

- гриппозной вакциной. Медицинская иммунология. 2008; 10 (4-5): 423-30.
4. Киселев О.И., Ершов Ф.И., Быков А.Т., Покровский В.И. Пандемия гриппа 2009/2010: противовирусная терапия и тактика лечения. СПб.; 2010: 98.
 5. Киселев О.И. Геном пандемического вируса гриппа А/Н1N1 – 2009. М.: Димитрийд График Групп; 2011.
 6. Методы определения показателей качества иммунобиологических препаратов для профилактики и диагностики гриппа: Методические указания 3.3.2.1758-03 от 28.09.2003, утв. Главным государственным санитарным врачом РФ. М.; 2003.
 7. Найхин А.Н., Донина С.А., Кустикова Ю.Г. и др. Моноклональная иммуноферментная тест-система для оценки секреторного иммунитета к вирусам гриппа А и В. Вопросы вирусологии. 1997; 5: 212-5.
 8. Найхин А.Н., Донина С.А., Кустикова Ю.Г. и др. Изучение в иммуноферментном анализе поствакцинального секреторного иммунитета к вирусам гриппа А и В с помощью разработанной моноклональной иммуноферментной тест-системы. Вопросы вирусологии. 1997; 6: 271-5.
 9. Найхин А.Н., Руденко Л.Г., Арден Н. и др. Иммунный ответ лиц пожилого возраста в зависимости от числа ежегодных сезонных иммунизаций живой и инактивированной гриппозными вакцинами. Вопросы вирусологии. 1998; 3: 130-4.
 10. Найхин А.Н., Баранцева И.Б. Локальный иммунный ответ к вирусам гриппа в назоассоциированной лимфоидной ткани. Медицинская иммунология. 2004; 6 (6): 487-92.
 11. Найхин А.Н. Гетеротипический иммунитет к вирусам гриппа А: эпидемиологические данные, вовлеченность разных иммунологических факторов, вакцинация. Вопросы вирусологии. 2012; 3.
 12. Петухова Г.Д., Найхин А.Н., Баранцева И.Б. и др. Локальный гуморальный и клеточный иммунный ответ мышей при гриппозной инфекции и вакцинации. Медицинская иммунология. 2006; 8 (4): 511-6.
 13. Рекстин А.Р., Найхин А.Н., Баранцева И.Б., Руденко Л.Г. В-клеточный и цитотоксический лимфоцитарный иммунный ответ на патогенные, аттенуированные и реассортантные вирусы гриппа. Вопросы вирусологии. 2002; 4: 27-32.
 14. Chirkova T., Naykhin A., Petukhova G. et al. Memory T-cell immune response in healthy young adults vaccinated with live attenuated influenza A(H5N2) vaccine. Clin. Vaccine Immunol. 2011; 18 (10): 1710-8.
 15. Maritz J., Maree L., Preiser W. Pandemic influenza A (H1N1) 2009: the experience of the first six months. Clin. Chem. Lab. Med. 2010; 48: 11-21.
 16. Naykhin A., Petukhova G., Chirkova T. et al. Virus-specific CD4+ and CD8+ memory T-cells in young volunteers after immunization with pandemic live attenuated reassortant influenza vaccines A(H5N2) and A(H1N1). In: Options for the control of influenza VII. 2010; September: 282. <http://www.controlinfluenza.com>.
 17. Petukhova G., Naikhin A., Chirkova T. et al. Comparative studies of local antibody and cellular immune responses to influenza and vaccination with live attenuated reassortant influenza vaccine (LAIV) utilizing a mouse nasal-associated lymphoid tissue (NALT) separation method. Vaccine. 2009; 27: 2580-7.
 18. Petukhova G., Korenkov D., Chirkova T. et al. B- and T-cell memory elicited by a seasonal live attenuated reassortant influenza vaccine: assessment of local antibody avidity and virus-specific memory T-cells using trogocytosis-based method. Influenza Other Respir. virus. 2012; 6 (2): 119-26.
 19. Writing Committee of the WHO consultation on clinical aspects of pandemic (H1N1) 2009 influenza. Clinical aspects of pandemic 2009 influenza A(H1N1) virus infection. N. Engl. J. Med. 2010; 362: 1708-19.

