

АНТИГЕННЫЕ СВОЙСТВА ИЗОЛЯТА КОРОНАВИРУСА SARS-CoV-2/HUMAN/RUS/NSK-FRCFTM-1/2020, ВЫДЕЛЕННОГО ОТ ПАЦИЕНТА В НОВОСИБИРСКЕ

А.А. Чепурнов, К.А. Шаршов, Е.И. Казачинская, Ю.В. Кононова, Е.А. Казачкова, О.П. Хрипко, К.С. Юрченко, А.Ю. Алексеев, М.И. Воевода, А.М. Шестопалов

Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия

Antigenic properties of SARS-CoV-2/human/RUS/Nsk-FRCFTM-1/2020 coronavirus isolate from a patient in Novosibirsk

A.A. Chepurnov, K.A. Sharshov, E.I. Kazachinskaya, Yu.V. Kononova, E.A. Kazachkova, O.P. Khripko, K.S. Yurchenko, A.Yu. Alekseev, M.I. Voevoda, A.M. Shestopalov

Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

Резюме

Цель: изоляция коронавируса SARS-CoV-2 из образцов носоглоточных мазков, положительных на наличие РНК SARS-CoV-2, получение инактивированного цельновирионного антигена и изучение его антигенных свойств.

Материалы и методы: изоляцию вируса проводили на культуре клеток Vero из вирусосодержащего образца клинического материала (мазок из носоглотки). Эффективность репликации вируса SARS-CoV-2 на культуре клеток оценивали по динамике появления цитопатического действия и наличию вирусной РНК при анализе культуральной жидкости методом обратной транскрипции – полимеразной цепной реакции. Очистку, концентрацию и инактивацию вирусного препарата проводили по стандартной методике. Степень чистоты очищенного препарата и профиль вирусных белков определяли методом электрофореза в 10% полиакриламидном геле с добавлением додецилсульфата натрия. Наличие и специфичность вирусных белков выявляли с помощью сывороток крови реконвалесцентов с диагнозом «COVID-19» методами иммуноферментного анализа и иммуноблоттинга.

Результаты: из вирусосодержащего клинического образца был выделен изолят SARS-CoV-2/human/RUS/Nsk-FRCFTM-1/2020 и получен очищенный, концентрированный, инактивированный цельновирионный антиген, содержащий три структурных белка – гликопротеин S (примерно 200 кДа), нуклеопротеин N (48 кДа) и матриксный M (20-25 кДа), выявляемые антителами сывороток крови реконвалесцентов с диагнозом COVID-19.

Заключение: показана возможность изоляции коронавируса SARS-CoV-2 на культуре клеток Vero. В очищенном вирусном препарате, инактивированном в лизирующем растворе, сохраняется антигенная специфичность трех структурных вирусных белков (S, N, и M), выявляемых антителами сывороток крови реконвалесцентов с диагнозом COVID-19. Инактивированный цельновирионный антиген изолята SARS-CoV-2/human/RUS/Nsk-FRCFTM-1/2020 может быть использован для изучения антигенных иммуномодулирующих свойств

Abstract

Objective: isolation of coronavirus SARS-CoV-2 from clinical sample of patient with COVID-19 in Novosibirsk; obtaining a purified and inactivated viral antigen and study of its antigenic properties. **Materials and methods:** virus isolation was carried out in Vero cell culture from nasopharyngeal swab positive on SARS-CoV-2 RNA. The efficiency of SARS-CoV-2 replication in cell culture was assessed on the appearance of cytopathic effect (CPE) and the presence of viral RNA in cultural medium with reverse transcription – polymerase chain reaction (RT-PCR). Purification, concentration and inactivation of the viral preparation were carried out according to standard methods. The purity of the purified preparation and the profile of viral proteins were determined by electrophoresis in 10% polyacrylamide gel (PAG) with the addition of sodium dodecyl sulfate (SDS). The presence and specificity of viral proteins were detected using COVID-19 convalescent's sera with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunoblotting. **Results:** SARS-CoV-2/human/RUS/Nsk-FRCFTM-1/2020 isolate was obtained after passage on Vero cells from a virus-containing clinical sample. A purified, concentrated, inactivated, whole-virion antigen was obtained. It contains three structural proteins: glycoprotein S (approximately 200 kDa), nucleoprotein N (48 kDa), and matrix protein M (20-25 kDa). All viral proteins were detected with serum antibodies of COVID-19 convalescents.

