

*Т.И. Глебова¹, Н.Г. Кливлеева¹, Н.С. Онгарбаева¹, С.Б. Байсейім¹,
Н.Т. Сактаганов¹, Г.В. Лукманова¹, М.Г. Шаменова¹,
М.Қ. Қалқожаева¹, А.М. Баймухаметова¹*

¹Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии,
г. Алматы, Казахстан

НОВЫЙ ШТАММ ВИРУСА ГРИППА H1N1 A/свинья/Костанай/06/12, ИСПОЛЬЗУЕМЫЙ ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Аннотация. Приведены результаты изучения биологических и антигенных свойств нового штамма вируса гриппа H1N1 A/свинья/Костанай/06/12, отличающегося от эталонных вариантов этого подтипа. Результаты изучения биологических и антигенных свойств нового штамма вируса гриппа A/свинья/Костанай/06/12 (H1N1), указывают на возможность использования его в качестве диагностикума с целью выявления специфических антител в сыворотках крови свиней, 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 нұсқаулардан ерекше, жаңадан белініп алынған А/шошқа/Қостанай/06/12 H1N1 тұмау вирус штамының биологиялық және антигендік құрамының зерттеу нәтижелері керсетілген. Жаңадан белініп алынған А/шошқа/Қостанай/06/12 тұмау вирусы штамының биологиялық және антигендік құрамын зерттеу нәтижелері, шошқалардың қан сарысуынан жаңа А тұмау вирусының H1 түрінің спецификалық антиденелерін анықтау мақсатында диагностикум ретінде пайдалануға болатындығын керсетеді, сонымен қоса іргелі молекулярлы-биологиялық зерттеулерде пайдаланылады.

Түйінді сөздер: тұмау вирусы, циркуляция, изолят, гемагглютинин, нейраминидаза, иммунды қансарысуы, диагностикум.

• • •

Abstract. The results of studying biological and molecular genetic properties of a new influenza virus H1N1 A/swine/Kostanay/06/12 strain differing from the reference variants of this subtype are presented. Studies on biological and antigenic properties of a new influenza virus A/swine/Kostanay/06/12 (H1N1) strain

Источник финансирования: Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии, г. Алматы, ул. Богенбай батыра, 105..

indicate the possibility of using it as a diagnosticum for the purpose of identifying specific antibodies in the sera of swine 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 типа А являются уникальными среди возбудителей инфекционных заболеваний, как людей, так и целого ряда млекопитающих (лошадей, свиней, китов, тюленей и т.д.) и птиц [1,2], характеризуются высокой антигенной гетерогенностью поверхностных белков. В настоящее время известно 18 подтипов гемагглютинина (HA) и 11 подтипов нейраминидазы (NA) вирусов гриппа А, циркулирующих среди позвоночных [3]. Водоплавающие птицы являются резервуаром вирусов гриппа А с подтипами HA H1-H16 и NA N1-N9, что объясняет роль птиц в эволюции вирусов гриппа. Генетический материал подтипов H17N10 и H18N11 обнаружен только у летучих мышей [4]. Среди других животных циркулируют лишь вирусы с определенным набором поверхностных белков.

В настоящий момент у свиней выделяют семь основных подтипов вируса гриппа А: H1N1, H1N2, H3N2, H3N1, H4N6, H5N1 и H9N2. Однако генетический анализ вирусов, изолированных от них, показал присутствие трех основных серотипов: классического свиного (H1N1), птичьего (H1N1), человеческого (H3N2), а также реассортантов, появившихся в процессе совместной циркуляции вирусов в организме свиней.

Имеется множество доказательств того, что все подтипы вирусов, изолированные от людей, могут персистировать среди свиней. Способность данных вирусов к активной репродукции в организме свиней определяет значение этого вида животных в качестве промежуточного звена между популяциями птиц и людей. Возникающий при этом инфекционный процесс у свиней сопровождается заметной патологией, и его можно зарегистрировать по факту накопления антител [5].

