

УДК 578.832.1

## МЕТОД ЛАТЕКСНОЙ АГГЛЮТИНАЦИИ КАК АЛЬТЕРНАТИВА РЕАКЦИИ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ ВИРУСОВ ГРИППА

© 2023 г. П. А. Иванов<sup>a, b, \*</sup>, А. В. Ляшко<sup>a</sup>, С. А. Ионов<sup>a, c</sup>, Д. В. Щербинин<sup>a</sup>, И. А. Руднева<sup>a</sup>, А. А. Шилов<sup>a</sup>, Н. И. Бунькова<sup>a</sup>, М. М. Шмаров<sup>a, d</sup>, Т. А. Тимофеева<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Федеральный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи  
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 123098 Россия

<sup>b</sup>Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского Российской академии наук, Москва, 125047 Россия

<sup>c</sup>Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Москва, 117312 Россия

<sup>d</sup>Первый Московский государственный университет им. И.М. Сеченова  
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 101000 Россия

\*e-mail: ivanovpa@mail.ru

Поступила в редакцию 05.12.2022 г.

После доработки 16.01.2023 г.

Принята к публикации 12.02.2023 г.

Для выявления и титрования вирусов гриппа А и В в качестве альтернативы классическому методу гемагглютинации эритроцитов разработана методика реакции агглютинации латекса, основанная на взаимодействии вирусов гриппа с сиалогликопротеином фетуином, иммобилизованным на поверхности полистирольных микросфер. Исследовано 12 штаммов вирусов гриппа А, относящихся к различным подтипам, и два вируса гриппа В разных линий. При одновременном титровании вирусов с помощью классической реакции гемагглютинации и предлагаемой реакции латексной агглютинации показана сходная чувствительность и высокая степень корреляции ( $R = 0.94$ ) между двумя этими методами. Полученные микросферы могут быть использованы для титрования и других вирусов, рецепторами которых служат сialiрированные гликаны. Так, агрегацию латекса индуцировал вирус болезни Ньюкасла.

**Ключевые слова:** вирусы гриппа, микросферы, фетуин, реакция латексной агглютинации, гемагглютинин, рецепторсвязывающая специфичность

**DOI:** 10.31857/S0026898423040092, **EDN:** QLOTLJ

Для ряда вирусов, таких как арбовирусы, вирусы гриппа и парагриппа, полиомиелита и краснухи, было показано связывание с эритроцитами крови [1]. Впервые это явление описал американский вирусолог George Hirst для вируса гриппа А, обнаружив, что вируссодержащая аллантоисная жидкость вызывала агглютинацию эритроцитов крови, вытекающей из поврежденных сосудов куриного эмбриона [2]. Позднее этим же автором были предложены методики проведения реакции гемагглютинации (РГА) и реакции торможения гемагглютинации (РТГА) [3]. В силу воспроизводимости и дешевизны эти реакции до сих пор остаются “золотым стандартом” для определения титра вируса и нейтрализующих антител вирусов

гриппа. К недостатку обеих реакций относится необходимость использования свежих эритроцитов, то есть требуется постоянное наличие доноров крови (птиц, морских свинок, человека и др.). Также использование РГА невозможно в условиях, вызывающих лизис эритроцитов (физико-химические факторы, такие как повышенная температура и отличающийся от физиологического рН среды).

Возможной альтернативой РГА может быть реакция латексной агглютинации (РЛА), в которой используют суспензию полимерных микросфер (латекс). Этот метод широко применяется для качественного и полуколичественного выявления различных патогенов [4–7]. Все существующие системы выявления инфекционных агентов в РЛА основаны на взаимодействии антиген–антитело: на поверхности полимерных микросфер иммобилизуют антитела и их взаимодействие с антигеном вызывает агрегацию микросфер. В частности, в описанной Chen с соавт. [8] системе

Сокращения: AdV5 (adenovirus serotype V) – аденовирус V серотипа; NDV (Newcastle disease virus) – вирус болезни Ньюкасла; Neu5Ac (*N*-acetylneuraminic acid) – *N*-ацетилнейраминная кислота; ГАЕ – гемагглютинирующая единица; ЛАЕ – латексагглютинирующая единица; РГА – реакция гемагглютинации; РЛА – реакция латексной агглютинации; ФСБ – фосфатно-солевой буфер.

РЛА для качественного выявления вирусов гриппа А, содержащих гемагглютинин подтипа 5 (H5), использованы антитела к этому белку, иммобилизованные на микросферах. Универсальной системы РЛА для выявления вирусов гриппа, различающихся подтипом гемагглютинина, до сих пор не было.

Известно, что рецептором вируса гриппа служат остатки сиаловой кислоты, терминирующей полисахаридные цепи гликозилированных белков клеточной мембраны [9]. Мы предположили, что полимерные микросферы, на поверхности которых иммобилизован один из таких сиалогликопротеинов, можно использовать в РЛА для выявления любых вирусов гриппа разных подтипов. В качестве такого сиалогликопротеина мы выбрали фетуин, взаимодействие с которым давно показано как для вирусов гриппа А различных подтипов, так и для вирусов гриппа В [10–12]. Ранее были попытки использовать фетуин, ковалентно присоединенный к микросферам, для выявления нейраминидазной активности вирусов гриппа [13], хотя распространения этот метод не получил.