Conclusion: SARS-CoV-2 coronavirus can be isolated in Vero cell culture. The antigenic specificity of the three structural viral proteins (S, N, and M) is preserved in the purified inactivated viral preparation. The inactivated whole-virion antigen of SARS-CoV-2/human/RUS/Nsk-FRCFTM-1/2020 isolate can be used to study the antigenic immunomodulating properties of viral proteins, to obtain immune sera of laboratory animals, and also as a component of test systems for the detection of specific antibodies with ELISA and immunoblotting.

вирусных белков, получения иммунных сывороток лабораторных животных, а также в качестве компонента тест-систем для выявления специфических антител методом ИФА и иммуноблоттинга.

Ключевые слова: коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома 2 типа (SARS-CoV-2), коронавирусная инфекция 2019 (COVID-19), культура клеток Vero, вирусные белки.

Введение

Коронавирусы (*Coronaviridae*) — самое многочисленное семейство вирусов порядка *Nidovirales*. Семейство *Coronaviridae* включает в себя два подсемейства — *Letovirinae* и *Orthocoronavirinae*. В первом представлен единственный род Альфалетовирус (*Alphaletovirus*), в состав второго входят четыре рода — Альфакоронавирусы (*Alphacoronavirus*), Бетакоронавирусы (*Betacoronavirus*), Гаммакоронавирусы (*Gammacoronavirus*) и Дельтакоронавирусы (*Deltacoronavirus*) [1]. Вирионы коронавирусов имеют псевдосферическую форму диаметром 80–120 нм, содержат липидную оболочку, на которой в электронно-микроскопических фотографиях хорошо различимы пепломеры, состоящие из тримеров спайкового белка S. По форме эти образования напоминают корону, благодаря чему семейство получило свое название. Также в состав оболочки входят мембранный белок M и небольшое количество белка оболочки E [2]. Геном коронавирусов представлен (+)РНК размером 27–32 тыс. нуклеотидов, находящейся в составе вириона в комплексе с белком нуклеопротеином N. Вирусная РНК кодирует структурные (S, M, E, N), неструктурные (16 белков репликативно-транскрипционного комплекса) и регуляторные белки (5–10 в зависимости от вида коронавируса) [2, 3]. Коронавирусы распространены повсеместно и имеют широкий круг хозяев среди млекопитающих и птиц, вызывая у восприимчивых животных разнообразные по тяжести и клиническим проявлениям заболевания респираторного тракта, гастроэнтериты, гепатиты и поражения ЦНС [2]. У млекопитающих встречаются коронавирусы всех четырех родов, у птиц — только Гамма- и Дельтакоронавирусы [1].

Коронавирус SARS-CoV-2 (первоначальное название 2019-nCoV — 2019-novel coronavirus) был установлен в качестве этиологического агента вспышки пневмонии в декабре 2019 г. в г. Ухань (КНР). Вирус эффективно передавался от человека человеку (основное число репродукции R_0 1,4–6,5, среднее 2,2), что привело к развитию эпидемии [4]. Вызываемое им заболевание получило официальное название «новая коронавирусная инфекция 2019» (coronavirus disease 2019, COVID-19). Вследствие высокой контагиозности и эффективной передачи

Key words: severe acute respiratory syndrome type 2 coronavirus (SARS-CoV-2), coronavirus infection 2019 (COVID-19), Vero cell culture, viral proteins.

SARS-CoV-2 в человеческой популяции, а также неготовности многих стран к проведению противоэпидемических мероприятий произошла глобализация эпидемии, что дало основание ВОЗ официально объявить 11 марта 2020 г. начало пандемии COVID-19 [5]. Сложившаяся ситуация поставила вопрос о необходимости изучения нового вируса, его биологических и патогенных свойств, филогении, а также антигенных и иммуномодулирующих свойств вирусных белков. В этой связи для решения фундаментальных и прикладных задач необходимо получить актуальные изоляты коронавируса SARS-CoV-2.

