

# ОСОБЕННОСТИ СОВРЕМЕННЫХ ВИРУСОВ ГРИППА А(Н3N2) ЧЕЛОВЕКА, ЦИРКУЛИРОВАВШИХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ В ПЕРИОД 2016–2018 ГГ.

П.А. Петрова, Н.И. Коновалова, А.Д. Васильева, Е.М. Еропкина, А.А. Иванова,  
А.Б. Комиссаров, М.Ю. Еропкин, Д.М. Даниленко

ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** Вирусы гриппа А(Н3N2) демонстрируют самый высокий уровень эволюционной изменчивости по сравнению с другими вирусами гриппа, циркулирующими в человеческой популяции. Штаммы данного подтипа поражают большое количество лиц, относящихся к группам повышенного риска: детей младше трех лет, беременных женщин, лиц старше 65 лет, медицинских работников, а также лиц, имеющих хронические заболевания нервной, сердечно-сосудистой и дыхательной систем. Вирусы А(Н3N2) вызывают значительное количество смертельных случаев среди лиц старше 65 лет. Штаммы данного подтипа вызывают наиболее тяжелые случаи гриппозной инфекции, сопровождающиеся серьезными осложнениями. В статье представлены результаты анализа антигенных и других биологических свойств циркулирующих вирусов гриппа человека А(Н3N2) на территории России в эпидемических сезонах 2016–2018 гг. Представлены данные активности нейраминидазы (NA) современных вирусов гриппа А(Н3N2), полученные MUNANA-тестом, выделенных на клеточных культурах MDCK и MDCK-Siat1, проанализирована роль аминокислотных замен в NA в зависимости от системы выделения штаммов. В связи с изменениями рецепторных свойств вирусов важным является подбор оптимальных условий выделения. Нами были выбраны клеточные культуры, рекомендованные ВОЗ, которые различаются по своим рецепторным свойствам. Проведена оценка эффективности выделения вирусов данного подтипа на клеточных линиях MDCK и MDCK-Siat1. Установлено, что эффективность выделения вирусов гриппа А(Н3N2) на клеточной культуре MDCK-Siat1 составила 77,3%, а на MDCK — 71,3%. Показано, что большинство выделенных изолятов (68,6% в 2016–2017 гг. и 44,6% в 2017–2018 гг.) имеют NA-индуцированную агрегацию эритроцитов. Установлено, что современные российские штаммы данного подтипа не имеют существенных антигенных отличий при выделении и пассировании на различных клеточных культурах, однако возможно появление адаптационных замен в нейраминидазе. При изучении антигенных свойств вирусов гриппа А(Н3N2) методом РТГА и реакцией микронеутрализации (cell-ELISA) отмечено, что большинство штаммов, выделенных в эпидемическом сезоне 2017–2018 гг., были антигенно родственны референс-штамму А/Сингапур/INFIMH-16-0019/2016 (MDCK-Siat1) и взаимодействовали с антисывороткой к нему до гомологичного титра. По результатам секвенирования установлено,

---

**Адрес для переписки:**

Петрова Полина Александровна  
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, 15/17,  
ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ.  
Тел.: 8 952 233-36-21 (моб.).  
E-mail: suddenkovapolina@gmail.com

**Contacts:**

Polina A. Petrova  
197376, Russian Federation, St. Petersburg, Professor Popov str.,  
15/17, Smorodintsev Research Institute of Influenza.  
Phone: +7 952 233-36-21 (mobile).  
E-mail: suddenkovapolina@gmail.com

**Библиографическое описание:**

Петрова П.А., Коновалова Н.И., Васильева А.Д., Еропкина Е.М.,  
Иванова А.А., Комиссаров А.Б., Еропкин М.Ю., Даниленко Д.М.  
Особенности современных вирусов гриппа А(Н3N2) человека,  
циркулировавших на территории России в период 2016–  
2018 гг. // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 5–6. С. 655–664.  
doi: 10.15789/2220-7619-2019-5-6-655-664

**Citation:**

Petrova P.A., Konovalova N.I., Vassilieva A.D., Eroпкина E.M., Ivanova A.A.,  
Komissarov A.B., Eroпкиn M.Yu., Danilenko D.M. Features 2016–2018 current  
human influenza A(H3N2) viruses circulating in Russia // Russian Journal  
of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 5–6,  
pp. 655–664. doi: 10.15789/2220-7619-2019-5-6-655-664

Работа выполнена при поддержке гранта NU51P000854-01 «Поддержание потенциала по надзору за гриппом»,  
а также стипендии Президента Российской Федерации молодым ученым и аспирантам (Конкурс СП-2018).

что в эпидемическом сезоне 2017–2018 гг. на территории России были выявлены вирусы субклайда 3С.2а2, а также 3С.2а3 и 3С.2а1b. Таким образом, была выявлена нарастающая генетическая гетерогенность вирусов А(Н3N2) на территории России.

**Ключевые слова:** вирусы гриппа А(Н3N2), реакция торможения гемагглютинации, реакция микронеutralизации, антигенные свойства, генетические свойства, MUNANA-тест.

## FEATURES 2016–2018 CURRENT HUMAN INFLUENZA A(H3N2) VIRUSES CIRCULATING IN RUSSIA

Petrova P.A., Konovalova N.I., Vassilieva A.D., Eroпкина E.M., Ivanova A.A., Komissarov A.B., Eroпкин M.Yu., Danilenko D.M.

*Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation*

**Abstract.** Influenza A(H3N2) viruses demonstrate the highest level of evolutionary variability compared to other influenza viruses circulating in human population. The strains of this subtype affect a large number of people belonging to high-risk groups: children under three years of age, pregnant women, people over 65 years, medical professionals, and persons with chronic nervous, cardiovascular and respiratory diseases. Influenza A(H3N2) viruses result in high mortality rate in subjects over 65 years causing the most severe course, accompanied by serious complications. Here, we present the data on analyzing antigenic and biological properties of human influenza A(H3N2) viruses which circulated in 2016–2018 epidemic seasons in Russia. The data on the neuraminidase activity (MUNANA test) of recent influenza A(H3N2) viruses isolated on MDCK and MDCK-Siat1 cell cultures are presented to compare with NA sequencing data in order to assess possible influence of the isolation system on NA activity. Due to changes in virus receptor properties, a choice of optimal isolation conditions is of high importance. The WHO recommended cell cultures differing in receptor properties were used. Efficiency of virus isolation on MDCK and MDCK-Siat1 cell lines was also analyzed. It has been established that the efficiency of influenza A(H3N2) virus isolation in MDCK-Siat1 cell culture was 77.3%, whereas in MDCK — 71.3%. It was shown that the majority of isolated strains (68.6% in 2016–2017 and 44.6% in 2017–2018) exhibited a NA-induced erythrocyte agglutination. It was found that current A(H3N2) strains isolated in Russia displayed no significant antigenic differences regardless of cell cultures used; however, adaptive substitutions in neuraminidase may emerge. While studying antigenic properties of influenza A(H3N2) viruses by using the HI assay and the microneutralization assay (cell-ELISA), it was noted that the majority of strains isolated in the 2017–2018 epidemic season was antigenically related and interacted with antiserum against the reference strain A/Singapore/INFIMH-16–0019/2016 (MDCK-Siat1) at a homologous titer. According to the sequencing data, it was established that during the 2017–2018 epidemic season, viruses of subclade 3С.2а2, as well as 3С.2а3 and 3С.2а1b were detected in Russia. Thus, an increasing genetic heterogeneity of A(H3N2) viruses was revealed in Russia.

**Key words:** influenza A(H3N2) viruses, hemagglutination inhibition test, microneutralization, antigenic properties, genetic properties, MUNANA-assay.

## Введение

В последние восемь эпидемических сезонов вирусы гриппа А(Н3N2) ежегодно циркулируют совместно с вирусами подтипа А(Н1N1)pdm09, а также двумя линиями вирусов гриппа В — Викторианской и Ямагатской. Во многих странах мира вирусы гриппа А(Н3N2) часто становятся доминирующим подтипом среди всех циркулирующих вирусов гриппа и вызывают наиболее тяжелые случаи гриппозной инфекции, сопровождающиеся серьезными осложнениями, такими как пневмония, синдром Рея, Киша, Уотерхауса–Фридериксена и т.д. Так, в США в сезоне 2017–2018 гг. зарегистрирована эпидемия высокой степени тяжести, связанная с доминированием в структуре циркулирующих вирусов гриппа А(Н3N2), которые составили 84,9% [3]. Схожая ситуация отмечена и в Австралии в сезоне 2017 г., когда интенсивность эпидемии гриппа, вызванной вирусами А(Н3N2), превы-

шала показатели, отмеченные в пандемию 2010 г. [2]. При этом было зафиксировано увеличение количества госпитализаций и смертности [2].

Вирусы гриппа А демонстрируют высокий уровень изменчивости. Ежегодно во всем мире наблюдается постоянный антигенный дрейф вирусов А(Н3N2). Наиболее подвержены антигенному дрейфу поверхностные белки — гемагглютинин (НА) и нейраминидаза (NA). Высокий уровень изменчивости позволяет вирусу уклоняться от иммунной системы хозяина. Как следствие, имеющиеся вакцины не обеспечивают долговременной протекции, а их состав ежегодно пересматривается экспертами Глобальной сети эпидемического надзора за гриппом ВОЗ (GISRS) и обновляется с учетом данных об антигенных и генетических особенностях штаммов, циркулирующих в мире за предшествующие полгода [20, 21].

Гемагглютинин и нейраминидаза выполняют определенные комплементарные роли на раз-

личных этапах развития вирусной инфекции. Аминокислотные замены, возникающие в этих гликопротеинах, оказывают существенное влияние на антигенные и биологические свойства штаммов. Для HA и NA вирусов гриппа А(Н3N2) данные изменения регистрируются значительно чаще, чем в тех же белках вирусов подтипа А(Н1N1)pdm09, а также обеих линиях гриппа В. Клеточные рецепторы, к которым имеют средство вирусы гриппа, представлены двумя видами, отличающимися между собой расположением гликозидной связи между сиаловой кислотой и терминальной галактозой:  $\alpha 2,3$  (Neu5Ac $\alpha 2$ -3Gal) и  $\alpha 2,6$  (6'SLN; Neu5Ac $\alpha 2$ -6Gal $\beta 1$ -4GlcNAc) [16]. Рецепторы  $\alpha 2,3$  наиболее широко представлены в пищеварительном тракте птиц. У людей в верхних дыхательных путях находится большое количество  $\alpha 2,6$ -рецепторов, а в нижних дыхательных путях — в бронхиальном эпителии преобладают  $\alpha 2,3$ -сиаловые кислоты [13]. Инфекции, вызванные сезонными вирусами гриппа у человека, преимущественно протекают легко, без выраженных осложнений. Однако заболевания, вызванные вирусами гриппа птичьего происхождения, протекают всегда тяжело для пациента из-за вовлечения и распространения вирусов в нижних дыхательных путях. Вследствие постоянного высокого уровня антигенного дрейфа у представителей данного подтипа возникли изменения связывания клеточных рецепторов. За последние 25 лет вирусы А(Н3N2) полностью утратили способность связываться с  $\alpha 2,3$  типом рецепторов, что подтверждается полным отсутствием взаимодействия с эритроцитами кур и индеек [8]. Изменение рецепторной специфичности влияет и на эффективность выделения и антигенный анализ вирусов А(Н3N2). Клетки MDCK, содержащие оба типа рецепторов —  $\alpha 2,3$  и  $\alpha 2,6$ , традиционно используются для выделения вирусов гриппа А и В. Отмечено, что эффективность выделения вирусов гриппа А(Н3N2) в данной клеточной системе по сравнению с вирусами А(Н1N1)pdm09 и В с каждым годом снижается. В то же время вирусы А(Н3N2) приобретают компенсаторные мутации, позволяющие им эффективнее реплицироваться в культуре клеток MDCK при лабораторном культивировании. К сожалению, эти мутации влияют и на результаты, получаемые в ходе оценки антигенных свойств вирусов в реакции торможения гемагглютинации, что недопустимо при отборе штаммов-кандидатов для производства гриппозных вакцин [7, 20, 21].

Высокая генетическая и антигенная гетерогенность популяции вирусов гриппа данного подтипа, диктует необходимость глубокого анализа циркулирующих штаммов для формирования верного прогноза при выборе вакцинного штамма [20, 21, 22].

Целью настоящей работы было изучение особенностей выделения на клеточных линиях MDCK и MDCK-Siat1 и антигенный анализ российских изолятов А(Н3N2) в эпидемические сезоны 2016–2018 гг. с учетом новых свойств этого подтипа вирусов гриппа.

