

УДК 57.083.2;578.832.1

ДЕТЕКЦИЯ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ СОВРЕМЕННЫХ ВИРУСОВ ГРИППА В МИКРОКУЛЬТУРАЛЬНЫМ ИММУНОФЕРМЕНТНЫМ АНАЛИЗОМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

© 2022 г. В. З. Кривицкая¹, *, **, В. Г. Майорова¹, Е. В. Сорокин¹, Т. Р. Царева¹, М. М. Писарева¹, А. И. Желтухина¹, Е. Р. Петрова¹, Е. В. Кузнецова¹, Р. А. Кадырова¹, Д. М. Даниленко¹, А. А. Соминина¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение “Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева” Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, 197376 Россия

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

**e-mail: krivitskayavera@yandex.ru

Поступила в редакцию 17.03.2022 г.

После доработки 01.04.2022 г.

Принята к публикации 16.04.2022 г.

Для детекции и дифференциации современных вирусов гриппа В обеих эволюционных линий проведена оценка чувствительности нового варианта микрокультурального иммуноферментного анализа (мкИФА) с использованием панели из 16 моноклональных антител (моноАТ), специфичных к гемагглютинину (НА) вирусов гриппа В. Исследование проведено на назофарингеальных образцах, полученных от больных острыми респираторными вирусными инфекциями (ОРВИ). Для апробации метода мкИФА использовано 192 клинических образца, ПЦР-положительных на вирус гриппа В. Наибольшая чувствительность метода для детекции и дифференциации вирусов гриппа В Ямагатской и Викторианской эволюционных линий была достигнута при использовании моноАТ 5В11 и 5В7 соответственно. При обнаружении вирусов гриппа В Ямагатской линии в ПЦР-положительных клинических образцах 2018 года чувствительность мкИФА была ниже (61.7%), чем при использовании традиционной методологии: выделения вируса в культуре клеток с последующим определением его принадлежности к эволюционной линии в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) с использованием штаммспецифичных иммунных сывороток животных (95.0%). При детекции более изменчивых Викторианских вирусов чувствительность метода зависела от времени циркуляции патогена. Результаты идентификации вирусов в пробах, собранных в 2016–2018 гг., были сопоставимы для мкИФА и традиционного метода (71–80%). Часть современных вирусов, циркулировавших в 2020–2021 гг., не взаимодействовала с иммунными сыворотками, полученными к соответствующим референс-штаммам, что затрудняло их идентификацию методом РТГА. В связи с этим циркулировавшие в это время вирусы идентифицировали с большей частотой в мкИФА, чем при выделении с последующей постановкой РТГА (59.5 против 35.7%, $p < 0.05$). В дополнение к идентификации эволюционной линии использование моноАТ 9В5 в мкИФА позволяет выявлять делеционные варианты Викторианских вирусов гриппа В, циркулировавших в России в 2018–2022 гг.

Ключевые слова: вирусы гриппа В, эволюционная линия, микрокультуральный иммуноферментный анализ, моноклональные антитела

DOI: 10.56304/S0234275822020053

Несмотря на достижения в профилактике и лечении гриппа, это заболевание до сих пор представляет серьезную проблему для общественного здравоохранения; при этом значимую роль в эпидеми-

ческом процессе гриппа играют вирусы гриппа В. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), вклад гриппа В в мировую заболеваемость в различные эпидемические сезоны 2010–2019 гг. составлял от 26 до 53% (<https://www.who.int/teams/global-influenza-programme/surveillance-and-monitoring/influenza-updates>).

Вирус гриппа В, серологически отличный от штаммов гриппа А, был впервые выделен в 1940 году. В середине 1980-х годов сформировались две со-

Список сокращений: НА (hemagglutinin) – гемагглютинин; NP (nucleoprotein) – нуклеопротеин вируса гриппа; а.к.о. – аминокислотные остатки; мкИФА – микрокультуральный иммуноферментный анализ; моноАТ – моноклональные антитела; ОРВИ – острая респираторная вирусная инфекция; ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией; РТГА – реакция торможения гемагглютинации.

временные эволюционные линии: Викторианская и Ямагатская, — родоначальниками которых были признаны референс-вирусы В/Виктория/2/87 и В/Ямагата/16/88. Штаммы Викторианской линии превалировали в циркуляции в 1980-е годы, в то время как вирусы, относящиеся к Ямагатской линии, доминировали в 1990-е [1]. В 2001 году вновь были выделены штаммы, подобные В/Виктория/2/87. С тех пор вирусы гриппа В обеих филогенетических линий социркулируют в человеческой популяции. Начиная с 2015 года, отмечается практически ежегодная высокая активность вирусов гриппа В, что указывает на серьезные изменения в их эволюционной и эпидемиологической динамике. В результате выраженной эволюции в период с июня 2016 года по январь 2017 года появились вирусы гриппа В Викторианской линии с делецией двух аминокислотных остатков (а.к.о.), 162–163, в антигенном сайте “головы” молекулы гемагглютинина (НА), а затем — с делецией трех остатков, 162–164 [2, 3]. Эти штаммы закрепились в человеческой популяции и циркулируют до сих пор.

