

Рабочее совещание по вопросам эпидемиологического надзора за гриппом и ОРВИ со  
специалистами территориальных органов и подведомственных организаций  
Роспотребнадзора

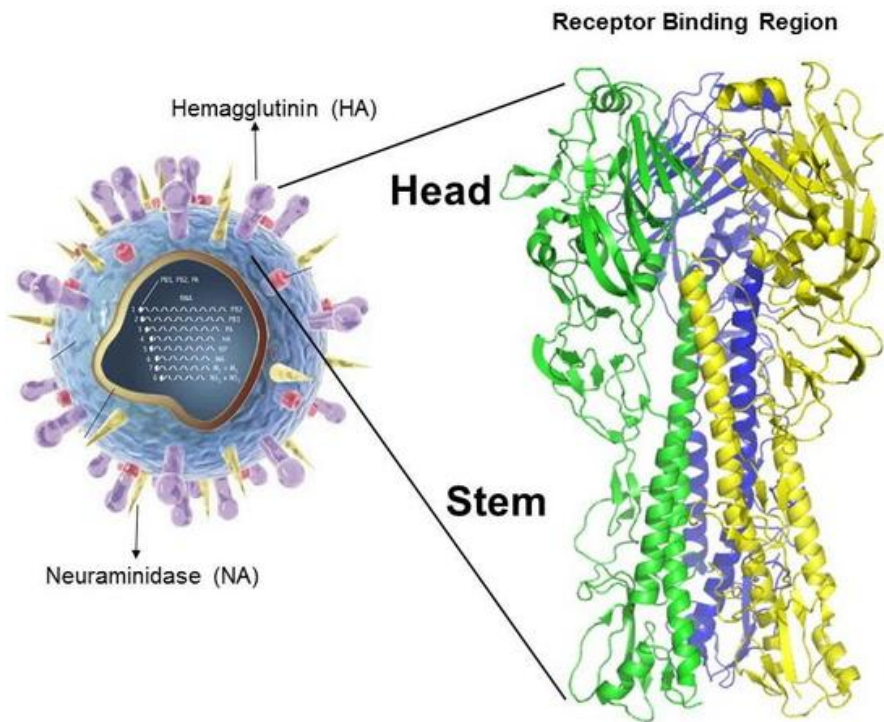
# Реакция микронеutralизации для определения антигенной принадлежности вновь выделенных вирусов гриппа человека

Петрова П.А.

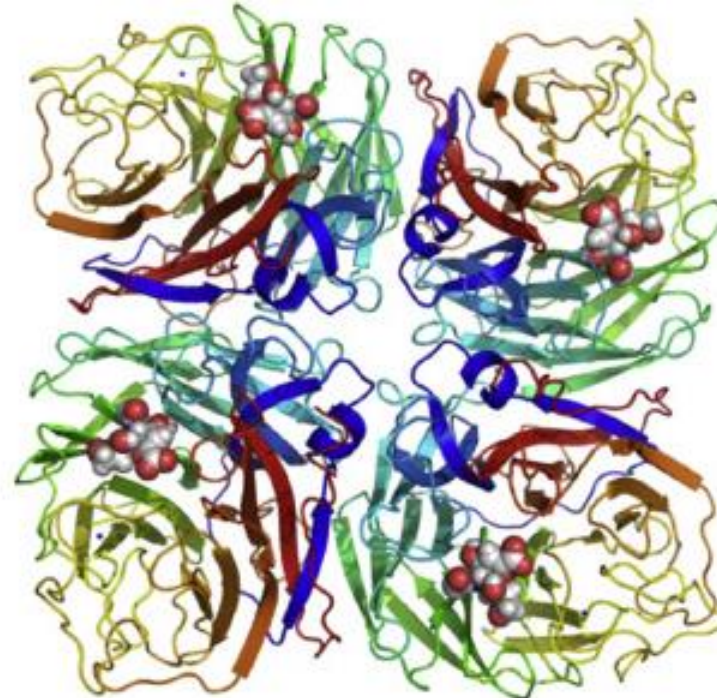
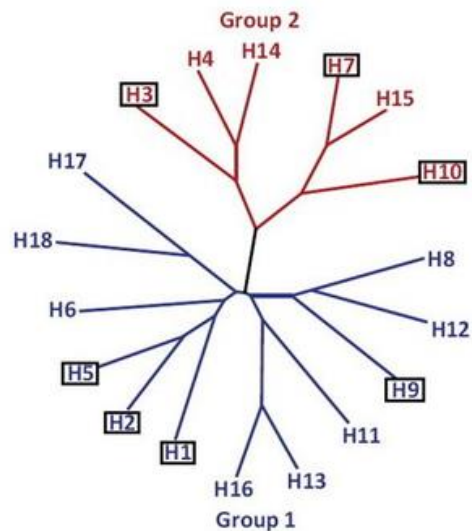
Н.с. лаб. Эволюционной изменчивости вирусов  
гриппа

ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева»  
Минздрава России

Санкт-Петербург, 2019

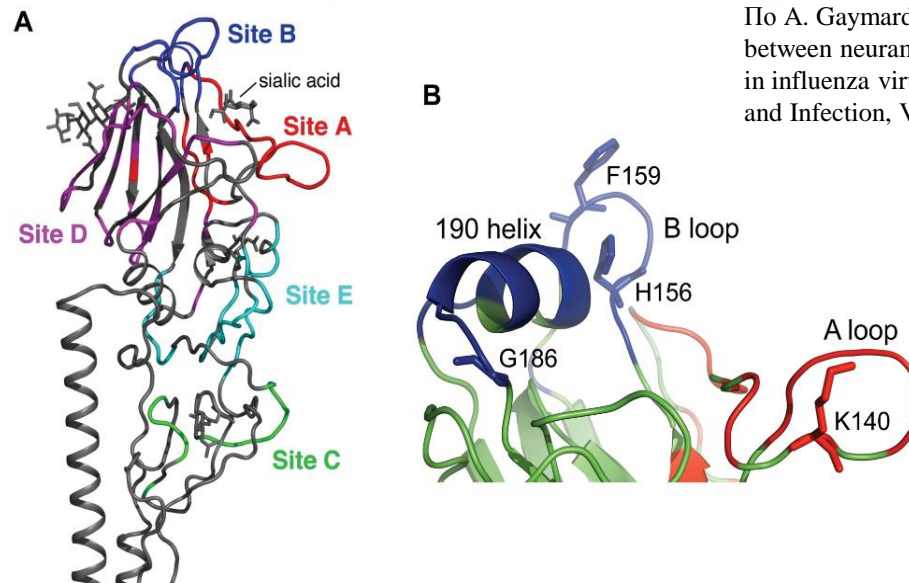


Phylogenetic tree of hemagglutinin (HA)



По A. Gaymard et al. Functional balance between neuraminidase and hemagglutinin in influenza viruses//Clinical Microbiology and Infection, Vol. 22,, 2016

Антигенные сайты или антигенные детерминанты – это участки мембранно-дистальной глобулярной части гемагглютинина, окружающие рецептор-связывающий домен и взаимодействующие с антителами



По Popova L., et al Immunodominance of Antigenic Site B over Site A of Hemagglutinin of Recent H3N2 Influenza Viruses//PLOS one July 25, 2012

