

Глебова Т.И., Кливлеева Н.Г.,
Лукманова Г.В.,
Шаменова М.Г., Байсейіт С.Б.,
Таубаева Ш.Ж.

**Изучение спектра реактивности
моноклональных антител к
казахстанским изолятам вируса
гриппа А(Н1N1)**

Glebova T.I., Klivleeva N.G.,
Lukmanova G.V.,
Shamenova M.G., Bayseyit S.B.,
Taubayeva Sh.Zh.

**Study of the spectrum of
reactivity of monoclonal
antibodies to Kazakhstan isolates
of influenza A virus (H1N1)**

Глебова Т.И., Кливлеева Н.Г.,
Лукманова Г.В., Шаменова М.Г.,
Байсейіт С.Б., Таубаева Ш.Ж.

**Моноклональді антитенелердің
спектра реактивтілігін
қазақстандық А(Н1N1) тұмау
вирус изоляттарына зерттеу.**

Представлены результаты изучения иммунологической характеристики моноклональных антител (МКА 5С3, 4F2, 3G4 и 2Н6), полученных к вирусам гриппа А/Алматы/5/98 (H1N1) и А/Алматы/373/09 (H1N1). Установлено, что МКА имеют широкий спектр реагирования и в реакции гемагглютинации в высоких титрах (1:160 – 1:10240) подавляли гемагглютинирующую активность гомологичных и родственных эталонных и казахстанских вирусов гриппа и не реагировали с гетерологичными вирусами А(Н3N2) и типа В. В реакции микронейтрализации МКА нейтрализовали вирусы гриппа А(Н1N1) и не реагировали с вирусами гриппа А(Н3N2) и типа В. Сходные спектры реактивности МКА по отношению к вирусам А/Н1N1 свидетельствуют о наличии в составе HA всех исследованных вирусов общих антигенных детерминант, что позволяет рекомендовать полученные МКА для дифференциации вирусов А(Н1N1) от сезонных штаммов А(Н3N2) и типа В.

Ключевые слова: вирус гриппа, моноклональные антитела, гемагглютинин, реакция торможения гемагглютинации, реакция микронейтрализации.

Results of the study immunological characteristics of monoclonal antibodies (mAb 5S3, 4F2, 3G4 and 2H6), received by influenza viruses A/Almaty/5/98 (H1N1) and A/Almaty/373/09 (H1N1) are presented. It was found that the MCA have a wide range of responses and reactions of hemagglutination in high titers (1: 160 - 1: 10240) inhibited the hemagglutinating activity of homologous and related reference and Kazakh influenza viruses and did not react with heterologous virus A (H3N2) and type B. reaction microneutralization ICA neutralize the virus influenza A (H1N1) and did not react with influenza A (H3N2) and B-type similar spectrum of ICA reactivity with respect to virus A/H1N1 indicate the presence in the lineup for all the studied viruses antigenic determinants, which allows recommend obtained by ICA to differentiate virus A (H1N1) strains of seasonal A (H3N2) and type B.

Key words: Keywords: monoclonal antibody, influenza virus, hemagglutinin, enzyme immunoassay, hemagglutination inhibition, reaction of micro neutralization.

А/Алматы/5/98 (H1N1) және А/Алматы/373/09 (H1N1) тұмау вирустарына алынған моноклоналды антитенелердің (МКА 5С₃, 4F₂, 3G₄ және 2Н₆) иммунологиялық сипаттамасын зерттеу жұмыстарының нәтижелері көрсетілген. МКА тұмау вирусының А(Н1N1) түрімен кең спектрлы әсер ететіні байқалған, сондықтан МКА тұмау вирусының А(Н1N1) түрін, маусымдық А(Н3N2) штамдарымен В типінен дифференциациялауға мүмкіндік береді.

А /Алматы/5/98 (H1N1) және А /Алматы/373/09 (H1N1) тұмау вирустарынан алынған, моноклоналдық антитененің иммунологиялық мінездемесінің нәтижелері (МКА 5С3, 4F26 3G4 және 2Н6). Моноклоналдық антитененің кең спектрі гемагглютинация реакциясында жоғары титрлерде (1:160 – 1:10240) эталондық және қазақстандық гемагглютинацияға белсенді гомологиялық тұмау вирусына жақын гетерологиялық емес вирустар А/(Н3N2) және В. А/(Н3N2) және В тұмау вирустарынсыз МКА-нің шағын бейтараптандыру реакциясында (H1N1) тұмау вирусын бейтараптандырды. МКА спектрлі қалыптасуы А /H1N1 вирусының құрамында ортақ гемагглютининдік антитененің детерминантын зерттеу МКА А(Н1N1) вирусының дифференциясы үшін маусымдық штамдардан алынған А/(Н3N2) және В типін ұсыну.