Согласно данным Национального Центра ВОЗ по гриппу (при ФГБУ “НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева” Минздрава России) в Российской Федерации в эпидсезоны 2015/2016 и 2016/2017 гг. циркулировали Викторианские вирусы, подобные штамму В/Брисбен/60/2008, не имевшие еще делеций в НА. В сезон 2017/2018 гг. идентифицировали вирусы как Ямагатской, так и Викторианской линий (подобные соответственно В/Пхукет/3073/2013 и В/Брисбен/60/2008); при этом в циркуляции появились делеционные мутанты (162–163), подобные В/Колорадо/06/2017. В 2018/2019 гг. социркулировали вирусы Ямагатской (подобные В/Пхукет/3073/2013) и Викторианской (с мутацией 162–163) линий. В период с 2019 по 2022 гг. детектировали только Викторианские вирусы с делециями 162–164 в НА (подобные штамму В/Вашингтон/02/2019) (https://www.influenza.spb.ru/system/epidemic_situation/laboratory_diagnosics/). Антигенное несоответствие между циркулирующими и вакцинными вирусами стало одной из основных причин низкой эффективности гриппозных вакцин, особенно по компоненту гриппа В [4].

В соответствии с концепцией ВОЗ в области борьбы с гриппом, сформулированной на ближайшее десятилетие (<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/311184/9789241515320-eng.pdf?sequence=18&isAllowed=y>), очевидна реальность возникновения новых антигенных вариантов вируса гриппа, что определяет необходимость дальнейшего совершенствования разных форм надзора за респираторными вирусными инфекциями, а также расширения доступных методов идентификации возбудителей.

Один из методов детекции вирусов гриппа — микрокультуральный иммуноферментный анализ (мкИФА), основанный на оценке репродукции патогена в инфицированной культуре клеток с использованием вирусспецифичных моноклональных антител (моноАТ). Так, моноАТ, специфичные к вирусному белку нуклеопротеину (NP), с успехом используют в мкИФА для выявления вирусов гриппа А [5, 6]. Ранее нами показано, что применение в мкИФА моноАТ, специфичных к поверхностному белку вируса, НА, позволяет проводить субтиповую идентификацию современных вирусов гриппа А при их репродукции в культуре клеток MDCK (Madin-Darby canine kidney cells) [7].

Цель представленной работы заключалась в оценке чувствительности мкИФА для детекции и дифференциации современных вирусов гриппа В обеих эволюционных линий с помощью полученных нами ранее НА-специфичных моноАТ [8, 9].

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Клетки и вирусы

Культура клеток MDCK получена из коллекции IRR (Influenza Reagent Resource, США). Референс-штаммы вируса гриппа В были предоставлены Сотрудничающими центрами ВОЗ в Атланте (США) и Лондоне (Великобритания). Охарактеризованные штаммы, выделенные в России в 2012–2021 гг., получены из Коллекции вирусов гриппа и острых респираторных заболеваний ФГБУ “НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева” Минздрава России.

Клинический материал

Назофарингеальные образцы, полученные от больных ОРВИ из различных городов России в период с 2015 по 2021 гг., предоставлены Криобанком клинических образцов при ФГБУ “НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева” Минздрава России.

Антитела к вирусам гриппа В

В работе использованы моноАТ к вирусам гриппа В, полученные ранее в лаборатории биотехнологии диагностических препаратов ФГБУ “НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева” Минздрава России. Методики их получения, характеристика, определение эпитопной направленности с помощью секвенирования эскейп-мутантов, устойчивых к действию моноАТ, описаны ранее [8–11].

*Выделение вирусов из клинических образцов
в культуре клеток МДСК и реакция
торможения гемагглютинации (РТГА)*

Для идентификации вирусов гриппа В использовали традиционную методику, утвержденную Методическими рекомендациями [12].

*Молекулярно-генетическая
характеристика вирусов гриппа В*

Все процедуры молекулярно-генетического анализа вирусов гриппа проводили с использованием наборов реагентов АмплиСенс в соответствии с инструкциями производителя (ООО “ИнтерЛабСервис”, Россия). Для выделения тотальной РНК использовали набор АмплиСенсРИБопреп; для обратной транскрипции вирусной РНК – набор АмплиСенсReverta; для определения вирусов гриппа А и В – ПЦР в реальном времени с использованием системы АмплиСенс® Influenzavirus A/B-FL. Специфическую амплификацию последовательностей, кодирующих НА вирусов гриппа В Ямагатской и Викторианской линий, проводили из положительных по гриппу В образцов методом одноступенчатой ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) при использовании набора реагентов Ambion AgPath-ID (Thermo Fisher Scientific, США) с праймерами, рекомендованными ВОЗ (https://cdn.who.int/media/docs/default-source/influenza/global-influenza-surveillance-and-response-system/related-documents/cdc_laboratory_support_for_influenza_surveillance_info_sheet_aug2017.pdf?sfvrsn=83d8b6e3_10). Для сборки последовательностей по результатам капиллярного секвенирования использовали программное обеспечение Vector NTI Advance (Thermo Fisher Scientific). Для филогенетического анализа применяли программное обеспечение Mega6.