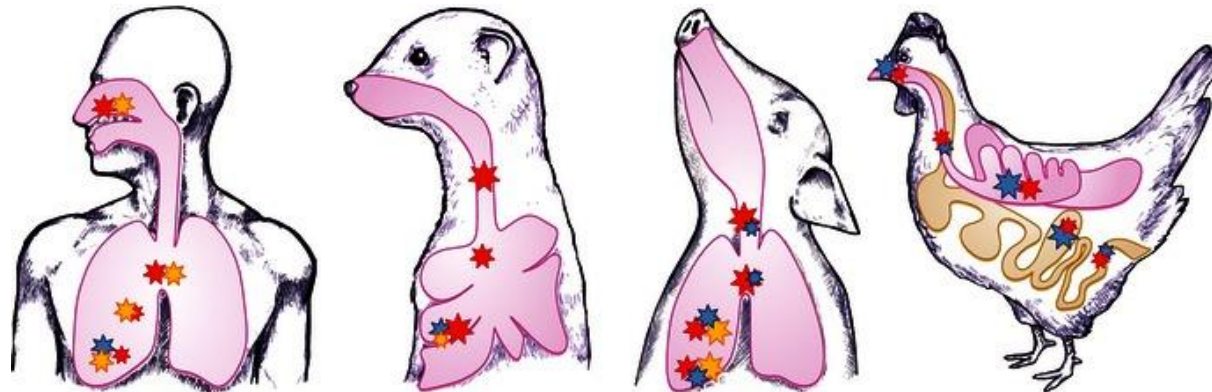
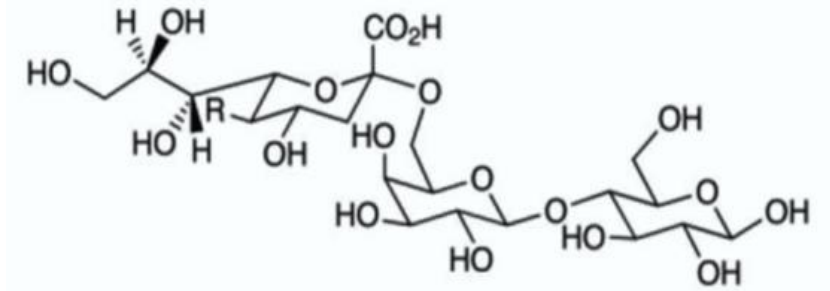
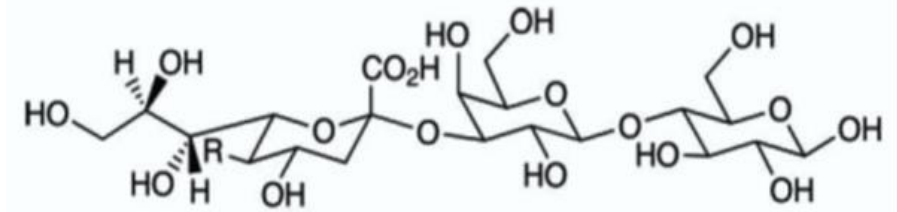
## Штаммы, рекомендованные о включении в состав противогриппозных вакцин для компонента А(Н3N2)

2005-2006	А/Калифорния/7/2004
2006-2007	А/Висконсин/67/2005
2007-2008	А/Висконсин/67/2005
2008-2009	А/Брисбен/10/2007
2009-2010	А/Брисбен/10/2007
2010-2011	А/Перт/16/2009
2011-2012	А/Перт/16/2009
2012-2013	А/Виктория/361/2011
2013-2014	А/Техас/50/2012
2014-2015	А/Техас/50/2012
2015-2016	А/Швейцария/9715293/2013
2016-2017	А/Гонконг/4801/2014
2017-2018	А/Гонконг/4801/2014
2018-2019	А/Сингапур/INFIMH-16-0019/2016
2019-2020	А/Канзас/14/2017

- Антигенный анализ проводят с использованием РТГА с различными панелями пост-инфекционных сывороток хорьков или крыс, включающих в себя антисыворотки к референс и вакцинным штаммам.
- Метод микронеutralизации основывается на способности вируса связываться с клетками, инфицировать клетки и производить инфекционное потомство.
- РТГА является суррогатом нейтрализации, т.к. эритроциты заменяют клетки, поддерживающих репликацию вируса гриппа.

Гемагглютинин в процессе инфицирования клеток-мишеней связывается с клеточными рецепторами, в состав которых входят сиаловые кислоты.

Сиаловые кислоты, с которыми связываются вирусы гриппа представлены двумя видами, различающиеся между собой по положению гликозидной связи между сиаловой кислотой и терминальной галактозой:  $\alpha 2,3$  и  $\alpha 2,6$

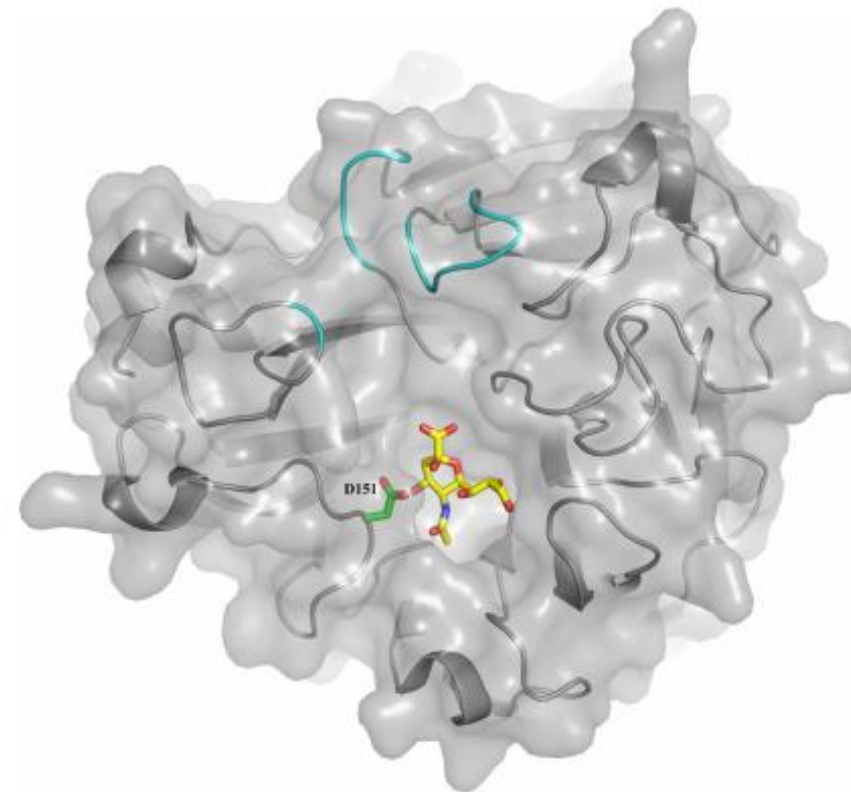


$\alpha 2,6$ SA	$\alpha 2,3$ SA MAA-I	$\alpha 2,3$ SA MAA-II
★ +++	★ +++	★ +++
★ ++	★ ++	★ ++
★ +	★ +	★ +