## Материалы и методы

Материалы для выделения вирусов гриппа (назофарингеальные мазки, секционные материалы) были получены из больниц и поликлиник Санкт-Петербурга, а также из базовых вирусологических лабораторий, расположенных в основных крупных городах страны, находящихся в различных федеральных округах.

Выделение вирусов гриппа производили на клеточных культурах MDCK FR-58 London Line и MDCK-Siat1, полученных из Сотрудничающего Центра (СЦ) по гриппу ВОЗ в Лондоне (Великобритания).

*Культивирование клеток.* Пересев монослойных клеточных линий осуществлялся на 7–8 сутки в среде альфа МЕМ с добавлением 10% фетальной сыворотки коров (Биолот, кат. номер 1.1.8.1). Посевная концентрация составляла  $2,5$ – $5,0 \times 10^5$  кл/мл.

*Выделение вирусов гриппа.* Монослой клеток MDCK и MDCK-Siat1, находящийся в специальных пластиковых пробирках со скошенным дном (Nunc, Дания), двукратно отмывали средой альфа-МЕМ (с антибиотиками и ТРСК-трипсином) по 2 мл. Материалы от больных вносили по 0,2 мл в 3 флакона с культурой клеток и после инкубации 30–40 мин при 34°C добавляли 1,8 мл поддерживающей среды. После этого флаконы инкубировали при 34°C, ежедневно контролируя состояние монослоя. При отсутствии выраженного цитопатического действия (ЦПД) пробы выдерживали при 34°C до 6 суток.

*Реакцию гемагглютинации и реакцию торможения гемагглютинации* ставили по стандартной методике, рекомендуемой ВОЗ, с использованием 0,75% взвеси эритроцитов человека I (0) группы. В реакции торможения гемагглютинации в качестве буфера использовали физиологический раствор, содержащий 20 нМ озельтамивира карбоксилата (Roche, Германия) [9].

*Реакцию микронейтрализации* выполняли по стандартной методике, рекомендуемой ВОЗ, с использованием моноклональных антител к NP вирусов гриппа типа А, конъюгированных с пероксидазой хрена, полученных в ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава России [9].

*Определение активности нейраминидазы* проводили по методике, рекомендованной ВОЗ [12] с использованием коммерчески доступно-

го субстрата MUNANA (Sigma, Германия, кат. номер М8639). По результатам калибровочной кривой вычисляли значение активности фермента, выраженное в мкмоль 4-метилумбеллиферола — флуоресцирующего продукта реакции/мл × мин.

*Экстракция нуклеиновых кислот* проводилась с использованием коммерческого набора «QIAamp Viral RNA Mini kit» (Qiagen, Германия).

*ОТ-ПЦР* для амплификации фрагментов нейраминидазы проводилась с использованием набора реагентов «AgPath-ID One-step RT-PCR Kit» (Ambion, США), амплификацию проводили в термоциклере «BioRad CFX96» (BioRad, США).

*Секвенирование NA* проводили методом Сэнгера с использованием коммерчески доступного набора реагентов «ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit» (Applied Biosystems, США). Определение нуклеотидных последовательностей производилось 4-канальной автоматизированной системой капиллярного электрофореза и флуоресцентной детекции ДНК-фрагментов «ABI 3100 avant» и «ABI 3130 Genetic Analyzer» (Applied Biosystems, США). Капиллярный электрофорез проводился в полимере POP-6 и POP-7 (Applied Biosystems, США).

*Животные.* Для получения диагностических сывороток были использованы белые беспородные крысы возраста 6–8 недель, массой 150–200 г, полученные из питомника АМН РФ «Рапполово».

*Сыворотки.* Для идентификации изолятов были использованы гипериммунные диагностические сыворотки крови овец и крупного рогатого скота, ежегодно предоставляемые ВОЗ. Для реакции торможения гемагглютинации и реакции микронеutralизации применялись поликлональные крысиные антисыворотки, полученные к референс- и эпидемическим штаммам вирусов гриппа подтипа А(Н3N2). Все процедуры по работе с животными выполнены согласно утвержденному Плану и Стандартным Операционным Процедурам лаборатории эволюционной изменчивости вирусов гриппа. Животные содержались в стандартных условиях, которые соответствовали нормативам, изложенным в Приказе Минздрава от 12.08.1977 № 755 «Правила поведения работ с использованием экспериментальных животных», Санитарные правила по устройству, оборудованию и содержанию вивариев СП 2.2.1.3218-14 РФ, утв. 29 августа 2014 г. № 51. Этические нормы обращения с животными соблюдались в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях (СПб., Rus-LASA, 2012. 48 с.) и European Convention for the Protection Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes.

ETS No. 123. Получение сывороток выполнялось по методике, представленной в работе [1], путем внутрибрюшинной четырехкратной иммунизации с интервалом в 3–4 дня. По окончании иммунизации через 10 дней всех животных подвергали эвтаназии под эфирным наркозом путем тотального забора крови из сердца. Категория боли, испытываемая животными, облегчалась надлежащим способом (D). Для антигенного анализа также использовались хорьковые поликлональные антисыворотки, любезно предоставленные для исследования Dr. J. McCauley (СЦ ВОЗ, Лондон, Великобритания).

## Результаты и обсуждение

### Выделение вирусов гриппа А(Н3N2)

Известно, что клеточная культура MDCK несет на себе рецепторы двух разновидностей —  $\alpha 2,3$ -SA и  $\alpha 2,6$ -SA, и поэтому является универсальной клеточной линией для выделения вирусов гриппа всех типов и подтипов. Однако распределение данных типов рецепторов неравномерно: рецепторов типа  $\alpha 2,6$  значительно меньше, чем  $\alpha 2,3$  [10]. Наблюдается тенденция к тому, что штаммы А(Н3N2) в последние годы слабо выделяются на клеточной культуре MDCK или же имеют низкие гемагглютинирующие титры, которые не удается существенно увеличить в результате дальнейшего пассирования [8, 10]. В последние годы ВОЗ рекомендует использовать клеточную культуру MDCK-Siat1 для выделения и пассирования вирусов гриппа А(Н3N2). Данная культура получена М. Matrosovich и соавт. в результате трансфекции клеток MDCK кДНК 2,6-сиалилтрансферазы человека (SIAT1). В результате этих изменений клетки экспрессируют в 2 раза больше  $\alpha 2,6$ -связанных сиаловых кислот и в 2 раза меньше  $\alpha 2,3$ -связанных сиаловых кислот, чем исходные клетки MDCK [10].