В представленной работе приведена методика иммобилизации фетуина на поверхности полистирольных микросфер и продемонстрирована возможность их использования в РЛА для оценки гемагглютинирующей активности вирусов гриппа разных подтипов.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Вирусы.** Вирусы гриппа A/gull/Moscow/3100/2006 (H6N2) и A/chicken/NJ/294598-12/2004 (H7N2) были любезно предоставлены доктором А.С. Гамбарян (Федеральный научный центр исследований и разработки иммунологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, Москва). Штамм A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) был любезно предоставлен доктором Л.Г. Руденко (ФГБНУ “Институт экспериментальной медицины”, Санкт-Петербург). Вирус гриппа A/duck/Moscow/4182C-MA/2010 (H5N3) был ранее получен в лаборатории физиологии вирусов ФГБУ “ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи” Минздрава России [14]. Остальные вирусы получены из Государственной коллекции вирусов ФГБУ “НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи” Минздрава России.

Вирусы гриппа A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) (вариант Mount Sinai), A/mallard/Pennsylvania/10218/84-MA (H5N2), A/Aichi/2/1968 (H3N2), A/chicken/NJ/294598-12/2004 (H7N2), A/swine/Hong Kong/9A-1/1998 (H9N2), A/Moscow/01/09 (H1N1)pdm09, A/gull/Moscow/3100/2006 (H6N2), A/duck/Moscow/4182C-MA/2010 (H5N3), A/duck/Moscow/4970-MA/2013 (H1N1), A/Leningrad/134/17/57 (H2N2), A/Darwin/9/2021 (H3N2) и вирус болезни Ньюкасла (NDV) штамм NDV-H культивировали в 10-дневных куриных эмбрионах, которые

заражали в аллантоисную полость с множественностью 1000 ЭИД<sub>50</sub> на эмбрион. После инкубации в течение 48 ч при 37°C (для вируса A/Leningrad/134/17/57 при 33°C) зараженные эмбрионы охлаждали в течение 12 ч при 4°C и отбирали вирусосодержащую аллантоисную жидкость.

Дополнительно вирус гриппа A/Moscow/01/09 (H1N1)pdm09 культивировали на клетках линии MDCK, которые заражали с множественностью 100 культуральных инфекционных доз (TCID<sub>50</sub>) на 10<sup>6</sup> клеток. Зараженные клетки инкубировали в среде MEM без сыворотки с добавлением 1 мг/мл ТРСК-трипсина при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Размножение вируса контролировали визуально по развитию цитопатического действия. Среду, содержащую вирус, отбирали через 48 ч.

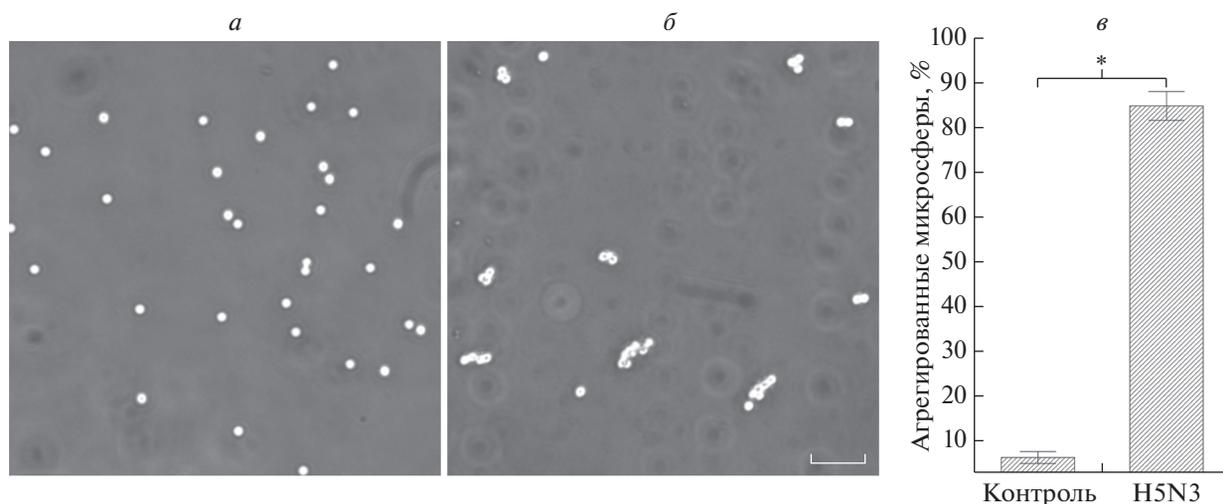
Вирусы гриппа B/Phuket/3073/2013 (Ямагатская эволюционная линия) и B/Washington/02/2019 (Викторианская эволюционная линия) аналогично культивировали в 10-дневных куриных эмбрионах. После инкубации в течение 72 ч при 34°C зараженные эмбрионы охлаждали в течение 12 ч при 4°C и отбирали вирусосодержащую аллантоисную жидкость.

Аденовирус человека серотипа 5 (AdV5) накапливали в культуре клеток линии 293Т. К монослою клеток с конфлюэнтностью 50–70% добавляли лизат клеток линии 293Т, зараженных аденовирусом. Развитие инфекции контролировали по наступлению цитопатического действия. Инфицированные клетки концентрировали низкоскоростным центрифугированием, суспендировали в буфере, содержащем 0.01 М Трис-НСl, рН 8.0, 0.01 М NaCl, 5 мМ EDTA, и разрушали с помощью трехкратного замораживания–оттаивания. Полученную суспензию центрифугировали при 2 000 об/мин в течение 10 мин при 4°C, осадок удаляли. Вирионы, находящиеся в надосадочной жидкости, очищали ультрацентрифугированием в градиенте плотности хлорида цезия.