Цель исследования — выделение изолята коронавируса SARS-CoV-2, циркулирующего в г. Новосибирске в период с апреля по июнь 2020 г., получение инактивированного и очищенного антигена и изучение его антигенных свойств при взаимодействии с сыворотками крови переболевших COVID-19.

Материалы и методы

Культуры клеток

В работе использовалась перевиваемая культура клеток Vero (почка африканской зеленой марышки) из собственной коллекции Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины (ФИЦ ФТМ) СО РАН. Клетки культивировали на питательной среде Игла MEM с L-глутамином (Биолот, Россия) с добавлением 1% Antibiotic Antimycotic Solution (SIGMA Life Science, Израиль) и 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (Carpicorn Scientific, ФРГ). Изоляцию вируса SARS-CoV-2 из образца мазка из носоглотки, позитивного на наличие вирусной РНК (аликвота транспортной среды, в которой находился зонд после взятия мазка) проводили по методике, описанной Park et al. [6]. Эффективность репликации вируса в культуре клеток оценивали по наличию цитопатического действия (ЦПД) и вирусной РНК методом ОТ-ПЦР. Выделение РНК проводили с использованием набора «РеалБест Экстракция 100» (АО Вектор-Бест, Россия) согласно инструкции производителя. Наличие РНК SARS-CoV-2 определяли с использованием набора «РеалБест РНК SARS-CoV-2» (АО Вектор-Бест, Россия) согласно инструкции производителя.

Для получения препаративных количеств изолята SARS-CoV-2 проводили заражение клеточного монослоя с использованием культуральных флаконов T75. После проявления тотального ЦПД материал собирали и низкоскоростным центрифугированием отделяли клетки от вирусосодержащей культуральной жидкости (ВКЖ). Клетки ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) и разрушали добавлением детергента IGEPAL® CA-630 (Merck KGaA, ФРГ) с последующим встряхиванием на вихревом смесителе и повторном низкоскоростном центрифугировании. Очистку и концентрирование вирусного препарата проводили по методике, описанной ранее [7]. Очищенный препарат вируса инактивировали (в соотношении 1:2) в лизирующем растворе (состав на объем 2 мл): 0,5 мл 1M Tris-HCl с pH 6,8; 10% раствор додецилсульфата натрия (SDS) – 0,8 мл; глицерин – 0,2 мл; меркаптоэтанол – 0,2 мл; 0,4% Bromphenol Blue Na-sulf – 0,1 мл. Степень чистоты очищенного препарата и профиль вирусных белков определяли методом электрофореза в 10% полиакриламидном геле (ПААГ) с добавлением SDS согласно методике, описанной Разумовым и др. [9]. Наличие и специфичность вирусных белков выявляли с помощью сывороток крови реконвалесцентов с диагнозом «COVID-19» методами иммуноферментного анализа (ИФА) и иммуноблоттинга. Постановку ИФА и иммуноблоттинга проводили по методикам, описанным ранее [9, 10]. Перед использованием сыворотки инактивировали прогреванием при 56° С в течение 30 мин.

Клинический материал

Для изоляции вируса был использован позитивный на наличие вирусной РНК образец мазка

из носоглотки, полученный из лаборатории по диагностике COVID-19 при ФИЦ ФТМ СО РАН. Для определения наличия и специфичности вирусных белков использовали сыворотки крови реконвалесцентов с диагнозом «COVID-19» (пациенты 1 и 2, перенесли заболевание в апреле 2020 г.), донора с диагнозом «Внебольничная пневмония» (пациент 3, РНК SARS-CoV-2 не обнаружена, заболевание в марте 2020 г.), донора с диагнозом «Хронический гайморит в стадии обострения» (пациент 4, заболевание в апреле 2020 г.) и клинически здорового донора (пациент 5, сыворотка от 2017 г.). Разрешение на использование клинического материала было получено от Этического комитета ФИЦ ФТМ (протокол №17 от 17.06.2020г.).