Поступила 16.05.12

В ПОМОЩЬ ВИРУСОЛОГУ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2013

Е.С. Шевченко¹, Н.В. Бреслав¹, В.В. Лаврищева¹, Е.А. Мукашева¹, Э.В. Силуянова¹, Т.А. Оскерко¹, Л.В. Колобухина¹, Л.Н. Меркулова¹, Н.В. Дубовая³, А.Л. Заплатников², Е.И. Бурцева¹

Эффективность изоляции вирусов гриппа А и В из носоглоточных смывов, взятых в пробирки Σ -Virocult® (M40 Compliant, Sigma Virocult) и Virocult® (M40 Compliant, Virocult), в эпидемическом сезоне 2010–2011 гг.

¹ФГБУ НИИ вирусологии им. Д.И. Иванова Минздравсоцразвития России, Москва; ²Российская медицинская академия последипломного образования Минздравсоцразвития России, Москва; ³ООО «МК Рустек», Москва

В статье представлены результаты сравнительного изучения эффективности изоляции вирусов гриппа в период эпидемического подъема 2010–2011 гг., вызванного А(Н1N1)pdm09 и В, при взятии клинических образцов в пробирки с транспортной средой на основе среды Игла MEM и коммерческие пробирки – Σ -Virocult® (M40 Compliant, Sigma Virocult) и Virocult® (M40 Compliant, Virocult). Показана высокая эффективность изоляции штаммов вирусов гриппа А и В из носоглоточных смывов, взятых в пробирки Σ -Virocult® (M40 Compliant, Sigma Virocult) и Virocult® (M40 Compliant, Virocult) с транспортной средой, сравнимая с эффективностью изоляции штаммов вирусов гриппа из носоглоточных смывов, взятых в пробирки со средой Игла MEM по всем оцениваемым показателям: пассажиру при выделении и титру изолята. Подтверждена возможность длительного хранения клинического материала при комнатной температуре и 4°C без замораживания, что является безусловно значимым при отсутствии необходимого оборудования.

Ключевые слова: *вирусы гриппа А(Н1N1)pdm09 и В, транспортная среда Virocult®, эффективность изоляции, длительность и режим хранения материала*

Efficiency of the Influenza A and B Viruses Isolation from Nasopharyngeal Swabs Taken in the Test Tubes Σ -Virocult® (M40 Compliant, Sigma Virocult) and Virocult® (M40 Compliant, Virocult) in 2010-2011 Epidemic Season

E. S. Shevchenko¹, N. V. Breslav¹, V. V. Lavrisheva¹, E. A. Mukasheva¹, E. V. Siluyanova¹, T. A. Oskerko¹, L. V. Kolobukhina¹, L. N. Merkulova¹, N. V. Dubovaya³, A. L. Zaplatnikov², E. I. Burtseva¹

¹ Ivanovsky Institute of Virology, Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation, Moscow, Russia; ² Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation, Moscow, Russia; ³ LLC MC Rustech, Moscow, Russia

The goal of this work was to compare the efficiency of the influenza A and B viruses isolated during 2010-2011 epidemic season. The clinical samples were taken in the test tubes with the transport medium on the basis of the medium EMEM and commercial test tubes Σ -Virocult® (M40 Compliant, Sigma Virocult) and Virocult® (M40 Compliant, Virocult). The results of this work demonstrated higher efficiency of influenza A and B viruses isolation from nasopharyngeal swabs of the patients taken in the test tubes Σ -Virocult® (M40 Compliant, Sigma Virocult) and Virocult® (M40 Compliant, Virocult) with the transport medium as compared with the efficiency of influenza strains isolation from nasopharyngeal swabs taken in test tubes with the medium EMEM with respect to all estimated indicators: efficiency of isolation, a passage of isolation and the titer of isolates. The possibility of the long-term storage of a clinical material at room temperature and at 4°C was confirmed, without resorting to freezing, which is significant in the absence of the necessary equipment.

