

ХАРАКТЕРИСТИКА ДРЕЙФ-ВАРИАНТОВ ВИРУСОВ ГРИППА А, ВЫДЕЛЕННЫХ В РАЗНЫЕ ГОДЫ ЭПИДЕМИЧЕСКИХ ПОДЪЕМОВ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ ГРИППОМ В Г. ХАРЬКОВЕ

Панченко Л.А., Волянский Ю.Л., Кратенко И.С., Герасюта Н.Н., Одражий Н.К., Торяник И.И., Короваева И.В., Ильина И.П.

Институт микробиологии и иммунологии им. И.И.Мечникова АМН Украины, г. Харьков

Областная санитарно-эпидемиологическая станция, г. Харьков

Уникальной особенностью вирусов гриппа является трудно предсказуемая антигенная изменчивость. Она связана с качественными изменениями антигенных детерминант, спонтанно возникающих или селекционированных под действием популяционного иммунитета [1].

Установление направления и интенсивности изменений поверхностных антигенов вируса гриппа является одной из наиболее важных задач вирусологического мониторинга. Постоянное слежение за циркулирующими вирусами позволяет выделить среди них возбудителей, отличающихся от основной массы и представляющих интерес в связи с возможностью их доминирования в предстоящий эпидемический сезон. Своевременное выделение и изучение таких штаммов необходимо для оперативного приготовления новых диагностических и профилактических препаратов.

Наблюдения последних лет свидетельствуют о смешанном характере эпидемий гриппа, обусловленных совместной циркуляцией вирусов гриппа А (H3N2), А (H1N1) и В [2]. На особенности эпидемий и эпидемиологических подъемов оказывает влияние доминирование вирусов гриппа А с определенной антигенной характеристикой (H3N2 или H1N1), либо появление нового подвида вируса гриппа.

По сообщению ВОЗ, в эпидемию гриппа 2002-2003 гг. в некоторых странах отмечалось возвращение в популяцию человека вируса гриппа А с новой антигенной характеристикой H1N2, который явился результатом реассортации генетического материала возбудителей типа H1N1 и H3N2. Этот тип возбудителя в течение последних нескольких лет не принимал участия в эпидемическом процессе и его появление на Украине необходимо своевременно установить [3].

В настоящем сообщении представлена характеристика некоторых биологических и антигенных свойств штаммов вирусов гриппа, выделенных в разные годы эпидемических подъемов гриппа (1986 и 2003 гг.) в г. Харькове.

Материалы и методы исследований

Материалом для изоляции вирусов гриппа от больных служили носоглоточные смывы, которые собирали сотрудники вирусологических лабораторий ОблСЭС и ДорСЭС г. Харькова при выезде в домашние очаги или во время амбулаторных приемов в поликлиниках.

В период эпидемического подъема гриппа в 1986 году для выделения вирусов использовали 10-дневные куриные эмбрионы путем заражения их в хорион - аллантоисную полость.

Изоляцию гриппозных вирусов в период эпидемического подъема гриппа в феврале 2003 г. осуществляли на перевиваемой культуре клеток почки собаки МДСК (Madin Darby kidney cells). До применения клетки сохраняли в криозащитной среде, состоящей из 80% среды Игла, 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота и 10% глицерина.

Клетки МДСК культивировали на среде Игла MEM с глутамином и с добавлением 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота и 100 мкг/мл гентамицина.

С поверхности стекла клетки снимали смесью растворов 0,02% версена и 0,25% трипсина в соотношении 2:1.

Инфицированные клетки поддерживали с помощью среды Игла MEM с добавлением 2% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота и 100 мкг/мл гентамицина.

Питательные среды для культивирования клеток и растворы для их снятия были получены из Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П.Чумакова РАМН (Москва, Россия).

Выявление гемагглютинирующих агентов и их идентификацию осуществляли классическим способом с помощью РГА и РТГА с 1% суспензией эритроцитов кур и морских свинок. Для установления типовой принадлежности применяли диагностические типоспецифические сыворотки к А, В и С вирусам гриппа производства НИИ гриппа РАМН (Санкт-Петербург, Россия).

