

УДК 576.616.858.921.75.095.5:578.085

Н. А. Попова¹, наук. співроб., **Ю. А. Бощенко**¹, канд. мед. наук,
Т. В. Гудзенко², канд. біол. наук, доц.

¹ Український НД протичумний інститут,
вул. Церковна, 2/2, Одеса, 65003 Україна

² Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова,
кафедра мікробіології і вірусології,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна

ОСОБЛИВОСТІ ПЕРСИСТУВАННЯ БАГАТОКОМПОНЕНТНИХ СУМШЕЙ ВІРУСУ ГРИПУ А В КУЛЬТУРІ КЛІТИН MDCK, СУПЕРІНФІКОВАНИХ ГЕТЕРОЛОГІЧНИМИ ШТАМАМИ ВІРУСУ ГРИПУ А

Показано спосіб формування персистентної інфекції вірусом грипу А в перещеплюваній культурі епітеліальних клітин собаки MDCK за умов суперінфікування гетерологічним штамом вірусу грипу А. Процес персистування має періодичний хвильовий характер динаміки накопичування вірусу, зміни інфекційності та антигенної структури популяції. Вірус грипу, що був першим вхідним, не впливає на процес формування персистентної системи при суперінфікуванні гетерологічним вірусом, система стабілізується відповідно до типу вірусу, що був введений останнім.

Ключові слова: віруси грипу А, персистентні системи, суперінфікування.

Міжпопуляційні взаємовідносини збудник—хазяїн у міжепідемічному періоді в поєднанні з впливом на вірусну популяцію умов зовнішнього середовища обумовлюють вибір епідемічного штаму, домінуючого у наступному підйомі захворюваності грипом [1]. При зміні домінуючого варіанту в процесі мікроеволюції є проміжний етап «свободи вибору», коли у гетерогенній популяції всі її частини присутні в приблизно однаковій кількості [2]. Процес персистування вірусу грипу в людській популяції призводить до різкого зростання ступеня його різноманітності [1, 3]. Етап «свободи вибору» має певне значення для вибору напрямку процесу мікроеволюції. В поєднанні з колективним імунітетом він є відповідальним за вибір штаму, що буде етіологічним чинником наступних епідемій.

З 1977 року в південному регіоні України циркуляція вірусу грипу А характеризувалась одночасною присутністю в епіпроцесі вірусів А/Н1N1 і А/Н2N3 [5, 6, 7]. Це створює умови для суперінфікування новим серотипом вірусу грипу А. Інший бік проблеми постає при рішенні питань про доцільність щеплення живими вакцинами з урахуванням їхнього впливу на циркулюючі вірусні популяції [4].

Дослідження гострої інфекції різних вірусів грипу А і В у культурі клітин провадилось досить регулярно [8], так само як і хроніч-

них (персистентних) моносистем різних штамів вірусу грипу А [9, 10] або С [11]. У роботах з персистуючими популяціями вірусів грипу А була показана можливість розподілу персистуючої популяції на її елементи [10, 11], але тривале вивчення персистуючої популяції вірусів грипу в змішаних системах з суперінфікуванням гетерологічними вірусами грипу А досі не провадилось.

В зв'язку з цим актуальним є вивчення особливостей персистування сумішей серотипів вірусу грипу А при суперінфікуванні їх гетерологічним штамом того ж серотипу вірусу в умовах відсутності селективного впливу зовнішнього середовища, а також істотних змін інших діючих факторів мікроеволюції.

Метою даної роботи було з'ясування напрямку домінування серотипів вірусу грипу А при введенні нового інфекційного вірусу до сформованої багатокомпонентної персистуючої системи в культурі клітин, що знаходиться в стані динамічної рівноваги (суперінфекція).

Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження були еталонні штами вірусу грипу H1N1 (H0N1) — А/WSN/33, /PR-8/34; H1N1 — А/FM-1/47, А/Прага/1/83; H2N2 — А/Сінгапур/1/57; H3N2 — А/Гонконг/1/68, А/Вікторія/35/72, А/Порт Чалмерс/1/73, А/Техас/1/77, А/Філіпіни/2/82, які отримані з музею ВНДІ грипу. Вони використовувались у вигляді алантоїсних вірусоміщуючих рідин і підтримувалися шляхом серійних пасажів у курячих ембріонах.