*Микрокультуральный иммуоферментный
анализ (мкИФА)*

В лунки 96-луночных планшетов для культуральных работ (Jet Biofil, Канада-Китай) с монослойными культурами клеток МДСК вносили по 100 мкл исследуемых вирусосодержащих материалов и культивировали в CO₂-термостате при 34°C. В качестве культуральной среды использовали alpha-МЕМ (ООО “БиолоГ”, Россия) с 0.2% бычьего сывороточного альбумина (фракция V) (Sigma, США), 0.05% аргинина (Sigma) и 2 мкг/мл ТРСК-трипсина (трипсин, обработанный L-тозиламидо-2-фенил-этилхлорметилкетон; Sigma). Через 72–96 ч инкубации из лунок удаляли культуральную среду, планшеты промывали 0.01 М фосфатно-солевым буфером (ФСБ), pH 7.2 (ООО “БиолоГ”), клетки фиксировали 80%-ным холодным ацетоном (ООО “Химмед”, Россия) в течение 20 мин. После промывки ФСБ на монослой

наносили раствор 5%-ного обезжиренного молока (ООО “Си-Продукт”, Россия) в ФСБ (ФСБ-М) в качестве блокирующего раствора и инкубировали при 37°C в течение 1 ч, после чего вносили специфичные к НА вирусов гриппа В моноАТ (100 мкл/лунку) в концентрации 5–10 мкг/мл ФСБ-М. Для контроля репродукции вирусов в культуре клеток использовали типоспецифичные моноАТ к белку NP вирусов гриппа В (моноАТ 2/3). Планшет инкубировали в течение 2 ч при 37°C, промывали ФСБ для удаления несвязавшихся антител, вносили пероксидазный конъюгат антител к IgG мыши (Sigma) в ФСБ-М (разведение 1/5000, 100 мкл/лунка) и инкубировали в течение 1 ч при 37°C, после чего отмывали и вносили раствор субстрата: 0.1 мг/мл 3.3', 5.5'-тетраметилбензидина (Sigma) с 0.02% H₂O₂ (АО “Ленреактив”, Россия) в ацетат-цитратном буфере, pH 5.0 (АО “Ленреактив”). Реакцию останавливали раствором 2N H₂SO₄ (ОАО “Реактив”, Россия), измеряли оптическую плотность при длине волны 450 нм (OD₄₅₀) на фотометре Multiskan MS (Lab-systems, Финляндия). Положительными по репродукции вируса считали пробы, в которых значения OD₄₅₀ превышали установленные пороговые значения не менее чем в 2.5 раза.

Статистическая обработка результатов

Для сравнения двух выборок по частоте выявления признаков использовали критерий χ^2 . Проверяемые критериями нулевые гипотезы отвергались при уровне значимости $p > 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Учитывая дивергентный характер эволюции вирусов гриппа В, на первом этапе исследования необходимо было провести отбор моноАТ, наиболее перспективных для детекции и идентификации методом мкИФА современных циркулирующих штаммов. Ранее были получены и охарактеризованы панели моноАТ к вирусам Ямагатской линии (моноАТ 5B11, 5F11, 4E11, 3C2, 3B12, 2B10, 1G4, вирус-иммуноген В/Массачусетс/02/2012) и Викторианским штаммам (моноАТ 5B7 и В/4Н1, вирус-иммуноген В/Шандонг/7/1997, а также моноАТ 10D9, 7D9, 10F1, 7G9, 8A8, 10D6, 9B5 к вирусу В/Брисбен/46/2015). Все указанные моноАТ были направлены к эпитомам субъединицы NA1 вирусов гриппа В соответствующей линии, обладали вируснейтрализующей активностью и ингибировали реакцию гемагглютинации [8–10].

Все перечисленные моноАТ использованы и проанализированы в методе мкИФА для детекции вирусов гриппа В в 192 ПЦР-положительных клинических образцах, полученных от больных ОРВИ в 2015–2020 гг. В 60 из них методом ОТ-ПЦР

Таблица 1. Детекция вирусов гриппа В Ямагатской и Викторианской линий методом мКИФА с использованием панели моноАТ**Table 1.** Detection of influenza B viruses of Yamagata and Victorian lineages by cell-ELISA with using the monoclonal antibodies (mAbs)

Вирусы гриппа В	Время сбора материала (эпидсезон)	Число проб	МоноАТ ^а	Частота обнаружения вирусов, %
Ямагатская линия	2017/2018 гг.	60	2/3	81.7
			5B11	61.7
			5F11	26.7
			4E11	16.7
			3C2	21.7
			3B12	11.7
			2B10	25.0
			1G4	30.0
Викторианская линия	2015/2016 гг. 2016/2017 гг. 2017/2018 гг.	75	2/3	58.7
			5B7	70.7
			B/4H1	58.7
			10D9	9.3
			7D9	42.6
			10F1	н.а. ^б
			7G9	н.а.
			8A8	н.а.
	10D6	н.а.		
	9B5	н.а.		
	2019/2020	57	2/3	35.1
			5B7	45.6
			B/4H1	н.а.
			10D9	6.8
			7D9	33.3
			10F1	28.1
7G9			26.3	
8A8			29.8	
10D6	19.3			
9B5	0			

Примечание: ^амоноАТ 2/3 направлены против белка NP, все остальные – против субъединицы HA1 вирусов гриппа В; ^б н.а. – не анализировали.

Note: ^аmonoclonal antibody (MAb) 2/3 is directed against the NP protein, all others are directed against the HA1 subunit of influenza B viruses; ^б n.a. – not analyzed.