Препараты вирусов хранили при температуре –80°C.

**Реакция гемагглютинации.** В лунках круглодонного планшета делали двукратные разведения вирусосодержащей аллантоисной или культуральной жидкости в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) и добавляли равный объем 0.75%-ных куриных эритроцитов. Планшеты помещали в холодильник при 4°C на 20–30 мин. Титр вируса выражали в гемагглютинирующих единицах (ГАЕ), соответствующих обратной величине последнего разведения, при котором наблюдали агглютинацию эритроцитов [15].

**Иммобилизация фетуина на поверхности латексных микросфер.** Ниже представлен протокол получения иммобилизованных фетуином микросфер.



**Рис. 1.** Агглютинация микросфер вирусом гриппа A/duck/Moscow/4182C-MA/2010 (H5N3). Покрытые фетуином микросферы после инкубации с незараженной аллантаической жидкостью (а) и с вирусом гриппа (б). Масштабная линейка – 10 мкм. в – Доля агрегированных микросфер после инкубации с незараженной аллантаической жидкостью (контроль) и с вирусом гриппа (H5N3). \* $p < 0.001$ .

1. Полистирольные микросферы (“Панэко”, Россия) дважды промывали ФСБ (рН 7.2–7.6) с последующим центрифугированием при 10000 g в течение 1 мин.

2. Готовили 1%-ный раствор фетуина на ФСБ.

3. Ресуспендировали осадок микросфер в растворе фетуина из расчета 1 мл раствора белка на  $1 \times 10^9$  полистирольных микросфер и инкубировали при комнатной температуре при постоянном перемешивании 1 ч.

4. Полученную суспензию центрифугировали при 10000 g в течение 1 мин, не менее двух раз, промывали и ресуспендировали в ФСБ в концентрации  $1 \times 10^8$  частиц/мл.

5. Для предотвращения бактериальной контаминации в суспензию микросфер добавляли тиомерсал до концентрации 0.005%. Суспензию хранили при 4°C.

**Обработка нейраминидазой.** Суспензию, содержащую  $1.0 \times 10^7$  покрытых фетуином микросфер, осаждали центрифугированием и ресуспендировали в буфере MES (2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты), рН 4.2. Нейраминидазу (0.2 U) из *Clostridium perfringens* (“Sigma”, США), растворенную в том же буфере, добавляли к суспензии микросфер и инкубировали в течении 1 ч при 37°C. Микросферы осаждали центрифугированием и ресуспендировали в ФСБ. В качестве контроля использовали покрытые фетуином микросферы, которые инкубировали в буфере MES, рН 4.2, в тех же условиях.

**Реакция латексной агглютинации (РЛА).** Ниже приведен оптимизированный протокол РЛА.

1. Смешивали 10 мкл суспензии иммобилизованных фетуином полистирольных микросфер с 10 мкл вирусосодержащего образца и инкубировали при 4°C в течение 1 ч.

2. Добавляли равный объем 6%-ного раствора параформальдегида, приготовленного на ФСБ, и инкубировали 10 мин при комнатной температуре.

3. Результат оценивали методом фазово-контрастной микроскопии.

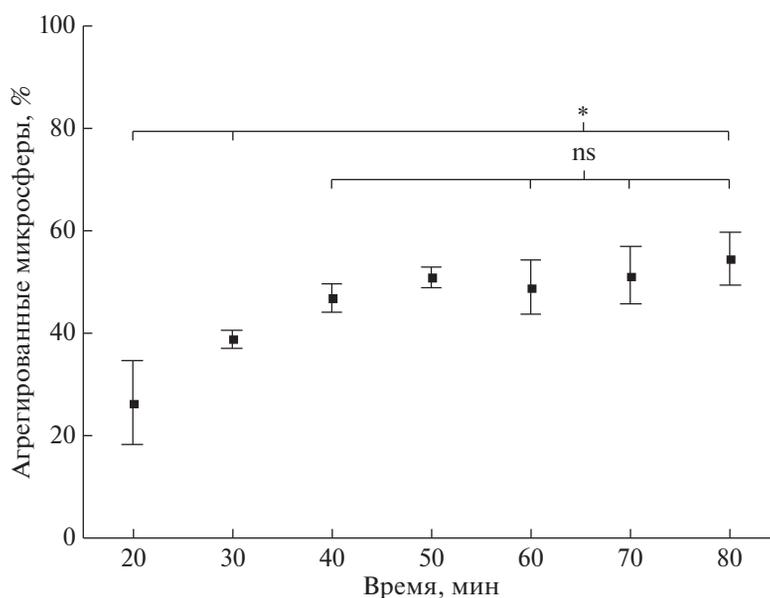
Для регистрации результатов анализа использован световой микроскоп Eclipse TS100 (“Nikon”, Япония), оснащенный камерой CMOS USB (“ZZCAT” или “IS300”, Китай) для захвата изображения с соответствующим программным обеспечением. Для каждой экспериментальной точки делали от 3 до 5 микрофотографий.

**Анализ и обработка изображений.** Анализ и редактирование изображений выполнен в программе ImageJ (США). На микрофотографиях подсчитывали число индивидуально расположенных микросфер, а также агрегатов, содержащих две или более микросферы. Относительное число агрегированных микросфер определяли по формуле:  $100 \times (\text{число агрегированных микросфер} / \text{общее число микросфер})$ .