Багатокомпонентні персистентні системи створювали шляхом зараження сформованого моношару культури клітин MDCK еталонними вірусами і їхніми сумішами в рівних кількостях: А/PR-8/34 (H1N1), А/Сінгапур/1/57 (H2N2), А/Гонконг/1/68 (H3N2). До стабільних систем, що вже мали 2—3 регулярних підйоми інфекційного титру персистуючих вірусів, вводили відмінний по антигенному складу серотип вірусу грипу А. Гетерологічне суперінфікування системи провадили на спаді інфекційного титру, при найбільшому ступені різноманітності персистуючої популяції. Інфікуюча доза вірусу грипу не перевищувала 1 ЕІД₅₀ кожного компоненту суміші на 1 клітину. Для визначення поверхневих антигенів вірусів грипу А використовували реакцію гальмування гемаглютинації (РГГА) та реакцію інгібування нейрамінідазної активності (РІНА). Ступінь різноманітності (і) персистуючої популяції визначався за Одумом [2].

Результати досліджень та їх обговорення

Для суперінфікування вірусом А/Сінгапур/1/57 підбирали персистентні системи довгострокового існування, що були раніше інфіковані сумішшю вірусів грипу А/ PR-8/34 та А/Гонконг/1/68. Система-реципієнт, що на момент суперінфікування існувала 371 день та пройшла 47 пасажів, знаходилася на спаді інфекційної активності та ви-

ділення вірусу, мала значний ступінь різноманітності персистуючої популяції ($i = 3,1953$), в якій були присутні представники майже всіх серопідтипів вірусу грипу А.

Після суперінфікування вірусом грипу А/Сінгапур/1/57 у системі почалося характерне для формування персистентної системи падіння інфекційних титрів до $3,0 \lg \text{ЕІД}_{50}$. Титр вірусу, що був введений останнім, також падав. Але згодом на позитивних піках інфекційності (+пік) титри підіймались до початкових значень вірусу грипу А/Сінгапур/1/57.

В цілому формування нової системи проходило за тим самим типом, що і в попередніх. Після початкового періоду дестабілізації почалися хвильові процеси підйому та спаду інфекційних титрів („+” та „-” піки) персистуючого вірусу з характерними змінами ступеня різноманітності, що показано у таблиці 1. Для цього процесу характерним є зменшення ступеня різноманітності на „+” — піках ($i = 1,2702$) та „-” — піках ($i = 1,2359$) інфекційності. В міжпикові періоди ступінь різноманітності підвищується до $i = 3,0006$.

За порівняння циклів прояву інфекційності виявлено коефіцієнт кореляції середнього ступеня ($0,3542$), що підтверджує думку про наявність певної залежності між ступенем різноманітності серопідтипів вірусу грипу А в персистентній системі і періодом циклу коливання інфекційності.

Таблиця 1

| Період циклу коливання інфекційності | Кількість циклів | Середні значення ступеня різноманітності |
|--------------------------------------|------------------|--|
| А – підвищення інфекційності | 14 | 2,9277* ⁺ |
| В – „+” пік інфекційності | 14 | 1,2702* ⁺ |
| С – зниження інфекційності | 15 | 3,0006* ⁺ |
| Д – „-” пік інфекційності | 15 | 1,2359* ⁺ |

Ступінь різноманітності серопідтипів вірусу грипу А в періоди зміни інфекційності в персистентній системі MDCK + (А/PR-8/34 + А/Гонконг/1/68) 371, що була суперінфікована А/Сінгапур/1/57

Примітка: * — різниця ступеня різноманітності серопідтипів вірусу грипу А у персистуючої популяції в А і В, В і С, С і Д, А і Д періодах зміни інфекційності вірогідна, $P < 0,001$;

⁺ — різниця вірогідна при порівнянні ступеня різноманітності серопідтипів вірусу грипу А у персистуючої популяції в А, В, С і Д періодах зміни інфекційності, $P < 0,001$

В таблиці 2 показано характер виділення штамів-аналогів основних вірусів, що приймали участь у формуванні персистентної системи. З моносистеми, що не була суперінфікована, штам-аналог вірусу грипу А/Сінгапур/1/57 виділявся в кількості до 20,11%. Із другої, третьої та четвертої систем, що утримували інші персистуючі серопідтипи, штам-аналог А/Сінгапур/1/57 виділявся в менших кількостях (17,19%, 13,32% та 12,50% відповідно). Виділення цього штаму (як самого по собі, так і у складі варіантів, що не типувалися) відмічалось протягом усього терміну спостереження в міжпікові періоди.

