

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018
УДК 578.832.1:578.1.083.3

Сорокин Е.В., Царёва Т.Р., Желтухина А.И.

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К ГЕМАГГЛЮТИНИНУ ВИРУСОВ ГРИППА В ВИКТОРИАНСКОЙ ЭВОЛЮЦИОННОЙ ЛИНИИ

ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, 197376, г. Санкт-Петербург

Социркуляция двух эволюционных линий (ЭЛ) вируса гриппа В в один эпидемический сезон определяет необходимость создания специфичных реагентов для быстрой идентификации и типирования новых изолятов. С этой целью была разработана панель моноклональных антител (МКА) к гемагглютининому (ГА) вируса гриппа В/Брисбен/46/15 Викторианской ЭЛ. Установлено, что все полученные МКА реагировали в иммуноферментном анализе только с вирусами Викторианской ЭЛ при полном отсутствии взаимодействия с гетерологичными вирусами гриппа В Ямагатской группы, сезонными и потенциально пандемическими вирусами гриппа А. МКА обладали выраженной антигемагглютинирующей и вируснейтрализующей активностью. Показано, что все МКА взаимодействовали в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) только с вирусами Викторианской ветви, но не связывались с В/Ямагата-подобными штаммами. При анализе МКА с вирусами ранних лет выделения было обнаружено, что МКА 6E11, 9G5, 9B5 и 6A4 обладали способностью взаимодействовать с вирусом В/Россия/69, что может быть связано с наличием общего эпитопа у вирусов гриппа В еще до разделения на две независимые филогенетические ветви и современных штаммов гриппа В Викторианской ветви. Показано, что МКА 7C8, 7G9, 7H8 и 8D11 направлены к консервативному эпитопу (или эпитопам), специфичным для ГА вирусов гриппа В Викторианской линии. Наличие различий в эффективности взаимодействия МКА 6A9, 7G9 и 8A8 в РТГА позволяет выявлять и дифференцировать изоляты, выделенные в куриных эмбрионах и культуре клеток MDCK. Таким образом, разработанные МКА могут быть успешно применены для идентификации и антигенного анализа В/Виктория-подобных штаммов.

Ключевые слова: вирус гриппа В; моноклональные антитела; гемагглютинин; антигенный анализ.

Для цитирования: Сорокин Е.В., Царева Т.Р., Желтухина А.И. Моноклональные антитела к гемагглютининому вирусам гриппа В Викторианской эволюционной линии. *Вопросы вирусологии*. 2018; 63(6): 275-280.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-6-275-280>

Sorokin E.V., Tsareva T.R., Zheltukhina A.I.

MONOCLONAL ANTIBODIES TO HEMAGGLUTININ OF INFLUENZA B VIRUSES VICTORIA EVOLUTIONARY LINEAGE

Smorodintsev Research Institute of Influenza, St.-Petersburg, 197376, Russian Federation

Co-circulation of two evolutionary distinct lineages of influenza virus in one epidemic season has led to development specific reagents for rapid identification and typing of new isolates. Panel of MAbs to hemagglutinin of influenza virus B/Brisbane/46/15 belonging to Victoria evolutionary lineage was developed. All MAbs reacted in ELISA with B/Victoria-like strains only. There were no interactions with heterologous influenza viruses of B/Yamagata lineage, seasonal and potentially pandemic influenza A viruses. All MAbs reacted in hemagglutination inhibition and virus neutralization. MAbs interacted in hemagglutination inhibition only with B/Victoria-like viruses, but did not interacted B/Yamagata-like strains. Neutralization and hemagglutination inhibition studies of viruses isolated before 1983 with MAbs revealed that MAbs 6E11, 9G5, 9B5 and 6A4 had the ability to interact with the virus B/ Russia/69 which may evidence that B strains of early isolation period (before lineage separation) have common epitope with recent Victoria lineage viruses. MAbs 7C8, 7G9, 7H8 and 8D11 were directed to a conserved epitope (or epitopes) specific for influenza hemagglutinin viruses of B/Victoria group. The presence of differences in the effectiveness of the interaction of MAbs 6A9, 7G9 and 8A8 in hemagglutination inhibition test allows the identification and differentiation of strains isolated in chicken embryos and MDCK cell culture. Thus, the developed MAbs can be successfully used for identification and antigenic analysis of B/Victoria-like strains.

Key words: influenza B virus; monoclonal antibodies; hemagglutinin; antigenic analysis.