Результаты и обсуждение

После заражения монослоя клеток Vero вирус-содержащим клиническим материалом на 4-е сутки наблюдалось характерное ЦПД (рис. 1), в соскобе монослоя и культуральной жидкости была обнаружена РНК SARS-CoV-2.

После проведения двух последовательных пассажей время появления ЦПД сократилось до 3 суток, что согласуется с результатами, полученными ранее Park et al. [6]. Выделенный изолят получил название SARS-CoV-2/human/RUS/Nsk-FRCFTM-1/2020. В настоящее время проводится определение нуклеотидной последовательности участков вирусного генома.

На рисунке 2 представлен электрофорез инактивированного очищенного препарата изолята SARS-CoV-2/human/RUS/Nsk-FRCFTM-1/2020.

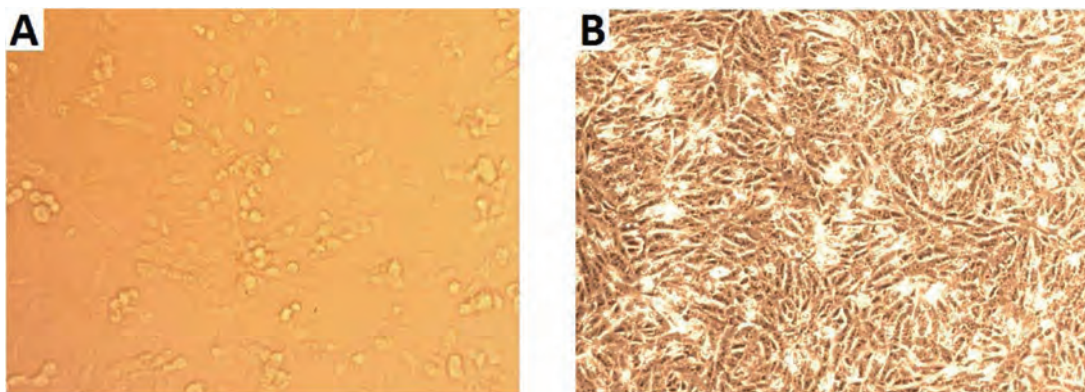


Рис. 1. Проявление ЦПД: А – изолят SARS-CoV-2/human/RUS/Nsk-FRCFTM-1/2020 на клетках Vero на 3-и сутки после заражения (3-й пассаж); В – контроль клеток Vero

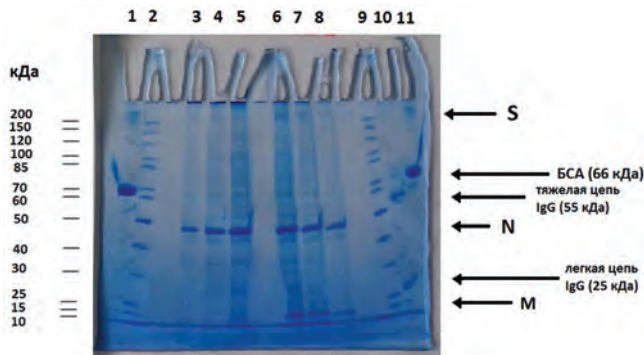


Рис. 2. Электрофореграмма инактивированного препарата изолята SARS-CoV-2/human/RUS/Nsk-FRCFTM-1/2020, очищенного из лизата инфицированных клеток Vero: 1, 11 — бычий сывороточный альбумин (БСА) с концентрацией 5 мг/мл и 10 мг/мл соответственно; 3, 4, 5 — вирусный препарат после прогревания (93 °С, 5 мин) 10, 20 и 40 мкл соответственно; 6, 7, 8 — вирусный препарат без прогревания, 40, 20 и 10 мкл соответственно; 2, 9 — белковые маркеры молекулярной массы (Thermo Scientific, США); 10 — очищенный препарат моноклональных антител 5Н6, специфичных к вирусу Западного Нила (дополнительный маркер 55 и 25 кДа на уровне тяжелой и легкой цепи IgG соответственно) [10]