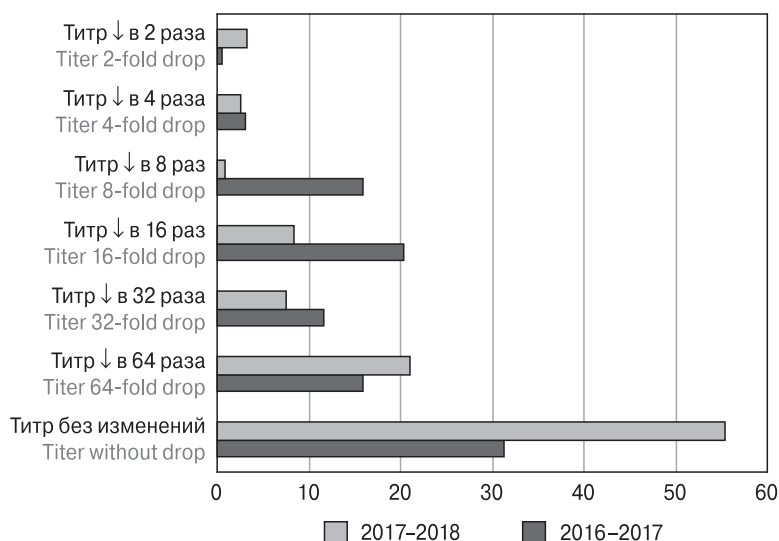
Для оценки эффективности репродукции вирусов гриппа А(Н3N2) были взяты 150 образцов материала от больных, положительных в реакции ПЦР на РНК вируса гриппа А(Н3N2) для параллельного выделения штаммов на культурах клеток MDCK и MDCK-Siat1. В результате было выделено 107 штаммов на MDCK и 116 штаммов на MDCK-Siat1. Эффективность выделения вирусов гриппа А(Н3N2) на клеточной культуре MDCK-Siat1 составила 77,3%, а на MDCK — 71,3%. Важно отметить, что у многих штаммов, изолированных на клеточной культуре MDCK-Siat1, в результате пассирования наблюдалось существенное увеличение гемагглютинирующих титров в отличие от MDCK-вариантов. Часть штаммов, выделенных на MDCK-Siat1, не имели гемагглютинирующих титров, но оказывали ярко вы-

раженное цитопатическое действие на клетки. При последовательном пассировании данных штаммов гемагглютинирующий титр достигал показателей не более чем 1:4. Для антигенной характеристики изолятов, не имеющих титра, использовалась реакция микронеutralизации.

Известно, что выделение вирусов гриппа А(Н3N2) на клеточной культуре MDCK приводит к появлению и накоплению адаптационных мутаций. Данные мутации возникают в NA вирионов в положениях D151G/N и T148I [6, 7]. По результатам глубокого секвенирования гена NA из клинических материалов, полученных от госпитализированных пациентов, больных гриппом, было показано, что данные аминокислотные замены встречаются достаточно редко [17], что указывает на то, что эти мутации являются приспособительными и возникают в ходе выделения вирусов гриппа на клеточных культурах. Это подтверждают данные секвенирования гена NA вирусов гриппа, выделенных в клеточной культуре: спустя один пассаж результаты секвенирования демонстрируют наличие смешанной популяции вирусов: D151 + G151 и D151 + N151 [18]. Положение 151 в молекуле NA до недавнего времени считалось высококонсервативным, так как находится в каталитическом центре белка. Мутация D151G приводит к потере каталитической активности NA, но дает возможность тетрамеру связываться с рецепторами клетки, вероятно, за счет присутствующего на нем сайта, ответственного за гемадсорбцию. Нейраминидаза вирусов, содержащая замены в 148 и 151 положениях, проявляет аффинность к  $\alpha 2,3$ -клеточным рецепторам. К.С. Хуе и соавт.

отмечают, что смешанные популяции вирусов гриппа А(Н3N2) гораздо лучше пассируются и имеют более высокие титры, чем чистые популяции [18]. При этом различные генетические варианты по данной позиции не вытесняют друг друга, так как один вариант имеет преимущество при выходе вирионов из зараженной клетки, а другой вариант имеет способность связываться с клеточными рецепторами [18]. Способность NA взаимодействовать с сиаловыми кислотами на поверхности клеток-мишеней очень сильно искажает результаты реакции гемагглютинации и реакции торможения гемагглютинации. При добавлении 20 нМ раствора озельтамивира карбоксилата блокируется активность NA, и, как следствие, исчезает ложноположительная NA-индуцированная агглютинация эритроцитов. При отборе штаммов, которые могут быть проанализированы в РТГА, необходимо вначале убедиться в наличии необходимого уровня гемагглютинирующего титра NA. При этом все штаммы тестируются в РГА в присутствии 20 нМ озельтамивира карбоксилата и без него.

В наших условиях в эпидемическом сезоне 2016–2017 гг. 31,4% выделенных на культуре клеток MDCK штаммов имели равный гемагглютинирующий титр в присутствии ингибитора NA и в его отсутствие. В эпидемическом сезоне 2017–2018 гг. доля штаммов с такими же свойствами составила 55,4% (рис. 1). У 16 и 21% штаммов гемагглютинирующий титр падал в 2 раза (2016–2017 и 2017–2018 гг.). Таким образом, можно сделать вывод, что 68,6 и 44,6% исследованных штаммов за два эпидемических сезона имели NA, способную связываться



**Рисунок 1. Изменения в гемагглютинирующих титрах вирусов гриппа, выделенных на клеточной культуре MDCK в 2016–2018 гг., в зависимости от присутствия в буфере ингибитора NA — озельтамивира карбоксилата**

Figure 1. Changes in the hemagglutinating titers of influenza viruses isolated in MDCK in 2016–2018, depending on the presence in the buffer of the NA inhibitor — 20 nM oseltamivir carboxylate

Таблица. Сравнение антигенных свойств вирусов гриппа А(Н3N2), выделенных на клеточных культурах MDCK и MDCK-Siat1

Table. Comparison of antigenic properties of influenza A(H3N2) viruses isolated on MDCK and MDCK-Siat1 cell cultures