Түйін сөздер: тұмау вирусы, моноклоналды антитене, иммунноферментті талдау, гемагглютинин, гемагглютинация тежеуінің реакциясы, шағын бейтараптандыру реакциясы.

**ИЗУЧЕНИЕ СПЕКТРА
РЕАКТИВНОСТИ
МОНОКЛОНАЛЬНЫХ
АНТИТЕЛ
К КАЗАХСТАНСКИМ
ИЗОЛЯТАМ ВИРУСА
ГРИППА А(Н1N1)**

Введение

Во всех странах мира основной экономической ущерб от инфекционных заболеваний наносят острые респираторные вирусные инфекции и грипп. В России на их долю приходится примерно 90% всей инфекционной заболеваемости. По данным официальной статистики в РФ ежегодно регистрируется от 900 тысяч до 3,5 млн. случаев гриппа, при этом умирает от 20 до 53 тысяч человек в год [1]. В Казахстане ежегодно регистрируется до миллиона случаев острых респираторных заболеваний [2].

Спектр эпидемических штаммов вирусов гриппа и их характеристика варьируют в зависимости от сезонов года. В последние годы наблюдается социркуляция вирусов гриппа подтипов А(Н1N1), А(Н3N2) и рода В в различных сочетаниях. Необычайная сложность эпидемической ситуации связана с появлением реассортантных вирусов [3, 4]. В связи с этим возрастает значение ранней дифференциальной диагностики первых случаев эпидемических вспышек с применением специфичных и чувствительных методов. Большой прогресс в диагностике вирусных инфекций достигнут за счет разработки системы получения моноклональных антител (МКА). Тем самым резко повысились специфичность и чувствительность диагностических методов определения вирусных антигенов [5].

Целью настоящего исследования являлось получение МКА к эпидемическим вирусам гриппа А/Алматы/5/98 (Н1N1) и А/Алматы/373/09 (Н1N1) и изучение их спектра реактивности по отношению к штаммам вирусов гриппа подтипа А(Н1N1).

Материалы и методы исследования

Вирусы. В работе использовали эталонные и эпидемические штаммы вирусов гриппа А и В: А/свинья/Айова/15/30 (Н1N1), А/Алматы/5/98 (Н1N1), А/Алматы/32/98 (Н1N1), А/Соломоновы острова/03/06 (Н1N1), А/Калифорния/04/09 (Н1N1)_v, А/Алматы/347/09 (Н1N1)_v, А/Алматы/352/09 (Н1N1)_v, А/Алматы/373/09 (Н1N1), А/Атырау/890/13 (Н1N1), А/Балхаш/911/13 (Н1N1), А/Висконсин/67/05 (Н3N2), В/Шаньдун/07/97 (Ямагата) и В/Брисбен/60/08 (Виктория).

Очистка и концентрация вирусов. Вирусы культивировали в аллантоисной полости 9-дневных куриных эмбрионов, затем концентрировали, очищали и инактивировали, как описано ранее [6]. Препараты поверхностных гликопротеидов получали из очищенных концентрированных суспензий вирусов путем обработки 5% детергентом МЭСК. Гемагглютинин (НА) и нейраминидазу (НА) отделяли центрифугированием на центрифуге Avanti J-30I (Beckman Coulter, США) при 29000 об/мин в течение 2ч [7].

Иммунизация животных. Для иммунизации использовали мышей линии BALB/c 7-8 недельного возраста, весом 15 – 20 г. Предварительно животных выдерживали в карантине в течение 15 дней. Первую иммунизацию проводили внутривенно введением очищенного и концентрированного вируса (50-100 мкг/мышь) в смеси с полным адьювантом Фрейнда (Sigma, G), повторную – с неполным адьювантом Фрейнда. Бустер-иммунизацию осуществляли путем внутривенного введения вируса гриппа в дозе 30 мкг/мышь за 3 дня до выделения клеток селезенки и проведения процедуры слияния.

Получение МКА. Слияние клеток селезенки гипериммунных животных и перевиваемой линии мышинной миеломы X63Ag8.653 проводили по методу, описанному в работе [8]. Отбор специфических гибридов осуществляли с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) и в реакции торможения гемагглютинации (РТГА). Положительные гибридные клетки клонировали методом предельных разведений.