Можно видеть, что в полученном препарате присутствуют три структурных белка — гликопротеин S (спайк) на уровне выше 200 кДа, нуклеопротеин N — 48 кДа и матриксный M — 20–25 кДа. Отсутствие белка M в прогретом образце согласуется с данными Sturman, впервые обнаружившим это явление на примере мышиноного коронавируса A59 [11]. Наши данные также подтверждают, что для визуализации матриксного белка не следует проводить прогревание вирусного препарата. Кроме того, в непрогретом вирусном препарате более четко виден бэнд белка S на уровне чуть выше 200 кДа. Мажорными вирусными белками на электрофореграмме проявляются белки N и M, что также согласуется с литературными данными как для коронавирусов животных [12], так и для коронавируса SARS-CoV, возбудителя тяжелого острого респираторного синдрома [13]. Профиль вирусных белков полученного нами препарата совпадает по молекулярной массе с данными Gao et al. для нового коронавируса SARS-CoV-2 — 200 кДа для белка S, 50 кДа для нуклеопротеина N и 20 кДа для мембранного белка M [14].

Методом иммуноблоттинга с сыворотками крови реконвалесцентов по COVID-19 и доноров с другими диагнозами определяли наличие и специфичность белков SARS-CoV-2 (рис. 3).

Антителами сыворотки крови пациента 1 (реконвалесцент по COVID-19) в иммуноблоттинге при отсутствии взаимодействия с белками лизата неинфицированных клеток Vero четко выявляются вирусные белки — на уровне 100 кДа (воз-

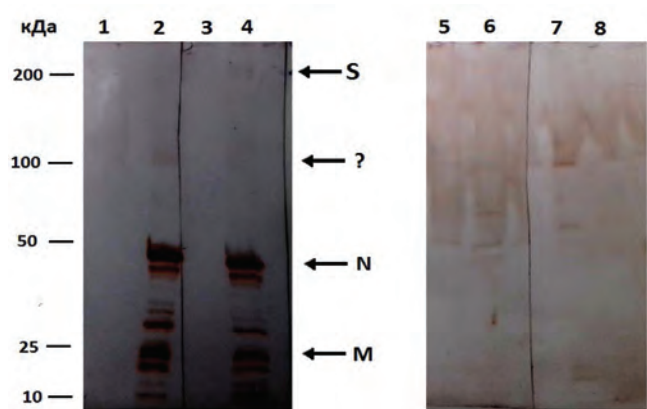


Рис. 3. Иммуноблоттинг белков изолята SARS-CoV-2/human/RUS/Nsk-FRCFTM-1/2020 с антителами сывороток крови: 1, 3, 5, 7 — лизат клеток Vero; 2, 4, 6, 8 — очищенный инактивированный вирусный препарат; 1, 2 — обработаны сывороткой крови пациента 1 в разведении 1/500; 3, 4 — обработаны сывороткой крови пациента 2 в разведении 1/500; 5, 6 — обработаны сывороткой крови пациента 4 в разведении 1/500; 7, 8 — обработаны сывороткой крови пациента 3 в разведении 1/500

можно, часть белка S), нуклеопротеин N (48 кДа) и матриксный M (20-25 кДа). В сыворотке крови пациента 2 (реконвалесцент по COVID-19), кроме того, присутствуют и антитела, специфичные к белку S и выявляющие его на уровне чуть выше 200 кДа. Наличие других бэндов (между белками N и M), выявляемых антителами в вирусном препарате, можно объяснить наличием в препарате неструктурных белков и/или неполных структурных белков (например, С-конечного домена белка S на уровне 12,5 кДа), подвергшихся воздействию клеточных протеаз, как показано Kuo et al. [15]. Выявление антител к нуклеопротеину у реконвалесцентов по COVID-19 согласуется с ранними данными Liu et al. — антитела, генерируемые против этого высоко иммуногенного и обильно экспрессируемого во время инфекции белка, особенно часто выявлялись у пациентов, инфицированных SARS-CoV во время вспышки 2003 г. [16].

Сыворотка крови пациента 3, перенесшего в марте 2020 г. внебольничную пневмонию, слабо взаимодействует с вирусными белками — на уровне 100 и 70 кДа (возможно, это части гликопротеина S), а также с бэндами на уровне между 20 и 10 кДа, при этом в лизате неинфицированных клеток таких белков не наблюдается. Сыворотка крови пациента 4 с вирусными белками не взаимодействует.