Key words: *A(H1N1)pdm09 and B Influenza viruses, transport medium Virocult®, efficiency of isolation, duration and mode of storage of material*

Одним из направлений исследований в службе надзора за циркуляцией вирусов гриппа как в России, так и других странах мира является изоляция эпидемических штаммов из клинического материала. Значение изоляции состоит в уточнении этиологии эпидемических подъемов заболеваемости и определении долевого участия вирусов гриппа в структуре ОРВИ; получении новых антигенных вариантов вирусов гриппа А и В, их антигенной характеристики; изучении биологических и молекулярно-генетических свойств; выборе и подготовке кандидатов в вакцинные штаммы и диагностические препараты; определении чувствительности выделенных штаммов к этиотропным препаратам (ремантадин, арбидол, ингибиторы нейраминидазы); оценке эффективности вакцинопрофилактики гриппа путем сопоставления данных по степени родства вакцинных штаммов и их эпидемических вариантов. Эффективность изоляции штаммов зависит от ряда факторов, среди которых особое место занимает взятие материала и его хранение до начала лабораторных исследований. В обычной практике вирусологов нашей страны используют транспортную среду, которую готовят на основе среды Игла МЕМ [4].

Безусловно наиболее удобными как для вирусологов, так и для врачей, берущих анализы, являются коммерческие пробирки с уже готовой транспортной средой, упакованные с тампонами для взятия материала. Их вариантами являются пробирки с транспортной средой Σ -Virocult® (M40 Compliant, Sigma Virocult) и Virocult® (M40 Compliant, Virocult). Одно из достоинств этих пробирок – возможность их хранения при комнатной температуре, а после взятия клинического материала – при 4°C.

Целью настоящего исследования было сравнительное изучение эффективности изоляции штаммов вирусов гриппа А и В в период эпидемического подъема 2010–2011 гг. при взятии клинических образцов в пробирки с транспортной средой на основе среды Игла МЕМ и в коммерческие пробирки Σ -Virocult® (M40 Compliant, Sigma Virocult) и Virocult® (M40 Compliant, Virocult).

Материалы и методы

Пробирки для взятия носоглоточных смывов. Среды Игла МЕМ с добавлением антибиотика (гентамицин), альбумина и хепес-буфера; Σ -Virocult® (M40 Compliant, Sigma Virocult, lot 10A06) и Virocult® (M40 Compliant, Virocult, lot 10B10), предоставленные компанией ООО "МК Рустек".

Клинический материал. Носоглоточные смывы от больных с диагнозом гриппа отбирали в первые 3 дня заболевания по клиническому диагнозу. Материал от одного пациента дублировали на 2 пробирки. Материал, взятый в среду Игла МЕМ, замораживали при -20°C; материал, взятый в коммерческие пробирки, хранили при 4°C не более 3 сут до использования в исследовании (рекомендации производителя).

Молекулярно-генетические методы. Подтверждением наличия вируса гриппа в носоглоточном смыве был положительный результат диагностики с ОТ-ПЦР-РВ с использованием коммерческих наборов АмплиСенс Influenza virus A/B-FL и АмплиСенс Influenza virus A/H1-swine-FL, "Интерлабсервис", Россия [2].

Изоляция вирусов гриппа. Использовали монослой клеток культуры ткани MDCK как наиболее чувствительной линии клеток в отношении вирусов гриппа А и В [10]. Первичное заражение монослоя клеток культуры ткани MDCK проводили по методике Н. Davies и соавт. [7]. Индикацию вирусных изолятов, полученных на клетках культуры MDCK, выполняли в реакции гемагглютинации (РГА) [4].

Определение антигенной структуры штаммов. Антигенную структуру выделенных штаммов определяли в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) с использованием эталонных штаммов вирусов гриппа А(H1N1)sw1 и В, А/Калифорния/7/2009(H1N1)sw1 и В/Брисбен/60/2007 и приготовленных к ним специфических поликлональных сывороток [3,4]. Эталонны получены из справочного центра ВОЗ по гриппу (CDC&P, США), а также коллекции лаборатории этиологии и эпидемиологии гриппа ФГБУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского Минздрава России.

Определение инфекционной активности вирусов. Инфекционную активность вирусов определяли согласно методике, описанной ранее [6]. Инфекционные титры рассчитывали по методу Рида и Менча [5].