были идентифицированы вирусы Ямагатской линии, в 132 – Викторианской. Чувствительность мКИФА варьировала в зависимости от введенных в реакцию моноАТ. С наибольшей частотой вирусы Ямагатской и Викторианской линий детектировали при использовании моноАТ 5B11 и 5B7 соответственно, их рабочие концентрации составили 5–10 мкг/мл (табл. 1).

Все HA-специфичные моноАТ реагировали в мКИФА только с вирусами гриппа В гомологичной линии. Для контроля репродукции вирусов

одновременно использовали типоспецифичные моноАТ 2/3 к NP-белку вирусов гриппа В, которые активно реагировали с вирусами обеих эволюционных линий.

Таким образом, использование в мКИФА NP-специфичных моноАТ 2/3 позволяет идентифицировать именно вирусы гриппа В, а моноАТ, направленных к HA, – дифференцировать эволюционную линию этих вирусов.

В процессе отработки варианта мКИФА с использованием выбранных моноАТ 5B11 и 5B7 бы-

Таблица 2. Сравнение чувствительности методов детекции вирусов гриппа В в клинических образцах
Table 2. Sensitivity of methods for detection of influenza B viruses in clinical samples

Вирусы гриппа В	Время сбора материала	Референс-штамм	Число образцов	Частота обнаружения вируса, %		
				РТГА	мКИФА с моноАТ	
					к NP ^a	к HA1 ^b
Ямагатская линия	Февраль–апрель 2018 г.	В/Пхукет/3073/2013	60	95.0*	81.7	61.7*
Викторианская линия	Январь–март 2016 г.	В/Брисбен/60/2008	75	80.0**	58.7**	70.7
	Март–апрель 2017 г.	В/Брисбен/60/2008				
	Февраль–март 2018 г.	В/Брисбен/60/2008				
	Февраль–март 2020 г.	В/Вашингтон/02/2019	42	35.7***	40.5***	59.5***

Примечание: ^a NP-специфичные моноАТ 2/3, ^b HA-специфичные моноАТ 5B11 или 5B7 для вирусов Ямагатской или Викторианской линий соответственно. * $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.05$.

Note: ^a NP-specific MAb 2/3, ^b HA-specific MAb 5B11 or 5B7 for influenza B viruses of the Yamagata or Victoria lineage, respectively. * $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.05$.

ли установлены пороговые значения оптической плотности (OD_{450}) для достоверной детекции анализируемых вирусов. Прежде всего, определили показания для отрицательных контролей ($K_{отр}$) – 20 образцов, содержащих вирусы гриппа В гетерологичной линии, – для чего использовали ранее выделенные и охарактеризованные штаммы. Средние значения OD_{450} для $K_{отр}$ составили 0.095 ± 0.018 и 0.097 ± 0.017 для вирусов гриппа В Ямагатской и Викторианской линий соответственно. Для положительных проб были приняты пороговые значения, превышающие значения OD_{450} для $K_{отр}$ не менее чем в 2.5 раза.

Эффективность варианта мКИФА с использованием моноАТ 5B11 и 5B7 дополнительно проанализирована на 177 клинических образцах в сравнении с традиционным вирусологическим методом: выделением вируса гриппа в культуре клеток MDCK с последующим определением принадлежности штамма к эволюционной линии в РТГА с использованием соответствующих штаммспецифичных иммунных сывороток животных. Все проанализированные пробы были отобраны как положительные и предварительно охарактеризованы по принадлежности к определенной эволюционной линии методом ОТ-ПЦР (табл. 2).

Частота типовой детекции в мКИФА вирусов гриппа В Ямагатской линии с использованием NP-специфичных моноАТ 2/3 была сопоставима с полученной при анализе выделенных штаммов в РТГА ($p > 0.05$). В то же время при идентификации принадлежности к конкретной линии мКИФА с HA-специфичными моноАТ к вирусу гриппа В Ямагатской линии оказался менее чувствительным, чем РТГА с поликлональной иммунной сывороткой к вирусу В/Пхукет/3073/2013. Что касается более изменчивых Викторианских штаммов, то чувствительность проанализированных методов

зависела от времени циркуляции патогена. При типовой детекции вирусов в пробах, собранных в 2016–2018 гг., мКИФА значимо уступал в чувствительности РТГА, в то время как при идентификации линии результаты были сопоставимы. Частота выявления современных вирусов, циркулировавших в сезон 2019/2020 гг., уступала таковой для Викторианских вирусов, изолированных раньше. Для метода РТГА эти отличия были значимы (80.0% против 35.7%, $p < 0.0001$); при этом методом мКИФА вирусы, циркулировавшие в 2020 году, идентифицировали чаще, чем при использовании традиционного метода (59.5 против 35.7%, $p < 0.05$) (табл. 2).

Учитывая выраженный антигенный дрейф возбудителей, нам было интересно оценить широту взаимодействия выбранных моноАТ 5B11 и 5B7 с современными вирусами гриппа В. С этой целью в мКИФА проанализировали 91 штамм вирусов гриппа В, полученных из Музейной коллекции вирусов гриппа и острых респираторных заболеваний НИИ гриппа. Вирусы были выделены в различных городах Российской Федерации из клинических образцов, охарактеризованы в НИИ гриппа генетически и антигенно методами секвенирования и РТГА соответственно. Тридцать семь штаммов 2012–2019 гг. принадлежали к Ямагатской линии, 54 Викторианских вируса циркулировали в 2015–2021 гг.

