

Т.И. ГЛЕБОВА¹, Н.Г. КЛИВЛЕЕВА¹, М.Г. ШАМЕНОВА¹, Н.Т. САКТАГАНОВ¹,
Г.В. ЛУКМАНОВА¹, М.К. КАЛКОЖАЕВА¹, А.Ж. МУРЗАГАЛИЕВА², Г. ДОСАНКЫЗЫ³

¹ РГП на ПХВ «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, Казахстан, г. Алматы

² Государственное коммунальное предприятие «Областная клиническая инфекционная больница» на праве хозяйственного ведения государственного учреждения «Управление здравоохранения Актыубинской области»

³ Филиал РГП на ПХВ «Национальный центр экспертизы» Комитета по защите прав потребителей МНБ РК по Кызылординской области

ЦИРКУЛЯЦИЯ ВИРУСОВ ГРИППА В АРАЛЬСКОМ РЕГИОНЕ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН В ЭПИДЕМИЧЕСКИЙ СЕЗОН 2015 Г.

В январе – марте 2015 г. в лечебных учреждениях Актыубинской и Кызылординской областей от больных людей с диагнозами ОРВИ, ринофарингит и аденовирусная инфекция собрано 293 носоглоточных смыва и 48 сывороток крови. В полимеразной цепной реакции генетический материал вируса гриппа А был обнаружен в 12,6% случаев, вируса гриппа В – в 1,0%. При субтипировании РНК вируса гриппа А/Н3N2 идентифицирована в 9,2% проб, А/Н1N1 – в 2,7%, в 0,7% проб РНК одновременно выявлена к обоим подтипам вирусов гриппа А(Н1N1+Н3N2). Результаты, полученные при скрининге носоглоточных смывов в ПЦР, также как и данные серологических исследований в реакции торможения гемагглютинации и иммуноферментном анализе, представленные в статье, свидетельствуют о социркуляции на территории Аральского региона вирусов гриппа А/Н3N2, А/Н1N1 и В.

В работе приводятся сведения по изоляции вирусов гриппа А/Н1N1 от больных людей на культуре клеток МДСК и развивающихся куриных эмбрионах.

Ключевые слова: вирус гриппа, циркуляция, изолят, гемагглютинин, нейраминидаза

ВВЕДЕНИЕ.

Острые респираторные вирусные инфекции и грипп являются самыми массовыми инфекциями человечества и представляют серьезную проблему для общественного здравоохранения. По социальной значимости, огромному ущербу наносимому здоровью населения и экономике, грипп находится на первом месте среди всех заболеваний человека. На долю гриппа и ОРЗ приходится 10 — 30% временной нетрудоспособности населения. Обычно грипп и ОРЗ составляют до 40% всех заболеваний взрослых, более 80% всей инфекционной патологии, более 60% заболеваний среди детей. Смертность от гриппа в разных странах колеблется от 2 до 80 случаев на 100 000 населения [1, 2].

Заболевания гриппом регистрируются постоянно в течение всего года в крупных городах и промышленных регионах, спорадическая заболеваемость не прекращается даже в летние месяцы, тем самым обеспечивая непрерывность эпидемического процесса гриппозной инфекции [3].

Спектр эпидемических штаммов вирусов гриппа и их характеристика варьируют в зависимости от сезонов года. В последнее время в мире, в том числе и в различных регионах Казахстана наблюдается одновременная циркуляция вирусов гриппа подтипов А(Н1N1), А(Н3N2) и рода В [4, 5, 6]. Кроме того, необычайная сложность эпидемической ситуации связана с появлением реассортантных вирусов [7, 8].

Целью настоящего исследования являлось изучение особенностей циркуляции вирусов гриппа в Аральском регионе Казахстана в эпидемический сезон 2015 г.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Сбор клинических образцов (назофарингеальные смывы, сыворотки крови) от больных осуществляли в лечебных учреждениях в эпидемический период 2015 г. Пробы до вирусологических исследований хранили в жидком азоте.

Первичный скрининг носоглоточных смывов в полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (РТ-ПЦР) осуществляли на амплификаторе RotorGen 6000 (CorbettResearch, Австралия) с применением наборов "РИБО – преп", "АмплиСенс® Influenzavirus A/B-FL" и "АмплиСенс® Influenzavirus A-тип -FL" (производства ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, г. Москва, РФ) [9].

