

Использование микрокультурального иммуноферментного анализа для субтиповой идентификации циркулирующих вирусов гриппа А(Н1) и А(Н3)

В.З. Кривицкая[#], Е.В. Сорокин, Т.Р. Царева, Е.Р. Петрова, Н.И. Коновалова, М.М. Писарева, Ж.В. Бузицкая, Т.Д. Смирнова, А.А. Соминина

ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, Санкт-Петербург, Российская Федерация

[#]Для корреспонденции: Vera Krivitskaya, E-mail: vera.kriv@influenza.spb.ru

DOI: 10.18527/2500-2236-2015-2-1-39-43

Ключевые слова: микрокультуральный ИФА, вирусы гриппа, А(Н1N1)pdm09, А(Н3N2), моноклональные антитела, субтипová дифференциация.

Получена 5 июля 2015 г.

Принята к печати 9 сентября 2015 г.

Опубликована 13 октября 2015 г.

АННОТАЦИЯ

Разработан чувствительный вариант микрокультурального ИФА (cell-ELISA) для субтиповой дифференциации современных вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09 и А(Н3N2), циркулирующих в человеческой популяции. Метод основан на оценке репродукции вируса в инфицированной культуре клеток MDCK с использованием на стадии детекции субтип-специфических моноклональных антител (mAb), взаимодействующих с гемагглютинином (НА) вируса гриппа. При отработке метода использованы штаммы вирусов гриппа А, выделенные из клинических образцов в эпидемический сезон 2014 года.

Показано, что при использовании mAb #1/#2 или #4 в концентрации 10–15 мкг/мл разработанный вариант cell-ELISA позволяет детектировать синтезируемый в зараженных клетках белок НА соответственно вирусов гриппа А(Н3N2) или А(Н1N1)pdm09.

Разработанный метод может быть использован для идентификации современных штаммов вируса гриппа А в процессе их репродукции в клеточной культуре MDCK, что позволяет проводить субтипирование вирусов с низкой гемагглютинирующей активностью, когда невозможно использовать общепринятый метод – реакцию торможения гемагглютинации (РТГА).

Development of the cell-ELISA for subtype identification of circulating influenza A(H1) and A(H3) viruses

Vera Krivitskaya[#], Evgeniy Sorokin, Tatyana Tsareva, Elena Petrova, Nadezhda Konovalova, Maria Pisareva, Zhanna Buzitskaya, Tatyana Smirnova, Anna Sominina

Research Institute of Influenza, Saint Petersburg, Russian Federation

[#]Corresponding author: Vera Krivitskaya, E-mail: vera.kriv@influenza.spb.ru

Keywords: cell-ELISA, influenza virus, A(H1N1)pdm09, A(H3N2), monoclonal antibodies, subtype differentiation.

ABSTRACT

The sensitive version of cell-ELISA was developed for the subtype-specific differentiation of current influenza A(H1N1)pdm09 and A(H3N2) viruses that are circulating in the human population. This method is based on the estimation of virus reproduction in the infected MDCK cells. The detection step of this method is an interaction of the subtype-specific monoclonal antibodies (mAbs) with the viral hemagglutinin (HA). The influenza A virus strains, isolated in 2014 epidemic season, were used to validate this method.

It was shown that by using mAb # 1/ # 2 or # 4 at a concentration of 10-15 µg / ml the developed variant of cell-ELISA allows the detection of HA protein, synthesized in the cells infected with influenza A(H3N2) or A(H1N1)pdm09 virus, respectively.

The developed method can be used for identification of HA subtype of modern influenza A viruses with low HA activity, which is not possible by the conventional hemagglutination inhibition test.

ВВЕДЕНИЕ

Грипп – одно из наиболее распространенных инфекционных заболеваний. В России ежегодно регистрируется около 50 млн. случаев инфекционных заболеваний и около 95% из них приходится на острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ), включая грипп. При этом по данным Федерального центра по

гриппу и ОРЗ, заболеваемость среди детей в 7–10 раз превышает показатели, регистрируемые в группе взрослого населения. В период гриппозной пандемии показатели заболеваемости и смертности всего населения существенно возрастают по сравнению с ежегодными эпидемиями [1].