Таблиця 2

| Системи з вхідним персистуванням | Суперінфікування | Виділено штамів-аналогів, % | | |
|---|------------------|-----------------------------|----------------|-----------------------|
| | | А/Сінгапур/1/57 (H2N2) | А/PR/34 (H1N1) | А/Гонконг/1/68 (H3N2) |
| 1. Моносистема А/Сінгапур/1/57 (H2N2) | – | 20,11 | 4,97 | 5,68 |
| 2. А/PR-8/34 (H1N1) | А/Сінгапур/1/57 | 17,19 | 7,66 | 6,07 |
| 3. А/Гонконг/1/68 (H3N2) | А/Сінгапур/1/57 | 13,32 | 4,57 | 9,14 |
| 4. А/PR-8/34 + А/Гонконг/1/68 (H1N1 + H3N2) | А/Сінгапур/1/57 | 12,50 | 7,16 | 8,59 |

Виділення штамів-аналогів вірусу А/Сінгапур/1/57 з аналогічної моносистеми та систем, суперінфікованих цим вірусом

Вхідні для системи реципієнта віруси у всіх трьох випадках не мали великого значення в подальшому розвитку персистенції. Вони лише давали незначне підвищення кількості виділення аналогічних їм варіантів.

Слід відмітити, що як результат поділу персистуючої популяції з другої, третьої та четвертої систем постійно виділявся представник серопідтипу H1N1– штам-аналог вірусу грипу А/Прага/1/83 в дуже близьких кількостях (8,59%; 7,23% і 7,16% відповідно).

У всіх трьох системах спостерігався одноманітний характер виділення варіантів, що не типуються та перехресно типуються зі зміною у районі третього інфекційного піку, та з наступним (починаючи з п'ятого – шостого піків) превалюванням тих варіантів, які типуються перехресно.

Таким чином, проведене нами дослідження показало наявність деяких спільних характеристик формування та розвитку персистуючих систем, що були суперінфіковані.

Усі досліджені персистентні системи, що були суперінфіковані вірусом грипу А/Сінгапур/1/57, мали: подібний характер становлення та формування персистенції; прояв хвильового процесу; зміни антигенного складу на піках та спадах інфекційних титрів; прояв антигенного

складу в міжпікові періоди; перехрест у вилученні варіантів, що не типуються та перехресно типуються, з наступним превалюванням їх під час п'ятого – шостого піків інфекційних титрів.

Отримані результати відкривають можливість подальшого вивчення процесу персистенції вірусів грипу як одного з вірогідних механізмів збереження цього вірусу в популяції людини.

Висновки

1. У випадку суперінфікування стабільних тривало існуючих персистуючих систем гетерологічним для них вірусом А/Сінгапур/1/57 (H2N2) формування і становлення систем є характерним для вірусу, введеного останнім, і є подібним до такого у відповідній моносистемі.

2. Основною ознакою формування нової персистуючої системи при суперінфікуванні є інший спосіб виділення вхідного вірусу, більш розтягнутий період, протягом якого відбувається зміна рівня виділення антигенних варіантів, що перехресно типуються, у порівнянні з тими, що не типуються, і більш швидка стабілізація персистуючої системи.

3. Персистенція призводить до розподілу популяції на складові частини з виділенням мінорних компонентів.