На рис. 1 и 2 представлены выборочные результаты мКИФА по детекции и идентификации референсных штаммов и отечественных изолятов с использованием моноАТ. Контролем репродукции вирусов в культуре клеток служили моноАТ 2/3. МоноАТ 5B11 эффективно взаимодействовали со всеми проанализированными Ямагатскими штаммами, которые относились не только к генетической группе Y2 (подобные В/Массачусетс/2/2012, вирусу-иммуногену для

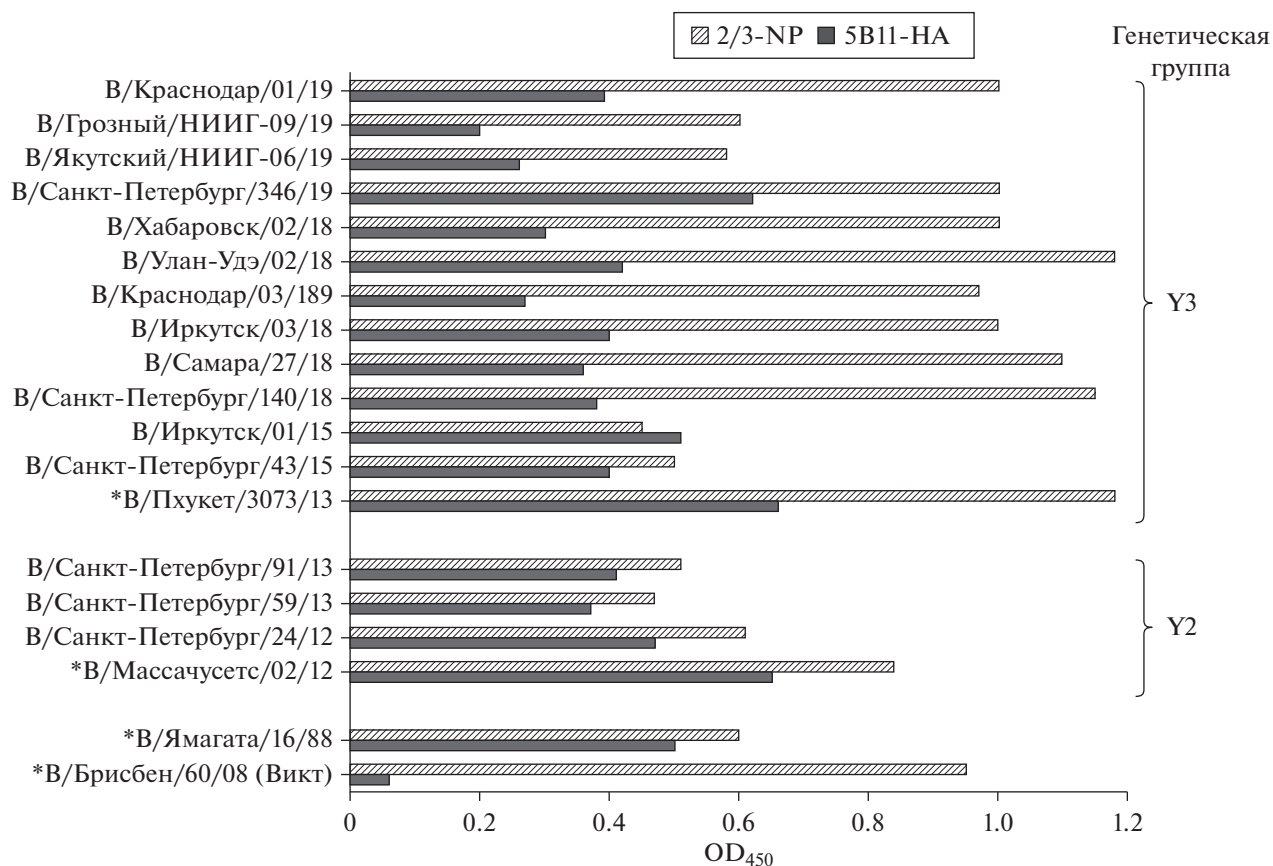


Рис. 1. Взаимодействие НА-специфичных моноАТ 5В11 с вирусами гриппа В Ямагатской линии различных генетических групп (под контролем репродукции вирусов по взаимодействию с NP-специфичными моноАТ 2/3). * – референс-штаммы.

Fig. 1. Interaction of HA-specific MAb 5B11 with influenza B/Yamagata viruses of different genetic groups (under the control of virus reproduction by interaction with NP-specific MAb 2/3). * – reference strains.

данных моноАТ), но также с более поздними вирусами из группы Y3 (референс-вирус В/Пхукет/3073/2013) (рис. 1).

В формате мКИФА для моноАТ 5В7 выявлен широкий спектр взаимодействия с Викторианскими вирусами, циркулировавшими в Российской Федерации в 2017–2021 гг. и относящимися к различным генетическим группам, включая современные делеционные варианты (рис. 2).