Известны референсные варианты вируса гриппа свиней A/swine/Iowa/15/30 (H1N1) и A/swine/USA/1976/31, которые циркулировали среди поросят с признаками поражения респираторных органов [6, 7]. В 1949 г. T. Francis et. al. [8] от больных свиней в Корее выделили штамм «Отти» по антигенным характеристикам идентичный вирусу A/FM/1/47 (H1N1). Вирусы с аналогичной формулой поверхностных антигенов затем изолированы в Румынии, Венгрии и СССР.

Установлено, что вирусы гриппа птиц и человека, преодолевая межвидовой барьер, попадают в организм свиней, который является неким резервуаром, смешивающим вирусы гриппа, что приводит к появлению новых реассортантных вирусов [9]. Так в 1979 г. в Северной Европе от больных свиней был выделен вирус гриппа А (H1N1), HA который по антигенным и генетическим характеристикам родственен с HA птичьего вируса [10]. Новые свиные вирусы смогли вновь преодолеть межвидовой барьер и вызвать эпизоотию среди индюшек, не претерпев никаких генетических изменений. Штаммы характеризовались крайней нестабильностью, высокой изменчивостью и, соответственно, высокой скоростью эволюции, что, вероятно, объясняет, почему 100 лет назад птичий вирус, преодолев межвидовой барьер, основал стабильную линию классического свиного вируса в США [11].

В Италии от свиней выделен тройной реассортант, содержащий гены вируса гриппа свиней, птиц и человека [12]. В США в 1998 г., также был выделен вирус гриппа свиней, являвшийся тройным реассортантом, содержащий в своем геноме гены, кодирующие белки M, NS и NP от классического вируса гриппа свиней, гены PA и PB1 – от вируса гриппа человека [13]. HA многих реассортантов, выделенных от здоровых и больных свиней, проявлял близкое родство с HA вирусов гриппа человека. Так, например, у свиней в Корее обнаружен вирус гриппа, HA который по антигенной специфичности сходен с HA вируса гриппа человека H1 [14]. В Литве от больных свиней выделен штамм вируса гриппа, HA который походил на таковой штамма вируса гриппа человека из группы A/WS/33/H1N1, т.е. с первыми штаммами вируса гриппа человека [15]. От свиней в Италии были выделены вирусы гриппа A/H1N1, HA которые были также сходны с человеческими вариантами вирусов A/H1 [16]. Вирусы гриппа свиней, изолированные в 1992 г. в Японии, имели HA и NA, близкородственные с таковыми вирусами гриппа человека A/H1N1 [17]. В Англии от свиней был выделен вирус гриппа A/H1N7 [18].

В результате вирусологического обследования поросят с клиническими признаками респираторных заболеваний в свиноводческих хозяйствах Восточного Казахстана в 1984 г. изолировано три штамма вируса гриппа A/H1N1 [19]. По характеру взаимодействия с набором моноклональных антител и иммунологическим свойствам казахстанские изоляты проявляли сходство с вирусом гриппа человека A/Англия/333/80 (H1N1).

В 2012 г. из биологических проб, собранных от свиней в крестьянском хозяйстве Костанайской области, выделен штамм вируса гриппа

A/H1N1. Изоляция вируса гриппа A/свинья/Костанай/06/12 (H1N1), по антигенной характеристике родственного с эталонными вариантами A/H1N1: A/swine/lowa/15/30 и A/swine/USA/1976/31, а также с «swine-like» вариантом вируса гриппа человека A/New Jersey/8/76 свидетельствует о потенциальной возможности циркуляции в РК эпизоотологически значимого варианта вируса гриппа [20].

В данной работе приводятся результаты изучения биологических и антигенных свойств нового штамма вируса гриппа A/свинья/Костанай/06/12 (H1N1), позволяющего использовать его в качестве диагностикума при выявлении специфических антител в сыворотках крови свиней, инфицированных современными вариантами вируса гриппа А подтипа H1, а также для проведения фундаментальных молекулярно-биологических исследований.