Методом ИФА была подтверждена специфичность взаимодействия очищенного антигена изолята SARS-CoV-2/human/RUS/Nsk-FRCFTM-1/2020 с антителами сывороток крови реконвалесцентов по COVID-19 (рис. 4).

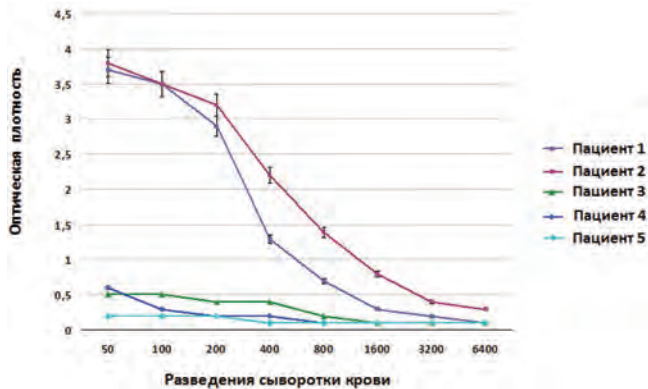


Рис. 4. Титрование сывороток крови на очищенном антигене SARS-CoV-2/human/RUS/Nsk-FRCFTM-1/2020

Как следует из рисунка 4, при использовании антигена в разведении 1/200 титры сывороток крови соответствуют разведениям 1/3200 для Пациента 1 и более 1/6400 для Пациента 2. Сыворотки Пациентов 3 и 4 показали примерно одинаковые результаты взаимодействия с антигеном, начиная с разведения 1/50 (оптическая плотность 0,6–0,5), что может быть обусловлено либо низким титром антител, специфичных к SARS-CoV-2, либо неспецифической перекрестной активностью с белками клеток Vero. Дополнительный контроль (сыворотка клинически здорового донора от 2017 г., пациент 5) был отрицательным в ИФА как в реакции с вирусным антигеном, так и с лизатом клеток Vero.

Коронавирусы, патогенные для человека, относятся к родам Альфакоронавирусов (HCoV-229E, HCoV-NL63) и Бетакоронавирусов (HCoV-OC43, HCoV-NKU-1, SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2). С момента изоляции первого коронавируса HCoV-229E в 1967 г. и до 2002 г. считалось, что в человеческой популяции циркулируют четыре коронавируса – HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 и HCoV-NKU-1, ассоциированные с сезонными заболеваниями респираторного тракта. Как правило, вызываемые ими заболевания протекают в легкой или среднетяжелой форме и не представляют серьезной эпидемиологической угрозы [17].

После появления высокопатогенных для человека коронавирусов SARS-CoV (возбудитель тяжелого острого респираторного синдрома, severe acute respiratory syndrome, SARS) в 2002 г. и MERS-CoV (возбудитель ближневосточного респираторного синдрома, Middle East respiratory syndrome, MERS) в 2012 г. встал вопрос о необходимости детального изучения новых коронавирусов. За это время были получены данные об их происхождении, эволюции, экологии, патогенных свойствах, а также о патогенезе, эпидемиологии и методах лечения вызываемых ими заболеваний [18]. Однако

появление нового коронавируса SARS-CoV-2 и его глобальное распространение, переросшее в пандемию, наглядно показало, что накопленные знания о природе патогенных для человека коронавирусов являются на сегодняшний день недостаточными.