Возможность дифференциального выявления вирусов Ямагатской и Викторианской линий в мКИФА с помощью выбранных моноАТ обусловлена особенностями их взаимодействия с молекулой НА. Так, в глобулярном домене молекулы НА1 вируса гриппа В выделяют 4 основные антигенные детерминанты: петля-120 (116–137 а.к.о.), петля-150 (141–150 а.к.о.), петля-160 (162–167 а.к.о.), спираль-190 (194–202 а.к.о.) [13]. Многие позиции в этих регионах подвержены позитивной селекции, но степень изменчивости одних и тех же позиций у вирусов двух эволюционных линий может сильно различаться [14].

Петля-120 играет важную роль в стабилизации структуры НА. Ранее показано, что для использованных нами моноАТ при связывании с НА вирусов гриппа В критичны а.к.о. именно этого региона: аргинина в позиции 136 (R136) для моноАТ 5В11 и гистидина в позиции 122 (H122) для моноАТ 5В7 [8, 10]. Важно отметить, что H122 консервативен среди подавляющего большинства Викторианских вирусов, в то время как у Ямагатских штаммов гистидин в этой позиции выявляли в единичных случаях. В свою очередь, R136 идентифицирован в НА 98% штаммов Ямагатской линии и только в 1% Викторианских вирусов [15].

Интерес вызывают результаты, полученные для моноАТ 9В5 в мКИФА: высокая эффективность связывания с Викторианскими штаммами из генетической группы 1А, выделенными в 2015–2018 гг. Однако это антитело практически не взаимодействовало с вирусами из генетических групп 1А(Δ2) с делецией 162–163 и 1А(Δ3) с делецией 162–164 в молекуле НА, которые появились в циркуляции в 2016 году (рис. 2).

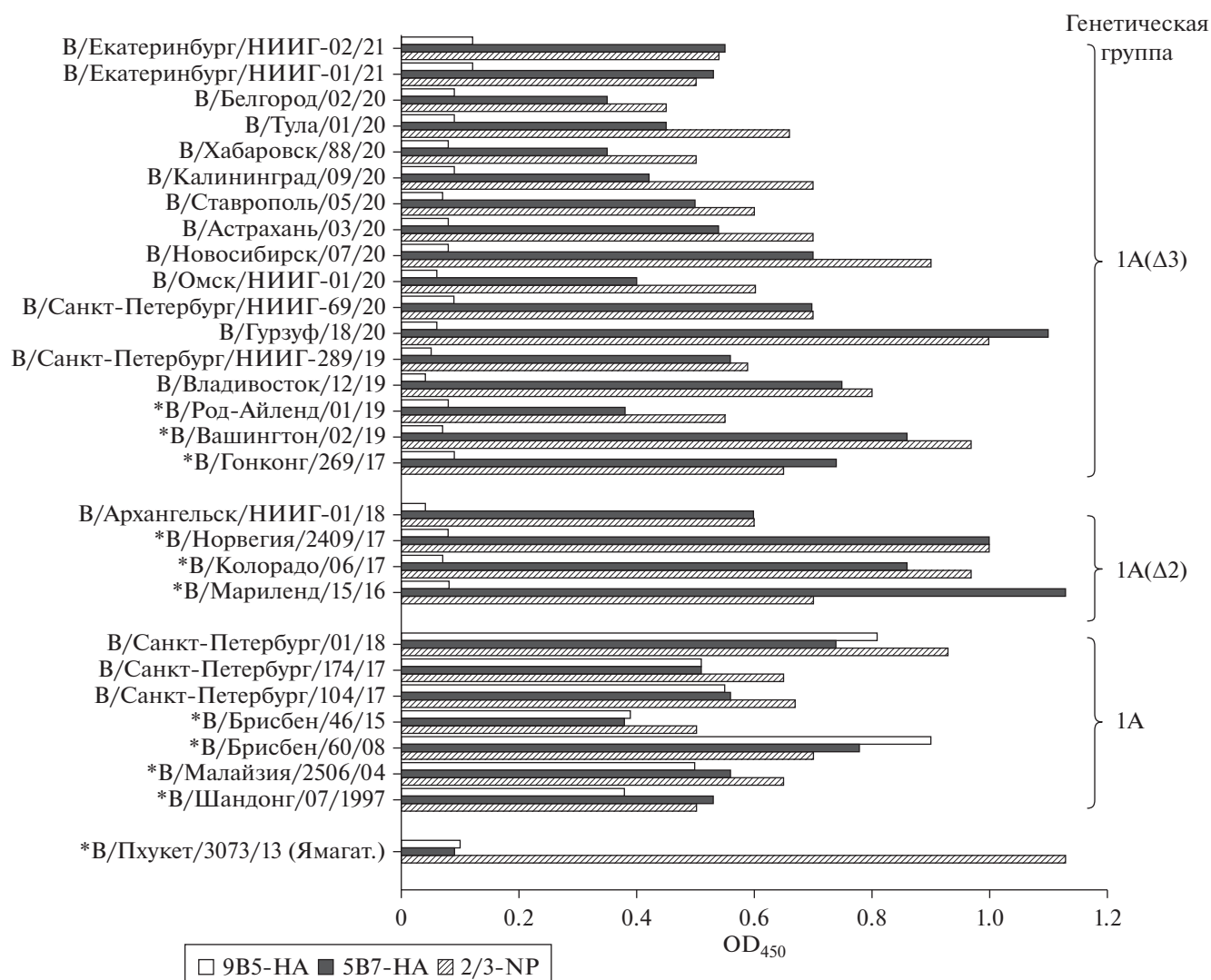


Рис. 2. Взаимодействие НА-специфичных моноАТ 5B7 и 9B5 с вирусами гриппа В Викторианской линии различных генетических групп (под контролем репродукции вирусов по взаимодействию с NP-специфичными моноАТ 2/3. * – референс-штаммы.