Изоляцию вирусов проводили в двух системах традиционными методами: на культуре клеток МДСК с добавлением ТРСК - трипсина (2 мкг/мл) и 9-11-дневных куриных эмбрионах (КЭ). Для индикации вируса в реакции гемагглютинации (РГА) использовали 0,75% взвесь эритроцитов петуха и человека 0(1) группы крови.

Инфекционную активность изолятов определяли по общепринятому методу [10] и их титр выражали в Ig ЭИД_{50/0.2мл} и IgТЦИД_{50/0.2мл}.

Идентификацию изолятов проводили в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) и реакции ингибции нейраминидазной активности (РИНА) с наборами поликлональных диагностических сывороток согласно рекомендации ВОЗ [11, 12].

Уровень специфических антител к вирусам гриппа в сыворотках крови определяли в РТГА и иммуноферментном анализе (ИФА). РТГА проводили согласно рекомендации ВОЗ с использованием как эталонных вирусов: А/California/04/09 (Н1N1), А/New Jersey/8/76(Н1N1), А/Wisconsin/67/05 (Н3N2), В/Shandong/07/07, так и коммерческих диагностикумов производства ФГБУ НИИ гриппа (г.Санкт-Петербург). Для ИФА использовали тест-системы производства ООО «ППДП» (г. Санкт-Петербург) к вирусам гриппа подтипов А(Н1N1), А(Н3N2) и типа В.

Результаты и обсуждение.

Сбор материалов проводили в эпидемический сезон (январь – март 2015 г.) в поликлиниках и инфекционных больницах Актыубинской и Кызылординской областей. Всего от больных людей было собрано 293 смыва из верхних дыхательных путей и 48 сывороток крови.

Процентное соотношение собранных образцов в зависимости от диагноза составило: «ОРВИ» - 97,27% (285 образцов) от общего числа смывов, «ринофарингит» – 2,04% (шесть проб) и «аденовирусная инфекция» – 0,68% (2 образца). Наибольшее количество носоглоточных смывов получено от детей до 14 лет (67,1%). Результаты первичного скрининга носоглоточных смывов в РТ-ПЦР представлены на рисунке 1.

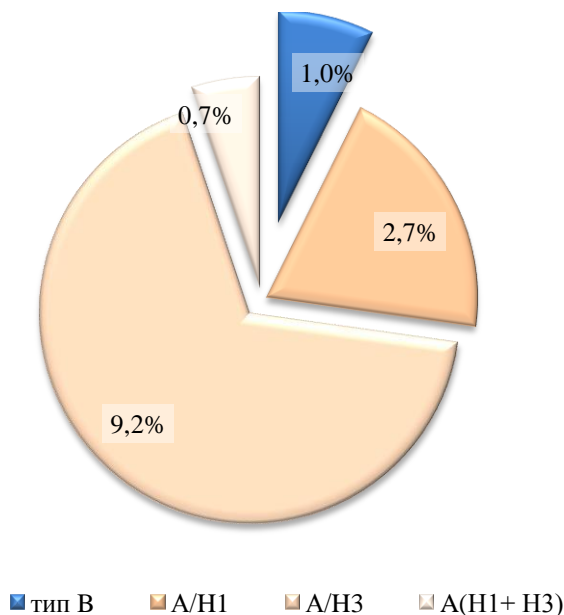


Рисунок 1 – Результаты ПЦР -скрининга носоглоточных смывов на наличие РНК вируса гриппа

Как видно из рисунка 1, при исследовании 293 проб генетический материал вируса гриппа был обнаружен в 13,6 % случаев от общего числа проб (40 образцов). РНК вируса гриппа А выявлена в 12,6% (37 проб), вируса гриппа В – в 1,0% (три образца). Субтипирование позволило обнаружить РНК вируса гриппа А/Н1N1 в 2,7% случаев (восемь смывов), в 9,2% (27 смывов) обнаружена РНК вируса А/Н3N2, в двух пробах (0,7%) выявлена РНК одновременно к обоим подтипам вирусов гриппа А(Н1N1+Н3N2).