For citation: Sorokin E.V., Tsareva T.R., Zheltukhina A.I. Monoclonal antibodies to hemagglutinin of influenza b viruses victoria evolutionary lineage. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2018; 63(6): 275-280. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-6-275-280>

For correspondence: Evgeniy V. Sorokin, Head of laboratory of biotechnology of diagnostic preparations of Smorodintsev Research Institute of Influenza, St.-Petersburg, 197376, Russian Federation. E-mail: evgeniy.sorokin@influenza.spb.ru

Information about authors:

Sorokin E.V., <http://orcid.org/0000-0003-1732-1727>

Tsareva T.R., <http://orcid.org/0000-0003-4757-0521>

Zheltukhina A.I., <http://orcid.org/0000-0001-8674-6097>

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 12 February 2018
Accepted 06 March 2018

Для корреспонденции: Сорокин Евгений Валентинович, зав. лабораторией биотехнологии диагностических препаратов «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, 197376, г. Санкт-Петербург. E-mail: evgeniy.sorokin@influenza.spb.ru

Введение

Вирус гриппа В впервые был изолирован в 1940 г. [1]. До 80-х годов XX века основной линией, находящейся в циркуляции, была Ямагатская эволюционная линия (ЭЛ), однако в 70-е годы, вероятно, в Китае появилась отличная от Ямагатской Викторианская ЭЛ вирусов гриппа В, которая возникла в результате постепенной эволюции минорных Ямагатских сублиний [2]. Начиная с 1983 г. наметился дивергентный характер их эволюции с формированием двух ЭЛ, родоначальниками которых были признаны референс-вирусы В/Виктория/2/87 и В/Ямагата/16/88 [3]. Штаммы Викторианской ЭЛ доминировали в циркуляции в 80-е годы прошлого столетия, а вирусы, относящиеся к Ямагатской линии, преобладали по всему миру в 90-е годы [4]. В 2001 г. В/Victoria/2/87-подобные штаммы вновь появились в циркуляции, и с тех пор обе филогенетически различающиеся линии вируса гриппа В социркулируют по всему миру [5].

В отличие от вирусов гриппа А вирусы гриппа В имеют ограниченный резервуар хозяев. Вирусы гриппа А заражают человека, свиней, птиц, лошадей и других млекопитающих, тогда как вирус гриппа типа В затрагивает только людей, хотя его присутствие было подтверждено в мазках, полученных от тюленей [6, 7] и домашних свиней [8]. Это определяет более низкую скорость эволюционной изменчивости вирусов гриппа В. Тем не менее выраженная изменчивость вирусов гриппа В затрудняет создание эффективных лечебных, профилактических и диагностических средств. Несмотря на то что значимость вирусов В продемонстрирована на глобальном уровне [9, 10], большинство научных исследований сосредоточено главным образом на вирусах гриппа А, и знания об антигенной структуре гемагглютинина (ГА) вируса гриппа типа В по-прежнему достаточно ограничены.

Сказанное определяет значимость исследования эволюционной изменчивости и антигенной структуры ГА вирусов гриппа В. Применение специфичных моноклональных антител (МКА) может способствовать решению данных задач. МКА успешно используют для типирования вирусов гриппа в таких простых и доступных методах, как реакция нейтрализации и реакция торможения гемагглютинации (РТГА). МКА также являются ценным исследовательским инструментом при антигенной характеристике новых изолятов вирусов гриппа, что при сопоставлении с данными генетического анализа позволяет выявить закономерности изменчивости и эволюции данного возбудителя.

В задачу настоящего исследования входила разработка и характеристика панели МКА, направленных к ГА вирусов гриппа В Викторианской линии.

Материал и методы

Получение аллантаической жидкости, содержащей вирусы гриппа

Культивирование вирусов гриппа проводили в аллантаической полости развивающихся куриных эмбрионов согласно Методическим рекомендациям НИИ гриппа. Для получения вирусосодержащей аллантаической жидкости 9—11-дневные куриные эмбрионы стерильно заражали посевным вирусом в дозе от 10 до 100 ЭИД₅₀/0,2 мл. После герметизации парафином эмбрионы помещали в термостат на 48 ч инкубации при $36 \pm 0,5^\circ\text{C}$ для вируса гриппа типа А или на 72 ч при $32 \pm 0,5^\circ\text{C}$ для вируса гриппа типа В. Далее эмбрионы охлаждали при 4°C ,

вирусосодержащую аллантаическую жидкость стерильно собирали и проводили контроль гемагглютинирующей активности.

Получение вирусосодержащей культуральной жидкости (ВКЖ)

Для получения ВКЖ клеточную культуру MDCK в концентрации 200 тыс. кл/мл засеивали в культуральные флаконы и выращивали в течение 1–2 сут до 85–95% состояния монослоя в термостате при $36 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Перед заражением клеток вирусом из флаконов удаляли ростовую среду и отмывали 2 раза средой RPMI-1640 без сыворотки, после чего вносили поддерживающую среду, содержащую вирус. Инкубацию для вируса гриппа типа В производили при $33 \pm 0,5^\circ\text{C}$. После развития выраженного цитопатического действия (ЦПД) среду стерильно собирали и использовали как ВКЖ. Все вирусы были получены из коллекции Музея вирусов гриппа ФГБУ «НИИ гриппа» МЗ РФ. В работе использовались референс-штаммы вируса гриппа В из Международных центров ВОЗ по гриппу (CDC&P, Атланта, США, и NIMR, Лондон, Англия).

Очистка и концентрация вирусов

После накопления эталонных штаммов вирусные частицы из аллантаической жидкости осаждали ультрацентрифугированием при 50 000 g в течение 2 ч, суспендировали в малом количестве 10 mM трис-ЭДТА буфера, pH 7,2 (STE), и производили очистку вируса через градиент 20–60% сахарозы ультрацентрифугированием при 100 000 g в течение 2,5 ч с последующим осаждением вируса из зоны 36–40% сахарозы на дно при 120 000 g в течение 1 ч. Осадок ресуспендировали в STE. Полученные цельновирионные суспензии хранили до исследования в замороженном состоянии при -75°C .