Методы исследования. Носоглоточные смывы от животных собирали во флаконы с 2 мл среды 199 с 0,5% бычьим сывороточным альбумином и комплексом антибиотиков (пенициллин 50 000 ед/мл, стрептомицин 50 мг/мл, гентамицин 3000 мг/мл, нистатин 5000 ед/мл). Пробы выдерживали в течение суток при 4°C и хранили в жидком азоте (-196°C).

Полимеразную цепную реакцию в режиме реального времени (РТ-ПЦР) осуществляли на амплификаторе RoterGen 6000 (Corbett Research, Австралия) с применением наборов «РИБО - преб», «Амплиценс® Influenzavirus A/B-FL» и «Амплиценс® Influenzavirus A-типа FL» (г. Москва) [21]. Изоляцию вирусов проводили в двух системах традиционными методами: на культуре клеток MDCK с добавлением ТРСК-трипсина (2 мг/мл) и 9-11 дневных куриных эмбрионах. Для индикации вируса в реакции гемагглютинации использовали 0,75% взвесь эритроцитов петуха и человека 0 (1) группы крови. Инфекционную активность изолятов определяли по общепринятому методу [22] и их титр выражали в Ig ЭИД50/0.2 мл.

Идентификацию вирусов проводили в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) и реакции ингибиции нейраминидазной активности (РИНА) с наборами поликлональных диагностических сывороток, согласно рекомендациям ВОЗ [23, 24].

Вирусосодержащую аллантаоисную жидкость осветляли центрифугированием при 5000 об/мин. в течение 10 мин. при 4°C. Затем вирус концентрировали 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 [25] с иммунными сыворотками, полученными путем 2-х кратной иммунизации кроликов очищенными и концентрированными вирусными материалами [26].

Результаты и обсуждение. При вирусологическом исследовании биологических проб, собранных от свиней в крестьянском хозяйстве Костанайской области 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/свинья/Костанай/06/12. Идентификацию вируса проводили в РТГА и РИНА с использованием наборов диагностических сывороток.

Результаты идентификации в РТГА представлены в таблице 1. Как видно из таблицы гемагглютинирующая активность изолята в титре 1:320 подавлялась иммунными сыворотками А/swine/lowa/15/30 и А/swine/USA/1976/31 с антигенной формулой А/Hsw1N1, что позволило отнести его к вирусу гриппа А с подтипом НА Н1.

Таблица 1 - Идентификация подтипа гемагглютинаина казахстанского изолята вируса гриппа А/свинья/Костанай/06/12

Иммунная сыворотка к референсному штамму	Гомологичный титр	Титр антител к изоляту А/свинья/Костанай/06/12
А/swine/lowa/15/30 (Hsw1N1)	640	320
А/swine/USA/1976/31 (Hsw1N1)	640	320
А/Wisconsin/67/05 (H3N2)	320	<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/свинья/Костанай/06/12 как вирус гриппа А с антигенной формулой Н1N1 (таблица 2).

Таблица 2 - Идентификация подтипа нейраминидазы казахстанского изолята вируса гриппа А/свинья/Костанай/06/12

Титр антител к подтипу нейраминидазы:	Изолят А/свинья/Костанай/06/12
N1	100
N2	<20

Примечание: даны обратные величины титров специфических антинейраминидазных антител

Биологические свойства. Штамм А/свинья/Костанай/06/12 (H1N1) активно репродуцируется в системе куриного эмбриона и культуре клеток МДСК при оптимальной (37°C) температуре. На куриных эмбрионах инфекционный титр составил 4,67 lg ЭИД_{50/0,2 мл}, титр гемагглютинации - 1:128. На культуре клеток МДСК эти показатели составили 3,23 lg ТЦИД_{50/0,2 мл} и 1:16. 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/свинья/Костанай/06/12 (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/свинья/Костанай/06/12 (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/свинья/Костанай/06/12 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 иммунной сывороткой А/California/04/09 pdm (H1N1) – в более низких титрах 1:160 (1/4 гомологичного титра).