**Статистический анализ.** Данные представлены как среднее  $\pm$  среднеквадратичное отклонение. Для проверки достоверности отличий между выборками использовали критерий Стьюдента, для проверки корреляции – критерий Спирмена.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

После инкубации покрытых фетуином микросфер с аллантаической жидкостью из незараженного



**Рис. 2.** Зависимость доли агрегированных покрытых фетуином микросфер от времени инкубации с вирусом гриппа A/duck/Moscow/4182C-MA/2010 (H5N3). \* $p < 0.05$ , ns — отсутствие достоверной разницы.

эмбриона (отрицательный контроль) обнаружено, что большая часть микросфер находится в виде индивидуальных частиц. В скоплениях наблюдали  $6.5 \pm 1.4\%$  микросфер. После 30-минутной инкубации микросфер с вирусом гриппа A/duck/Moscow/4182C-MA/2010 (H5N3) доля индивидуальных частиц уменьшалась на порядок, а в скоплениях зарегистрировано  $84.8 \pm 3.2\%$  микросфер, что достоверно ( $p < 0.001$ ) отличалось от контроля. Отметим, что после обработки суспензией вируса в препарате микросфер детектировали скопления, содержащие 4 и более частиц, в то время как в отрицательном контроле такие скопления отсутствовали (рис. 1).

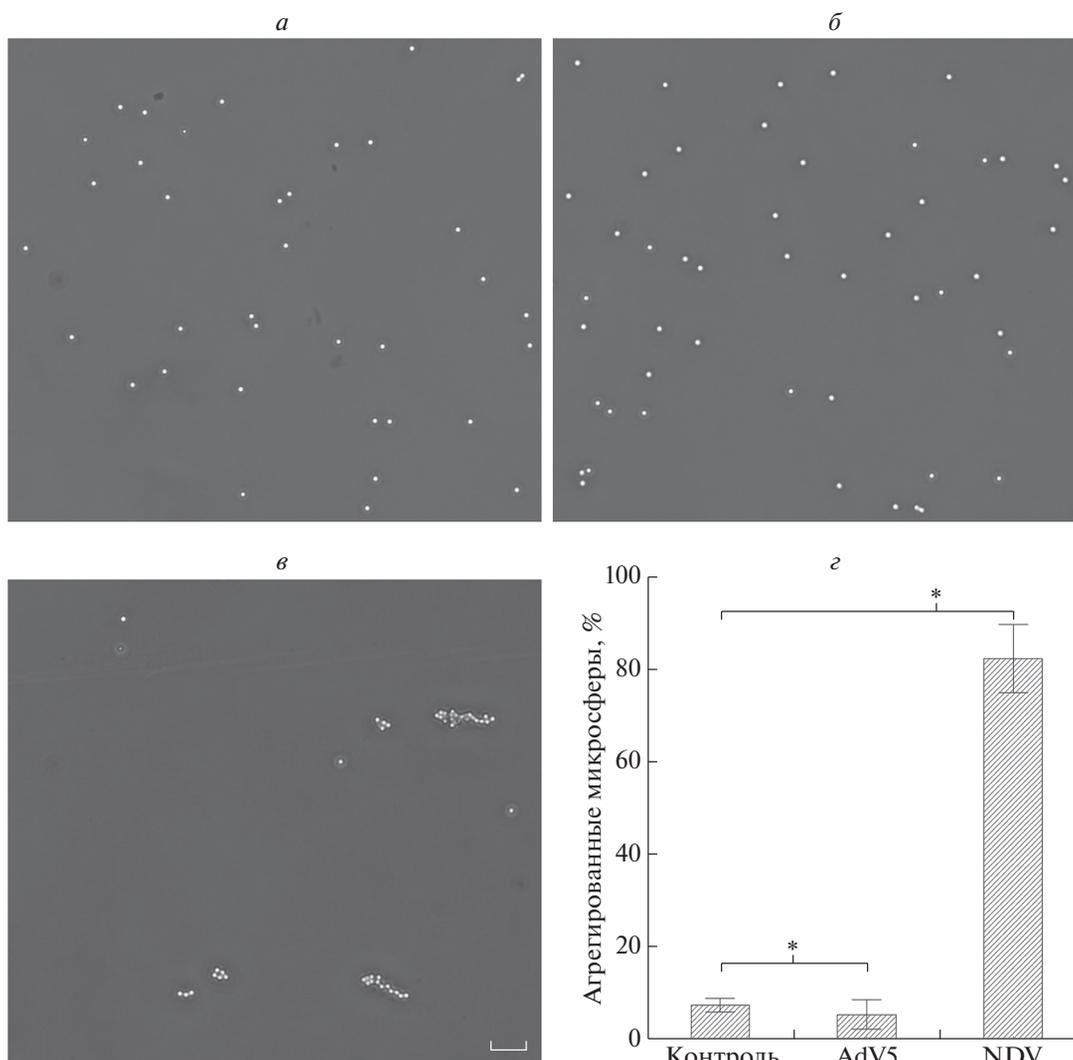
На основании сравнения препаратов микросфер, проинкубированных с незараженной аллантоисной жидкостью или с вирусом, мы ввели критерий “наличия агрегации” микросфер: присутствие в препарате скоплений микросфер, содержащих четыре и более частиц, и не менее 10% микросфер в составе таких агрегатов.