Определение концентрации белка

Для определения концентрации белка использовали набор «BCA™ Protein Assay Kit» («Pierce», США). Реакцию проводили в полном соответствии с инструкцией по применению. Учёт результатов проводили при длине волны 560 нм, используя фотометр фирмы «Anthos» (Австрия). Концентрацию белка в исследуемых пробах рассчитывали по калибровочной кривой, линейный участок которой соответствовал интервалу концентраций 0,05–2 мг/мл, по белку.

Получение МКА

МКА к вирусу гриппа типа В (штамм В/Брисбен/46/15) были получены в лаборатории биотехнологии диагностических препаратов НИИ гриппа по методу, приведённому в работе [11], в следующей модификации. Мышей линии Balb/c иммунизировали путём внутрибрюшинного введения 70 мкг антигена вируса В/Брисбен/46/15, очищенного ультрацентрифугированием в градиенте плотности сахарозы. Через 8 нед мыши были бустированы очищенным концентратом того же вируса (50 мкг/мышь). Через 3 дня после бустер-иммунизации проводили гибридизацию спленоцитов иммунных мышей с клетками мышинной миеломы линии X63Ag8.653 в соотношении 10:1 в присутствии 50% раствора полиэтиленгликоля-2000 в среде Игла DMEM. Клонирование гибридом выполняли методом предельных разведений. Первичное тестирование клонов проводили в иммуноферментном анализе (ИФА). Гибридные клоны с заданным спектром реагирования реклонировали на селективной среде НАТ. Стабильные клоны – продуценты МКА подвергали криоконсервированию, а также использовали для получения асцитов.

Получение асцитных жидкостей

Мышам линии BALB/c, предварительно праймированным пристаном (0,5 мл/мышь), внутрибрюшинно вводили гибридные клетки в количестве 3–5 млн клеток на мышь. Спустя 2–3 нед асцитную жидкость отбирали из брюшной полости мышей. Исследования выполнены согласно Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных (приказ № 266 МЗ РФ от 19.06.2003).

Реакция гемагглютинации (РГА) и РТГА

РГА и РТГА ставили общепринятым методом в соответствии с Практическими рекомендациями [12]. За титр антител принимали их наибольшее разведение, полностью подавляющее гемагглютинацию 4 ГАЕ вируса.

Оценка свойств полученных МКА в непрямом ИФА

Планшеты сенсibiliзирова-ли в течение 18 ч при 4°C очищенным концентратом вируса, разведённым карбонатно-бикарбонатным буфером (КББ) до концентрации 2–4 мкг/мл. После отмывания несвязавшегося антигенного материала 0,01 М фосфатно-солевым буфером (ФСБ) с добавлением 0,05% твина -20 (ФСБ-Т)₂, рН 7,2, носили МКА в ФСБ-Т в разведениях 10⁻³–10⁻⁷ и инкубировали 1 ч при 37°C. Связавшиеся с антигеном МКА детектировали с помощью пероксидазных конъюгатов к IgG мыши («Sigma», США) в ФСБ-Т в течение 1 ч при 37°C. Пероксидазную реакцию проявляли добавлением субстратной смеси, содержащей 0,1 мг/мл 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) и 0,02% H₂O₂, в ацетат-цитратном буфере, рН 5,0. После остановки реакции 2N H₂SO₄ оптическую плотность измеряли на фотометре Anthos-2010 (Австрия) при длине волны 450 нм (ОП₄₅₀).

Изогипотипы МКА определяли в ИФА с использованием коммерческого набора «Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents» («Sigma») в соответствии с инструкциями фирмы-изготовителя.

Оценка нейтрализующей активности МКА в микрокультуральном ИФА

Двукратные разведения МКА (50 мкл) соединяли с равными объёмами вирусосодержащего материала, содержащего 100 ТЦД₅₀ вируса. 100 мкл смеси вирус/МКА инкубировали 1 ч при 37°C, после чего её наносили на отмытый 0,01М ФСБ, рН 7,2, монослой культуры клеток MDCK, выращенных в 96-луночных планшетах для культуральных работ («Nunc», Дания). Планшеты выдерживали в CO₂-инкубаторе до развития ЦПД в контрольных лунках (контроль репродукции 100 ТЦД₅₀ вируса в отсутствие МКА). Культуральную жидкость полностью удаляли, клетки фиксировали в течение 10 мин 80% холодным ацетоном и промывали. Ингибирование синтеза вирусных белков в присутствии МКА учитывали в микрокультуральном ИФА. Для этого в лунки с фиксированными клетками вносили по 100 мкл конъюгата вирусспецифичных МКА с пероксидазой хрена (инкубация 1ч при 37°C). Результаты ИФА учитывали, как описано выше. Нейтрализующим титром МКА считали последнее разведение МКА, при котором наблюдалось двукратное и большее снижение ОП₄₅₀ по сравнению с контролем репродукции вируса.