Fig. 2. Interaction of HA-specific MAb 5B7 and 9B5 with influenza B/Victoria viruses of different genetic groups (under the control of virus reproduction by interaction with NP-specific MAb 2/3). * – reference strains.

По данным ПЦР, все клинические образцы, собранные в 2019/2020 гг. и проанализированные в мКИФА, содержали вирусы Викторианской линии, принадлежавшие к группе 1A(Δ3). Как видно из данных, приведенных в табл. 1, моноАТ 9B5 не взаимодействовали ни с одним из этих изолятов, в отличие от моноАТ 5B7. На основании этих результатов можно предполагать, что узнаваемый моноАТ 9B5 эпитоп НА включает область 162–164 а.к.о., которая отсутствует у современных вирусов Викторианской линии. Следовательно, при совместном использовании двух моноАТ: 9B5 и 5B7 – можно выявлять делеционные варианты Викторианских вирусов.

Как отмечено выше, преимущество мКИФА в сравнении с РТГА состоит в повышенной чувствительности при идентификации Викторианских вирусов, циркулировавших в России в последние два эпидсезона (табл. 2). Причиной могут быть изменения в структуре НА современных вирусов гриппа В. Так, показано, что у Викторианских вирусов, циркулировавших в период 1997–2016 гг., позиции 136 и 150 в молекуле НА были строго консервативны [14]. Однако осенью 2018 года впервые были выделены штаммы из группы 1A(Δ3) с мутациями K136E + N150K, которые генетически отличались от ранее циркулировавших вирусов как из группы 1A(Δ2) (136K + 150N), так и из группы 1A(Δ3) (136E + 150N) [16, <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/influenza-char>

acterisation-report-july-2021.pdf]. Среди Викторианских вирусов, циркулировавших в различных регионах мира, включая Россию, в 2020–2021 гг. преобладали штаммы, характеризовавшиеся мутациями K136E + N150K (<https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/influenza-characterisation-report-july-2021.pdf>; <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Influenza-a-characterisation-report-Oct-2021-RE.pdf>). Антигенно изоляты 2020–2021 гг. сильно отличались от вирусов группы 1A(Δ3), подобных штамму В/Вашингтон/02/2019 (136E + 150N), и не взаимодействовали с иммунными сыворотками, полученными к этому референс-вирусу, что затрудняло их идентификацию в РТГА (<https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Influenza-a-characterisation-report-February-2021.pdf>; <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Influenza-characterisation-report-Septemb-er-2021.pdf>). Российские вирусы, выделенные весной 2021 года, в том числе В/Екатеринбург/НИИГ-01/2021 и В/Екатеринбург/НИИГ-02/2021, также относились к новой группе K136E + N150K (<https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/influenza-characterisation-report-july-2021.pdf>). По нашим данным, эти вирусы реагировали в РТГА с иммунными диагностическими сыворотками крыс, полученными к штаммам В/Колорадо/06/2017 и В/Вашингтон/02/2019, лишь до титров 1/10–1/20 (до 1/16–1/32 от титров, показанных для гомологичных штаммов). Однако современные вирусы Викторианской линии четко выявлялись в культуре клеток МДСК в мКИФА с моноАТ 5В7 (рис. 2).

Таким образом, предложенный вариант мКИФА позволяет выявлять в культуре клеток МДСК широкий спектр вирусов гриппа В и определять их принадлежность к определенной эволюционной линии с помощью НА-специфичных моноАТ 5В11 и 5В7, а также дифференцировать делеционные варианты Викторианских вирусов при дополнительном использовании моноАТ 9В5.