В соответствии с глобальной концепцией, изложенной в директивных документах ВОЗ, реальность возникновения новых возбудителей, включая потенциально пандемические шифт-варианты вируса гриппа, определяет настоятельную необходимость дальнейшего развития служб надзора за респираторными вирусными инфекциями в целях раннего распознавания предстоящих пандемических событий и идентификации новых вирусов гриппа [2].

Поскольку ОРВИ разной этиологии зачастую имеют сходную клиническую симптоматику, особенно на начальных этапах, особую значимость приобретает совершенствование и развитие современных методов лабораторной дифференциальной диагностики. Ранняя идентификация гриппозной инфекции позволяет назначить этиотропную терапию в самом начале заболевания, предупредить развитие вторичных инфекций разной этиологии и ограничить применение антибиотиков. Своевременная расшифровка природы эпидемических вспышек необходима для определения тактики проведения противоэпидемических мероприятий и структуры экстренных превентивных мер в очагах заболеваний. В этой связи особую значимость приобретает совершенствование и развитие современных методов лабораторной диагностики гриппа и других ОРВИ.

Наиболее простым и доступным лабораторным методом идентификации вновь выделенных вирусов гриппа остается реакция торможения гемагглютинации (РТГА) с использованием субтипспецифичных иммунных сывороток животных. Метод позволяет визуально учитывать результаты взаимодействия антиген-антитело без использования какого-либо оборудования. Однако длительная аккумуляция эволюционных мутаций в молекуле гемагглютинина (НА) циркулирующих в человеческой популяции вирусов гриппа А(Н1N1) и, особенно, А(Н3N2) затронула и рецептор-связывающий сайт НА, что привело к снижению его аффинности к рецепторам эритроцитов различной видовой принадлежности [3-6]. В результате возникли трудности в идентификации подтипов (серотипировании) некоторых современных штаммов с использованием общепринятого метода РТГА.

Одним из альтернативных методов выделения и анализа новых патогенов считается микрокультуральный иммуноферментный метод cell-ELISA, основанный на оценке репродукции вируса в инфицированной культуре клеток с использованием на стадии детекции высокоспецифичных моноклональных антител (mAb), взаимодействующих с вирусными белками. Метод cell-ELISA, с использованием mAb, специфичных к NP-белку вируса гриппа, рекомендован ВОЗ для оценки активности вируснейтрализующих антител в реакции микронейтрализации [7]. Этот метод с успехом используют также для детекции штаммов вируса гриппа, слабо реагирующих в РГА [8].

Поскольку NP-белок высоко консервативен, cell-ELISA с применением NP-специфичных mAb позволяет детектировать вирусы гриппа А любого подтипа,

но при этом не дискриминирует его субтип, т.е. не подходит для серотипирования.

Целью проведенной работы была разработка чувствительного варианта cell-ELISA для субтиповой дифференциации современных вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09 и А(Н3N2), циркулирующих в человеческой популяции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение вирусов гриппа из клинических образцов

В работе использованы штаммы вирусов гриппа А, выделенные из клинических материалов, полученных от больных гриппом и ОРВИ в различных городах России в период эпидсезона 2014 года.

Сбор клинических образцов и выделение из них вирусов гриппа А в культуре клеток МДСК или развивающихся куриных эмбрионах проводили согласно Методическим рекомендациям [9]. Идентификацию выделенных штаммов вируса гриппа А проводили с использованием РТГА и полимеразноцепной реакции (ПЦР).

Реакция гемагглютинации (РГА) и торможения гемагглютинации (РТГА)

РГА и РТГА ставили общепринятым методом в соответствии с Практическими рекомендациями [10]. Для увеличения чувствительности методов использовали эритроциты человека (Rh+ группы 0).