Для определения времени, необходимого для взаимодействия вируса с иммобилизованным на микросферах фетуином, суспензию микросфер инкубировали с разведенной аллантоисной жидкостью, содержащей вирус A/duck/Moscow/4182C-MA/2010 (H5N3), в течение 80 мин, при этом каждые 10 мин из реакционной смеси отбирали и фиксировали аликвоты. Доля агрегированных микросфер возрастала в течение первых 40 мин, при дальнейшей инкубации она достоверно не менялась (рис. 2). В последующих экспериментах микросферы с суспензиями вируса инкубировали в течение 1 ч.

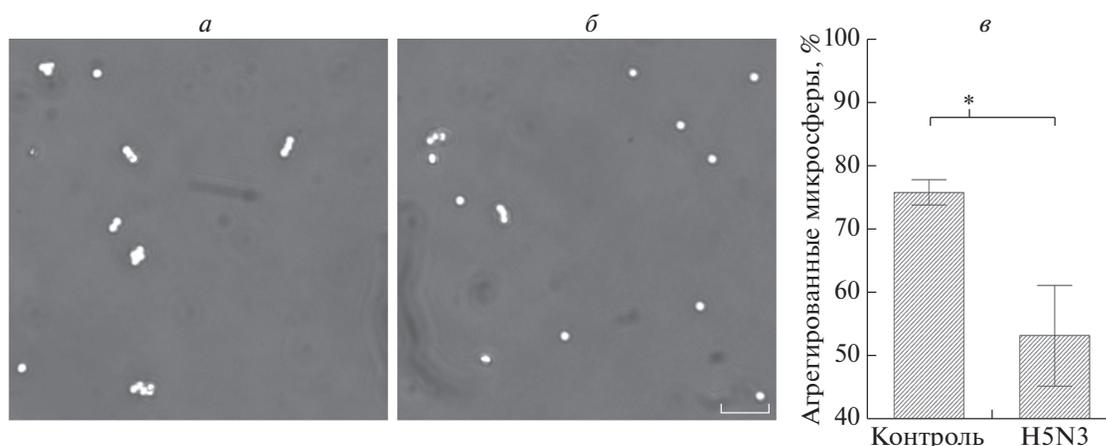
Для проверки специфичности РЛА были исследованы два различных вируса: не вызывающий агглютинации эритроцитов AdV5 и NDV, ее вызывающий. После инкубации с аденовирусом подавляющее большинство микросфер находилось в виде индивидуальных частиц, относительное содержание микросфер в агрегатах достоверно не отличалось ( $p = 0.18$ ) от контроля (незараженная аллантоисная жидкость) и составляло  $5.2 \pm 3.2\%$ . При этом после инкубации с NDV большая часть ( $82.3 \pm 7.3\%$ ) микросфер находилась в форме агрегатов, что достоверно ( $p < 0.001$ ) отличалось от контроля (рис. 3).

Для проверки специфичности взаимодействия вируса гриппа с сиалированными углеводными цепями фетуина в РЛА использовали покрытые фетуином микросферы, обработанные нейрамидазой из *Clostridium perfringens*. После инкубации покрытых фетуином микросфер с вирусом гриппа A/duck/Moscow/4182C-MA/2010 (H5N3) большая часть микросфер находилась в составе агрегатов. Предварительная обработка нейрамидазой приводила к достоверному ( $p = 0.009$ ) уменьшению доли агрегированных микросфер (рис. 4).

В РЛА нами исследовано 12 штаммов вируса гриппа А, а также 2 штамма вируса гриппа В, относящихся к двум эволюционным линиям. Обнаружено, что все исследованные вирусы вызывают агрегацию микросфер. Используя критерий “наличия агрегации”, для каждого исследованного вируса мы определили титр, выраженный в латексагглютинирующих единицах (ЛАЕ), соответствующих обратной величине последнего разведе-



**Рис. 3.** Агглютинация покрытых фетуином микросфер при инкубации с аденовирусом (AdV5) и вирусом болезни Ньюкасла (NDV). Покрытые фетуином микросферы после инкубации с незараженной аллантаической жидкостью (а), с AdV5 (б), с NDV (в). Масштабная линейка – 10 мкм. з – Доля агрегированных микросфер после инкубации с незараженной аллантаической жидкостью (Контроль), AdV5 и NDV. \* $p < 0.001$ , ns – отсутствие достоверной разницы.



**Рис. 4.** Влияние нейраминидазы *Clostridium perfringens* на агрегацию микросфер в РЛА. Вирус гриппа A/duck/Moscow/4182С-МА/2010 (H5N3) инкубировали с покрытыми фетуином микросферами, не обработанными (а) или обработанными нейраминидазой (б). Масштабна линейка – 10 мкм. в – Доля агрегированных микросфер в РЛА с микро-частицами, не обработанными (–NA) или обработанными (+NA) нейраминидазой. \* $p < 0.009$ .