При детекции современных вирусов Викторианской линии чувствительность мКИФА превышала классический вирусологический метод идентификации вирусов гриппа в РТГА с помощью иммунных поликлональных сывороток животных, хотя РТГА с использованием широкого набора штаммспецифических сывороток остается классическим методом изучения антигенных особенностей вирусов гриппа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lin Y.P., Gregory V., Bennett M., Hay A. Recent changes among human influenza viruses. *Virus Res.*, 2004, 103(1–2), 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2004.02.011>
2. Koutsakos M., Nguyen T.H., Barclay W.S., Kedzierska K. Knowns and unknowns of influenza B viruses. *Future Microbiol.*, 2016, 11(1), 119–135. <https://doi.org/10.2217/fmb.15.120>
3. Virk R.K., Jayakumar J., Mendenhall I.H., et al. Divergent evolutionary trajectories of influenza B viruses underlie their contemporaneous epidemic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2020, 117(1), 619–628. <https://doi.org/10.1073/pnas.1916585116>
4. Belongia E.A., Skowronski D.M., McLean H.Q., et al. Repeated annual influenza vaccination and vaccine effectiveness: review of evidence. *Expert. Rev. Vaccines*, 2017, 16(7), 723–736. <https://doi.org/10.1080/14760584.2017.1334554>
5. 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. <https://doi.org/10.1128/JCM.03575-13>
6. 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. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.11.060>
7. Кривицкая В.З., Соминина А.А., Майорова В.Г. и др. Детекция и субтипная дифференциация современных вирусов гриппа (H1N1)pdm09 и A(H3N2) микрокультуральным иммуноферментным анализом с использованием новых моноклональных антител. *Биотехнология*, 2018, 34(5), 48–56. <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2018-34-5-48-56>
8. Соминина А.А., Сорокин Е.В., Царева Т.Р. Новые моноклональные антитела для диагностики гриппа и других ОРВИ. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*, 2015, 14(5), 72–76. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2015-14-5-72-76>
9. Сорокин Е.В., Царева Т.Р., Желтухина А.И. Моноклональные антитела к гемагглюнину вирусов гриппа В Викторианской эволюционной линии. *Вопросы вирусологии*, 2018, 63(6), 275–280. <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-6-275-280>
10. Сорокин Е.В., Царева Т.Р., Соминина А.А. и др. Эпитопный анализ молекулы гемагглюнина вирусов гриппа В Викторианской линии. *Вопросы вирусологии*, 2014, 59(6), 27–31.
11. Sorokin E., Tsareva T., Komissarov A., et al. Neutralizing epitopes in receptor binding site of hemagglutinin influenza B viruses Yamagata lineage. International conference “Trends in Influenza Research”, Saint-Petersburg, September 18–20, 2017, Abstract book, 140–141. <https://www.influenza.spb.ru/files/conf/flutrends-2017/flutrends-2017-abstracts.pdf>
12. Соминина А.А., Бурцева Е.И., Лобова Т.Г. и др. Выделение вирусов гриппа в клеточных культурах и куриных эмбрионах и их идентификация. Методические рекомендации, Санкт-Петербург, 2006, 1–20. <https://docs.cntd.ru/document/420214503>

13. Wang Q., Cheng F., Lu M., et al. Crystal structure of unliganded influenza B virus hemagglutinin. *J. Virol.*, 2008, 82, 3011–3020. <https://doi.org/10.1128/JVI.02477-07>
14. Suptawiwat O., Ninpan K., Boonarkart C., et al. Evolutionary dynamic of antigenic residues on influenza B hemagglutinin. *Virology*, 2017, 502, 84–96. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.12.015>
15. Ni F., Kondrashkina E., Wang Q. Structural basis for the divergent evolution of influenza B virus hemagglutinin. *Virology*, 2013, 446(1–2), 112–122. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.07.035>
16. Xie H., Xiang R., Wan H.J., et al. Reduced influenza B-specific postvaccination antibody cross-reactivity in the B/Victoria lineage-predominant 2019/20 season. *Clin. Infect. Dis.*, 2021, 72(11), e776–e783. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1481>

Detection and Differentiation of Current Influenza B Viruses by Microculture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Monoclonal Antibodies

V. Z. Krivitskaya^{a, #, ##}, V. G. Mayorova^a, E. V. Sorokin^a, T. R. Tsareva^a,
M. M. Pisareva^a, A. I. Zheltukhina^a, E. R. Petrova^a, E. V. Kuznetsova^a,
R. A. Kadyrova^a, D. M. Danilenko^a, and A. A. Sominina^a

^aSmorodintsev Research Institute of Influenza, Ministry of Health
of the Russian Federation, Saint Petersburg, 197376, Russia

[#]e-mail: vera.kriv@influenza.spb.ru

^{##}e-mail: krivitskayavera@yandex.ru

Abstract—To detect and differentiate current influenza B viruses of both evolutionary lines, the sensitivity of a new variant of microcultural enzyme immunoassay (cell-ELISA) was assessed using 16 monoclonal antibodies (MAbs) specific to hemagglutinin of influenza B viruses. Nasopharyngeal samples from patients with acute respiratory viral infections were analyzed. The cell-ELISA was tested for the detection of influenza B viruses in 192 PCR-positive clinical samples. The highest sensitivity in detection and differentiation of influenza B viruses of the Yamagata and Victoria evolutionary lineages was shown for 5B11 and 5B7 MAbs, respectively. The detection of Yamagata influenza B viruses with cell-ELISA in PCR-positive clinical samples obtained in 2018 showed a lower sensitivity (61.7%) compared to traditional methods — isolation of viruses in cell culture with subsequent determination of their belonging to the evolutionary lineage in hemagglutination inhibition test (HIT) using strain-specific immune sera of animals (95.0%). The sensitivity of cell-ELISA while detecting the more variable Victoria viruses depended on the pathogen circulation time. The level of virus identification in samples collected in 2016–2018 was comparable for cell-ELISA and the traditional method (71–80%). Some of the current viruses circulating in 2020–2021 did not interact with immune sera obtained to the corresponding reference strains, which made it difficult to identify them by HIT. Thus, the viruses circulating at that time were identified with a higher frequency using cell-ELISA than by isolation and subsequent HIT (59.5 versus 35.7%, $p < 0.05$). In addition to the identification of the evolutionary lineage, the use of MAb 9B5 in the cell-ELISA made it possible to detect deletion variants of the Victoria influenza B viruses circulating in Russia in 2018–2022.

Keywords: influenza B viruses, evolutionary lineages, microculture enzyme-linked immunosorbent assay, monoclonal antibodies