ПЦР

Постановку ПЦР осуществляли с использованием наборов реагентов «АмплиСенс» («ИнтерЛабСервис», г. Москва) в соответствии с Инструкцией по применению системы. Выделение РНК из образцов проводили с использованием набора «АмплиСенсРИБопреп», для проведения обратной транскрипции вирусной РНК использовали наборы «АмплиСенсReverta». Для проведения ПЦР в реальном времени использовали системы «АмплиСенс® Influenzavirus A/B-FL» (анализ РНК вирусов гриппа типов А и В), «АмплиСенс® Influenzavirus A type FL» (субтипирование вирусов гриппа Н1/Н3) и «АмплиСенс® Influenzavirus A/Н1-swine-FL» (выявление вируса гриппа А(Н1N1)pdm09).

Получение моноклональных антител (mAb)

Панели mAb к вирусам гриппа А(Н3N2) и А(Н1N1)pdm09 были получены в лаборатории биотехнологии диагностических препаратов НИИ гриппа по методу [11] с некоторыми модификациями. Мышей линии BALB/c или гибридов F1(BALB/c X SJL/J) иммунизировали путем внутривентриального введения вирусов, очищенных ультрацентрифугированием в градиенте плотности сахарозы. Через несколько недель мышей бустировали очищенной фракцией поверхностных

гликопротеинов того же вируса. Через 3 суток после бустер-иммунизации проводили гибридизацию спленоцитов иммунизированных мышей с клетками мышины миеломы линии X63Ag8.653 в присутствии 50% ПЭГ-2000. Клонирование гибридных клеток проводили методом предельных разведений. При первичном анализе клонов использовали традиционный метод ИФА: тестируемую культуральную жидкость вносили в лунки планшетов, сенсibilизированных вирусодержащим материалом, с последующей детекцией прореагировавших mAb пероксидазным конъюгатом к IgG мыши («Sigma», США). Гибридные клоны с заданным спектром реагирования реклонировали на селективной среде НАТ. Стабильные клоны-продуценты mAb использовали для получения асцитов.

Мышам линии BALB/c или F1 (BALB/c X SJL/J), предварительно праймированным пристаном (0.5 мл/мышь), внутрибрюшинно вводили гибридные клетки в количестве $(3-5) \times 10^6$ клеток/мышь. Спустя 2–3 недели асцитную жидкость собирали. Исследования выполняли согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 266 МЗ РФ от 19.06.2003).

Микрокультуральный ИФА для оценки репродукции вирусов гриппа А в культуре клеток

Репродукцию вируса в клетках оценивали по содержанию внутриклеточного НА. Для этого в лунки 96-луночных планшетов для культуральных работ («NUNC», Дания) с монослойными культурами клеток MDCK вносили 100 мкл исследуемого вирусодержащего материала и культивировали в CO₂-термостате при 37°C. В качестве культуральной среды использовали alpha-MEM (ООО «Биолот», Санкт-Петербург) с 0.2% бычьего сывороточного альбумина (фракция V) («Sigma», США); 0.05% аргинина («Sigma», США) и 2 мкг/мл ТРСК-трипсина («Sigma», США). Через 48–96 ч инкубации (после появления цитопатического действия или при его отсутствии) из лунок удаляли культуральную среду, планшеты отмывали 0.01 М фосфатносолевым буфером, pH 7,2 (ФСБ) и клетки фиксировали 80% холодным ацетоном в течение 20 мин. После промывки ФСБ на монослой наносили блокирующий раствор (5% обезжиренное молоко в ФСБ, ФСБ-М), и инкубировали при 37°C в течение 1 ч с последующим внесением 100 мкл/лунку субтипоспецифичных mAb к НА вируса гриппа А(H1N1)pdm09 или А(H3N2) в концентрации 5–10 мкг/мл в ФСБ-М. После 2-ч инкубации при 37°C и удаления несвязавшихся первичных антител в лунки добавляли пероксидазный конъюгат антител к IgG мыши («Sigma», США) в ФСБ-М (в разведении 1/10 000); планшеты инкубировали в течение 1 ч при 37°C, отмывали и добавляли раствор субстрата, содержащий 0.1 мг/мл 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) и 0.02% H₂O₂ в ацетат-цитратном буфере, pH 5.0.