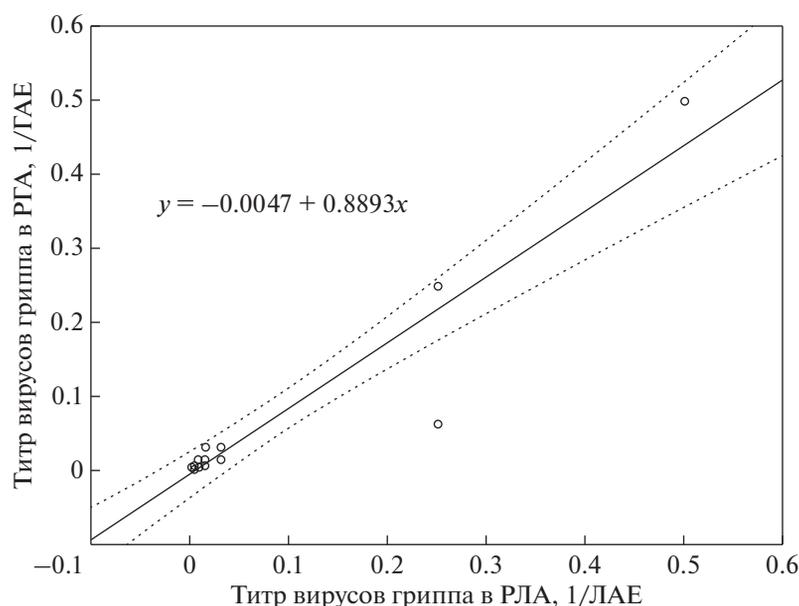


Рис. 5. Корреляционный анализ результатов РГА и РЛА

дения, при котором наблюдается агрегация микросфер. Одновременно с РЛА тот же набор вирусов был исследован в РГА и для каждого вируса был определен титр (табл. 1).

При сравнении результатов, полученных в РГА и РЛА, между ними выявлена положитель-

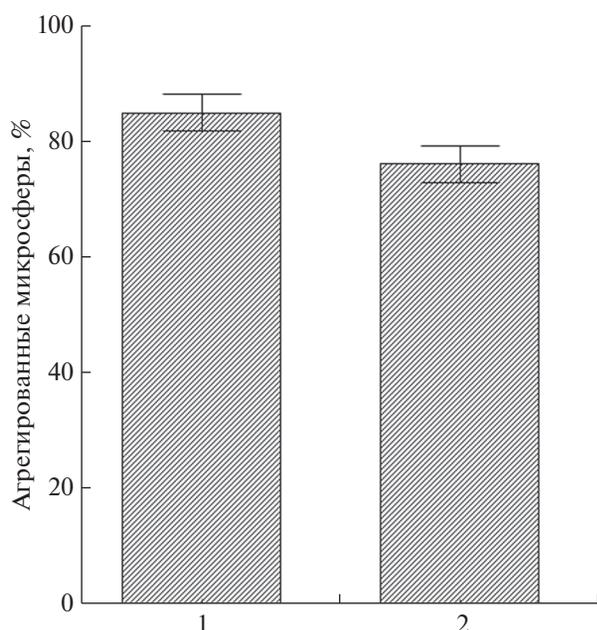
ная корреляция с достаточно высоким коэффициентом ( $R = 0.94$ ,  $p < 0.05$ ) (рис. 5).

Для исследования стабильности препарата покрытых фетуином микросфер был использован образец, хранившийся в течении 6 месяцев при 4°C. После его инкубации с вирусом гриппа

Таблица 1. Титры исследованных вирусов в РГА и РЛА

Исследуемый вирус	Титр вируса <sup>a</sup>	
	РГА	РЛА
A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1)	512	256
A/Moscow/01/09 (H1N1)pdm09 (культуральный)	2	2
A/Moscow/01/09 (H1N1)pdm09	4	4
A/duck/Moscow/4970-MA/2013 (H1N1)	32	64
A/Leningrad/134/17/57 (H2N2)	128	256
A/Aichi/2/1968 (H3N2)	32	32
A/Darwin/9/2021 (H3N2)	4	16
A/mallard/Pennsylvania/10218/84-MA (H5N2)	64	128
A/duck/Moscow/4182C-MA/2010 (H5N3)	256	512
A/gull/Moscow/3100/2006 (H6N2)	64	64
A/chicken/NJ/294598-12/2004 (H7N2)	128	256
A/swine/Hong Kong/9A-1/1998 (H9N2)	256	128
B/Washington/02/2019 (Викторианская линия)	64	32
B/Phuket/3073/2013 (Ямагатская линия)	64	128
Аденовирус 5 серотипа	>2	>2
Вирус болезни Ньюкасла	128	64

<sup>a</sup>Приведены результаты одного из типичных экспериментов.



**Рис. 6.** Стабильность покрытых фетуином микросфер. Процент микросфер в агрегатах после инкубации с вирусом гриппа A/duck/Moscow/4182C-MA/2010 (H5N3) свежеприготовленного препарата покрытых фетуином микросфер (1) и этого же препарата, хранившегося в течении 6 месяцев при 4°C (2).

A/duck/Moscow/4182C-MA/2010 (H5N3) доля агрегированных микросфер составляла  $75.9 \pm 3.3\%$ . Таким образом, способность к агрегации препарата микросфер после хранения достоверно понизилась по сравнению со свежеприготовленным препаратом ( $84.8 \pm 3.2\%$ ), но это снижение не превышало 10% (рис. 6).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нами обнаружено, что вирусы гриппа могут вызывать агрегацию покрытых фетуином микросфер. Показано, что этот процесс опосредован взаимодействием вируса с сиалированными цепями фетуина — после обработки нейраминидазой агрегация микросфер в РЛА достоверно снижалась. При сравнительном анализе титров вирусов гриппа в РГА и РЛА обнаружена корреляция полученных результатов: значения ГАЕ и ЛАЕ различались не более чем в 2 раза для всех исследованных вирусов гриппа, за исключением штамма A/Darwin/9/2021 (H3N2). Для него титр в РЛА был в 4 раза выше, чем в РГА. Возможно, это различие отражает предпочтительность взаимодействия этого вируса гриппа, недавно выделенного от человека, с “человеческим” типом сиаловых рецепторов.