Результаты

В результате отбора положительных клонов была получена панель из 12 новых МКА (6А9, 7С8, 7Д9, 7Г9, 8А8, 6Е11, 9Г5, 10Д3, 7Н8, 8Д11, 9В5 и 6А4), специфически взаимодействующих в ИФА с очищенным концентратом

вируса-иммуногена В/Брисбен/46/15 Викторианской ЭЛ. Данный штамм является В/Брисбен/60/08-подобным вирусом, рекомендованным для включения в состав вакцин в Северном полушарии в сезоны 2016–2017 гг. [13] и 2017–2018 гг. [14]. Установлено, что все полученные МКА реагировали до высоких титров в ИФА (10⁶–10⁷) только с вирусами Викторианской ЭЛ при полном отсутствии взаимодействия с гетерологичными вирусами гриппа В Ямагатской ЭЛ, сезонными и потенциально пандемическими вирусами гриппа А субтипов (H1N1) pdm09, H3N2, H2N2, H5N1, H7N9 и H9N2. Согласно данным вестер-блоттинга все МКА были направлены к молекуле ГА. МКА относились к различным изотипам IgG, в частности МКА 6А9, 8А8, 9В5 к IgG1, МКА 7С8 и 7Г9 к IgG2a, МКА 7Д9 к IgG2b и МКА 6Е11, 9Г5, 10Д3, 7Н8, 8Д11 и 6А4 к IgG3. Для характеристики антигенных свойств штаммов используют РТГА и реакцию нейтрализации. Известно, что при типировании изолятов «золотым стандартом» является реакция нейтрализации. Было установлено, что все разработанные МКА обладали выраженной вируснейтрализующей активностью в отношении штамма-иммуногена В/Брисбен/46/15 до концентраций от 28 нг/мл до 120 мкг/мл для разных клонов МКА. Это позволяет использовать данные МКА для эпитопного картирования ГА вирусов гриппа В Викторианской ЭЛ. Однако наибольшее распространение для типирования и антигенного анализа изолятов имеет РТГА. МКА были исследованы в РТГА с набором штаммов разных лет выделения, относящихся к различным ЭЛ (табл. 1). Установлено, что все МКА обладали выраженной антигемагглютинирующей активностью в отношении вируса-иммуногена В/Брисбен/46/15. По степени интенсивности взаимодействия в РТГА МКА были условно разделены на 2 группы: 1) МКА (6А9, 7С8, 7Д9, 7Г9 и 8А8) с невысокой активностью (титры 1/80–1/320); 2) МКА (6Е11, 9Г5, 10Д3, 7Н8, 8Д11, 9В5 и 6А4) с высокими титрами (1/81920–1/163840). Ни одно из МКА не взаимодействовало в РТГА с вирусами гриппа В Ямагатской ЭЛ. Отмечено, что МКА 6Е11, 9Г5, 9В5 и 6А4 обладали способностью связываться с вирусом В/Россия/69, не взаимодействуя при этом со штаммами более поздних лет выделения – В/Гонконг/5/72, В/Сингапур/222/79 и В/СССР/100/83. Все МКА взаимодействовали в РТГА в эталонным штаммом В/Брисбен/60/08. Однако по степени реагирования с другими референс-штаммами гриппа В Викторианской ветви разработанные МКА были гетерогенны. Так, МКА 6А9, 7Д9, 8А8, 9Г5 и 9В5 были активны только в отношении генетической группы, представленной штаммом В/Брисбен/60/08. МКА 6Е11, 10Д3 и 6А4 не взаимодействовали с референс-штаммом В/Гонконг/330/01, при этом они реагировали с вирусами, подобными В/Шандонг/7/97 и В/Малайзия/2506/04. МКА 7С8, 7Г9, 7Н8 и 8Д11 проявляли антигемагглютинирующую активность в отношении всех протестированных в РТГА эталонных вирусов Викторианской ЭЛ.

Для оценки способности полученных МКА взаимодействовать с современными штаммами вируса гриппа В Викторианской филогенетической ветви было проведено тестирование МКА в РТГА с отечественными изолятами 2016–2017 гг. выделения. Были проанализированы вирусы, выделенные в двух различных системах – в куриных эмбрионах (КЭ) и культуре клеток MDCK. Установлено, что МКА 7С8, 7Г9, 6Е11, 9Г5, 10Д3, 7Н8, 8Д11, 9В5 и 6А4 реагировали в РТГА до высоких титров со всеми исследованными вирусами независимо от систе-

Взаимодействие МКА с эталонными штаммами вируса гриппа В разных лет выделения в РТГА