ИФА выполняли на панелях «NUNC», (Дания), лунки которых сенсibilизировали вирусами А/Алматы/5/98 (Н1N1) и А/Алматы/373/09 (Н1N1) в концентрации 2 мкг/лунка и инкубировали с МКА в серийных разведениях. Далее реакцию выполняли, как описано ранее [6].

РТГА проводили с использованием 0,75% взвесей эритроцитов человека группы 1(0) или кур по стандартной методике [9]. При постановке РТГА использовались МКА в концентрациях 8-10 мг/мл.

Реакцию микронейтрализации (РМН) проводили на 96-луночных планшетах фирмы Sarstedt (Германия) при 37°C в CO₂-термостате CB150 «Binder» (Германия).

Десятикратные разведения препаратов МКА соединяли с равными объемами 100 ТЦД₅₀ вирусов гриппа А в среде Игла МЭМ без сыворотки с добавлением 0,126 мг/мл аргинина, 2 мкг/

мл ТРСК-трипсина (Sigma), и инкубировали 1 ч при 37°C. 100 мкл смеси вирус – МКА наносили на отмытые ФСБ лунки с монослоем клеток MDCK. Планшеты выдерживали трое суток в CO₂-термостате до развития ЦПД в контрольных лунках. После удаления среды клетки фиксировали 20 мин 80% холодным ацетоном. В лунки вносили по 100 мкл конъюгата МКА с пероксидазой хрена и инкубировали 1 ч при 37°C. Рабочее разведение конъюгата на 0,01М ФСБ с 5% обезжиренным молоком составляло 1:5000. После отмывания ФСБ в лунки добавляли 100 мкл субстрат-хромогенной смеси, содержащей 0,05% H₂O₂ и 0,1 мг/мл 3,3', 5,5' – тетраметилбензидина на 0,1М ацетат-цитратном буфере (рН 5,0). Реакцию останавливали 2NH₂SO₄. Оптическую плотность при длине волны 450нм (ОП₄₅₀) определяли на фотометре Anthos (Австрия). Титром антител считали последнее разведение сыворотки, при котором наблюдалось двукратное снижение ОП_{450 нм} по сравнению с контролем вируса.

Все эксперименты проводили в трехкратной повторности и проводили статистическую обработку полученных результатов.

Результаты и обсуждение

При слиянии клеток селезенки гипериммунных животных и перевиваемой линии мышинной миеломы отобраны четыре специфические гибридомы, продуцирующие МКА к вирусам гриппа А/Алматы/5/98 (Н1N1) и А/Алматы/373/09 (Н1N1). Специфическую активность полученных препаратов определяли в РТГА и РМН, используя в качестве антигенов вирусы гриппа А человека и свиней подтипов Н1N1, Н3N2 и вирусы гриппа рода В.

В таблице 1 представлены результаты изучения специфической активности МКА в РТГА. Как видно из таблицы 1, МКА 5С₃ и 4F₂ к вирусу А/Алматы/5/98 (Н1N1) в высоких титрах (1:2560 – 1:10240) подавляли гемагглютинирующую активность гомологичного вируса и вирусов А/Балхаш/911/13, А/Атырау/890/13 и А/Соломоновы острова/03/06, в титрах 1:160–1:1280 – штаммов А/Алматы/32/98, А/Алматы/373/09, А/Алматы/347/09, А/Алматы/352/09, А/свинья/Айова/15/30 и А/Калифорния/04/09 и не реагировали с вирусами А/Висконсин/67/05 (Н3N2), В/Шаньдун/07/07 (Ямагата), В/Брисбен/60/2008 (Виктория).

Таблица 1 – Реактивность МКА к вирусам гриппа А/Алматы/5/98 (H1N1) и А/Алматы/373/09 (H1N1) в РТГА

Вирус	Титр МКА			
	А/Алматы/5/98		А/Алматы/373/09	
	5C ₃	4F ₂	3G ₄	2H ₆
А/Алматы/347/09 (H1N1)v	320	160	320	320
А/Алматы/352/09 (H1N1)v	160	320	160	320
А/Алматы/373/09 (H1N1)	320	320	5120	10240
А/Алматы/32/98 (H1N1)	640	640	1280	5120
А/Алматы/5/98 (H1N1)	5120	10240	320	320
А/Атырау/890/13 (H1N1)	1280	2560	320	320
А/Балхаш/911/13 (H1N1)	2560	5120	160	320
А/Соломоновы острова/03/06 (H1N1)	2560	5120	160	320
А/свинья/Айова/15/30 (H1N1)	1280	640	1280	2560
А/Калифорния/04/09 (H1N1)v	160	160	160	320
А/Висконсин/67/05 (H3N2)	<10	<10	<10	<10
В/Шаньдун/07/97 (Ямагата)	<10	<10	<10	<10
В/Брисбен/60/08 (Виктория)	<10	<10	<10	<10
Контроль – незараженная аллантоисная жидкость	<10	<10	<10	<10