## Реакция торможения гемагглютинации

- Используется для анализа антигенной изменчивости вирусов гриппа.
- Для вирусов A(H1N1)pdm09 и B можно использовать эритроциты кур и индеек
- Вирусы A(H3N2) с 2005 г. не связываются с эритроцитами кур и индеек
- Для анализа вирусов A(H3N2) используются эритроциты морской свинки и человека (I группы)
- Часть современных вирусов A(H3N2) не взаимодействуют с эритроцитами морской свинки и человека

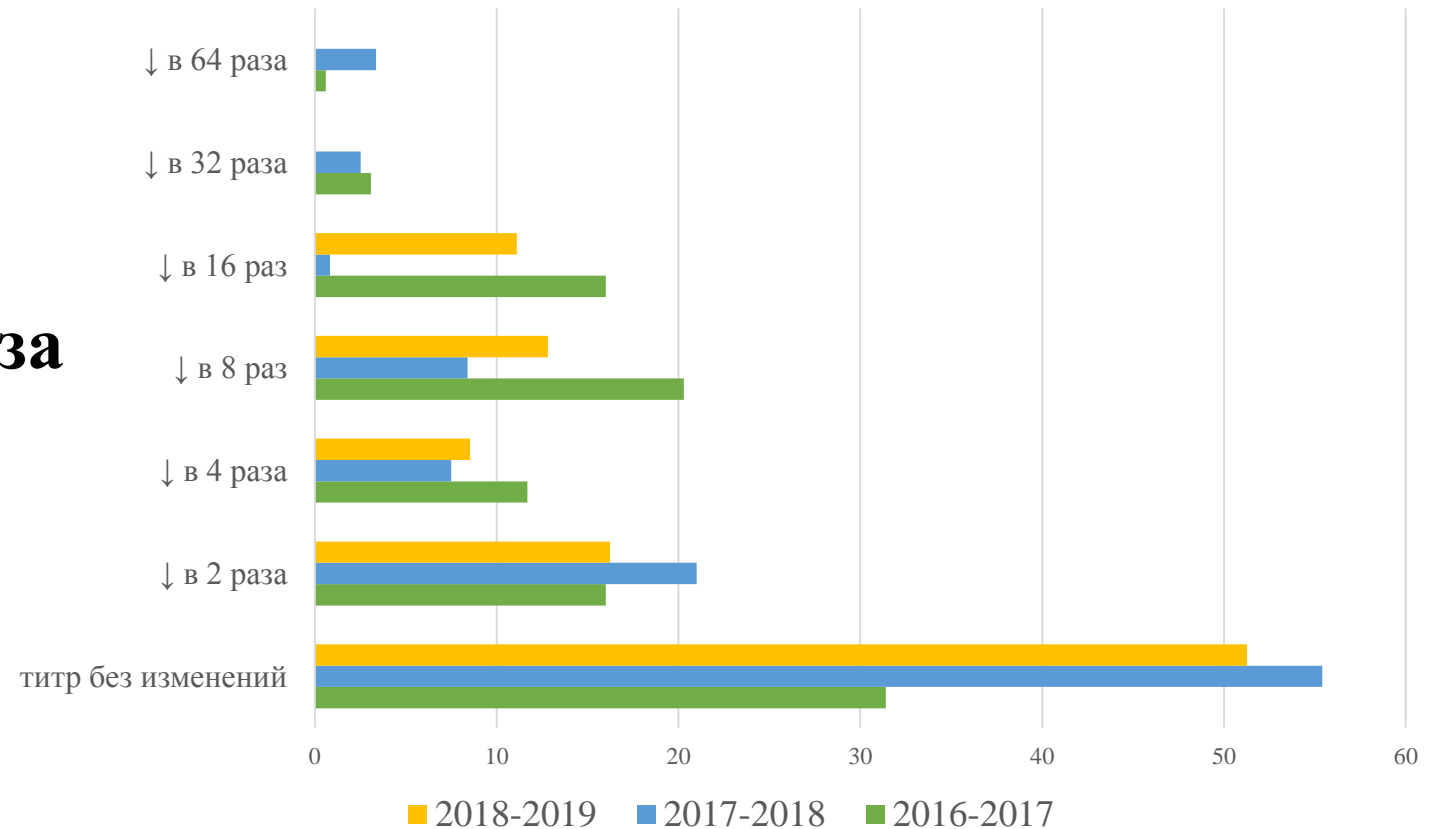
- При выделении и пассировании вирусов А(Н3N2) в клеточной культуре MDCK, штаммы приобретают мутации D151G/N и T148I в NA.
- Эти замены приводят к тому, что NA становится способной связываться с  $\alpha 2,3$ -рецепторами клетки.
- Наблюдается ложноположительная NA-индуцированная агглютинация эритроцитов.



По Lin Y.P., Gregory V., Collins P., Kloess J., Wharton S. et al. 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

При добавлении 20 нМ раствора озельтамивира карбоксилата блокируется активность НА, и, как следствие, исчезает ложноположительная агглютинация эритроцитов.

Все вирусы,  
гемагглютинирующий титр  
которых уменьшается **в 4 раза**  
**и более** невозможно  
проанализировать в РТГА