Результаты

Настоящее исследование предусматривало 2 этапа работы.

На первом этапе проведено сравнительное изучение эффективности культивирования пандемического штамма вируса гриппа А/HV-Moscow/01/2009 (H1N1)sw1 при разных режимах хранения материала в пробирках с транспортной средой на основе среды Игла МЕМ и в коммерческих пробирках со средой Σ -Virocult® (M40 Compliant, Sigma Virocult). Эффек-

Таблица 1

Инфекционные титры вируса гриппа A/IV-Moscow/01/2009 (H1N1)sw1 при разных режимах разведения и хранения

Режим хранения пробирок с транспортной средой	Инфекционный титр вируса, (lg)	
	разведение вируса в среде Игла MEM	разведение вируса в среде Σ -Virocult® (M40 Compliant, Sigma Virocult)
	Исходный титр вируса	
	6,7	6,45
	Через 7 дней	
t комнатная	3,5	2,5
4°C	4,0	2,5
-20°C	5,5	2,5
	Через 14 дней	
t комнатная	3,5	1,7
4°C	5,5	5,0
-20°C	6,7	1,7

тивность культивирования вируса оценивали путем сравнения результатов инфекционной активности вируса гриппа A/IV-Moscow/01/2009 (H1N1)sw1, полученных при хранении вируса, разведенного средой Игла MEM и Σ -Virocult® (M40 Compliant, Sigma Virocult), в режимах: при комнатной температуре, 4°C, -20°C в течение 7 и 14 дней.

В табл.1 представлены результаты определения инфекционных титров вируса гриппа A/IV-Moscow/01/2009 (H1N1)sw1 при различных режимах хранения пробирок. Как видно из представленных данных, практически при всех режимах хранения вируса в его разведении транспортной средой Σ -Virocult® (M40 Compliant, Sigma Virocult) инфекционные титры ниже аналогичных показателей для среды Игла MEM на 1,0–3,0 lg, что является статистически значимым. Исключение составил режим хранения при 4°C в течение 14 дней, для которого показатели инфекционных титров были сравнимы.

Тем не менее предварительные результаты позволили сделать вывод о возможности хранения материала в течение более длительного срока (до 14 дней), не прибегая к замораживанию (результаты сравнимы при хранении при комнатной температуре). При всех режимах вирус сохранял жизнеспособность и мог быть рекультивирован с достаточным инфекционным титром, необходимым для его дальнейшего изучения.

На втором этапе проведены исследования, посвященные оценке эффективности изоляции эпидемических штаммов вирусов гриппа А и В из носоглоточных смывов, взятых в пробирки со средой на основе среды Игла MEM, а также Σ -Virocult® (M40 Compliant, Sigma Virocult) и Virocult® (M40 Compliant, Virocult).

В эпидемическом сезоне 2010–2011 гг. в России циркулировали штаммы вирусов гриппа А(H1N1)pdm09 и В, что было определено в настоящем исследовании. Штаммы вируса гриппа А(H1N1)pdm09 были антигенно родственны эталону А/Калифорния/7/2009 (H1N1)sw1. Штаммы гриппа В были родственны эталонному вирусу В/Брисбен/60/2007 (линия В/Виктория-подобных) [1].

В табл. 2 и табл. 3 в сравнительном плане представлены результаты изоляции эпидемических штаммов из носоглоточных смывов, взятых в пробирки со средой на основе среды Игла MEM, Σ -Virocult® (M40 Compliant, Sigma Virocult) и

Virocult® (M40 Compliant, Virocult) от пациентов, госпитализированных с предварительным диагнозом “грипп” средней и тяжелой формы. Критерием отбора пациентов был клинический диагноз, в связи с чем не во всех случаях была подтверждена гриппозная инфекция или наличие вирусов гриппа в носоглоточном смыве, выявляемых постановкой ОТ-ПЦР-РВ. Только по клиническим симптомам среди 60 пациентов, включенных в исследование, грипп был подтвержден у 42 положительных результатом на специфическую РНК вируса гриппа А и В методом ОТ-ПЦР-РВ. При этом эффективность изоляции составила 52% (22 пациента), что является достаточно высоким показателем (обычно не более 20%).