В сиалированных углеводных цепях гликанов эпителия верхних дыхательных путей человека концевые остатки *N*-ацетилнейраминовой кис-

лоты (Neu5Ac) преимущественно присоединены к соседнему остатку сахара через связь  $\alpha$ 2-6. Именно такие углеводные цепи узнает и связывает гемагглютинин вирусов гриппа человека на хозяйских клетках — отсюда и название для этих рецепторов вирусов гриппа: “человеческий” тип. Вирусы гриппа птиц связываются с клетками, на поверхности которых есть гликаны, терминированные  $\alpha$ 2-3-связанными остатками Neu5Ac (“птичий” тип рецепторов вирусов гриппа). Природные изоляты вирусов гриппа адаптированы к тому или другому типу сиалированных углеводных цепей, Neu5Ac $\alpha$ 2-6 или Neu5Ac $\alpha$ 2-3, что и определяет их хозяйскую специфичность [16]. В этом контексте следует заметить, что в экспериментах РГА мы использовали куриные эритроциты, где соотношение Neu5Ac $\alpha$ 2-6-/Neu5Ac $\alpha$ 2-3-связанных остатков составляет 0.81 [17]. В случае РЛА роль рецептора вирусов гриппа выполняют сиалированные углеводные цепи фетуина — белка из печени крупного рогатого скота, где Neu5Ac $\alpha$ 2-6-связанных остатков в 1.56 раз больше, чем Neu5Ac $\alpha$ 2-3 [18, 19]. На основании вышеизложенного можно предположить, что вирус гриппа A/Darwin/9/2021 (H3N2) связывается преимущественно с Neu5Ac $\alpha$ 2-6-терминированными цепями, которых на фетуине больше, чем на куриных эритроцитах, — отсюда и возможны различия в титрах по двум тестам.

Использование световой микроскопии для анализа результатов РЛА, предположительно, позволит количественно оценивать содержание вирусных частиц в суспензии. Агрегация покрытых фетуином микросфер определяется взаимодействием гемагглютининов одной вирусной частицы с сиалированными цепями фетуина, расположенного на разных микросферах, — то есть в местах, где происходит контакт между микросферами при образовании агрегата, находятся вирусные частицы. Очевидно, что при максимальных разведениях вирусной суспензии там будет найдено минимальное число вирионов, необходимых для удержания микросфер вместе. Исходя из того, что энергия броуновского движения частиц примерно на порядок меньше энергии связи гемагглютинина с рецептором [20], это минимальное число равно единице. Таким образом, при агрегации микросфер разбавленной суспензией вируса число образованных контактов между микросферами будет равняться числу вирусных частиц.

Вероятно, предлагаемый метод РЛА может быть расширен за счет использования помимо фетуина других сиалогликопротеинов, в частности таких, на углеводных цепях которых присутствуют либо только  $\alpha$ 2-6-, либо только  $\alpha$ 2-3-связанные остатки Neu5Ac. В этом случае РЛА может быть использована для исследования рецептор-связывающей специфичности вирусов гриппа.

Таким образом, предлагаемая нами методика РЛА может стать альтернативой методу РГА в рутинной лабораторной практике. Вероятно, ее можно использовать для определения любых вирусов, взаимодействующих с сialiрированными углеводными цепями гликанов, — как это показано для вируса болезни Ньюкасла.

Авторы выражают глубокую признательность д.б.н. А.С. Гамбарян (Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, Москва) и д.б.н. Л.Г. Руденко (ФГБНУ “Институт экспериментальной медицины”, Санкт-Петербург) за предоставленные штаммы вирусов гриппа А, а также к. ф.-м. н. Б.И. Тимофееву и к. б. н. Н.Ф. Ломакиной (ФГБНУ “Федеральный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи”, Москва) за помощь в анализе результатов.