После остановки реакции раствором 2 N H₂SO₄ измеряли оптическую плотность на спектрофотометре Anthos-2010 (Австрия) при длине волны 450 нм (OD₄₅₀). Положительными по репродукции вируса считали пробы, в которых значения OD₄₅₀ в два и более раз превышали таковые в лунках с незараженной культурой клеток (негативный контроль).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При отработке метода cell-ELISA использованы штаммы вирусов гриппа А(H1N1)pdm09, выделенные из клинических образцов в эпидсезон 2014 года (1–3 пассажа). Вирусы А(H3N2) изолировали в культуре клеток MDCK, а вирусы А(H1N1)pdm09 – в развивающихся куриных эмбрионах. Наличие вируса гриппа во всех образцах подтверждали с помощью ПЦР и РГА с использованием эритроцитов человека. Титры геммагглютинации вирусов варьировали от 1/4 до 1/64.

Для обнаружения вирусов, реплицирующихся в инфицированных культурах клеток MDCK, сначала проанализировали клетки, инфицированные эталонными штаммами вирусов гриппа А, и выбрали из панели полученных mAb три: #1 и #2, наиболее эффективно взаимодействующие с вирусами гриппа А/Техас/50/2012 и А/Швейцария/9715293/2013 (H3N2), а также #4, специфически связывающееся с вирусом гриппа А(H1N1)pdm09 (штамм А/Калифорния/07/2009). При предварительном скрининге выбранных антител с использованием ряда иммунологических методов (иммуноблоттинга, ИФА, РТГА) показано, что mAb #1, #2 и #4 направлены к НА1 субединице и являются строго субтипспецифичными.

В дополнение к субтиповой дифференциации, наличие в культуре репродуцирующихся вирусов было доказано в cell-ELISA при использовании типоспецифичных антител, mAb #3, взаимодействующих с NP-белком вирусов гриппа А.

Результаты анализа изолятов вирусов гриппа А в cell-ELISA представлены на Рис. 1, 2. Для mAb #1, #2 и #4 не было зарегистрировано перекрестной реакции с клетками, инфицированными вирусами гетерологичных субтипов. С использованием mAb #1, #2 или #4 в концентрации 10–15 мкг/мл специфично выявляли синтезированный в зараженных клетках НА вирусов гриппа А(H3N2) или А(H1N1)pdm09, соответственно.

Таким образом, микрокультуральный вариант ИФА (cell-ELISA) на основе моноклональных антител, специфически взаимодействующих с вирусным НА, может быть использован в качестве дифференциального метода диагностики современных штаммов вируса гриппа А в процессе их репродукции в клеточной культуре.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы не преследуют коммерческих или финансовых интересов.

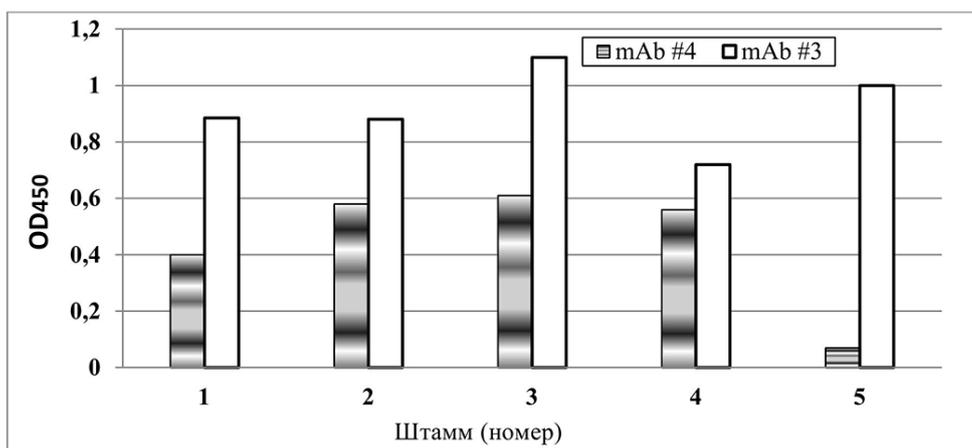


Рис. 1. Взаимодействие моноклональных антител с вирусами гриппа человека. Представленные результаты получены методом cell-ELISA на следующих штаммах A(H1N1)pdm09:

- 1 – А/Санкт-Петербург/1/2014
- 2 – А/Санкт-Петербург/16/2014
- 3 – А/Санкт-Петербург/46/2014
- 4 – А/Калифорния/07/2009

Вирус гриппа А/Техас/50/2012 (H3N2) (5) использован как контроль специфичности антитела #4, направленного к субъединице HA1 вируса гриппа A(H1N1)pdm09. Универсальное антитело #3, специфичное к белку NP вирусов гриппа А любых подтипов, использовано как позитивный контроль репликации.