Штамм	Титр ¹ МКА в РТГА											
	6A9	7C8	7D9	7G9	8A8	6E11	9G5	10D3	7H8	8D11	9B5	6A4
Штаммы ранних лет выделения:												
В/Россия/69	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	1280	20 480	< 20	< 20	< 20	10 240	1280
В/Гонконг/5/72	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
В/Сингапур/222/79	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
В/СССР/100/83	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
Штаммы Ямагатской ЭЛ:												
В/Ямагата/16/88	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
В/Панама/45/90	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
В/Харбин/07/94	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
В/Яманаши/166/98	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
В/Виктория/504/00	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
В/Флорида/07/04	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
В/Массачусетс/2/12	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
В/Пхукет/3073/13	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
Штаммы Викторианской ЭЛ:												
В/Шандонг/7/97	< 20	40	< 20	80	< 20	10 240	< 160	10 240	40 960	40 960	< 160	5120
В/Шига/51/98	< 20	160	< 20	80	< 20	5120	< 160	2560	40 960	20 480	< 160	10 240
В/Токио/53/99	≤ 20	160	< 20	160	< 20	5120	< 160	640	20 480	40 960	< 160	2560
В/Гонконг/330/01	< 20	320	< 20	160	< 20	< 160	< 160	< 160	40 960	40 960	< 160	< 160
В/Малайзия/2506/04	< 20	160	< 20	80	< 20	10 240	< 160	1280	81 920	40 960	< 160	20 480
В/Брисбен/60/08	20	320	160	160	80	40 960	40 960	81 920	20 480	20 480	81 920	40 960
В/Брисбен/46/15	80	320	160	160	80	81 920	163 840	163 840	163 840	81 920	163 840	81 920

мы выделения (табл. 2). МКА 7С8 и 7G9 также взаимодействовали как с вирусами, выделенными в КЭ, так и с МДСК-вариантами, при этом, как правило, титры МКА при реагировании с «клеточными» изолятами были выше. Совершенно другая картина наблюдалась при взаимодействии вирусов, выделенных в разных системах, с МКА 6A9, 7D9 и 8A8. МКА 6A9 и 8A8 практически не взаимодействовали с вирусами, выделенными в КЭ (титр в РТГА < 20–1/20), но при этом МКА 8A8 реагировали до более высоких титров со штаммами, выделенными в клетках МДСК, по сравнению со штаммом-иммуногеном В/Брисбен/46/15, а МКА 6A9 имели сходный уровень взаимодействия. МКА 7G9 также не взаимодействовали с большинством КЭ-вариантов вирусов, но при этом хорошо реагировали с МДСК-вариантами. С целью проверки предположения, что МКА отличаются по уровню взаимодействия в РТГА с вирусами, изолированными в различных системах выделения, было проведено сравнение штаммов, выделенных параллельно в КЭ и культуре клеток МДСК (табл. 3). Действительно, оказалось, что МКА 6A9, 7G9 и 8A8 практически не выявляли варианты вирусов, выделенных в КЭ, тогда как те же вирусы, но выделенные в клетках МДСК, реагировали с МКА в РТГА до высоких титров. МКА 7С8, 7D9, 6E11, 9G5, 10D3, 7H8, 8D11, 9B5 и 6A4 выявляли в РТГА оба варианта изолятов, но при этом титр МКА с МДСК-вариантами был выше по сравнению с КЭ-вариантами вирусов.

Обсуждение

Социркуляция двух ЭЛ вируса гриппа В в один эпидемический сезон определяет необходимость создания специфичных реагентов для быстрой идентификации и типирования новых изолятов. С этой целью была разра-

ботана панель МКА к ГА вируса гриппа В/Брисбен/46/15 Викторианской ЭЛ. Показано, что все МКА взаимодействовали в РТГА только с вирусами Викторианской ветви при отсутствии неспецифического взаимодействия с В/Ямагата-подобными штаммами. При анализе МКА с вирусами ранних лет выделения было обнаружено, что МКА 6E11, 9G5, 9B5 и 6A4 обладали способностью связываться с вирусом В/Россия/69, не взаимодействуя при этом со штаммами более поздних лет выделения – В/Гонконг/5/72, В/Сингапур/222/79 и В/СССР/100/83. Предполагается, что штаммы Ямагатской линии эволюционировали от В/СССР/100/83-подобных штаммов [15, 16]. Было показано, что вирусы Ямагатской разновидности отличались от штамма В/СССР/100/83 на 16–18 аминокислотных замен, а от эталонного представителя В/Виктория/2/87 – на 25–27 аминокислотных замен [15]. Кроме того, у штаммов В/Гонконг/5/72, В/Сингапур/222/79 и В/СССР/100/83 показано наличие делеций в гене ГА, что характерно для В/Ямагата-подобных вирусов. Так как МКА 6E11 и 6A4 реагировали в РТГА со всеми протестированными штаммами Викторианской ЭЛ за исключением В/Гонконг/330/01, можно предполагать, что эти МКА направлены к консервативному эпитопу, который имелся у вирусов гриппа В ещё до разделения на две независимые филогенетические ветви. Однако этот эпитоп впоследствии был утрачен у В/Ямагата-подобных штаммов, но сохранился у большинства современных представителей Викторианской линии. С другой стороны, МКА 9G5 и 9B5, также взаимодействующие со штаммом В/Россия/69 как в РТГА, так и в реакции нейтрализации, не реагировали с изолятами Викторианской группы, подобными В/Шандонг/7/97 и В/Малайзия/2506/04, до появления генетической группы, представленной эталоном В/Брисбен/60/08. Вероятнее все-

Таблица 2

Взаимодействие МКА со штаммами вируса гриппа В Викторианской линии 2016–2017 гг. выделения в РТГА