Работа финансировалась в рамках темы Государственного задания “Проведение клинических исследований безопасности, реактогенности и иммуногенности (фазы I и II) четырехвалентной векторной вакцины для профилактики гриппа Гам-Флю-Вак-Квадри у здоровых добровольцев”.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов. Также в экспериментах не использовали биологические материалы, полученные от человека.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дерябин П.Г., Бутенко А.М., Бурцева Е.И. (2013) Реакция гемагглютинации и торможения гемагглютинации. В кн.: *Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных*. Ред. Львов Д.К. Москва: Мед. информ. агентство. 426–430.
2. Hirst G.K. (1941) The agglutination of red cells by allantoic fluid of chick embryos infected with influenza virus. *Science*. **94**, 22–23.
3. Hirst G.K. (1942) The quantitative determination of influenza virus and antibodies by means of red cell agglutination. *J. Exp. Med.* **75**, 49–64.
4. Hajra T.K., Bag P.K., Das S.C., Mukherjee S., Khan A., Ramamurthy T. (2007) Development of a simple latex agglutination assay for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) by using polyclonal antibody against STEC. *Clin. Vaccine Immunol.* **14**, 600–604.
5. Фролов Д.М., Сенина Т.В., Замарина Т.В., Храпова Н.П. (2019) Использование реакции латекс-агглютинации в ускоренном определении патогенных буркхольдеров. *Проблемы особо опасных инфекций*. **3**, 106–110.
6. Poplin V., Boulware D.R., Bahr N.C. (2020) Methods for rapid diagnosis of meningitis etiology in adults. *Bio-mark. Med.* **14**, 459–479.
7. Sedgwick A.K., Tilton R.C. (1983) Identification of *Legionella pneumophila* by latex agglutination. *J. Clin. Microbiol.* **17**, 365–368.
8. Chen J., Jin M., Yu Z., Dan H., Zhang A., Song Y., Chen H. (2007) Latex agglutination test for the rapid detection of avian influenza virus subtype H5N1 and its clinical application. *J. Vet. Diagn. Invest.* **19**, 155–160.
9. Цветкова И.В., Липкинд М.А., Закстельская Л.Я., Юсипова Н.А., Розенфельд Е.Л., (1967) Нейраминная кислота как клеточный рецептор вируса гриппа. *Биохимия*. **32**, 994–999.
10. Gambaryan A.S., Matrosovich M.N. (1992) A solid-phase enzyme-linked assay for influenza virus receptor-binding activity. *J. Virol. Methods*. **39**, 111–123.
11. Matrosovich M.N., Gambaryan A.S. (2022) Characterization of influenza virus binding to receptors on isolated cell membranes. *Methods Mol. Biol.* **2556**, 149–168.
12. Boravleva E., Treshchalina A., Postnikova Y., Gambaryan A., Belyakova A., Sadykova G., Prilipov A., Lomakina N., Ishmukhametov A. (2022) Molecular characteristics, receptor specificity, and pathogenicity of avian influenza viruses isolated from wild ducks in Russia. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 10829.
13. Quash G.A., Aymard M., Fougereuze J., Ripoll H. (1982) A fetuin-latex agglutination test for detecting the neuraminidases of myxoviruses in allantoic fluid. *J. Biol. Stand.* **10**(2), 115–124.
14. Timofeeva T.A., Rudneva I.A., Sadykova G.K., Lomakina N.F., Lyashko A.V., Shilov A.A., Voronina O.L., Aksenova E.I., Ryzhova N.N., Kunda M.S., Asatryan M.N., Shcherbinin D.N., Timofeeva E.B., Kushch A.A., Prilipov A.G., Adams S.E., Logunov D.Y., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L. (2020) Variability of nonpathogenic influenza virus H5N3 under immune pressure. *Acta Virol.* **64**, 480–489.
15. Шубладзе А.К., Гайдамович С.Я. (1964) *Краткий курс практической вирусологии*. Москва: Медгиз, 379 с.
16. Гамбарян А.С., Матросович М.Н. (2015) Какие адаптационные изменения в гемагглютинине и нейраминидазе нужны для возникновения пандемического вируса гриппа из птичьего предшественника? Обзор. *Биохимия*. **80**, 1040–1048.
17. Jankowski M.D., Glaberman S.R., Kimball D.B., Taylor-McCabe K.J., Fair J.M. (2019) Sialic acid on avian erythrocytes. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **238**, 110336.
18. Green E.D., Adelt G., Baenziger J.U., Wilson S., Van Halbeek H. (1988) The asparagine-linked oligosaccharides on bovine fetuin. Structural analysis of N-glycanase-released oligosaccharides by 500-megahertz <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **263**, 18253–18268.
19. Guttman M., Lee K.K. (2016) Site-specific mapping of sialic acid linkage isomers by ion mobility spectrometry. *Anal. Chem.* **88**, 5212–5217.
20. Sawada T. (2012) Chemical insight into the influenza A virus hemagglutinin binding to the sialoside revealed by the fragment molecular orbital method. *Open Glycoscience*. **5**, 26–30.

## Latex Agglutination as an Alternative to Hemagglutination Reaction of Influenza Viruses

P. A. Ivanov<sup>1, 2, \*</sup>, A. V. Lyashko<sup>1</sup>, S. A. Ionov<sup>1, 3</sup>, D. N. Shcherbinin<sup>1</sup>, I. A. Rudneva<sup>1</sup>, A. A. Shilov<sup>1</sup>, N. I. Bunkova<sup>1</sup>, M. M. Shmarov<sup>1, 4</sup>, and T. A. Timofeeva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 123098 Russia*

<sup>2</sup>*Winogradsky Institute of Microbiology RC Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia*

<sup>3</sup>*Mendeleev University of Chemical Technology, Moscow, 117312 Russia*

<sup>4</sup>*Sechenov First Moscow State University, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 101000 Russia*

\*e-mail: ivanovpa@mail.ru

As an alternative to the classical method of erythrocyte hemagglutination, a latex agglutination assay based on the interaction of influenza viruses with the sialoglycoprotein fetuin immobilized on the surface of polystyrene microspheres, has been developed. Twelve influenza A virus strains of different subtypes and two influenza B viruses of different lines were tested. Simultaneous titration of viruses using the classical hemagglutination test and the proposed latex agglutination assay showed similar sensitivity and a high degree of correlation ( $R = 0.94$ ). The obtained microspheres can be used for titration of viruses that recognize and bind sialylated glycans as receptors. In particular, latex aggregation was also induced by the Newcastle disease virus.

**Keywords:** influenza viruses, microspheres, fetuin, latex agglutination reaction, hemagglutinin, receptor binding specificity