Таким образом, первичный скрининг носоглоточных смывов в РТ-ПЦР показал, что в Актюбинской и Кызылординской областях циркулируют вирусы гриппа подтипов А/Н1N1, А/Н3N2 и типа В.

В результате первичного заражения КЭ и культуры клеток MDCK 293 пробами и проведения последующих пассажей выделено восемь гемагглютинирующих агентов (ГАА) (Таблица 1).

Таблица 1 – Гемагглютинирующая и инфекционная активность казахстанских изолятов вирусов гриппа, выделенных на куриных эмбрионах и культуре клеток MDCK

Изолят	Титр РГА при культивировании на		Инфекционная активность изолятов на	
	куриных эмбрионах	культуре клеток MDCK	куриных эмбрионах, lg ЭИД _{50/0,2мл}	культуре клеток MDCK, lgТЦИД _{50/0,2мл}
02/15	1:512	1:4	3,77	2,33
03/15	1:512	1:4	4,5	3,77
06/15	1:512	1:8	8,77	6,33
18/15	1:128	1:4	7,98	4,33
20/15	1:128	1:4	6,00	3,33
58/15	1:8	1:2	2,33	1,23
83/15	1:16	1:4	3,77	2,33
121/15	1:8	1:4	3,33	3,77

Как видно из таблицы 1, наименьшей инфекционной активностью обладал изолят 58/15 (2,33 lg ЭИД_{50/0,2мл} и 1,23 lgТЦИД_{50/0,2мл}), наибольшей – 06/15 (8,77 lgЭИД_{50/0,2мл} и 6,33 lgТЦИД_{50/0,2мл}). Для дальнейшей работы отобрано пять актюбинских изолятов (2/15, 3/15, 6/15, 18/15 и 20/15) с более высокими гемагглютинирующими титрами.

При определении подтипа гемагглютинина в РТГА установлено, что гемагглютинирующая активность всех изолятов от 1/4 до 1/32 гомологичных титров подавлялась иммунными сыворотками к вирусам А/США/1976/31 (Н1N1), А/Соломоновы Острова/03/06 и А/Калифорния/04/09 (Н1N1)pdm. Это позволило отнести ГАА к вирусу гриппа А с подтипом гемагглютинина Н1 (таблица 2).

Таблица 2 - Идентификация подтипа гемагглютини́на актюбинских изолятов вирусов гриппа 2015 г. выделения в РТГА

Иммунная сыворотка к вирусам	Гомологичный титр сывороток к вирусам эталонам	Титр антигемагглютининов к изолятам				
		02/15	03/15	06/15	18/15	20/15
А/США/1976/31 (H1N1)	1280	160	80	80	80	320
А/Соломоновы Острова/03/06	640	160	40	20	20	160
А/Калифорния/04/09(H1N1)pdm	640	160	40	20	20	160
А/Висконсин/67/05 (H3N2)	640	<20	<20	<20	<20	<20
А/Панама/2009/99 (H3N2)	640	<20	<20	<20	<20	<20
В/Флорида/09/06	640	<20	<20	<20	<20	<20

Примечание – приведены обратные величины титров специфических антигемагглютининов

Результаты идентификации подтипа второго поверхностного гликопротеида изолятов вируса гриппа А в РИНА представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Идентификация подтипа нейраминидазы актюбинских изолятов вируса гриппа 2015 г. выделения в РИНА

Изолят	Титр антител к подтипам нейраминидазы	
	N1	N2
02/15	100	<20
03/15	100	<20
06/15	100	<20
18/15	100	<20
20/15	100	<20

Примечание – приведены обратные величины титров антинейраминидазных антител

Из таблицы 3 видно, что нейраминидазная активность всех изолятов в титрах 1:100 подавлялась иммунной поликлональной сывороткой к H1N1.

Таким образом, по результатам РТГА и РИНА изоляты А/Актобе/02/15, А/Актобе/03/15, А/Актобе/06/15, А/Актобе/18/15 и А/Актобе/20/15 отнесены к вирусу гриппа А с антигенной формулой H1N1.

Для изучения сероэпидемиологической ситуации по гриппу в Аральском регионе в 2015г. исследовано 48 сывороток крови в РТГА и ИФА. Результаты РТГА приведены на рисунке 2.