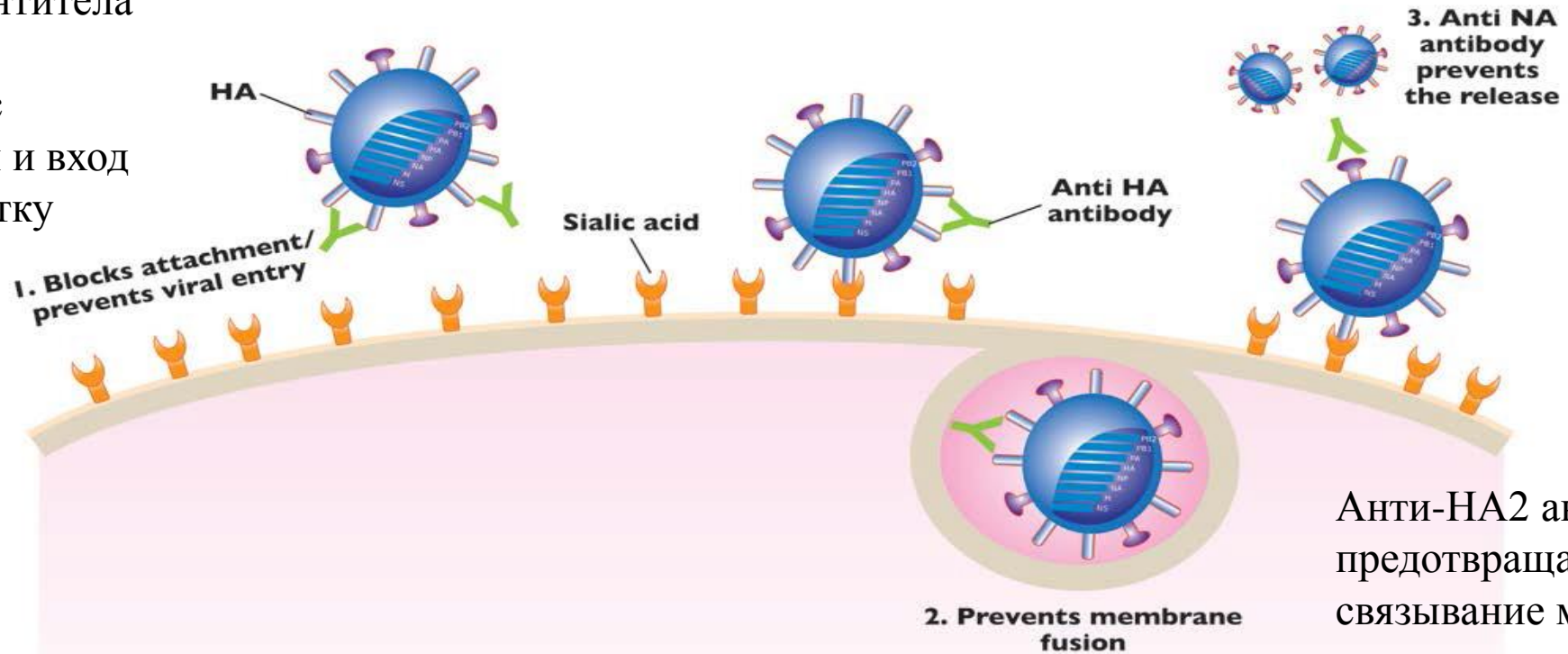




- Микронеutralизация – метод, с помощью которого определяют титр нейтрализующих антител в сыворотках.

### Mechanisms of Virus Neutralization

Анти-НА1 антитела блокируют связывание с рецепторами и вход вируса в клетку

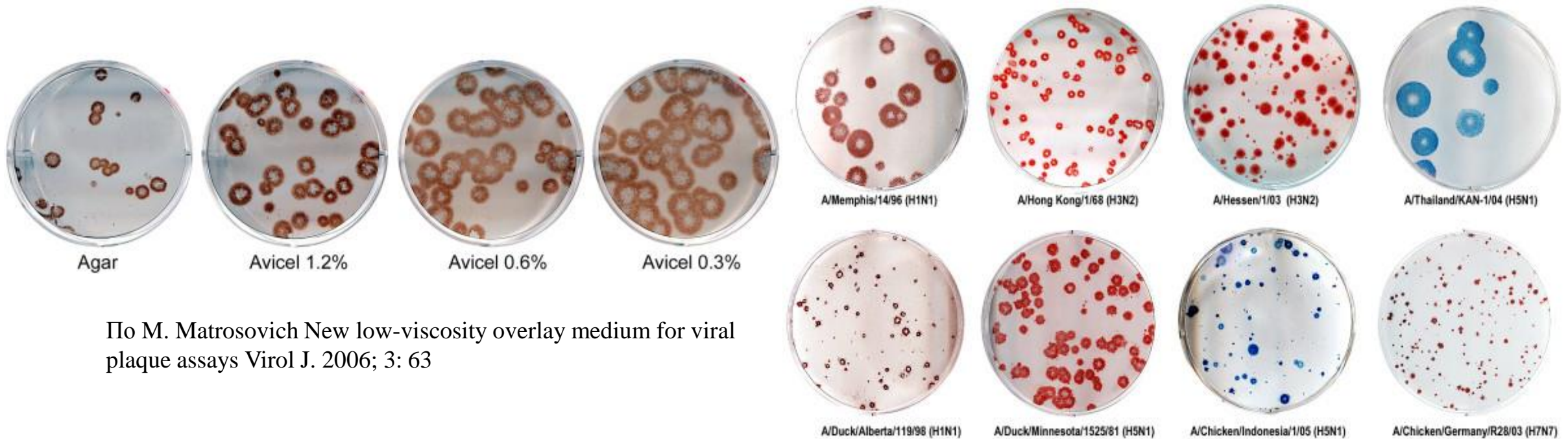


Анти-НА2 антитела предотвращают связывание мембран

## История метода:

- М. W. Harmon et al. 1988г. применил метод, используемый при характеристики РС-вирусов, для исследования вирусов гриппа В. Базировался на ELISA.
- Т. Rowe et al. 1999г. модифицировал метод и ввел его в CDC для анализа уровня антител к А(Н5N1).

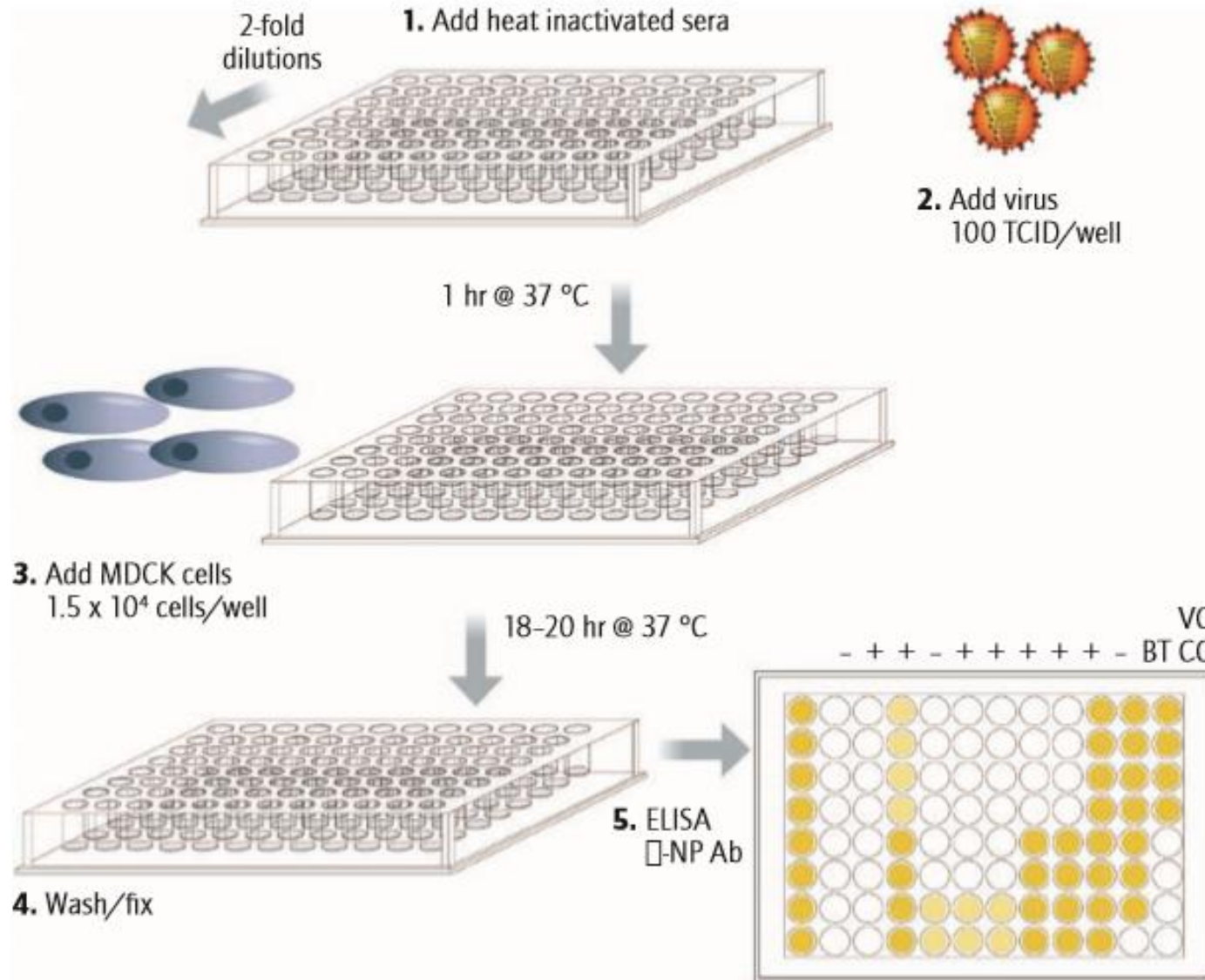
- Matrosovich M. et al. 2006 г. использовал Avicell в качестве покрывающей среды для реакции бляшкообразования.