Вирусы гриппа Influenza A(H3N2) viruses	Система выделения Isolation system	Постинфекционные крысиные поликлональные антитисыворотки к вирусам гриппа А(Н3N2) Postinfectious rat polyclonal antisera					
		А/Гонконг/ 4801/2014 A/Hong Kong/ 4801/2014 MDCK 3С.2а	А/СПб/80/2014 A/St. Petersburg/ 80/2014 MDCK 3С.2а	А/Нидерланды/ 525/2014 A/Netherlands/ 525/2014 MDCK 3С.2b	А/Швейцария/ 9715293/2013 A/Switzerland/ 9715293/2013 Egg 3С.3а	А/Хабаровск/ 19/2015 A/Khabarovsk/ 19/2015 MDCK 3С.3а	А/Сингапур/ INFIMH-16-0019/16 A/Singapore/ INFIMH-16-0019/16 MDCK-Siat1 3С.2а1
А/Гонконг/4801/2014 A/Hong Kong/4801/2014	MDCK	160	160	80	40	40	320
А/Санкт-Петербург/80/2014 A/St. Petersburg/80/2014	MDCK	80	320	40	20	20	320
А/Нидерланды/525/2014 A/Netherlands/525/2014	MDCK	160	160	320	160	160	320
А/Швейцария/9715293/2013 A/Switzerland/9715293/2013	Egg*	40	40	20	640	320	80
А/Сингапур/INFIMH-16-0019/16 A/Singapore/INFIMH-16-0019/16	Egg	160	320	40	40	20	320
А/Санкт-Петербург/71/17 A/St. Petersburg/71/17	MDCK-Siat1	80	320	40	<	10	320
А/Санкт-Петербург/71/17 A/St. Petersburg/71/17	MDCK	40	160	40	10	10	320
А/Санкт-Петербург/80/17 A/St. Petersburg/80/17	MDCK-Siat1	40	80	20	<	<	160
А/Санкт-Петербург/80/17 A/St. Petersburg/80/17	MDCK	40	160	40	20	10	160
А/Санкт-Петербург/87/17 A/St. Petersburg/87/17	MDCK-Siat1	80	160	20	<	<	160
А/Санкт-Петербург/87/17 A/St. Petersburg/87/17	MDCK	80	160	20	10	10	320
А/Санкт-Петербург/89/17 A/St. Petersburg/89/18	MDCK-Siat1	40	40	10	<	<	160
А/Санкт-Петербург/89/17 A/St. Petersburg/89/18	MDCK	80	80	20	10	<	160
А/Санкт-Петербург/104/17 A/St. Petersburg/104/17	MDCK-Siat1	80	80	20	<	<	160
А/Санкт-Петербург/104/17 A/St. Petersburg/104/17	MDCK	80	80	20	10	10	320

Примечание. \*Штаммы, выделенные на куриных эмбрионах.  
Note. \* Strains isolated in chicken embryos.

с рецепторами на поверхности эритроцитов человека. Штаммы, гемагглютинирующий титр которых уменьшается более чем в 4 раза, невозможно проанализировать в РТГА, что затрудняет анализ дрейфовых изменений подобных изолятов. Для вирусов гриппа, выделенных на культуре MDCK-Siat1, также наблюдается падение титров в присутствии озельтамивира карбоксилата (рис. 2). 29,6% изученных MDCK-Siat1-изолятов демонстрировали уменьшение гемагглютинирующего титра в 2 раза, тогда как среди MDCK-вирусов доля таких штаммов составила 18,1%. Вирусов, титр которых уменьшался в 16 раз, было существенно больше среди MDCK-Siat1-изолятов (18,5%). Таким образом, применение клеточной системы MDCK-Siat1 при выделении вирусов гриппа А(Н3N2) не дало однозначных результатов.

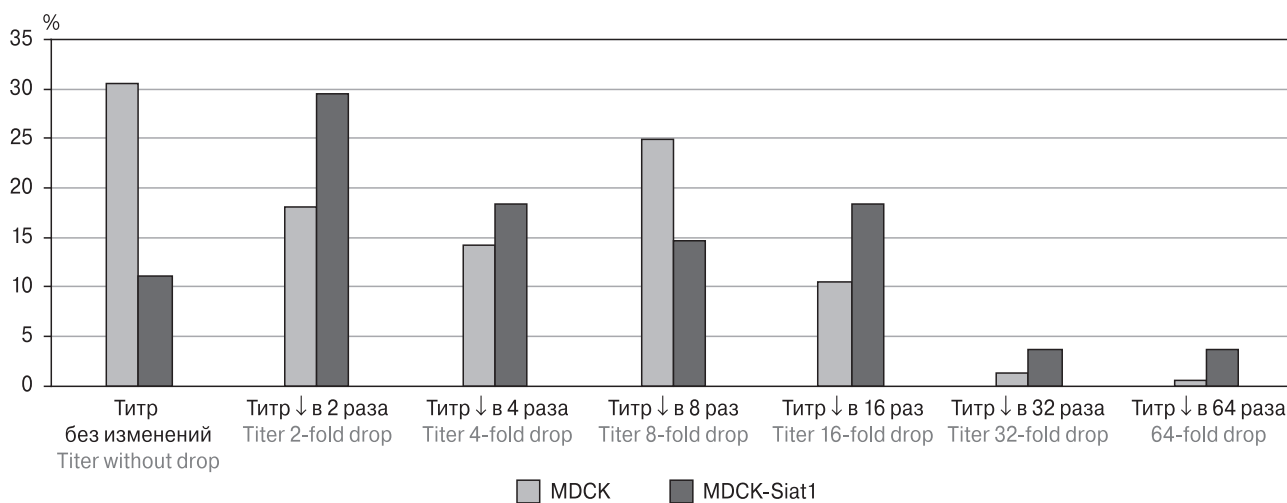
Вирусы гриппа, выделенные параллельно на клеточных культурах MDCK и MDCK-Siat1 и имеющие ГА титры  $\geq 1:8$ , показали сходные результаты в РТГА (табл.). Можно заключить, что клеточные линии не оказывают влияния на антигенные свойства выделенных на них изолятов. Различия между результатами РТГА штаммов при взаимодействии с антисыворотками составляли не более  $1/2$  титра, что находится в пределах погрешности используемого метода.

