Алматы/856/12

Иммунная сыворотка к референсному штамму	Гомологичный титр	Титр антител к изоляту А/Алматы/856/12
A/Solomon Islands/03/06 (H1N1)	640	160
A/California/04/09 pdm (H1N1)	640	160
A/Wisconsin/67/05 (H3N2)	640	<20
B/Florida/07/04	640	<20

Примечание - даны обратные величины титров специфических антигемагглютининов

В РИНА ферментативная активность изолята подавлялась иммунной сывороткой к нейраминидазе N1. Полученные результаты позволили идентифицировать казахстанский изолят А/Алматы/856/12 как вирус гриппа А с антигенной формулой Н1N1 (таблица 2).

Таблица 2 - Идентификация подтипа нейраминидазы казахстанского изолята вируса гриппа А/Алматы/856/12

Титр антител к подтипу нейраминидазы	Изолят А/Атырау/874/12
N1	100
N2	<20

Примечание - даны обратные величины титров специфических антинейраминидазных антител

Биологические свойства. Штамм А/Алматы/856/12 (H1N1) активно репродуцируется в системе куриного эмбриона и культуре клеток

MDCK при оптимальной (37°C) температуре. На куриных эмбрионах инфекционный титр составил 6,45 lg ЭИД₅₀/0,2 мл, титр гемагглютинации - 1:1024. На культуре клеток MDCK эти показатели составили 4,5 lg БОЕ/мл и 1:32. Исследуемый штамм активно агглютинирует эритроциты курицы, морской свинки, барана, лошади, крупного рогатого скота и человека. Предлагаемый штамм обладает термостабильным НА, поскольку сохранял способность вызывать агглютинацию эритроцитов курицы после прогревания при 56°C в течение 120 мин.

Штамм А/Алматы/856/12 (H1N1) оказался резистентным к неспецифическим ингибиторам нативных и прогретых (62°C - 30 мин., 100°C - 10 мин.) сывороток морской свинки и кролика. По скорости элюции с нативных куриных эритроцитов исследуемый штамм относится к быстроэлюирующему варианту, так как полностью элюировал через 30 мин. инкубации при 37°C.

К выделенному штамму А/Алматы/856/12 (H1N1) получена кроличья иммунная сыворотка с титром в РТГА 1:640.

Антигенные взаимосвязи. В таблице 3 представлены результаты анализа антигенной структуры казахстанского изолята и эталонных штаммов вируса гриппа в перекрестной РТГА. Как видно из таблицы 3, вирус А/Алматы/856/12 взаимодействовал с антисыворотками к эталонам А/Swine/Iowa/15/30 (Hsw1N1), А/swine/USA/1976/31 (Hsw1N1) и А/New Jersey/8/76 (H1N1) в титрах 1:320 (1/2 гомологичного титра). С иммунными сыворотками А/H1N1 (А/Solomon Islands/03/06 и А/California/04/09 pdm) - в более низких титрах 1:160 (1/4 гомологичного титра).

Референсные вирусы А(H1N1): А/Solomon Islands/03/06, А/California/04/09 pdm и А/Swine/Iowa/15/30 ингибировались сывороткой к казахстанскому изоляту от 1/4 до 1/2 гомологичного титра (1:160-1:320), тогда как штаммы А/swine/USA/1976/31 (Hsw1N1) и А/New Jersey/8/76 (H1N1) подавлялись сывороткой к вирусу А/Алматы/856/12 (H1N1) в гомологичных титрах (1:640). Установлено, что прямые титры изолята существенно не отличались от обратных и составляли 1/4 - 1/2 гомологичного титра, тогда как обратные для штаммов А/swine/USA/1976/31 (Hsw1N1) и А/New Jersey/8/76 (H1N1) соответствовали гомологичному титру, для А/Swine/Iowa/15/30, А/Solomon Islands/03/06 и А/California/04/09 pdm - от 1/4 до 1/2 гомологичного титра.

Таблица 3 – Результаты перекрестной РТГА казахстанского штамма вируса гриппа А/Алматы/856/12

Штамм	Иммунная сыворотка					
	A/A Алматы/856/12	A/Solomon Islands/03/06	A/Swine/Iowa/15/30	A/swine/USA/1976/31 (Hsw1N1)	A/New Jersey/8/76 (H1N1)	A/California/04/09 pdm (H1N1)
A/Алматы/856/12	640	160	320	320	320	160
A/Solomon Islands/03/06	160	640				
A/Swine/Iowa/15/30	320		640			
A/swine/USA/1976/31 (Hsw1N1)	640			640		
A/New Jersey/8/76 (H1N1)	640				640	
A/California/04/09 pdm (H1N1)	160					640

Примечание - приведены обратные величины титров антигемагглютининов

Таким образом результаты анализа антигенной структуры казахстанского штамма А/Алматы/856/12 (H1N1) в РТГА указывают на его близкое родство с «swine-like» вариантом вируса гриппа человека A/New Jersey/8/76 (H1N1), а также с классическими вирусами гриппа свиней A/swine/Iowa/15/30 и A/swine/USA/1976/31.

Молекулярно-биологические свойства указывают на то, что вирус А/Алматы/856/12 (H1N1) отличается от эталонного штамма вируса гриппа А подтипа H1N1 A/California/04/09 pdm и является природным, эпидемическим «swine-like» вариантом вируса гриппа А (H1N1).