Антигенную общность и различия гемагглютининов выявляли с помощью перекрестных постановок РТГА между вариантами вирусов разных лет выделения и иммунными специфическими сыворотками к ним.

Результаты и их обсуждение

В течение эпидемического подъема гриппа в Харькове в 1986 г. из носоглоточных смывов больных было изолировано 28 штаммов вирусов гриппа, идентифицированных как вирусы гриппа А (H3N2).

После подтверждения их природы в Республиканском и Всесоюзном Центрах по гриппу были отобраны два штамма, получившие название А /Харьков/105/86) и А /Харьков/355/86. Они рассматривались как оригинальные, так как отличались по ряду свойств от циркулировавших в период эпидемии 1986 г. вирусов.

Штамм вируса гриппа А/Харьков/355/86 характеризовался низкой гемагглютинирующей и инфекционной активностью, не размножался при 40°C, был чувствителен к γ -ингибиторам. Этот штамм вместе с вирусом гриппа А/Харьков/355/86 были направлены для дальнейшего изучения в Международные справочные центры по гриппу.

Приведенные доктором А. Кендал данные изучения вируса гриппа А/Харьков/105/86 в вирусологической лаборатории Центра контроля за инфекционными болезнями (Атланта, США) были нам любезно предоставлены. Протокол опытов и результаты этих исследований приведены в таблице 1.

Как видно из представленных в табл. 1 данных, в перекрестных реакциях торможения гемагглютинации были испытаны 7 референс-вирусов предшествующих лет изоляции и иммунных сывороток к ним, полученных путем иммунизации хорьков. Антисыворотка к вирусу гриппа А/Миссисипи/1/85 тормозила гемагглютинирующую активность вируса гриппа А/Харьков/105/86 до титра 1:160, что позволило его отнести к дрейф-варианту этого типа вируса.

Наличие отличий по антигенному профилю гемагглютинина от циркулирующих представителей вирусов гриппа А(H3N2) с учетом вышеприведенных свойств, послужили основанием рассматривать вирус гриппа А /Харьков/105/86 как оригинальный и депонировать его в коллекцию вирусов Института вирусологии им. Д.И.Ивановского (№депонента 2035).

Вирус гриппа А /Харьков/105/86 было предложено использовать в качестве диагностикума (Авторское свидетельство № 151033 от 8.06.89 г.) [4].

Другой штамм вируса гриппа А /Харьков/355/86 оказался дрейф-вариантом вируса гриппа гонконгской разновидности, родственной циркулировавшим в 1984-1985 гг. вирусам гриппа А(H3N2).

Таблица 1. Гемагглютинирующие титры вирусов гриппа А (H3N2) разных лет выделения по результатам исследований д-ра А. Kendal (СДС, Атланта, США).

Референс Вирус	Хорьковские антисыворотки к вирусам гриппа						
	А/Бангкок 1/79	А/Филиппины 7/82	А/Кейптаун 2/89	А/Миссисипи 1/85	А/Кен 1/84	А/Стокгольм 8/85	А/СССР 26/85
А/Бангкок 1/79	<u>2560</u>	<u>1280</u>	640	640	160	320	160
А/Филиппины 7/82	160	640	80	320	160	160	80
А/Кейптаун 2/89	640	320	<u>1280</u>	320	160	1280	80
А/Миссисипи 1/85	320	640	320	<u>1280</u>	640	640	320
А/Кен 1/84	80	320	160	320	<u>1280</u>	320	640
А/Стокгольм 8/85	80	320	160	320	160	<u>640</u>	80
А/СССР 26/85	40	80	80	320	320	320	<u>640</u>
Испытуемый вирус А/Харьков/105/86	10	40	40	160	80	80	160

- Приведены результаты РТГА от 29.10.86 г.

В течение многих лет вплоть до эпидемического подъема гриппа в Харькове в феврале 2003 г, несмотря на настойчивые попытки, вирус гриппа выделить от больных не удавалось. В какой-то мере сказало на этом сокращение объема вирусологических исследований вследствие снижения уровня материального обеспечения.

Улучшение снабжения лабораторий и использование для изоляции вирусов двух систем (куриных эмбрионов и клеточных культур) способствовало повышению эффективности вирусывыделения [5].