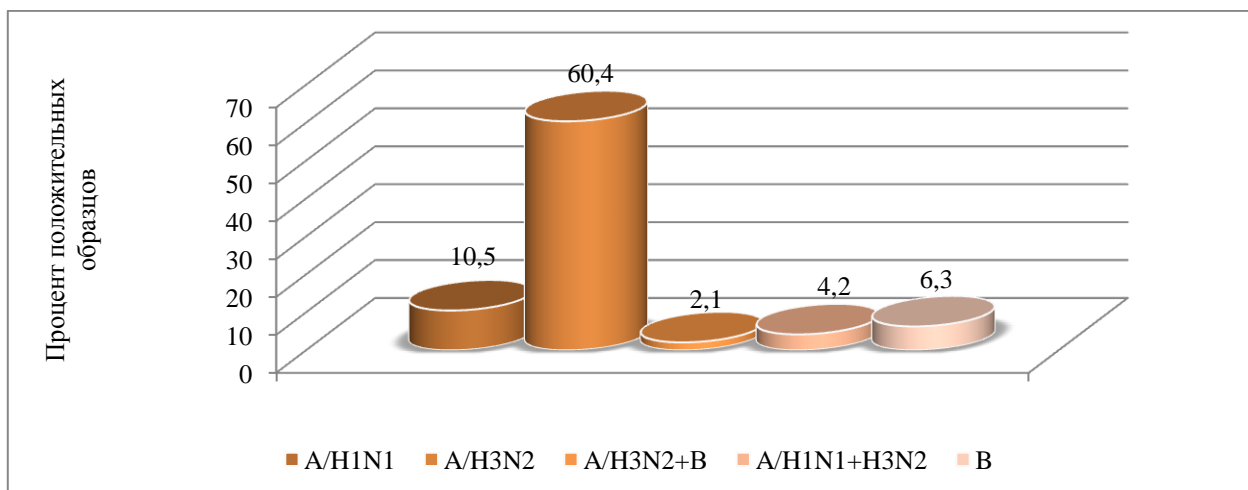


Рисунок 2 - Обнаружение специфических антител к вирусам гриппа в сыворотках крови в РТГА

Как видно из рисунка 2, в 60,4% случаев в сыворотках крови людей обнаружены антигемагглютини́ны к вирусу гриппа А/Н3N2. Титры антител составили 1:40 - 1:640. Серопозитивными по отношению к вирусу гриппа А/Н1N1 оказались 10,5% сывороток с титрами антител 1:80 - 1:320. В 6,3% случаев сыворотки были положительными по отношению к вирусу гриппа В, в 2,1% сывороток выявлены антигемагглютини́ны одновременно к вирусам гриппа А/Н3N2 и В, в 4,2% - к А/Н1N1 и А/Н3N2.

Серологическое исследование 48 сывороток крови, проведенное в ИФА показало наличие антител к вирусу гриппа А/Н3N2 в 69,6% случаев, к А/Н1N1 - в 12,6% и к вирусу гриппа В - в 4,2% сывороток (Рисунок 3).