Штамм	Титр ¹ МКА в РТГА											
	6A9	7C8	7D9	7G9	8A8	6E11	9G5	10D3	7H8	8D11	9B5	6A4
В/Брисбен/46/15	80	320	160	160	80	81 920	163 840	163 840	163 840	81 920	163 840	81 920
В/Санкт-Петербург/44/17*	< 20	160	80	80	< 20	20 480	81 920	163 840	81 920	40 960	81 920	40 960
В/Санкт-Петербург/79/17*	20	160	20	160	20	81 920	81 920	163 840	163 840	81 920	81 920	81 920
В/Санкт-Петербург/80/17*	< 20	160	160	80	20	20 480	81 920	81 920	40 960	20 480	40 960	20 480
В/Санкт-Петербург/83/17*	20	80	≤ 20	80	< 20	81 920	327 680	163 840	81 920	81 920	163 840	81 920
В/Санкт-Петербург/104/17*	< 20	80	< 20	80	< 20	40 960	81 920	40 960	40 960	20 480	40 960	40 960
В/Санкт-Петербург/106/17*	< 20	160	< 20	160	< 20	40 960	81 920	81 920	40 960	20 480	81 920	40 960
В/Санкт-Петербург/114/17*	< 20	80	80	40	< 20	20 480	40 960	40 960	40 960	20 480	40 960	40 960
В/Санкт-Петербург/156/17*	≤ 20	80	< 20	80	< 20	81 920	163 840	163 840	81 920	40 960	81 920	81 920
В/Санкт-Петербург/174/17*	< 20	80	< 20	80	< 20	40 960	40 960	40 960	20 480	10 240	40 960	20 480
В/Санкт-Петербург/187/17*	< 20	80	< 20	80	< 20	40 960	40 960	40 960	20 480	10 240	40 960	40 960
В/Санкт-Петербург/201/17*	< 20	80	< 20	80	< 20	40 960	40 960	20 480	20 480	5120	20 480	40 960
В/Санкт-Петербург/203/17*	< 20	40	< 20	40	< 20	20 480	20 480	20 480	10 240	5120	20 480	20 480
В/Санкт-Петербург/209/17*	< 20	80	< 20	80	< 20	40 960	81 920	40 960	20 480	10 240	40 960	81 920
В/Санкт-Петербург/225/17*	< 20	80	< 20	80	< 20	81 920	163 840	327 680	81 920	81 920	327 680	81 920
В/Санкт-Петербург/225/16**	160	5120	320	1280	640	163 840	327 680	327 680	327 680	163 840	327 680	327 680
В/Санкт-Петербург/230/16**	160	10 240	160	640	2560	40 960	163 840	163 840	40 960	20 480	163 840	81 920
В/Санкт-Петербург/292/16**	160	2560	160	640	320	40 960	81 920	81 920	40 960	40 960	163 840	81 920
В/Санкт-Петербург/323/16**	80	2560	160	320	320	81 920	163 840	163 840	81 920	81 920	327 680	163 840
В/Санкт-Петербург/324/16**	160	2560	320	640	640	40 960	163 840	163 840	81 920	40 960	163 840	40 960
В/Иркутск/2/16**	160	10 240	320	2560	5120	40 960	327 680	81 920	81 920	40 960	40 960	40 960
В/Иркутск/4/16**	160	20 480	640	2560	1280	163 840	327 680	327 680	327 680	327 680	327 680	163 840
В/Астрахань/2/17**	< 20	160	160	80	≤ 20	40 960	163 840	81 920	81 920	40 960	40 960	40 960
В/Санкт-Петербург/148/17**	160	20 480	640	2560	2560	163 840	327 680	327 680	327 680	163 840	163 840	327 680

Примечание. Здесь и в табл. 3: * – штаммы, изолированные в КЭ; ** – штаммы, изолированные в культуре клеток MDCK.

Таблица 3

Сравнение взаимодействия МКА со штаммами вируса гриппа В Викторианской линии в РТГА, изолированными параллельно в КЭ и культуре клеток MDCK