В период эпидемического подъема гриппа в Харькове в феврале 2003 г. сотрудниками вирусологической лаборатории ОблСЭС из носоглоточных смывов больных с диагнозом «Грипп» было выделено 9 штаммов вирусов гриппа (5- от детей и 4- от взрослых). Все вирусы были выделены на культуре клеток МДСК. Цитопатическое действие, как правило, отмечали на 3-4 день после заражения.

Только 2 из 9 штаммов имели гемагглютинирующую активность (ГА) в титре 1:128, у остальных изолятов она не превышала 1:4 – 1:8. С целью повышения ГА вирусосодержащей жидкостью были заражены 10-дневные куриные эмбрионы. В результате проведенного пассажа титр вирусов удалось повысить в 4-8 раз. Идентификация изолированных штаммов в РТГА с 1% суспензией эритроцитов морской свинки позволила отнести их к вирусам гриппа А (H1N1). Общие результаты проведенных исследований по изоляции вирусов гриппа представлены в таблице 2.

Изучение выделенных вирусов в Институте эпидемиологии и инфекционных болезней им. Л.В.Громашевского показало, что все они являются дрейф-вариантами вируса гриппа А(H1N1), имеющими антигенное родство с вирусами гриппа А/Новая Каледония/20/99. Анализ данных иммунофлюоресцентного обследования 341 больных, проведенного в период эпидемического подъема гриппа в Харькове в феврале 2003 г., показал наличие одновременной циркуляции среди населения трех типов вирусов гриппа. Антигены гриппозных вирусов типов А(H1N1), А(H3N2) и В были определены в 16,3%, 19,2% и 10,3% случаев соответственно. Примерно такая же картина, подтверждающая смешанный характер эпидемий гриппа, наблюдается и в других регионах Украины [5].

Таким образом, после возвращения в человеческую популяцию в 1977 году вируса гриппа А(H1N1) отмечена его периодическая активизация, которая имеет место в настоящее время. У вирусов этого типа также, как и у вирусов гриппа А(H3N2), наблюдается антигенный дрейф вирионных белков, особенно гемагглютинина [6].

Выводы

1. В разные годы эпидемических подъемов заболеваемости гриппом в г. Харькове были выявлены дрейф-варианты вирусов гриппа с различной антигенной характеристикой: в 1986 г. – вирус гриппа А(H3N2), в 2003 г. – вирус гриппа А(H1N1).

2. Вирус гриппа А/Харьков/105/86 был изолирован на куриных эмбрионах. Он отличался от циркулирующих штаммов вирусов по термо- и ингибиторочувствительности, сохраняя общность гемагглютинирующих антигенов с вирусами Миссисипской разновидности (1985г.) и утратив антигенные взаимосвязи с вирусами предыдущих лет.

3. Вирусы гриппа 2003 г. были изолированы от больных гриппом на культуре клеток МДСК. Они характеризовались низкой гемагглютинирующей активностью, которая повышалась в 4-8 раз после проведения пассажей на куриных эмбрионах. В антигенном отношении вирусы гриппа оказались родственными эталонным штаммам А/Новая Каледония/20/99.

Таблица 2 Характеристика вирусов гриппа А(Н1N1) 2003 г. выделения

№№ штамма	Дата изоляции на клетках МДСК	ГА титр*	Дата пассирования на куриных эмбрионах	ГА титр*	Идентификация в РТГА с типоспецифическими сыворотками	Совпадение результатов вирусывыделения с данными РИФ
63	18.02.03	1:128	-	-	А(Н1N1)	+
68	18.02.03	1:128	-	-	А(Н1N1)	+
80	21.02.03	1:4	07.03.03	1:32	А(Н1N1)	+
88	21.02.03	1:8	07.03.03	1:32	А(Н1N1)	-
99	21.02.03	1:8	07.03.03	1:32	А(Н1N1)	+
130	03.03.03	1:8	07.03.03	1:32	А(Н1N1)	- выявлен антиген вируса парагриппа
212	03.03.03	1:4	12.03.03	1:32	А(Н1N1)	+
213	03.03.03	1:8	12.03.03	1:32	А(Н1N1)	-
258	03.03.03	1:4	12.03.03	1:32	А(Н1N1)	+