Референсный вирус А/Swine/Iowa/15/30 (H1N1) ингибировался сывороткой к казахстанскому изоляту в 1/2 гомологичного титра (1:320), тогда как эталонные штаммы А/New Jersey/8/76 (H1N1) и А/swine/USA/1976/31 (Hsw1N1) подавлялись сывороткой к вирусу А/свинья/Костанай/06/12 (H1N1) в гомологичных титрах (1:640), пандемический вирус А/California/04/09 pdm - в 1/4 гомологичного титра (1:160). Установлено, что прямые титры казахстанского изолята А/свинья/Костанай/06/12 существенно не отличались от обратных и составляли 1/4 - 1/2 гомологичного титра, тогда как обратные для референсных штаммов А/swine/USA/1976/31 (Hsw1N1) и А/New Jersey/8/76 (H1N1) соответствовали гомологичному титру, для

вирусов A/California/04/09 pdm и A/Swine/Iowa/15/30 – от 1/4 до 1/2 гомологичного титра.

Таблица 3 – Результаты перекрестной РТГА казахстанского штамма вируса гриппа А/свинья/Костанай/06/12

Штамм	Иммунная сыворотка				
	06/12	A/Swine/Iowa/15/30	A/swine/USA/1976/31 (Hsw1N1)	A/New Jersey/8/76 (H1N1)	A/California/04/09 pdm (H1N1)
A/свинья/Костанай/06/12	640	320	320	320	160
A/Swine/Iowa/15/30 (Hsw1N1)	320	640	640	320	40
A/swine/USA/1976/31 (Hsw1N1)	640	320	640	640	80
A/New Jersey/8/76 (H1N1)	640	160	640	640	40
A/California/04/09 pdm (H1N1)	160	80	80	40	640

Примечание - приведены обратные величины титров антигемагглютининов

Таким образом, результаты изучения антигенных взаимосвязей указывают на близкое родство штамма A/Костанай/06/12 (H1N1) с классическими вирусами гриппа свиней A/swine/Iowa/15/30 и A/swine/USA/1976/31, а также с «swine-like» вариантом вируса гриппа человека A/New Jersey/8/76 (H1N1).

Молекулярно-биологические свойства указывают на то, что вирус A/Костанай/06/12 (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. При вирусологическом исследовании биологических проб, собранных от свиней в крестьянском хозяйстве Костанайской области в 2012 г., выделен гемагглютинирующий агент, который в РТ-ПЦР, РТГА и РИНА идентифицирован как вируса гриппа A/Костанай/06/12 (H1N1).

Вирус обладает термостабильным НА, относится к быстроэлюирующему варианту, агглютинирует эритроциты человека и различных видов животных и проявляет резистентность к неспецифическим ингибиторам нативных и прогретых сывороток морской свинки и циплика.

Изоляция вируса гриппа А/Костанай/06/12 (H1N1), по антигенной характеристике родственного с эталонами A/swine/Iowa/15/30 и A/swine/USA/1976/31, 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-20-15/Д от 24.08.2015г.)