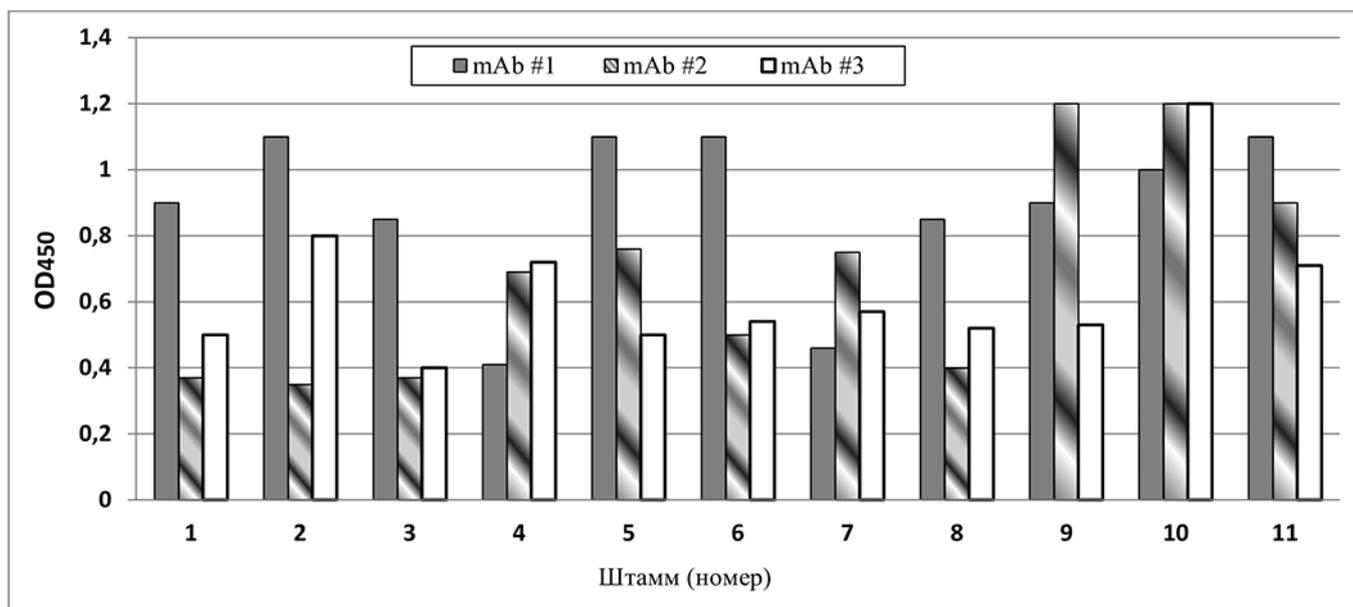


Рис. 2. Взаимодействие различных штаммов вируса гриппа A(H3N2) с моноклональными антителами (по результатам cell-ELISA). Антитела #1 и #2 связываются с HA1 субъединицей вирусов гриппа H3N2, а #3 с белком NP вирусов гриппа А.

Штаммы вируса гриппа A(H3N2):

- | | | |
|------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 1–А/Астрахань/23/2014 | 5– А/Чита/261/2014 | 9–А/Москва/252/2014 |
| 2–А/Астрахань/24/2014 | 6– А/Чита/258/2014 | 10– А/Техас/50/2012 |
| 3–А/Астрахань/25/2014 | 7– А/Чита/257/2014 | 11– А/Швейцария/9715293/2013 |
| 4– А/Астрахань/26/2014 | 8– А/Санкт-Петербург/80/2014 | |

ЦИТИРОВАНИЕ

Кривицкая ВЗ, Сорокин ЕВ, Царева ТР, Петрова ЕР, Коновалова НИ, Писарева ММ, Бузицкая ЖВ, Смирнова ТД, Соминина АА. Использование микрокультурального иммуноферментного анализа для субтиповой идентификации циркулирующих вирусов гриппа А(Н1) и А(Н3). *MIR J*, 2015; 2(1), 39-43, doi: 10.18527/2500-2236-2015-2-1-39-43.