По М. Matrosovich New low-viscosity overlay medium for viral plaque assays Virol J. 2006; 3: 63

- Alberini I. et al. 2009 г. использовала нейтрализацию псевдочастиц, экспрессирующих НА вирусов H5N1.

# Микронейтрализация с детекцией cell-ELISA



## Этапы:

1. Определение 100 TCID
2. Микронейтрализация
3. ELISA

Для каждого вируса используется отдельный планшет на втором этапе

По Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza



## Анализ результатов:

- Производится для каждого планшета индивидуально
- Определение 50% нейтрализующего титра каждой сыворотки:

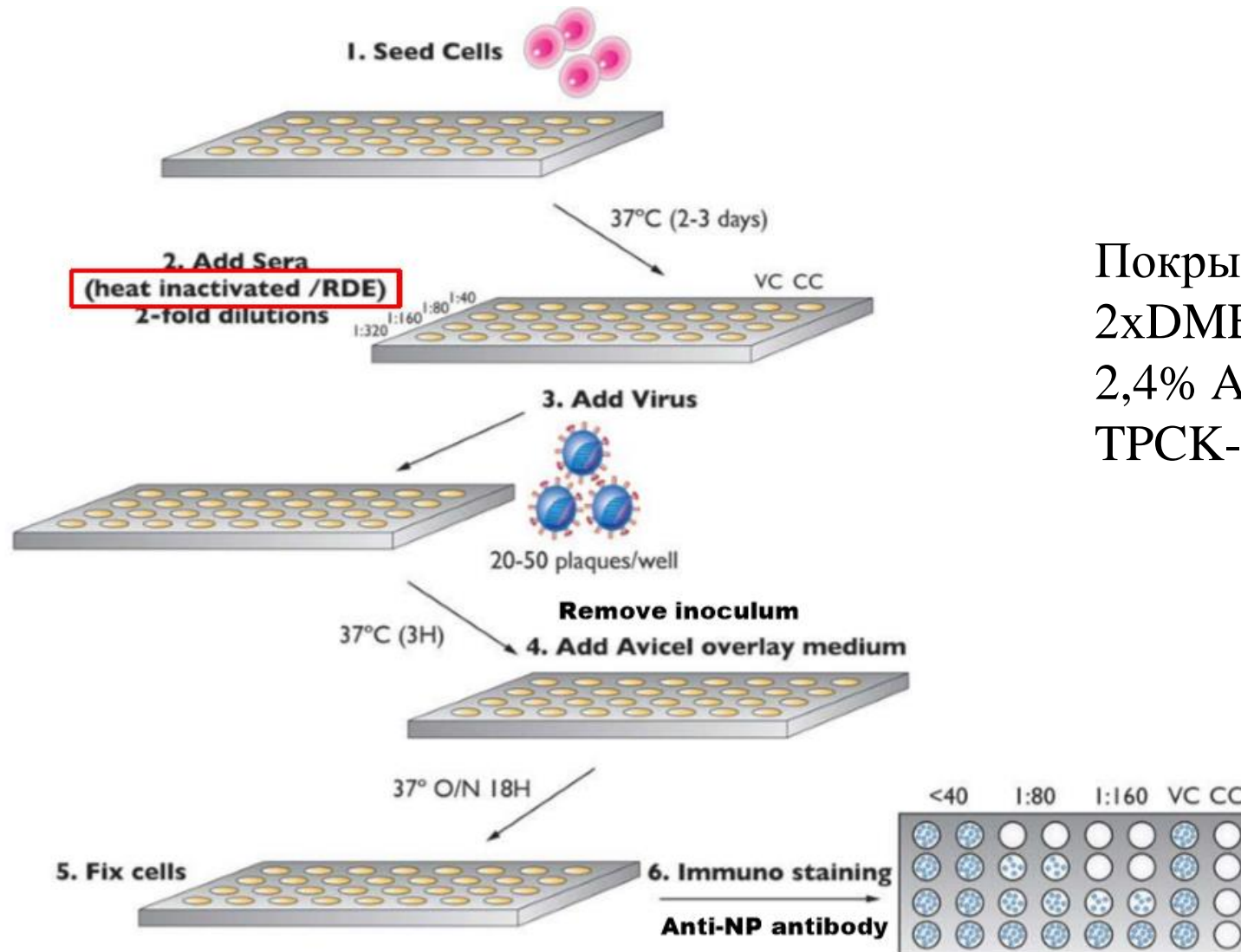
$$X = \frac{(\text{Сред.ОП лунок с контролем вируса}) - (\text{Сред.ОП лунок контроля клеток})}{2} + (\text{ср.ОП лунок контроля клеток})$$

Все значения меньше или равные X положительны на нейтрализующую активность

## Проблемы:

1. Слабая или полное отсутствие окраски в лунках контроля вируса:
  - Неправильно выбранные антитела или субстрат
  - Неправильно подготовлены буферные растворы
  - Слишком маленькая доза вируса или вирус не был добавлен в контрольные лунки
  - Вирус инактивируется на стадии взаимодействия с сывороткой
  - Клетки на больших пассажах и не на стадии логарифмического роста
2. Слабая или полное отсутствие нейтрализации с сывороткой, являющейся положительным контролем
  - Слишком большая доза тестируемого вируса
  - Титр сыворотки уменьшился
3. Нейтрализация сывороткой, являющейся отрицательным контролем
  - Неспецифическая реакция или кросс-реактивность
  - Слишком маленькая доза вируса