Список литературы

- 1 Lvov D.K. //Sov. Med. Rev. E. Virol. Rev. 1987. V.2. P.15-37.
- 2 Webster R.G., Bean W.J., German O.T. et al. //Microbiol. Rev. 1992. V.56. P.152-179.
- 3 Tong S., Zhu X., Li Y. et al. New World Bats Harbor Diverse Influenza A Viruses // PLOS Pathogens. – 2013. – № 10. – V. 9. – e1003657. // www.plospathogens.org. 23.08.2017.
- 4 Michalek P., Krejova L., Adam V., Kizek R. Hemagglutinin structure, membrane fusion and virus entry // Journal of Metallomics and Nanotechnologies. – 2015. – №1. – С. 53-56.
- 5 Van Reeth K. Avian and swine viruses: our understanding of zoonotick risk// Vet. Rec. 2007. Vol. 38. P.243-260.
- 6 Easterday B.C. //Diseases of Swine. New York. 1970. P.127-157.
- 7 Gorman O.T., Bean W.J., Kawaoka Y., Webster R.G. Evolution of the nucleoprotein gene of influenza A virus // J Virol. – 1990. – 64(4) – P. 1487-97.
- 8 Горбунова А.С., Пысина Т.В. //В кн.: «Грипп животных». М. - 1973. – с. 232.
- 9 Суслопаров И.М., Шаршов К.А., Романовская А.А. и др. Генетические особенности штамма вируса гриппа А(H1N1), вызвавшего пандемию 2009 г. Журн. Микробиол., 2011, №5, с.107-110.
- 10 Ludwig S., Stilz L., Planz O. et al. European swine virus as a possible source for the next influenza pandemic //J. Virol. 1995. Vol. 212. P. 555-561.
- 11 Suarez D.L., Woolcock P.R., Bermudez A.J., Senne D.A. Isolation from turkey breeder hens of a reassortant H1N2 influenza virus with swine, human, and avian lineage genes //Avian Dis. 2002. Vol. 46. N 1. P. 111-121.
- 12 Casstrucci M., Donatelli I., Sidoil L. et. al. Reassortment between avian an and human influenza A virus Italian pigs // J. Virol. 1993. Vol. 119. P. 503-506.
- 13 Garten R., Davis C., Russel C et. al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 (H1N1) influenza virus circulating in humans //Science. 2009. 325: 197-201.

14 Francis T., Quilligan J., Minuse E. Resemblance of a strain of swine influenza virus to human A – prime strains. Proc. Soc. Exp. Biol. 1949. 71:216-220.

15 Стаханова В.М., Андриаскус Э.Я. Изучение вируса гриппа А, выделенного от свиней в 1959 г. В кн.: Аннотации работ НИИ вирусологии им. Ивановского за 1960 г. М. 1962. С. 62.

16 Christopher W., Olsen W., Karasin A., Gene Ericson. Characterization of a swine-like reassortant H1N2 influenza virus isolated from wild duck in the United States //Virus research. 93. 2003. P. 115-121.

17 Marozin S., Gregory V., Cameron K. et al. Antigenic and genetic diversity among swine influenza A H1N1 and H1N2 viruses in Europe //J. Gen. Virol. 2002. Vol. 83. P. 735-745.

18 Brown I., Ludwig S., Olsen C. et. al. Antigenic and genetic analyses of H1N1 influenza A viruses from European pigs //J. Gen. Virol. 1997. Vol. 78. P. 553-562.

19 Лаптев С.В., Ямникова С.С., Саятов М.Х. и др. Изучение биологических и антигенных свойств вирусов гриппа А(H1N1), выделенных от свиней в Восточном Казахстане //Известия АН КазССР. № 2. 1987. С. 55-58.

20 Онгарбаева Н.С., Лукманова Г.В., Сактаганов Н.Т., Глебова Т.И., Кливлеева Н.Г. Биологические свойства штаммов вируса гриппа свиней А/Н1N1, выделенных в 2010 и 2012 гг. на территории республики Казахстан // Матер. III Междунар. конф. молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов "OpenBio". Сборник тезисов. – Новосибирск, 2016. – С.172-174.

21 Hoffmann E, Stech J, Guan Y et. al. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. // Arch Virol. - 2001. - № 146 (12). - P. 2275-89.

22 Reed L., Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints // Amer. J. Hyg.- 1938.- Vol. 27.- P.493.

23 Douwdal W.A., Kendal A., Noble G.R. Influenza virus //Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infection. – Washington. - 1979. - P. 585-609.

24 Amino D. Method for the quantitative estimation of N-acetylneuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids // Biochem. - 1961. - Vol. 81. - P. 384-392.

25 WHO Manual for on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance, Geneva, 2002. 105 pp.

26 Антительные эритроцитарные диагностикумы для определения типовой и подтиповой принадлежности вирусов гриппа // Вопр. Вирусол. 1985. №1. С. 39-43.