#### Антигенные и генетические свойства

Согласно филогенетическому анализу, среди многочисленных групп вирусов гриппа А(Н3N2) в настоящее время в мире широкое распространение получили штаммы, принадлежащие к клайду 3С.2а [20, 21]. По результатам

РТГА и микронейтрализации, большинство вирусов гриппа А(Н3N2), выделенных в эпидемическом сезоне 2017–2018 гг., были антигенно подобны штамму, введенному в состав вакцин на предстоящий эпидемический сезон 2018–2019 гг. — А/Сингапур/INFIMH-16-0019/2016, и реагировали с антисывороткой, полученной к клеточному (MDCK-Siat1) варианту данного штамма до  $1-1/2$  гомологичного титра. При этом большинство из проанализированных штаммов также были родственны референс-вирусу А/Гонконг/4801/2014 (MDCK-вариант). Антигенные свойства вирусов, выделенных из постмортальных материалов, не отличались от таковых для вирусов, выделенных из назальных мазков. Все изоляты слабо взаимодействовали с антисывороткой к эталонному штамму генетической группы 3С.3b А/Нидерланды/525/2014. Взаимодействие с антисыворотками, полученными к вирусам группы 3С.3а — А/Швейцария/9715293/2013 и А/Хабаровск/19/2015, изолятов последних двух эпидемических сезонов, было минимальным либо отсутствовало.

По результатам антигенного анализа можно сделать вывод, что антигенные свойства вирусов гриппа А(Н3N2) 2017–2018 гг. не отличаются от вирусов 2016–2017 гг. В настоящее время невозможно выявить антигенные различия вирусов группы 3С.2а и 3С.2а1. При этом по антигенным свойствам группы 3С.2а и 3С.3а сильно отличаются. Вирусы клайда 3С.3а на территории России встречались в эпидемическом сезоне 2014–2015 гг. Впоследствии представителей данной группы на территории РФ выделено и охарактеризовано не было.



**Рисунок 2.** Изменения в гемагглютинирующих титрах вирусов гриппа, выделенных на клеточной культуре MDCK и MDCK-Siat1, в зависимости от присутствия в буфере ингибитора NA — 20 нМ озельтамивира карбоксилата

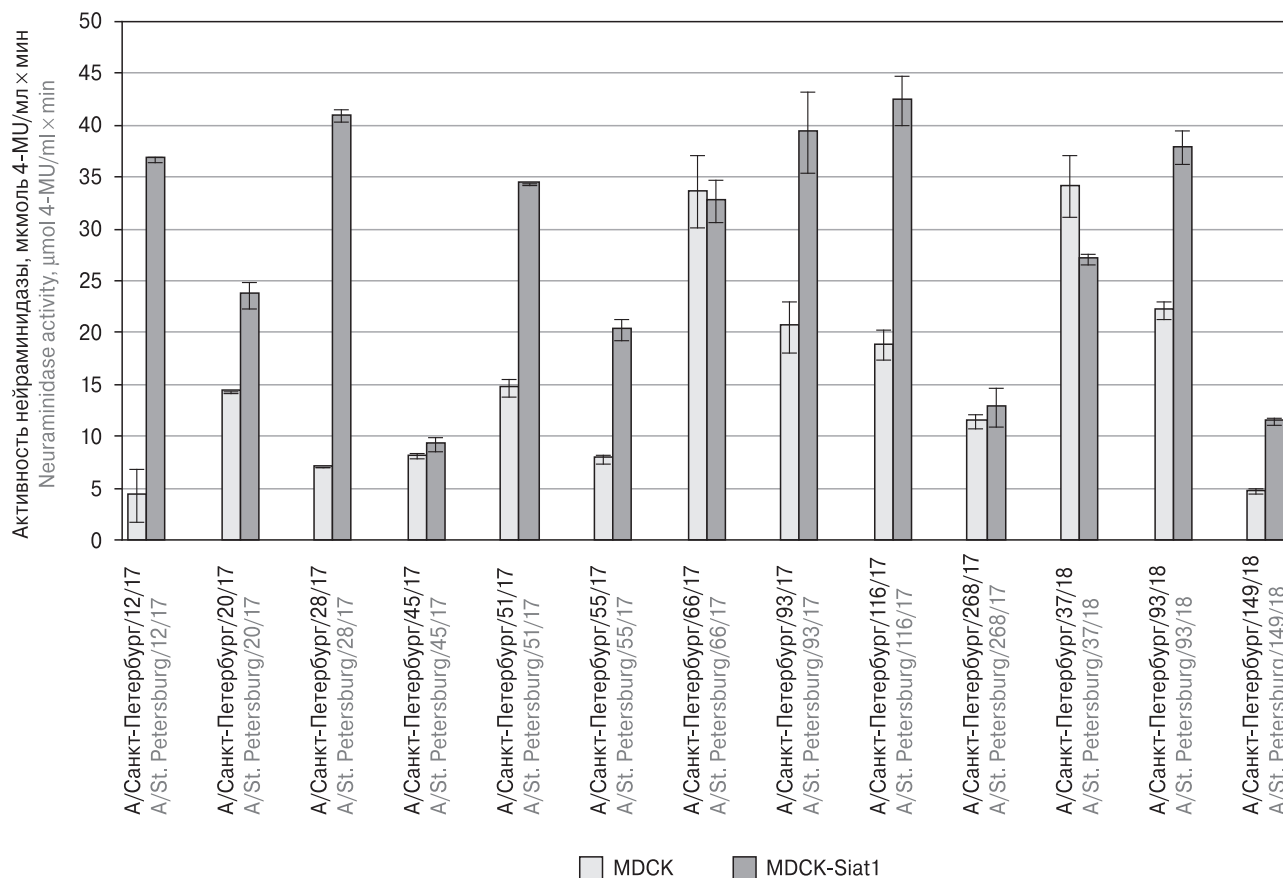
Figure 2. Changes in the hemagglutinating titers of influenza viruses isolated in MDCK and MDCK-Siat1 cell cultures, depending on the presence in the buffer of the NA inhibitor — 20 nM oseltamivir carboxylate

В настоящее время регистрируется появление новых генетических групп и подгрупп вирусов А(Н3N2), что демонстрирует нарастающую гетерогенность популяции вирусов гриппа данного подтипа [20, 21]. Во время эпидемического сезона 2017–2018 гг. на территории России циркулировали вирусы гриппа, принадлежащие к клайду 3С.2а. Генетическая группа 3С.2а обладает следующими характерными аминокислотными заменами: L3I, N144S (потеря потенциального сайта гликозилирования), F159Y, K160T, N225D и Q311H в субъединице HA1 [21]. В конце эпидемического сезона 2018 г. в России были выявлены вирусы, принадлежащие к разным генетическим подгруппам. Большинство секвенированных штаммов по гену HA принадлежало к новому субклайду 3С.2а2 и характеризовалось следующими аминокислотными заменами: T131K, R142K — в антигенном сайте А и R261Q [22].