Література

1. *Беляков В. Д., Голубев Д. Б., Зуев В. А.* Антигенная гетерогенность популяции вирусов гриппа А человека и ее роль в эпидемическом процессе // Вестник АМН СССР. — 1983. — № 5. — С. 23—28.
2. *Шмальгаузен И. И.* Факторы эволюции. — М.: Наука, 1968. — 675 с.
3. *Амвросьева Т. В., Иткин З. Б., Скляренов С. И.* Синтез вирусспецифических белков при смешанной инфекции, вызванной различными штаммами вируса гриппа А и В // Вопр. вирусол. — 1983. — № 4. — С. 90—96.
4. *Петров Н. А., Киселев О. И., Гринбаум Е. Б., Лузянина Т. Я., Полежаев Ф. И., Василенко С. К.* Возможность циркуляции вакцинных штаммов вируса гриппа в биосфере // Докл. АН СССР. — 1990. — Т. 315. — С. 725—728.
5. *Anon.* Acute respiratory infections: the forgotten pandemic. Communique from the International conference on Acute Respiratory Infections, held in Canberra, Australia, 7–10 July 1997 // Int. J. Tuberc. Lung. Dis. — 1998. — V. 2, № 1. — P. 2—4.
6. *Безброж И. М., Скрипченко Г. С., Крыжановский Л. К.* Эпидемическое значение штаммов вируса гриппа, выделенных на Юге Украины в 1987—1988 гг. / Вирусы и вирусные заболевания. Вып. 19. — К.: Здоров'я, 1991. — С. 8—11.
7. *Христофоров Ю. П., Фучижі И. С., Закусило В. Н., Карица Н. А., Попова Е. В.* Антигенная структура штаммов вируса гриппа А, выделенных от больных в 1983—1984 г. / Гострі респ. інф. — К.: Здоров'я, 1986. — С. 64—66.
8. *Амвросьева Т. В., Иткин З. Б., Скляренов С. И.* Синтез вирусспецифических белков при смешанной инфекции, вызванной различными штаммами вируса гриппа А и В // Вопр. вирусол. — 1983. — № 4. — С. 90—96.
9. *Вялушкина С. Д.* Хроническая инфекция культур клеток животных, вызванная вирусом гриппа А0/WSN: Автореф. дис... канд. мед. наук. — М., 1970. — 43 с.
10. *Голубев Д. Б.* Характеристика персистентной гриппозной инфекции / Экология вирус. — Баку: БМИ, 1976. — С. 172—173.
11. *Marschall M., Helten A., Hechtfisher A., Zach A., Banaschewski C., Hell W., Meier Ewert H.* The ORF, regulated synthesis, and persistence-specific variation of influenza C viral NS1 protein // Virology. — 1999. — V. 253, № 2. — P. 208—218.

Н. А. Попова, Ю. А. Бощенко, Т. В. Гудзенко

Украинский НИ противочумный институт,
ул. Церковная, 2/2, Одесса, 65003, Украина

Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова,
кафедра микробиологии и вирусологии,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина

**ОСОБЕННОСТИ ПЕРСИСТИРОВАНИЯ МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ
СМЕСЕЙ ВИРУСА ГРИППА А В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК МДСК,
СУПЕРИНФИЦИРОВАННЫХ ГЕТЕРОЛОГИЧНЫМИ ШТАММАМИ
ВИРУСА ГРИППА А**

Резюме

Показан способ формирования персистентной инфекции вирусом гриппа А в культуре клеток МДСК при суперинфицировании гетерологичным штаммом вируса гриппа. Процесс персистирования носит периодичный колебательный характер динамики накопления ГА, изменения инфекционности и антигенной структуры популяции. Вирус гриппа, первоначально использованный для формирования системы-реципиента, не влияет на процесс формирования персистентной системы, при суперинфицировании гетерологичным вирусом система стабилизируется по его типу. Персистенция разделяет персистирующие популяции, которые при больших сроках существования приобретают очень близкий по антигенному составу вид.

Ключевые слова: вирус гриппа А, персистентные системы, суперинфицирование.

N. A. Popova, V. A. Boschenko, T. V. Gudzenko

The Ukrainian Anti-Plague S. I. Institute,
Tserkovnaya st., 2/2, Odessa, 65003, Ukraine

Odessa National I. I. Mechnikov University,
Department of Microbiology and Virusology,
Dvoryanskaya St., 2, Odessa, 65026, Ukraine

**MULTICOMPONENT A VIRUS INFLUENZA MIXTURE
PERSISTENCE IN MDCK CELL CULTURE, SUPERINFECTED BY
HETEROLOGICAL STRAINS OF A VIRUS INFLUENZA**

Summary

The mode of A virus influenza persistence forming and stabilization in MDCK cell culture in case of superinfection by heterological serotype of A virus influenza is shown. The process has periodical character of HA/infectivity/antigen structure dynamics, which was very much alike either in case of mono-infection or in case of superinfection by the same A virus influenza serotype. The initial infecting influenza virus of recipient-system doesn't influence the process, the persistent infection forming has the mode of superinfectant. The persistence divides the persisting population, which has very alike antigenic mode on long-lasting terms for all serotypes of human A viruses influenza.

Key words: A virus influenza, persistent systems, superinfection.