Эффективность изоляции штаммов вирусов гриппа А и В из носоглоточных смывов больных, взятых в пробирки Σ -Virocult® (M40 Compliant, Sigma Virocult) и Virocult® (M40 Compliant, Virocult) с транспортной средой, в эпидемическом сезоне 2010–2011 гг. была достаточно высокой и сравнимой с эффективностью изоляции штаммов вирусов гриппа из носоглоточных смывов, взятых в пробирки со средой Игла MEM, по всем оцениваемым показателям: эффективности выделения, пассажи изоляции, титру изолята, возможности проведения ОТ-ПЦР-РВ, спектру вирусов гриппа А и В.

Таблица 2

Изоляция эпидемических штаммов при применении пробирок Σ -Virocult® (M40 Compliant, Sigma Virocult) с транспортной средой

Пробирки для взятия носоглоточных смывов	Число пациентов	Число пациентов с РНК вирусов гриппа, выявленной методом ОТ-ПЦР-РВ	Число пациентов с выделенным вирусом в клетках культуры MDCK					
			пассаж выделения			титр ГА при выделении		
			первичное заражение	1-й пассаж	в целом	1/4	1/8	1/16
Со средой Σ -Virocult®	30	26	11	2	13	8	4	1
Со средой Игла MEM			12	1	13	4	9	-

Таблица 3

Изоляция эпидемических штаммов при применении пробирок Virocult® (M40 Compliant, Virocult) с транспортной средой

Пробирки для взятия носоглоточных смывов	Число пациентов	Число пациентов с РНК вирусов гриппа, выявленной методом ОТ-ПЦР-РВ	Число пациентов с выделенным вирусом в клетках культуры MDCK						
			пассаж выделения			титр ГА при выделении			
			первичное заражение	1-й пассаж	в целом	1/4	1/8	1/16	1/32
Со средой Virocult®	30	16	9	-	9	3	5	-	1
Со средой Игла MEM			7	2	9	5	2	1	1

Обсуждение

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о достаточно высокой эффективности изоляции штаммов вирусов гриппа А и В из носоглоточных смывов больных, взятых в пробирки Σ -Virocult® (M40 Compliant, Sigma Virocult) и Virocult® (M40 Compliant, Virocult) с транспортной средой, которая была сравнима с эффективностью изоляции штаммов вирусов гриппа из носоглоточных смывов, взятых в пробирки со средой Игла MEM по всем оцениваемым показателям.

Наши результаты подтверждают многочисленные данные зарубежных исследователей. Данные литературы указывают на высокую эффективность культивирования вирусов гриппа А и В, а также РС-вируса, аденовируса, риновируса, вируса парагриппа, коронавируса, энтеровируса из смывов, взятых в транспортную среду Virocult®, сравнимую с эффективностью среды Игла MEM. Значимым является тот факт, что среда Virocult® совместима со многими молекулярно-диагностическими методами исследования: иммунохроматографией, ИФА, ПЦР и культивированием на разных клеточных линиях [8, 9].

Наше исследование подтвердило сохранение жизнеспособности вирусов гриппа А и В при длительном хранении клинического материала до 14 дней при комнатной температуре и при 4°C без замораживания, что является, безусловно, значимым при отсутствии необходимого оборудования.

Презентация проф. А. Rudsdale на последнем клинико-вирусологическом симпозиуме продемонстрировала, что транспортная среда Virocult® поддерживает вирус гриппа в жизнеспособном состоянии, по крайней мере 8 дней при двух температурных режимах: 4°C и комнатной температуре, а также совместима со многими молекулярными методами исследования для обычной и быстрой идентификации известных штаммов. Virocult® соответствует мировому стандарту для транспортных сред, который утвержден и зарегистрирован для использования во всем мире, включая США и Канаду [12].

Другие зарубежные исследования продемонстрировали высокую эффективность изоляции вируса гриппа типа А, а также аденовируса, вируса парагриппа, риновируса и вируса простого герпеса 1-го и 2-го типов из смывов, взятых в пробирки со средой Virocult®, после хранения материала в течение 7 дней при комнатной температуре и при 4°C [11].