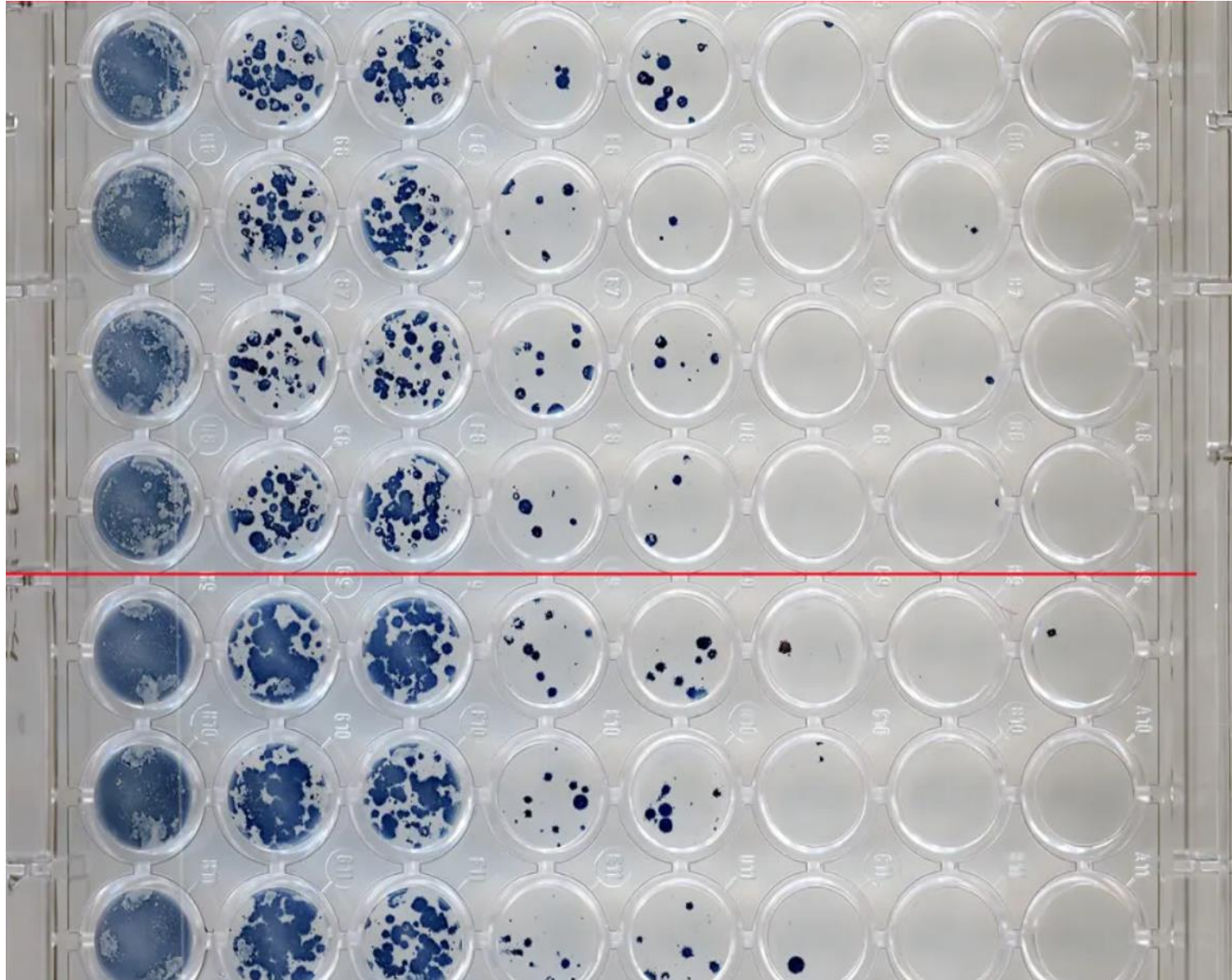
# Микронейтрализация, основанная на уменьшении количества бляшек



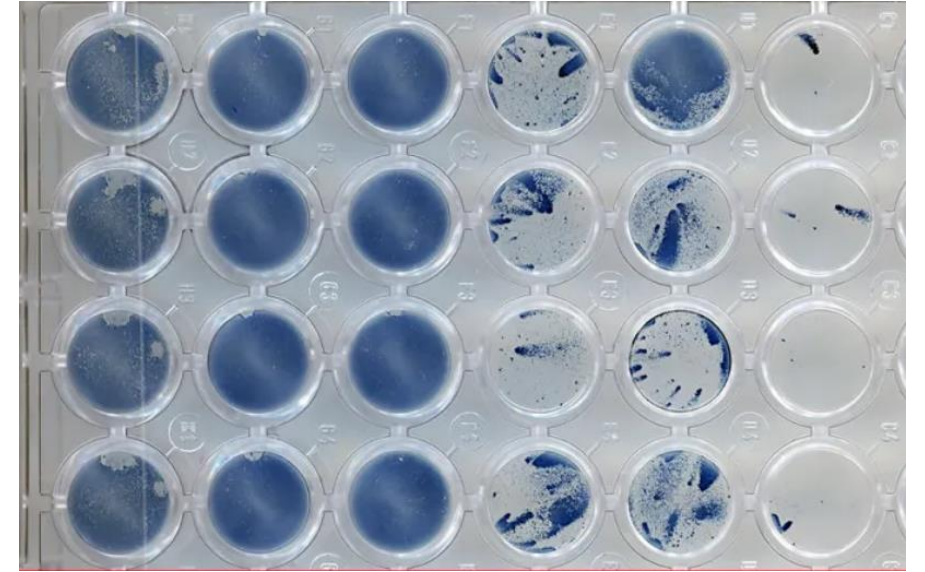
Покрывающая среда:  
2хDMEM с добавлением  
2,4% Avicell и 4 мкг/мл  
TPCK-трипсина