По данным ВОЗ, антигенные характеристики вирусов, принадлежащих к субклайдам 3С.2а3, 3С.2а2, 3С.2а1b, имеют определенные отличия [19]. Такое разнообразие циркулирующих вирусов А(Н3N2) по антигенным и генетическим характеристикам является благоприятным фоном для появления вирусов с новыми свойствами.

### Активность нейраминидазы современных российских изолятов

Для оценки активности вирусной нейраминидазы штаммов, выделенных на клеточных культурах MDCK и MDCK-Siat1, использовалась стандартная флуоресцентная методика с субстратом MUNANA. Для получения более точных количественных показателей гемагглютинирующий титр всех тест-вирусов был приравнен к единому показателю 1:4 в РГА в присутствии 20 нМ озельтамивира карбоксилата. В результате установлено, что вирусы, выделенные на клетках MDCK-Siat1, в большинстве случаев имеют более высокую активность нейраминидазы, чем аналогичные им MDCK-варианты. Например, вирус А/Санкт-Петербург/28/17<sub>MDCK-Siat1</sub> имеет активность NA равную 40,91 мкмоль 4-MU/мл × мин, а аналогичный штамм, выделенный на MDCK — 7,06 мкмоль 4-MU/мл × мин (рис. 3). Для выяснения причины значительно более высокой активности NA были проанализированы первичные АК последовательности данных штаммов. По результатам секвенирования в аминокислотных последовательностях NA соответствующих пар вирусов отличий выявлено не было. Исключение составил штамм



**Рисунок 3. Активность нейраминидазы в тесте MUNANA вирусов гриппа А(Н3N2) 2016–2018 гг. выделения**

Figure 3. Neuraminidase activity in the MUNANA test of influenza A(H3N2) viruses 2016–2018



А/Санкт-Петербург/45/2017. В аминокислотной последовательности нейраминидазы вируса А/Санкт-Петербург/45/17MDCK произошла замена относительно вируса, выращенного на MDCK-Siat1 — D151N. Однако по результатам MUNANA-теста активность MDCK и MDCK-Siat1-вариантов была примерно равна и составила 8,2–9,2 мкмоль 4-MU/мл × мин соответственно. Так как на поверхности клеток MDCK-Siat1 находится большее количество рецепторов типа  $\alpha 2,6$ -SA, то вирусы с повышенной активностью NA обладают преимуществом при размножении. Более активная NA отщепляет большее количество рецепторов при высвобождении вирионов [10, 12]. Впрочем, не исключено, что при капиллярном секвенировании по Сэнгеру остаются не обнаруженными минорные мутантные варианты вируса с пониженной активностью NA, присутствующие в смешанной популяции, что особенно характерно для штаммов, полученных на линии MDCK [12].

## Заключение

Постоянный высокий уровень антигенного дрейфа вирусов гриппа А(Н3N2) наряду с изменением рецепторных свойств этих вирусов и приобретением ряда адаптационных замен в поверхностных белках диктует необходимость подбора оптимальных условий для выделения и антигенной характеристики циркулирующих штаммов. В данной работе подтверждена роль

нейраминидазы как интерферирующего фактора при оценке гемагглютинирующих титров современных штаммов и необходимость блокирования ее активности озельтамивиром карбоксилатом для получения неискаженных результатов в антигенном анализе вирусов гриппа. В то же время сравнительный антигенный анализ актуальных штаммов А(Н3N2) методами реакции торможения гемагглютинации и микронейтрализации показал одинаковые результаты. В настоящее время продолжают работы по выявлению наиболее перmissive клеточной культуры для выделения вирусов данного подтипа, которая не будет оказывать влияния на антигенные и генетические свойства изолятов [14]. Наше исследование показывает, что выделение на культурах MDCK или MDCK-Siat1 не влияет на антигенные свойства современных вирусов гриппа А(Н3N2) человека. В то же время система выделения может приводить к возникновению адаптационных замен в нейраминидазе выделенных вирусов, что согласуется с данными зарубежных исследователей [6].

## Благодарности

Авторы выражают благодарность сотрудникам базовых вирусологических лабораторий ФБУЗ за присланные изоляты, а также доктору J. McCauley (СЦ по гриппу ВОЗ, Лондон, Великобритания) за предоставление хорьковых антисывороток.

## Список литературы/References

1. Даниленко Д.М., Коновалова Н.И., Прокопец А.В., Бильданова Е.Р., Еропкин М.Ю., Соминина А.А. Возможности использования поликлональных крысиных антисывороток в антигенном анализе вирусов гриппа человека // *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2013. № 1 (68). С. 73–79. [Danilenko D.M., Konovalova N.I., Prokopets A.V., Bildanova E.R., Eroptkin M.Y., Somnina A.A. Potential use of rat polyclonal antisera for antigenic analysis of human influenza viruses. *Epidemiologija i vakcinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccine Prevention*, 2013, vol. 68, no. 1, pp. 73–79. (In Russ.)]
2. Australian Influenza Surveillance Report and Activity Updates – 2017.
3. CDC: Influenza Activity in the United States During the 2017–18 Season and Composition of the 2018–19 Influenza Vaccine.
4. Gulati S., Smith D.F., Cummings R.D., Couch R.B., Griesemer S.B., George K.S., Webster R.G., Air G.M. Human H3N2 influenza viruses isolated from 1968 to 2012 show varying reference for receptor substructures with no apparent consequences for disease or spread. *PLoS One*, 2013, vol. 8. doi: 10.1371/journal.pone.0066325
5. Koel B.F., Burke D.F., Bestebroer T.M., van der Vliet S., Zondag G.C., Vervaeke G., Skepner E., Lewis N.S., Spronken M.I., Russell C.A., Eroptkin M.Y., Hurt A.C., Barr I.G., de Jong J.C., Rimmelzwaan G.F., Osterhaus A.D., Fouchier R.A., Smith D.J. Substitutions near the receptor binding site determine major antigenic change during influenza virus evolution. *Science*, 2013, vol. 342, pp. 976–979. doi: 10.1126/science.1244730
6. Lin Y., Gregory V., Collins P., Kloess J., Wharton S., Cattle N., Lackenby A., Daniels R., Hay A. Neuraminidase receptor binding variants of human influenza A (H3N2) viruses resulting from substitution of aspartic acid 151 in the catalytic site: a role in virus attachment? *J. Virol.*, 2010, vol. 84, no. 13, pp. 6769–6781. doi: 10.1128/JVI.00458-10
7. Lin Y., Wharton S.A., Whittaker L., Dai M., Ermetal B., Lo J., Pontoriero A., Baumeister E., Daniels R.S., McCauley J.W. The characteristics and antigenic properties of recently emerged subclade 3C.3a and 3C.2a human influenza A(H3N2) viruses passaged in MDCK cells. *Influenza Other Respir. Viruses*, 2017, vol. 11, no. 3, pp. 263–274. doi: 10.1111/irv.12447
8. Lin Y., Xiong X., Wharton S.A., Martin S.R., Coombs P.J. Evolution of the receptor binding properties of the influenza A(H3N2) hemagglutinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2012, vol. 109, no. 52, pp. 21474–21479. doi: 10.1073/pnas.1218841110
9. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. *WHO Press*, 2011.
10. Matrosovich M., Matrosovich T., Carr J., Roberts N.A., Klenk H. Overexpression of the  $\alpha$ -2,6-sialyltransferase in MDCK cells increases influenza virus sensitivity to neuraminidase inhibitors. *J. Virol.*, 2003, vol. 77, no. 15, pp. 8418–8425. doi: 10.1128/JVI.77.15.8418-8425.2003