Штамм	Титр ¹ МКА в РТГА											
	6A9	7C8	7D9	7G9	8A8	6E11	9G5	10D3	7H8	8D11	9B5	6A4
В/Брисбен/46/15	80	320	160	160	80	81 920	163 840	163 840	163 840	81 920	163 840	81 920
В/Санкт-Петербург/176/17*	< 20	80	< 20	20	< 20	40 960	40 960	20 480	20 480	10 240	40 960	20 480
В/Санкт-Петербург/176/17**	320	10 240	640	5120	5120	163 840	327 680	327 680	327 680	327 680	327 680	81 920
В/Санкт-Петербург/204/17*	< 20	160	≤ 20	80	< 20	40960	81 920	40 960	20 480	20 480	40 960	20 480
В/Санкт-Петербург/204/17**	320	10 240	2560	5120	10240	81 920	327 680	327 680	327 680	163 840	327 680	163 840
В/Санкт-Петербург/210/17*	≤ 20	160	≤ 20	160	20	81 920	163 840	327 680	81 920	81 920	163 840	81 920
В/Санкт-Петербург/210/17**	640	10 240	640	1280	5120	327 680	327 680	327 680	327 680	327 680	327 680	163 840
В/Санкт-Петербург/234/17*	< 20	80	< 20	80	< 20	20 480	40 960	20 480	20 480	10 240	40 960	20 480
В/Санкт-Петербург/234/17**	320	20 480	1280	5120	10 240	163 840	163 840	163 840	327 680	163 840	163 840	81 920
В/Санкт-Петербург/235/17*	20	160	< 20	160	< 20	81 920	163 840	163 840	81 920	81 920	163 840	81 920
В/Санкт-Петербург/235/17**	320	5120	320	1280	1280	81 920	327 680	327 680	327 680	163 840	327 680	81 920
В/Санкт-Петербург/236/17*	< 20	80	< 20	80	< 20	20 480	40 960	20 480	20 480	10 240	20 480	20 480
В/Санкт-Петербург/236/17**	160	2560	320	640	640	81 920	163 840	327 680	163 840	163 840	327 680	163 840
В/Санкт-Петербург/238/17*	< 20	80	< 20	80	< 20	40 960	81 920	40 960	20 480	10 240	40 960	40 960
В/Санкт-Петербург/238/17**	80	1280	320	640	640	81 920	163 840	327 680	327 680	81 920	163 840	163 840
В/Санкт-Петербург/257/17*	20	160	20	160	< 20	81 920	163 840	163 840	81 920	40960	163 840	81 920
В/Санкт-Петербург/257/17**	320	20 480	640	5120	10 240	163 840	327 680	327 680	327 680	163840	163 840	81 920

го это связано с появлением реверсивной аминокислотной замены по отношению к эталонному штамму В/Россия/69. Ранее было показано, что у российских изолятов 2009–2012 гг. выделения, относящихся к группе В/Брисбен/60/08-подобных штаммов, зафиксированы 4 аминокислотные за-

мены, 3 из которых расположены в антигенных сайтах ВЕ, ВА (петля 150), ВВ2 (петля 160), и аминокислотная замена S172P, которая расположена вне антигенно-значимой области, но сопровождается приобретением пролина – аминокислоты с крупным радикалом, которая несовместима с

α -спиралью молекулы ГА, что характерно для эталонного штамма В/Брисбен/60/08 [17].

МКА 7С8, 7G9, 7Н8 и 8D11 взаимодействовали в РТГА со всеми штаммами вируса гриппа В Викторианской линии (В/Шандонг/7/97-, В/Гонконг/330/01-, В/Малайзия/2506/04- и В/Брисбен/60/08-подобные штаммы), что позволяет предполагать, что данные МКА направлены к консервативному эпитопу (или эпитопам), специфичному для ГА вирусов гриппа В Викторианской ветви.

В ходе анализа вирусов гриппа В Викторианской линии в РТГА было обнаружено, что ряд МКА (6А9, 7G9 и 8А8) отличаются по уровню взаимодействия в РТГА от вирусов, изолированных в различных системах выделения. Известно, что вирусы гриппа В, адаптированные к размножению в КЭ, отличаются по антигенной структуре ГА от вирусов, выращенных в культуре клеток МДСК. Было показано, что культивирование вирусов в различных системах приводит к ряду специфических замен в большой субъединице ГА. В частности, было обнаружено, что адаптация вирусов гриппа В к КЭ приводит к потере сайта гликозилирования (N-X-T) в позициях 194–196 в молекуле ГА1 [18]. Кроме того, показано, что некоторые лабораторные варианты вируса гриппа В, выращенные на КЭ, проявляли альтернативные антигенные свойства благодаря единичной замене глицина в положении 141 [18, 19]. Установлено, что адаптированный к КЭ вирус В/Люон/1271/96, несущий замену 141Gly→Arg, показал увеличение сродства к 3'-сиалил(N-ацетиллактозе), в то время как связывание с 6'-сиалил(N-ацетиллактозамин) было ослаблено. В то же время МДСК-адаптированный вариант того же вируса с Gly141 отображал улучшенное сродство к 6'-сиалил(N-ацетиллактозамину) и значительно меньшее сродство к 3'-сиалил(N-ацетиллактозе) [20]. Вероятно, МКА 6А9, 7G9 и 8А8 распознают антигенные области ГА вирусов гриппа В Викторианской ЭЛ, которые подвержены изменениям в результате культивирования в различных клеточных системах. Этим можно объяснить отсутствие взаимодействия этих МКА с эталонными В/Виктория-подобными штаммами, так как все эти вирусы выращивались в КЭ.

Выводы

1. Получены и охарактеризованы новые МКА к ГА вирусам гриппа В Викторианской ЭЛ.

2. Установлено, что созданные МКА могут быть успешно применены для идентификации и антигенного анализа В/Виктория-подобных штаммов. Полученные МКА позволяют выявлять и дифференцировать изоляты, выделенные в КЭ и культуре клеток МДСК.

3. Наличие вируснейтрализующей активности у МКА позволяет использовать их для эпитопного картирования ГА вирусов гриппа В Викторианской ЭЛ и установления эволюционных связей с вирусами ранних лет выделения.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1-11, 13-16, 18-20 см. REFERENCES)

12. Соминина А.А., Бурцева Е.И., Лобова Т.Г., Коновалова Н.И., Гудкова Т.М., Литвинова О.М. и др. МР «Выделение вирусов гриппа в клеточных культурах и куриных эмбрионах и их идентификация». М.; 2006.