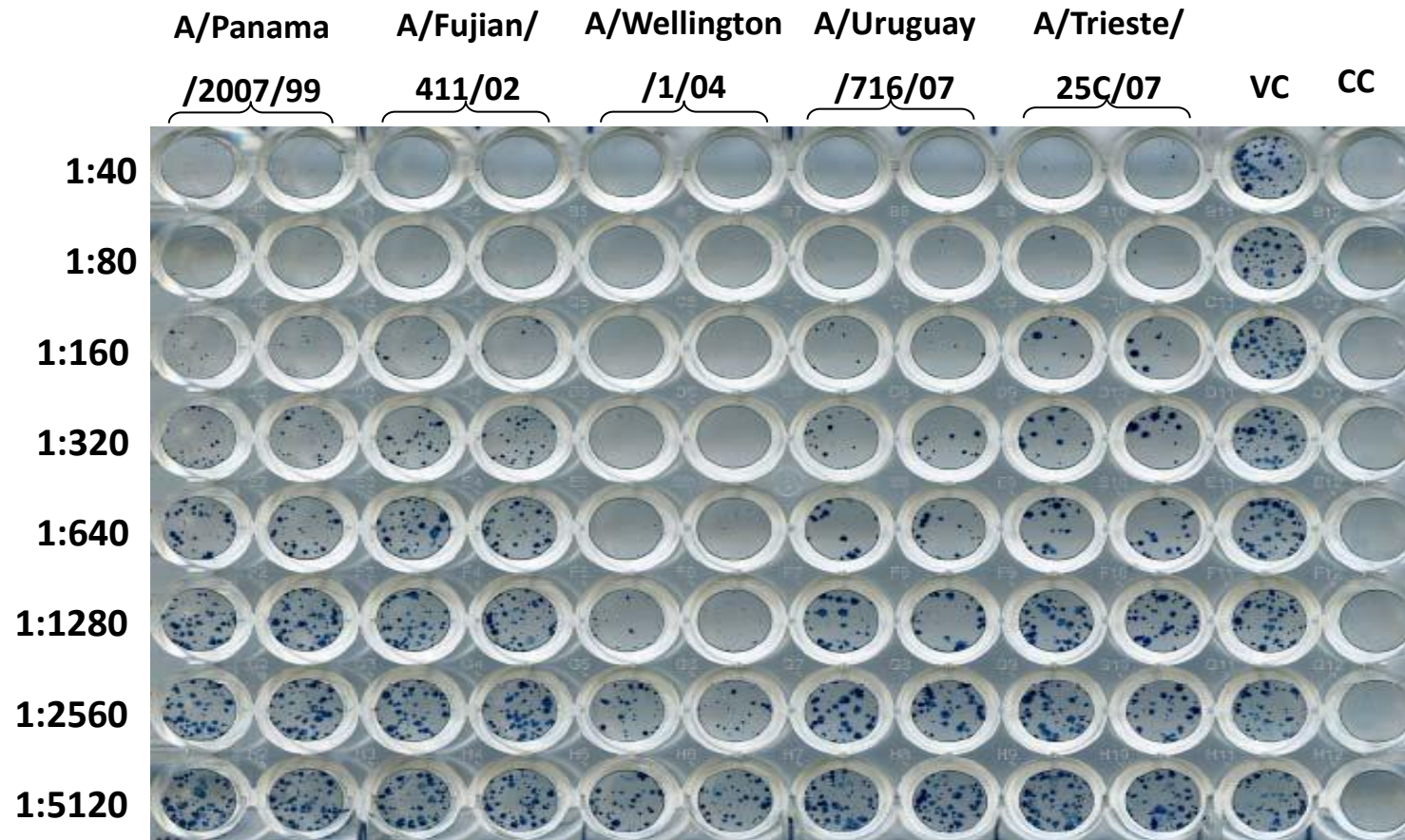
# 1 Этап: Титрование вируса



По М. Matrosovich New low-viscosity overlay medium for viral plaque assays *Virol J.* 2006; 3: 63



## Этап 2: Нейтрализация вируса антисыворотками



A/Wellington/1/04

Нейтрализующий титр антител определяется как наибольшее разведение сыворотки, вызывающей уменьшение количества бляшек по сравнению со средним значением вирусного контроля на 50 или 80%.

# Результат:

№	Influenza A(H3N2) viruses	Collection date	Rat polyclonal antisera										Ferret antisera
			A/Khab/19/15 MDCK 3C.3a	A/Switz /9715293/13 Egg 3C.3a	A/SPb/80/14 MDCK 3C.2a	A/Hong Kong/ 4801/14 MDCK 3C.2a	A/Singap./INF1 MH-16-009/16 Egg 3C.2a1	A/Singap./INF1 MH-16-009/16 Siat 3C.2a1	A/Naryan Mar/RII-01/18 MDCK 3C.2a2	A/Bretagne/14 13/17 MDCK 3C.2a2	A/Chita/8/18 MDCK 3C.2a3	A/Spb/RII- 475/18 MDCK	A/La Rioja/2202/17 Siat 3C.2a1b
1	A/Khabarovsk /19/15 MDCK 3C.3a	04.02.15	<b>1280</b>	1280	80	20	40	80	40	40	20	20	20
2	A/Switzerland /9715293/13 Egg 3C.3a	06.12.15	640	<b>640</b>	80	20	40	80	20	40	40	20	40
3	A/St. Petersburg/80/14 MDCK 3C.2a	07.03.14	80	80	<b>320</b>	160	160	160	160	320	160	160	80
4	A/Hong Kong/4801/14 MDCK 3C.2a	26.02.14	40	80	320	<b>320</b>	320	320	160	160	160	160	80
5	A/Singapore/INF1MH-16-009/16 MDCK-Siat1 3C.2a1	14.06.16	40	40	160	160	<b>320</b>	<b>320</b>	320	160	320	640	320
6	A/Naryan Mar/RII-01/18 MDCK 3C.2a2	14.04.18	20	<20	160	160	160	320	<b>320</b>	320	320	80	80
7	A/Bretagne/1413/17 MDCK 3C.2a2	09.10.17	40	20	160	320	40	320	320	<b>640</b>	160	160	80
8	A/Chita/8/18 MDCK 3C.2a3	22.01.18	<20	20	160	160	160	160	80	80	<b>640</b>	160	160
9	A/St. Petersburg/RII-475/18 MDCK 3C.2a1b	03.05.18	<20	20	320	320	80	320	160	320	320	<b>640</b>	320
10	A/Arkhangelsk/1/2019	26.12.18	<20	<20	20	<20	20	320	40	40	160	160	160
11	A/Arkhangelsk/23/2019	03.02.19	20	<20	40	40	40	640	20	40	80	320	320
12	A/Chelyabinsk/31/19	19.01.19	<20	<20	20	<20	<20	320	20	20	80	160	160
13	A/Groznyy/RII-16/19	22.02.19	20	<20	40	40	20	320	20	80	40	80	320
14	A/Naryan Mar/RII-01/19	25.01.19	<20	<20	80	160	40	640	160	160	160	160	320
15	A/Khabarovsk/44/2018	04.12.18	<20	<20	20	<20	20	320	20	80	160	160	160
16	A/St. Petersburg/RII-38/2019	09.01.19	<20	20	160	320	<20	320	160	20	640	640	320

Table 9-8 . Antigenic analysis of influenza A(H3N2) viruses - Plaque Reduction Neutralisation (MDCK-SIAT) 2019-09-05