11. Mohr P.G., Deng Y.M., McKimm-Breschkin J.L. The neuraminidases of MDCK grown human influenza A(H3N2) viruses isolated since 1994 can demonstrate receptor binding. *Virology J.*, 2015, no. 12: 67. doi: 10.1186/s12985-015-0295-3
12. Namura D, Nguyen H.T., Sleeman K., Levine M., Mishin V.P., Yang H., Guo Z., Okomo-Adhiambo M., Xu X., Stevens J., Gubareva L.V. Cell culture-selected substitutions in influenza A(H3N2) neuraminidase affect drug susceptibility assessment. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2013, vol. 57, no. 12, pp. 6141–6146. doi: 10.1128/AAC.01364-13
13. Nicholls J.M., Bourne A.J., Chen H., Guan Y., Peiris J.S. Sialic acid receptor detection in the human respiratory tract: evidence for widespread distribution of potential binding sites for human and avian influenza viruses. *Respir. Res.*, 2007, vol. 8: 73. doi: 10.1186/1465-9921-8-73
14. Skowronski D.M., Sabaiduc S., Chambers C., Eshaghi A., Gubbay J.B. Kraiden M., Drews S.J., Martineau C., De Serres G., Dickinson J.A., Winter A.L., Bastien N., Li Y. Mutations acquired during cell culture isolation may affect antigenic characterization of influenza A(H3N2) clade 3C.2a viruses. *Eurosurveillance*, 2016, vol. 21, no. 3: 30112. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.3.30112
15. Smith D.J., Lapedes A.S., de Jong J.C., Bestebroer T.M., Rimmelzwaan G.F., Osterhaus A.D., Fouchier R.A. Mapping the antigenic and genetic evolution of influenza virus. *Science*, 2004, vol. 305, pp. 371–376. doi:10.1126/science.1097211
16. Xiong X., McCauley J.W., Steinhauer D.A. Receptor binding properties of the influenza virus hemagglutinin as a determinant of host range. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2014, vol. 385, pp. 63–91. doi: 10.1007/82\_2014\_423
17. Xue K.S., Greninger A.L., Pérez-Osorio A., Bloom J.D. Cooperating H3N2 influenza virus variants are not detectable in primary clinical samples. *mSphere*, 2018, vol. 3, no. 1: e00552-17. doi: 10.1128/mSphereDirect.00552-17
18. Xue K.S., Hooper K.A., Ollodart A.R., Dings A.S., Bloom J.D. Cooperation between distinct viral variants promotes growth of H3N2 influenza in cell culture. *Microbiol. Infect. Dis.*, 2016, no. 5: e13974. doi: 10.7554/eLife.13974
19. WHO Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2019 southern hemisphere influenza season.
20. Worldwide influenza centre WHO CC for Reference & Research on Influenza Annual report. *The Francis Crick Institute. February, 2017.*
21. Worldwide influenza centre WHO CC for Reference & Research on Influenza Annual report. *The Francis Crick Institute. February, 2018.*
22. Worldwide influenza centre WHO CC for Reference & Research on Influenza Annual report. *The Francis Crick Institute. September, 2018.*

**Авторы:**

**Петрова П.А.**, младший научный сотрудник лаборатории эволюционной изменчивости вирусов гриппа ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;  
**Коновалова Н.И.**, к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории эволюционной изменчивости вирусов гриппа ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;  
**Васильева А.Д.**, лаборант-исследователь лаборатории эволюционной изменчивости вирусов гриппа ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;  
**Еропкина Е.М.**, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории эволюционной изменчивости вирусов гриппа ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;  
**Иванова А.А.**, м.н.с., лаборатории молекулярной вирусологии ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;  
**Комиссаров А.Б.**, зав. лабораторией молекулярной вирусологии ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;  
**Еропкин М.Ю.**, д.б.н., зав. лабораторией эволюционной изменчивости вирусов гриппа ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;  
**Даниленко Д.М.**, к.б.н., зам. директора по научной работе, зав. отделом этиологии и эпидемиологии гриппа и ОРВИ ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия.

**Authors:**

**Petrova P.A.**, Junior Researcher, Department of Evolutionary Variability of Influenza Viruses, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation;  
**Konovalova N.I.**, PhD, Leading Researcher Assistant of the Laboratory of Evolutionary Variability of Influenza Viruses, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation;  
**Vassilieva A.D.**, Research Assistant of the Laboratory of Evolutionary Variability of Influenza Viruses, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation;  
**Eropkina E.M.**, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Evolutionary Variability of Influenza Viruses, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation;  
**Ivanova A.A.**, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Virology, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation;  
**Komissarov A.B.**, Head of the Laboratory of Molecular Virology, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation;  
**Eropkin M.Yu.**, PhD, Head of the Laboratory of Evolutionary Variability of Influenza Viruses, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation;  
**Danilenko D.M.**, PhD, Deputy Director on Science, Head of Etiology and Epidemiology of Influenza and ARI Department, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 31.10.2018  
 Отправлена на доработку 13.03.2019  
 Принята к печати 14.03.2019

Received 31.10.2018  
 Revision received 13.03.2019  
 Accepted 14.03.2019