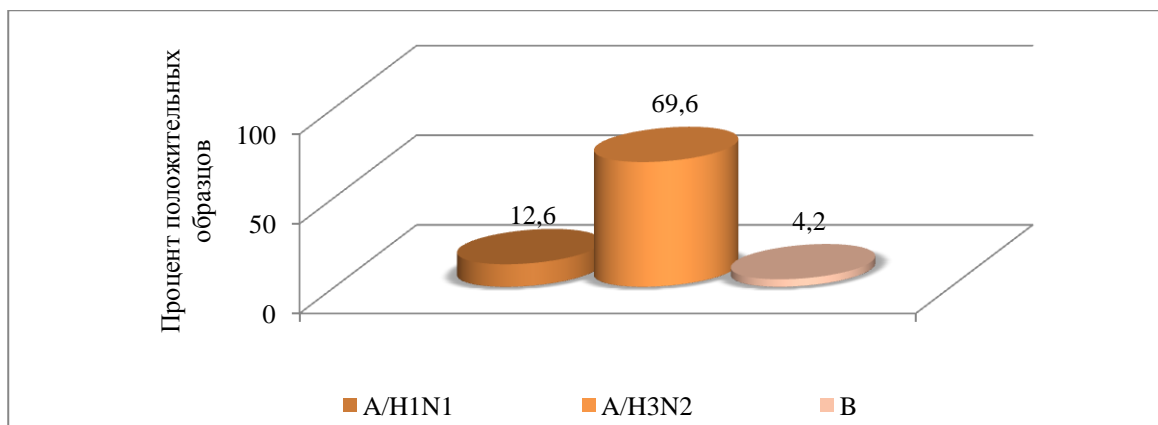


Рисунок 3 - Выявление антител к вирусам гриппа в сыворотках крови в ИФА

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

В результате первичного скрининга в РТ-ПЦР носоглоточных смывов и серологических исследований сывороток крови, собранных в эпидемический сезон 2015 г. от больных людей в Актюбинской и Кызылординской областях РК, выявлена социркуляция вирусов гриппа А/Н3N2, А/Н1N1 и В. Циркуляция вируса гриппа с антигенной формулой А/Н1N1 подтверждена выделением из клинических образцов пяти изолятов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Салтыкова Т.С. Отсроченная смертность при гриппе среди лиц пожилого возраста // ЖМЭИ. - 2010. - №4. - С. 8-13.
- 2 Социальное значение эпидемий гриппа [Электронный ресурс]. Дата обновления: 16.11.15. — URL: <http://www.vitaminov.net/rus-gripp-epidem-0-20371.html> (дата обращения: 16.11.15).
- 3 Карпунин Г.И. Грипп. – Л.: Медицина. - 1986. – С. 348.
- 4 Klivleyeva N.G., Glebova T.I., Lukmanova G.V., Bayseit S.B., Taubaeva Sh.Zh., Kalkozhaeva M.K. Influenza virus circulation among the population of Kazakhstan in 2012-2014 // 17th International Conference on Virology and Infection Diseases. World Academy of Science, Engineering and Technology, International Science Index, Medical and Health Sciences, 2(9), 1030. – London: 2015.- 2(9).- P. 1030.
- 5 Klivleyeva N.G., Lukmanova G.V., Glebova T.I., Shamenova M.G., Saktaganov N.T., Duysenova K.V. Molecular diagnostics and genetic characteristics of influenza A/H1N1 virus circulating in the territory of the West Kazakhstan in 2012-2014 // Journal of Clinical Virology. – Edinburg: 2015.- P. 22.
- 6 Ишмухаметова Н.Г., Глебова Т.И., Кузнецова Т.В., Шаменова М.Г., Дуйсенова К.В. Циркуляция вирусов гриппа в Казахстане в эпидемические сезоны 2009 – 2013 гг. // Мат-лы науч.-практич. конференции «Профилактическая медицина: вчера, сегодня, завтра». – Омск: 2013. - С. 57-59.
- 7 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.
- 8 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.
- 9 Hoffmann E, Stech J, Guan Y et. al .Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. // Arch Virol. - 2001. - № 146 (12). - P. 2275-89.
- 10 Reed L, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints // Amer. J. Hyg. - 1938.- Vol. 27.- P.493.
- 11 Douwdal W.A., Kendal A., Noble G.R. Influenza virus //Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infection. – Washington: 1979. - P. 585-609.
- 12 Amino D. Method for the quantitative estimation of N-acetylneuraminic acid and their application to hidrolysates of sialomucoids // Biochtm. - 1961. - Vol. 81. - P. 384-392.

**Т.И. ГЛЕБОВА¹, Н.Г. КЛИВЛЕЕВА¹, М.Г. ШАМЕНОВА¹, Н.Т. САКТАГАНОВ¹,
Г.В. ЛУКМАНОВА¹, М.К. КАЛКОЖАЕВА¹, А.Ж. МУРЗАГАЛИЕВА², Г. ДОСАНКЫЗЫ³**

¹ ҚР БҒМ ҒК «Микробиология және вирусология институты» РМК Алматы қ, Қазақстан

² «Ақтөбе облысының денсаулық сақтау басқармасы» мемлекеттік мекемесінің шаруашылық жүргізу құқығындағы
«Облыстық клиникалық инфекциялық ауруханасы» мемлекеттік коммуналдық кәсіпорыны