Транспортная среда Virocult® использовалась на протяжении многих лет во Франции для отбора проб в рамках эпиднадзора за гриппом. Применяя методы диагностики ПЦТ-ПЦР и ИФА, исследователи показали, что среда Σ -Virocult® является надежной и повышает эффективность изоляции вируса гриппа А(Н3N2), а также его жизнеспособность при сроке хранения до 4 дней при комнатной температуре и 4°C [13].

Заключение

Полученные данные могут быть использованы для решения проблемы взятия и хранения носоглоточных смывов от больных в период эпидемии гриппа в пробирках с транспортными средами Σ -Virocult® (M40 Compliant, Sigma Virocult) и Virocult® (M40 Compliant, Virocult), а также и эффективной изоляции из них штаммов вирусов гриппа А и В.

Транспортная среда Virocult® пригодна для идентификации новых вирусов гриппа и других респираторных вирусов, а также для дифференциальной диагностики острых респираторных инфекций.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бурцева Е.И., Щелканов М.Ю., Колобухина Л.В., Прилизов А.Г., Альховский С.В., Львов Д.К. Анализ результатов надзора, лабораторной диагностики и выделения штаммов вирусов гриппа в базовых лабораториях ЦЭЭГ в период 2009–2011 гг. В кн.: Грипп: эпидемиология, профилактика и лечение: Сборник статей и тезисов. СПб.; 2011: 12–6.
2. Львов Д.К., Бурцева Е.И., Прилизов А.Г. и др. Изоляция 24.05.2009 г. и депонирование в Государственную коллекцию вирусов (ГКВ N 2452 от 24.05.2009 г.) первого штамма A/HIV-Moscow/01/2009 (H1N1)swl, подобного свиному вирусу A(H1N1) от первого выявленного 21.05.2009 г. больного в г. Москве. Вопросы вирусологии. 2009; 5: 10–4.
3. Методические указания к работе опорных баз Всесоюзного центра по гриппу и ОРЗ. Л.; 1986: 40–2.
4. Методы определения показателей качества иммунобиологических препаратов для профилактики и диагностики гриппа. Методические указания МУ 3.3.2.1758–03. М.; 2005.
5. Сергиенко В.И., Бондарева Н.Б., Маевский Е.И. «Статистическая обработка результатов доклинических испытаний. В кн.: Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических средств. М.: «ИИА Ремедиум»; 2000: 360–98.
6. Шевченко Е.С., Бурцева Е.И., Слепушкин А.Н. и др. «Спектр чувствительности к ремантадину вирусов гриппа А, циркулировавших в эпидемических сезонах 2002–2004 гг. Вопросы вирусологии. 2005; 5: 32–5.
7. Davies H.W., Appleyard G., Cunnighan P., Pereira M.S. The use of continuous cell line for the isolation of influenza virus. Bull. WHO. 1978; 56: 1991–3.
8. Lina B., Valette M. Medix biochemica influenza A and B. Actim influenza A and B. In: Test evaluation report. Translation from the French original. March, 2005.
9. Rezza G., Valdarchi C., Puzelli S., Ciotti M., Farchi F. et al. Respiratory viruses and Influenza-like illness: a survey in the area of Rome, winter 2004–2005. Eurosurveillance. 2006; 11 (10): 251-3.
10. Richardson J.C.W., Scolera V., Simmonds N.L. Identification of two strains of MDCK cells which resemble separate nephron tubule segments. Biochim. Biophys. Acta. 1981; 673: 26–6.
11. Rudsdale A. Evaluation of a virology specimen transport device with six viruses using CLSI standard M40-A. In: Poster C-053, ASM 109: General meeting. Philadelphia; 2009.
12. Rudsdale A., Shedden D. "Investigation of the Suitability of the Virocult® Swab transport device for influenza a specimens which are to be analyzed by cell culture or molecular techniques. In: POSTER M42. Clinical virology symposium. 2009.
13. Valette M., Bouscambert-Duchamp M., Farget R., Lambert S., Lina B. Comparison of Virocult® Swab, Σ -Swab TM and Σ -Virocult® for Influenza A viability for cell culture and molecular detection. In: POSTER S84. Clinical virology symposium. 2010.

Поступила 31.05.12