Примечание: + совпадение результатов вирусывыделения с данными РИФ

- отсутствие совпадения результатов вирусывыделения с данными РИФ

ГА - гемагглютинирующий титр*

Список литературы

1. Исаева Е.И., Ровнова З.И., Подчерняева Р.Я. Сравнительное исследование моноклональных и моноспецифических антител в определении иммунодоминантных антигенных сайтов гемагглютинаина вируса гриппа А(Н3N2) // Вопр. вирусол. – 1991. - №1. – С. 7-10
2. Гринбаум Е.Б., Литвинова О.Л., Банников А.И. и др. Полиморфизм популяции современных вирусов гриппа А и В человека // Вестн. РАМН. – 1994. -№9. –С. 32-40
3. Грип та гострі респіраторні інфекції в Україні у епідемічний сезон 2002/2003 року // Огляд Центра по грипу. Київ. – 2003 –31с.
4. А.С. СССР № 1513033. Штамм вируса, используемый для приготовления гриппозного диагностикума/Пархоменко Л.М., Панченко Л.А. Опубл. 07.10.89.
5. Міроненко А.П. Методичні підходи до виділення вірусів грипу та реалізація їх в Україні // Лабораторна діагностика. –2002. -№ 4. – С. 42-44
6. Иванова В.Т., Бурцева Е.И., Оскерко Т.А. и др. Изменчивость и особенности распространения вируса гриппа А(Н1N1) в период 1990-1998 г.г. // Вопр. вирусол. – 2000. - №5. – С. 18-22

Выражаем искреннюю благодарность д-ру А. Kendal за сообщение о проведенном исследовании по идентификации вируса гриппа А /Kharkov/105/86.

УДК 578.832:57.031

ХАРАКТЕРИСТИКА ДРЕЙФ-ВАРИАНТІВ ВІРУСІВ ГРИПУ А, ВИДІЛЕНИХ В РІЗНІ РОКИ ЕПІДЕМІЧНИХ СПАЛАХІВ ЗАХВОРЮВАНОСТІ ГРИПОМ У ХАРКОВІ

Панченко Л.О., Волянський Ю.Л., Кратенко І.С., Герасюта Н.М., Одражій Н.К., Торянік І.І., Короваєва В., Ільїна Н.П.

Дрейф-варіанти вірусів грипу А з різними антигенними властивостями були виділені в епідемічні роки в Харкові. В 1986 р. вірус грипу А(Н3N2) був домінуючи, який був виділений на курячих ембріонах. В 2003 р. – вірус грипу А(Н1N1), який був виділений на культурі клітин МДСК.

USC 578.832:57.031

CHARACTERISTIC OF THE DRIFT-VARIANTS OF INFLUENZA A VIRUSES, ISOLATED IN DIFFERENT EPIDEMIC YEARS IN KHARKOV

Panchenko L., Volyansky U., Kratenko I., Gerasujta N., Odraziy N., Toranik I., Korovaeva I., Ilina N.

The drift-variants of influenza a viruses with different antigenic properties were isolated in the epidemic years in Kharkov. In 1986 influenza A(H3N2) virus was dominated, which was isolated on the gallinaceae embryos. In 2003 - A(H1N1) virus, which was isolated on the cells culture MDSK.

УДК 578.832:57.031

**ХАРАКТЕРИСТИКА ДРЕЙФ-ВАРИАНТОВ ВИРУСОВ ГРИППА А, ВЫДЕЛЕННЫХ
В РАЗНЫЕ ГОДЫ ЭПИДЕМИЧЕСКИХ ПОДЪЕМОВ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ ГРИППА
В Г. ХАРЬКОВЕ**

Панченко Л.А., Волянский Ю.Л., Кратенко И.С., Герасюта Н.Н., Одражий Н.К.,
Торяник И.И., Короваева И.В., Ильина И.П.

Дрейф-варианты вирусов гриппа А с разными антигенными свойствами были выделены в эпидемические годы в Харькове. В 1986 году вирус гриппа А(Н3N2), выделенный на куриных эмбрионах, был доминирующим. В 2003 году – вирус гриппа А(Н3N2), который был изолирован на культуре клеток МДСК.