³ ҚР ҰЭМ Тұтынушылардың құқықтарын Қорғау комитетінің «Ұлттық сараптама орталығы» шаруашылық жүргізу
құқығындағы РМК Қызылорда облысы бойынша

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫНЫҢ АРАЛ ӨңІРІНДЕГІ 2015 Ж. ЭПИДЕМИЯЛЫҚ МАУСЫМДАҒЫ ТҰМАУ ВИРУСТАРЫНЫҢ АЙНАЛЫМЫ

Түйін: 2015ж. қаңтар – наурыз айларында Ақтөбе және Қызылорда облыстарындағы емдік мекемелердегі, ЖРВИ, ринофаренгит және аденовирусты инфекциялармен науқастанған адамдардан 293 танау мұрын сынаması және 48 қан сарысуы жиналды.

Полимеразды тізбекті реакцияда А тұмау вирусының генетикалық материалы 12,6 % құраса, В тұмау вирусы 1,0 %. Тұрастын анықтауда 9,2 % сынамада А/Н3N2 тұмау вирусының РНҚ құрады, 2,7 % – А/Н1N1, сонымен қоса 0,7 % сынамада тұмау вирусының А(Н1N1+Н3N2) екі түрі бірдей анықталды. Биологиялық сынамаларды полимеразды тізбекті реакциясында, сонымен қоса қан сарысуын иммуноферментті талдау және гемагглютинин тежеу реакциясында скрининг жұмыстарын жүргізу нәтижелері мақалада көрсетіліп, Арал өңірінде тұмау вирустарының айналымында А/Н3N2, А/Н1N1 және В түрлері бар екендігін айғақтайды.

Мақалада ауру адамдардан А/Н1N1 тұмау вирусын MDCK клеткаларында және дамып келе жатқан тауық эмбриондарында бөліп алу туралы мәліметтер келтірілген.

Түйінді сөздер: тұмау вирусы, айналым, изолят, гемагглютинин, нейраминидаза

**T.I. GLEBOVA¹, N.G. KLIVLEEVA¹, M.G. SHAMENOVA¹, N.T. SAKTAGANOV¹,
G.V. LUKMANOVA¹, M.K. KALKOZHAEVA¹, A.ZH. MURZAGALIEVA², G. DOSANKYZY³**

¹ RSOE on the right of economic management "Institute of Microbiology and Virology", Committee of Science, Ministry of Education and Science, Republic of Kazakhstan, Kazakhstan, Almaty, biochem_vir@mail.ru

² State municipal enterprise "Regional Clinical Hospital of Infectious Diseases" on the right to run the state institution
"Department of Health Aktobe region"

³ Branch of RSOE on the right of economic management «National center of expertise Committee on Consumer Protection MHB
PK Ministry of National Security of Kazakhstan Kyzylorda region

CIRCULATION OF INFLUENZA VIRUSES IN ARAL SEA REGION OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN IN THE 2015 EPIDEMIC SEASON

Resume: In January-March 2015, 293 nasopharyngeal swabs and 48 sera have been collected in medical institutions of Aktobe and Kyzylorda oblasts from the patients diagnosed with ARVI (acute respiratory viral infection), nasopharyngitis and adenoviral infection.

The genetic material of influenza A virus was detected by polymerase chain reaction in 12.6% of cases, influenza virus B – in 1.0%. At subtyping, RNA of the influenza A/H3N2 virus was detected in 9.2% of the samples, A/H1N1 – in 2.7%; in 0.7% of samples RNA was simultaneously detected for both subtypes of influenza A virus (H1N1+H3N2). The results obtained in the PCR screening of nasopharyngeal swabs, as well as serological data obtained in haemagglutination assay and immunoenzyme tests and presented in the paper indicate cocirculation of influenza A/H3N2, A/H1N1 and B viruses on the territory of the Aral Sea region.

The paper presents data on the isolation of influenza A/H1N1 virus from the patients in the MDCK cell culture and developing chicken embryos.

Keywords: influenza virus circulation, isolate, hemagglutinin, neuraminidase