Примечание – приведены обратные величины титров специфических антигемагглютининов

Сходные спектры реактивности проявляли МКА 3G₄ и 2H₆ к вирусу А/Алматы/373/09 (H1N1), которые в титрах 1:160-1:5120 ингибировали гемагглютинацию штаммов вирусов гриппа подтипа А(H1N1). Полученные данные

свидетельствуют о наличии в составе НА всех исследованных вирусов общих антигенных детерминант.

В таблице 2 приведены результаты изучения реактивности МКА в РМН.

Таблица 2 – Реактивность МКА к вирусам гриппа А/Алматы/5/98 (H1N1) и А/Алматы/373/09 (H1N1) в реакции микро-нейтрализации

Вирус	Титр МКА			
	А/Алматы/5/98		А/Алматы/373/09	
	5C ₃	4F ₂	3G ₄	2H ₆
А/Алматы/5/98 (H1N1)	5120	10240	80	160
А/Атырау/890/13 (H1N1)	1280	5120	160	160
А/Балхаш/911/13 (H1N1)	1280	5120	80	160
А/Алматы/32/98 (H1N1)	160	320	1280	2560
А/Алматы/373/09 (H1N1)	320	320	2560	5120
А/Алматы/347/09 (H1N1)v	320	640	160	320
А/Соломоновы острова/03/06 (H1N1)	1280	5120	80	160
А/свинья/Айова/15/30 (H1N1)	320	640	1280	2560
А/Калифорния/04/09 (H1N1)v	160	640	160	160
А/Висконсин/67/05 (H3N2)	0	0	0	0
В/Шаньдун/07/97	0	0	0	0
В/Брисбен/60/08	0	0	0	0

Примечание – приведены обратные величины титров МКА

Из таблицы 2 видно, что МКА 5С₃ и 4F₂ к вирусу А/Алматы/5/98 (Н1N1) и 3G₄ и 2H₆ к вирусу А/Алматы/373/09 (Н1N1) в титрах 1:80 – 1:5120 нейтрализовали те же штаммы вирусов, гемагглютинирующая активность которых подавлялась в РТГА, но не оказывали нейтрализующего действия на вирусы А/Висконсин/67/05 (Н3N2), В/Шаньдун/07/07 (Ямагата) и В/Брисбен/60/2008 (Виктория).

Таким образом, полученные МКА являются высокоспецифичными и чувствительными по отношению к НА вирусов гриппа подтипа А(Н1N1) и дифференцируют их от сезонных штаммов вирусов гриппа А(Н3N2) и типа В.

Известно, что существенную роль в выборе тактики лечения и профилактике вирусных инфекций играет ранняя и точная лабораторная диагностика. Одной из основных составляющих в определении этиологии вирусной инфекции остается серологический анализ. МКА позволяют резко повысить специфичность и чувствительность диагностических методов определения вирусных антигенов [10]. Моноклоны, полученные к казахстанским вирусам гриппа перспективны для создания тест-систем для быстрой дифференциальной диагностики циркулирующих вирусов гриппа А(Н1N1).