Viruses	Passage history Ferret number Genetic group	Collection Date	Passage History	Neutralisation Titre <sup>1</sup>										HA1 substitutions for 3C.2a/3a viruses compared to A/Hong Kong/4801/2014: Egg adaptation HA substitutions compared to the corresponding cell culture propagated virus
				Post-infection ferret antisera										
				A/Norway 3275/2018		A/Norway 3275/2018		A/La Rioja 2202/18		A/Kansas 14/2017		NYMC X-327 A/Kansas/14		
				SIAT F03/19 3C.2a1b	Read F03/19 3C.2a1b	Egg F21/19 3C.2a1b	Read F21/19 3C.2a1b	SIAT F26/18 3C.2a1b	Read F26/18 3C.2a1b	SIAT F17/19 3C.3a	Read F17/19 3C.3a	Egg F16/19 3C.3a	Read F16/19 3C.3a	
<b>REFERENCE VIRUSES</b>														
A/Norway/3275/2018	3C.2a1b	2018-10-04	SIAT2 10 <sup>-3</sup>	640	596	80	61	80	87	<	16	<	13	E62G, K92R, A106V, N121K, T131K, R142G, N171K, H311Q
A/Norway/3275/2018	3C.2a1b	2018-10-04	E6 (Am3/AI3)	80	80	1280	1050	160	127	<	5	<	10	E62G, K92R, A106V, N121K, T131K, R142G, T160K(-CHO), N171K, L194P, T203I, H311Q
A/La Rioja/2202/2018	3C.2a1b	2018-04-02	SIAT1/SIAT1 10 <sup>-1</sup>	160	197	40	55	320	393	40	20	40	28	E62G, K92R, N121K, T128A(-CHO), T135K(-CHO), R142G, N171K, H311Q
A/Kansas/14/2017	3C.3a	2017-12-14	SIAT3/SIAT2 10 <sup>-3</sup>	<	15	<	10	40	33	320	288	160	160	S91N, T128A(-CHO), A138S, R142G, S144K, Y159S, T160K(-CHO), F193S, H311Q, K326R
NYMC X-327 (A/Kansas/14/17)	3C.3a	2017-12-14	Ex/E1	40	46	40	30	80	70	320	285	2560	2008	S91N, T128A(-CHO), A138S, R142G, S144K, Y159S, T160K(-CHO), G186V, D190N, F193S, S219Y, H311Q, K326R
<b>TEST VIRUSES</b>														
A/Dijon/1974/2019	3C.2a1b	2019-04-24	MDCK1/SIAT1	160	160	160	127	160	235	80	80	80	68	E62G, K92R, N121K, T128A(-CHO), T135K(-CHO), S137L, A138S, R142G, N171K, F193S, H311Q
A/South Africa/R06219/2019	3C.2a1b	2019-05-31	SV/SIAT1	80	102	40	40	80	80	40	20	40	48	E62G, K92R, N121K, T128A(-CHO), T135K(-CHO), R142G, T160K(-CHO), N171K, H311Q
A/Pays de Loire/1864/2019	3C.2a1b	2019-04-01	MDCK2/SIAT1	160	226	160	136	160	156	40	56	80	99	E62G, F79L, K92R, N121K, T128A(-CHO), T135K(-CHO), R142G, N171K, H311Q
A/Palermo/20/2019	3C.2a1b	2019-03-06	SIAT4/SIAT1	640	491	160	186	320	455	40	42	80	106	E62G, K92R, N121K, T128A(-CHO), T135K(-CHO), R142G, N171K, H311Q
A/Torino/780/2019	3C.2a1b	2019-03-06	SIAT3/SIAT1	640	618	320	258	320	366	40	58	80	78	E62G, K92R, N121K, T128A(-CHO), T135K(-CHO), R142G, N171K, H311Q
A/Tomsk/156/2019	3C.2a1b	2019-03-11	SIAT2/SIAT1	640	623	320	253	640	510	80	111	80	77	E62G, K92R, N121K, T128A(-CHO), T135K(-CHO), R142G, N171K, H311Q
A/Moscow/146/2019	3C.2a1b	2019-03-10	SIAT1/SIAT1	640	567	160	206	320	384	80	92	80	72	D53N, E62G, K92R, N121K, T128A(-CHO), T135K(-CHO), R142G, N171K, S198P, H311Q
A/Finland/61/2019	3C.2a1b	2019-03-06	SIAT1/SIAT1	1280	1138	160	157	320	266	80	66	40	40	E62G, K92R, N121K, T131K, R142G, N171K, S219F, H311Q
A/Dijon/2017/2019	3C.2a1b	2019-04-21	MDCK2/SIAT1	640	860	160	127	160	212	<	<	<	<	E62G, K92R, N121K, T131K, R142G, N171K, H311Q
A/Champagne Ardenne/1908/2019	3C.2a1b	2019-04-10	MDCK2/SIAT1	640	486	80	80	160	209	40	40	40	40	E62G, K92R, N121K, T131K, R142G, R150K, T160A(-CHO), N171K, Q197R, K207R, S219F, H311Q
A/South Africa/R06432/2019	3C.2a1b	2019-06-05	MDCK1/SIAT1	1280	1387	160	209	320	305	80	103	80	82	E62G, K92R, N121K, T131K, R142G, N171K, Q197R, K207R, S219F, H311Q
A/South Africa/R06421/2019	3C.2a1b	2019-06-05	MDCK1/SIAT1	640	947	160	181	320	288	80	72	80	79	E62G, K92R, N121K, T131K, R142G, N171K, Q197R, S219F, H311Q
A/South Africa/R05937/2019	3C.2a1b	2019-05-28	MDCK1/SIAT1	1280	960	160	187	320	309	80	72	80	62	E62G, K92R, N121K, T131K, R142G, N171K, Q197R, S219F, H311Q
A/Moscow/152/2019	3C.2a1b	2019-03-30	SIAT1/SIAT1	1280	1189	160	234	320	405	80	73	80	92	E62G, K92R, N121K, T131K, R142G, N171K, S219F, H311Q
A/Cheboksary/154/2019	3C.2a1b	2019-03-18	SIAT2/SIAT1	2560	2146	320	384	320	460	160	196	160	195	E62G, K92R, N121K, T131K, R142G, N171K, S219F, H311Q
A/Vladivostok/5/2019	3C.2a1b	2019-03-14	SIAT1/SIAT1	1280	1902	320	377	640	610	160	123	160	166	E62G, K92R, N121K, T131K, R142G, N171K, S219F, H311Q
A/Brest/2002/2019	3C.3a	2019-04-11	MDCK1/SIAT1	40	40	40	40	<	3	320	199	320	290	S91N, T128A(-CHO), A138S, R142G, S144K, H156Q, L157S, Y159S, T160K(-CHO), F193S, H311Q, S312G, K326R
A/Bretagne/1913/2019	3C.3a	2019-04-11	MDCK1/SIAT1	40	54	40	40	40	51	160	232	320	320	S91N, T128A(-CHO), A138S, R142G, S144K, H156Q, L157S, Y159S, T160K(-CHO), F193S, H311Q, S312G, K326R
A/South Africa/R06917/2019	3C.3a	2019-06-10	MDCK1/SIAT1	<	10	<	0	<	0	320	242	160	138	S91N, T128A(-CHO), A138S, R142G, S144K, Y159S, T160K(-CHO), F193S, H311Q, K326R
A/South Africa/R05121/2019	3C.3a	2019-05-14	MDCK1/SIAT1	<	10	<	5	<	10	320	315	320	240	S91N, T128A(-CHO), A138S, R142G, S144K, Y159S, T160K(-CHO), F193S, H311Q, K326R
A/Czech Republic/1275/2019	3C.3a	2019-04-10	MDCK3/SIAT1	<	0	<	0	<	3	320	373	160	217	H56Y, K82R, S91N, N121D, T128A(-CHO), A138S, R142G, S144K, Y159S, T160K(-CHO), F193S, A304E, H311Q, K326R
A/Picardie/1898/2019	3C.3a	2019-04-08	MDCK1/SIAT1	160	124	80	71	80	61	320	379	320	331	S91N, T128A(-CHO), A138S, R142G, S144K, Y159S, T160K(-CHO), Y161F, F193S, H311Q, K326R
A/Palermo/13/2019	3C.3a	2019-03-05	SIAT3/SIAT1	40	50	40	20	40	40	320	320	320	248	S91N, T128A(-CHO), A138S, R142G, S144K, Y159S, T160K(-CHO), F193S, H311Q, K326R
												Vaccine NH 2019-20		Virus with S137F, A138S, F193S substitutions

<sup>1</sup> Antiserum dilution value (2-fold), equivalent to HI reading, closest to the actual computer read value from a digitized image (Read) causing 50% reduction in plaque formation

## Использование реакции микронеutralизации:

1. Определение новых вакцинных штаммов: помогает дифференцировать антигенные группы вирусов, у которых отсутствует гемагглютинация – современных А(Н3N2).
2. Более чувствительная детекция иммунного ответа на вакцины.
3. Для работы с вирусами гриппа птиц.



Спасибо за внимание!