Приготовленные на его основе диагностические препараты могут быть использованы в вирусологических лабораториях при расшифровке этиологии эпидемических вспышек гриппа.

Выводы.

1. При вирусологическом исследовании биологических проб, собранных в поликлиниках и инфекционных больницах г. Алматы в 2012 г., выделен гемагглютинирующий агент, который в РТ-ПЦР, РТГА и РИНА идентифицирован как вируса гриппа А/Алматы/856/12 (H1N1).

2. Вирус обладает термостабильным НА, относится к быстроэлюирующему варианту, агглютинирует эритроциты курицы, морской

свинки, барана, лошади, крупного рогатого скота, человека и проявляет резистентность к неспецифическим ингибиторам нативных и прогретых сывороток морской свинки и кролика.

3. Изоляция вируса гриппа А/Алматы/856/12 (H1N1), по антигенной характеристике родственного с эталонами A/swine/USA/1976/31 и A/New Jersey/8/76, свидетельствует о потенциальной возможности циркуляции в РК эпидемически значимого свиного варианта вируса гриппа.

Новый штамм депонирован в коллекции микроорганизмов «РГП НИИ проблем биологической безопасности» КН МОН РК (депозит М-19-15/Д от 24.08.2015).

Список литературы

1 Webster R.G., Bean W.J., Gorman O.T. et al. Evolution and ecology of influenza A viruses //Microbiol. Rev.- 1992.- Vol. 56. - P. 152-179.

2 Fouchier R.M., Munster V., Wallensten A. et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls //J Virol.- 2005.- Vol. 79, №5.- P. 2814-2822.

3 Lvov D.K. //Sov. Med. Rev. E. Virol. Rev. 1987.- V.2.- P.15-37.

4 Shortridge K.F., Webster R.G. //Intervirol. 1979.- Vol. 11. - P. 9.

5 Shope R. Swine influenza. III Filtration experiments and etiology. J. Exp. Med. 1931, 54: 373-380.

6 Shinde V., Bridges C., Uyeki T. et al. Triple-reassortant swine influenza A(H1) in humans in the United States, 2005-2009. New Engl.J.Med.2009, 360:2616-2625.

7 Львов Д.К., Николаева В., Коцева Р. И. Информация о штаммах, родственных А/Нью Джерси/8/76, изолированных от людей в 1982 г. // Регионный центр по гриппу за IV квартал 1982 г. Обзор., М. 1982. - С. 21-23.

8 Киселев О.И. Пути эволюции вирусов гриппа типа А: роль белка NS-1 в патогенности //Грипп и гриппоподобные инфекции, включая особо опасные формы гриппозной инфекции. Фундаментальные и прикладные аспекты изучения. Бюллетень проблемной комиссии. С-Пб., 2008. - С.49-63.

9 Чувакова З.К., Ровнова З.И., Исаева Е.И. и др. Три случая изоляции вируса гриппа А с гемагглютинином Hsw1 от людей в 1983 г. в Алма-Ате // Вопр. Вирусол., 1985.- № 5.- С. 530-536.

10 Свиной грипп. Обзор // Ветеринария. 2009.- № 5(9). -12с.

11 *Икранбегийн Р.* Обзор информации по молекулярной эпидемиологии вируса гриппа свиней H1N1 «swine-like» //Вестник НАН РК. 2004.- № 4.- С. 152-159.

12 *Jong J.C., Pascaud M.H., Ronde-Veploop J.M et.al.* "Isolation of swine – like influenza A(H1N1) viruses from man in Switzerland and Netherlands. Ann. Inst. Pasteur Virol. 1988.- V.139.- № 4. - P. 429-437.

13 *Карпова Л.С., Маринич И.Г., Поповцева Н.М., Столярова Т.П.* Эпидемиология гриппа А(H1N1) Калифорния/07/09 среди населения 49 городов России в сезон 2009-2010 гг. //Журн. Микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2011. - № 3.- С.14-20.

14 *Икранбегийн Р., Кузнецова Т.В., Грудинин М.П. и др.* молекулярно-генетические свойства пандемического вируса H1N1v, циркулировавшего на территории Казахстана (2009-2010) //Вестник НГУ. Т.10(3). 2012. - С. 80-86.

15 *Гендон Ю.З.* Пандемия гриппа: предположения и факты. Журн.микробиол.2008.- 5:109-118.

16 *Ишмухаметова Н.Г., Глебова Т.И., Кузнецова Т.В., Шаменова М.Г., Дуйсенова К.В.* Циркуляция вирусов гриппа в Казахстане в эпидемические сезоны 2009 – 2013 гг. //Мат-лы науч.-практич. конференции «Профилактическая медицина: вчера, сегодня, завтра». – Омск: - 2013. - С. 57-59.

17 WHO Manual for on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance, Geneva, 2002. -105 p.

18 *Саятов М.Х., Асанова С.Е., Бейсембаева Р.У., Каральник Б.В.* Антительные эритроцитарные диагностикумы для определения типовой и подтиповой принадлежности вирусов гриппа // Вопр. Вирусол. 1985.- №1. - С. 39-43.