Литература

- 1 Салтыкова Т. С. Заболеваемость гриппом и отсроченная смертность у лиц старше 60 лет: автореф. ... к. м. н.: 14.02.02. – М., 2010. – 25 с.
- 2 Ежегодно в Казахстане регистрируется до миллиона случаев ОРЗ – zakon.kz. [Электронный ресурс]. Дата обновления: 5.10.2014. — URL: <http://www.zakon.kz/4657748-ezhegodno-v-kazakhstan-registriruietsja.html> (дата обращения: 5.10.2014).
- 3 Онищенко Г.Г., Ежова Е.Б., Лазикова Г.Ф. и др. Пандемия гриппа А/Н1N1/09 в мире и Российской Федерации в 2009-2010 гг. и прогноз на 2010-2011 гг. // ЖМЭИ. – 2010. – № 6. – С. 12-17.
- 4 Иванова В.Т., Матюшина Р.О., Слепушкин А.Н. и др. Эпидемические штаммы вирусов гриппа А и В в сезоне 2005-2006гг. в России // Вопр. вирусол. – 2008. – №4. – С.13-18.
- 5 Носик Н.Н., Стаханова В.М. Лабораторная диагностика вирусных инфекций // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН. – М., 2000. – Т. 2. – № 2. – С. 70-78.
- 6 Куц А. А., Климова Р. Р., Масалова О. В. и др. Получение и свойства моноклональных антител к высокопатогенному штамму вируса гриппа птиц А(Н5N1), выделенного на территории Российской Федерации // Вопр. вирусол. – 2008. – Т. 53. – № 5. – С. 9-14.
- 7 Березин В. Э., Исаева Е. С. Методы получения поверхностных антигенов вируса гриппа // Изв. АН Каз. ССР. Сер. биол. – 1982. – №3. – С. 5-10.
- 8 Kohler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity // Nature. – 1976. – Vol. 256. – P. 495-497.
- 9 Дерябин П. Г. Бутенко А. М., Бурцева Е. И. Реакция гемагглютинации и реакция торможения гемагглютинации // В кн.: Медицинская вирусология / под ред. Д. К. Львова. – М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2008. – 656 с.
- 10 Носик Н.Н., Стаханова В.М. Лабораторная диагностика вирусных инфекций // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2000. – Т. 2. – № 2, – С. 70-78 [Электронный ресурс]. Дата обновления: 22.04.2015. — URL: http://www.antibiotic.ru/cmac/2000_2_2/070.htm (дата обращения: 22.04.2015.).

References

- 1 Saltykova T. S. Zaboлеваemost' grippom i otsrochennaja smertnost' u lic starshe 60 let: avtoref. ... k. m. n.: 14.02.02. – М., 2010. – 25 s.
- 2 Ezhegodno v Kazahstane registriruietsja do milliona sluchaev ORZ – zakon.kz. [Jelektronnyj resurs]. Data obnovenija: 5.10.2014. — URL: <http://www.zakon.kz/4657748-ezhegodno-v-kazakhstan-registriruietsja.html> (data obrashhenija: 5.10.2014).
- 3 Onishhenko G.G., Ezhova E.B., Lazikova G.F. i dr. Pandemija grippa A/H1N1/09 v mire i Rossijskoj Federacii v 2009-2010 gg. i prognoz na 2010-2011 gg. // ZhMJeI. – 2010. – № 6. – S. 12-17.
- 4 Ivanova V.T., Matjushina R.O., Slepshkin A.N. i dr. Jepidemicheskie shtammy virusov grippa A i V v sezone 2005-2006gg. v Rossii // Vopr. virusol. – 2008. – №4. – S.13-18.
- 5 Nosik N.N., Stahanova V.M. Laboratornaja diagnostika virusnyh infekcij // Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija. – Institut virusologii im. D.I. Ivanovskogo RAMN. – М., 2000. – Т. 2. – № 2. – S. 70-78.
- 6 Kushh A. A., Klimova R. R., Masalova O. V. i dr. Poluchenie i svoystva monoklonal'nyh antitel k vysokopatogennomu shtammu virusa grippa ptic A(H5N1), vydelennogo na territorii Rossijskoj Federacii // Vopr. virusol. – 2008. – Т. 53. – № 5. – S. 9-14.

- 7 Berezin V. Je., Isaeva E. S. Metody polucheniya poverhnostnyh antigenov virusa grippa // Izv. AN Kaz. SSR. Ser. biol. – 1982. – №3. – S. 5-10.
- 8 Kohler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity // Nature. – 1976. – Vol. 256. – P. 495-497.
- 9 Derjabin P. G. Butenko A. M., Burceva E. I. Reakcija gemaggljutinacii i reakcija tormozhenija gemaggljutinacii // V kn.: Medicinskaja virusologija / pod red. D. K. L'vova. – M.: OOO «Medicinskoe informacionnoe agenstvo», 2008. – 656 s.
- 10 Nosik N.N., Stahanova V.M. Laboratornaja diagnostika virusnyh infekcij // Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija. – 2000. – T. 2. – № 2, – S. 70-78 [Elektronnyj resurs]. Data obnovlenija: 22.04.2015. — URL: http://www.antibiotic.ru/cmac/2000_2_2/070.htm (data obrashhenija: 22.04.2015.).