17. Лобова Т.Г., Прокопец А.В., Комиссаров А.Б., Даниленко Д.М., Паянкова В.Ф., Суховецкая В.Ф. и др. Эволюционная изменчивость вирусов гриппа В, циркулировавших в Российской Федерации с 2005 по 2012 г. *Вопросы вирусологии*. 2012; 54(6): 22-6.

REFERENCES

- Nerome R., Hiromoto Y., Sugita S., Tanabe N., Ishida M., Matsumoto M., et al. Evolutionary characteristics of influenza B virus since its first isolation in 1940: dynamic circulation of deletion and insertion mechanism. *Arch. Virol.* 1998; 143(8): 1569-83.
- Chen J.M., Guo Y.J., Wu K.Y., Guo J.F., Wang M., Dong J., et al. Exploration of the emergence of the Victoria lineage of influenza B virus. *Arch. Virol.* 2007; 152(2): 415-22.
- Kanegae Y., Sugita S., Endo A., Ishida M., Senya S., Osako K., et al. Evolutionary pattern of the hemagglutinin gene of influenza B viruses isolated in Japan: cocirculating lineages in the same epidemic season. *J. Virol.* 1990; 64(6): 2860-5.
- Lin Y.P., Gregory V., Bennett M., Hay A. Recent changes among human influenza viruses. *Virus Res.* 2004; 103(1-2): 47-52.
- Paiva T.M., Benega M.A., Silva D.B., Santos K.C., Cruz A.S., Hortenci M.F., et al. Evolutionary pattern of reemerging influenza B/Victoria lineage viruses in São Paulo, Brazil, 1996-2012: Implications for vaccine composition strategy. *J. Med. Virol.* 2013; 85(11): 1983-9.
- Osterhaus A.D., Rimmelzwaan G.F., Martina B.E., Bestebroer T.M., Fouchier R.A. Influenza B virus in seals. *Science*. 2000; 288(5468): 1051-3.
- Bodewes R., Morick D., de Mutsert G., Osinga N., Bestebroer T., van der Vliet S., et al. Recurring influenza B virus infections in seals. *Emerg. Infect. Dis.* 2013; 19(3): 511-2.
- Ran Z., Shen H., Lang Y., Kolb E.A., Turan N., Zhu L., et al. Domestic pigs are susceptible to infection with influenza B viruses. *J. Virol.* 2015; 89(9): 4818-26.
- Glezen W., Schmier J.K., Kuehn C.M., Ryan K.J., Oxford J. The burden of influenza B: a structured literature review. *Am. J. Public Health.* 2013; 103(3): e43-5. doi: 10.2105/AJPH.2012.301137.
- Caini S., Huang Q.S., Ciblak M.A., Kuszniarz G., Owen R., Wangchuk S., et al. Epidemiological and virological characteristics of influenza B: results of the Global Influenza B Study. *Influenza Other Respir. Viruses.* 2015; 9(Suppl. 1): 3-12.
- Kohler G., Milstein C. Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur. J. Immunol.* 1976; 6(7): 511-9.
- Sominina A.A., Burtseva E.I., Lobova T.G., Konovalova N.I., Gudkova T.M., Litvinova O.M., et al. MR «Isolation of influenza viruses in cell cultures and chicken embryos and their identification». Moscow; 2006. (in Russian)
- Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2016–2017 northern hemisphere influenza season. *Wkly Epidemiol. Rec.* 2016; 91(10): 121-32.
- Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2017–2018 northern hemisphere influenza season. *Wkly Epidemiol. Rec.* 2017; 92(11): 117-28.
- Rota P.A., Wallis T.R., Harmon M.W., Rota J.S., Kendal A.P., Nerome K. Cocirculation of two distinct evolutionary lineages of influenza type B virus since 1983. *Virology.* 1990; 175(1): 65-8.
- Ambrose C.S., Levin M.J. The rationale for quadrivalent influenza vaccines. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2012; 8(1): 81-8.
- Lobova T.G., Prokopets A.V., Komissarov A.B., Danilenko D.M., Payankova V.F., Sukhovetskaya V.F., et al. Evolutionary variability of influenza B viruses in Russian Federation in 2005-2012. *Voprosy virusologii.* 2012; 54(6): 22-6. (in Russian)
- Lugovtsev V.Y., Vodeiko G.M., Strupczewski C.M., Ye Z., Levandowski R.A. Generation of the influenza B viruses with improved growth phenotype by substitution of specific amino acids of Hemagglutinin. *Virology.* 2007; 365(2): 315-23.
- Lugovtsev V.Y., Vodeiko G.M., Levandowski R.A. Mutational pattern of influenza B viruses adapted to high growth replication in embryonated eggs. *Virus Res.* 2005; 109(2): 149-57.
- Govorkova E.A., Matrosovich M.N., Tuzikov A.B., Bovin N.V., Gerdil C., Fanget B., et al. Selection of receptor-binding variants of human influenza A and B viruses in baby hamster kidney cells. *Virology.* 1999; 262(1): 31-8.

Поступила 12.02.18

Принята в печать 06.03.18