ЛИТЕРАТУРА

1. Карпова ЛС, Ишкина ЕР, Столяров КА, Поповцева НМ, Столярова ТП, Забайкин АВ. Смертность от соматических и инфекционных заболеваний и ее корреляция с заболеваемостью гриппом и ОРВИ населения Санкт-Петербурга (2004-2010гг). *Эпидемиология и вакцинопрофилактика* 2012; 4 (65), 29-36. [Karpova LS, Ishkina EP, Stolyarov KA, Popovtseva NM, Stolyarova TP, Zabaykin AV. Mortality from infectious and somatic diseases and its correlation with the incidence of influenza and ARVI for the population of St. Petersburg (2004-2010). *Epidemiologiya i vaksino profilaktika* 2012; 4 (65), 29-36. (In Russian)].
2. WHO global technical consultation: global standards and tools for influenza surveillance / World Health Organization. 2011. Available: <http://whqlibdoc.who.int/hq/2011>.
3. Nobusawa E, Ishihara H, Morishita T, Sato K, Nakajima K. Change in receptor-binding specificity of recent human influenza A viruses (H3N2): a single amino acid change in hemagglutinin altered its recognition of sialyloligosaccharides. *Virology* 2000; 278, 587-96.
4. Medeiros R, Escriou N, Naffakh N, Manuguerra JC, van der Werf S. Hemagglutinin residues of recent human A(H3N2) influenza viruses that contribute to the inability to agglutinate chicken erythrocytes. *Virology* 2001; 289, 74-85.
5. Obuchi M, Yokoyama M, Horimoto E, Obara M, Iwai M, Sato H, Sata T, Takizawa T. 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, 448-50.

АВТОРСКИЕ ПРАВА

© 2015 Кривицкая и др. Эта статья публикуется в свободном доступе в соответствии с лицензией Creative Commons AttributionNonCommercial-ShareAlike 4.0 International Public License (CC BY-NC-SA), которая позволяет неограниченное использование, распространение и воспроизведение на любых носителях при условии, что указываются автор и источник публикации, а материал не используется в коммерческих целях.

6. Lin YP, Xiong X, Wharton SA, Martin SR, Coombs PJ, Vachieri SG, Christodoulou E, Walker PA, Liu J, Skehel JJ, Gamblin SJ, Hay AJ, Daniels RS, McCauley JW. Evolution of the receptor binding properties of the influenza A(H3N2) hemagglutinin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109, 21474-9.
7. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. WHO. 2011. Available: http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241548090_eng.pdf
8. van Baalen CA, Els C, Sprong L, van Beek R, van der Vries E, Osterhaus AD, Rimmelzwaan GF. Detection of nonhemagglutinating influenza a(h3) viruses by enzyme-linked immunosorbent assay in quantitative influenza virus culture. *J Clin Microbiol* 2014; 52, 1672-7.
9. Соминина АА. Методические рекомендации. Выделение вирусов гриппа в клеточных культурах и куриных эмбрионах и их идентификация. Санкт-Петербург, 2006. [Sominina A.A., Guidelines. Isolation of influenza viruses in cell culture and chicken embryos and their identification. St. Petersburg, 2006 (In Russian)].
10. Соминина АА, Кривицкая ВЗ, Войцеховская ЕМ, Медведева НА, Липина НВ, Потапенко ЛБ. Практические рекомендации по диагностике вирусных инфекций. Санкт-Петербург, 2005. [Sominina AA, Krivitskaya VZ, Voytsekhovskaya EM, Medvedeva NA, Lipina NV, Potapenko L.B. Practical recommendations for the diagnostics of viral infections. St. Petersburg, 2005. (In Russian)].
11. Kohler G, Milstein C. Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur J Immunol* 1976; 6, 511-9.