По данным филогенетического анализа, коронавирус SARS-CoV-2 наиболее близок (уровень гомологии 79,5%) своему предшественнику SARS-CoV, что позволило классифицировать их в подрод *Sarbecovirus* рода Бетакоронавирусов [1]. В этой связи естественно предполагать, что некоторые характеристики вирусных белков, в частности, антигенные свойства, будут схожими. Как было сказано выше, наблюдаемый профиль вирусных белков изолята SARS-CoV-2/human/RUS/Nsk-FRCFTM-1/2020 демонстрирует сходство с электрофореграммой вакцинного штамма CN2 коронавируса SARS-CoV-2, описанного Gao et al. [14]. Белок S является основным антигеном коронавирусов [2] и отвечает за взаимодействие вируса с клетками посредством клеточных рецепторов. Белок S коронавируса SARS-CoV-2, как и его предшественника SARS-CoV, использует в качестве рецептора ангиотензин превращающий фермент 2 ACE2 (Angiotensin-converting Enzyme 2). С изменением антигенных свойств S белка связано преодоление межвидового барьера при попадании вируса в человеческую популяцию от животных [19]. В препарате изолята SARS-CoV-2/human/RUS/Nsk-FRCFTM-1/2020 белок S имеет молекулярную массу немного больше 200 кДа. Белок N нашего изолята и штамма CN2 имеют почти одинаковую молекулярную массу (см. рис. 2). Разница в молекулярной массе вирусных белков S и M изолята SARS-CoV-2/human/RUS/Nsk-FRCFTM-1/2020 и вакцинного штамма CN2 может быть обусловлена мутациями в генах соответствующих белков, накопившихся вследствие локальной микроэволюции вируса, как было ранее показано на примере вируса Эбола [8]. Белок оболочки E коронавирусов является минорным по соотношению с другими структурными белками, имеет небольшую молекулярную массу (8,4–12 кДа) [2] и не визуализируется на электрофореграммах вирусных препаратов SARS-CoV и SARS-CoV-2 [14, 20].

Как было показано ранее Qiu et al., белки шипа (спайка) S и нуклеокапсида N коронавируса SARS-CoV являются наиболее иммуногенными из структурных вирусных белков и именно к ним формируется гуморальный иммунный ответ [21]. Схожие результаты были получены To et al. при анализе сывороток крови пациентов с диагнозом COVID-19 [22], что также согласуется с нашими результатами (см. рис. 3). По данным Qu et al., наличие антител к белку S может коррелировать с тяжестью заболевания – антитела к этому белку

в высоких титрах выявлялись у пациентов с более тяжелым течением [23]. Сыворотка пациента 2, госпитализированного по поводу левосторонней пневмонии средней степени тяжести, реагировала с белком S в иммуноблоттинге, в отличие от сыворотки пациента 1, коронавирусная инфекция у которого протекала по типу фарингита. Возможно, что антитела к белку S в низких титрах также присутствуют в сыворотке этого пациента.

Структурный белок M коронавируса SARS-CoV также вызывает выработку специфических антител у заболевших, что было показано Guan et al. при анализе сывороток крови пациентов с SARS методом иммуноблоттинга при использовании как инактивированного вирусного препарата, так и рекомбинантного белка M, полученного в эукариотической системе экспрессии [20]. Вполне возможно, что антитела к этому белку вырабатываются и у пациентов с COVID-19. Наши результаты показывают, что сыворотки крови реконвалесцентов по COVID-19 содержат антитела, реагирующие с белком M (20–25 кДа), выявляемые в иммуноблоттинге (см. рис. 3). Согласно данным Guan et al., антитела к белку E в сыворотках крови пациентов с SARS в иммуноблоттинге не обнаруживались при использовании в качестве антигена инактивированного вируса и рекомбинантного белка [20]. В используемых нами сыворотках крови людей, переболевших COVID-19, содержатся антитела к вирусным белкам с массой 10–15 кДа (см. рис. 4), что может соответствовать белку E. Однако, учитывая данные литературы, необходимы дополнительные исследования как по составу белков вирусного препарата, так и по репертуару антител у переболевших COVID-19. В сыворотках крови реконвалесцентов по COVID-19 также присутствуют антитела к неструктурным или регуляторным белкам SARS-CoV-2 с молекулярной массой в диапазонах 10–25 кДа и 25–50 кДа (см. рис. 4). Qiu et al. было показано, что в сыворотках переболевших SARS присутствуют антитела к трем регуляторным белкам, выявляемым в иммуноблоттинге с использованием их рекомбинантных аналогов [21], что может быть аналогично и для переболевших COVID-19.

В настоящее время пока неизвестно, каким образом структурные белки коронавируса SARS-CoV-2 взаимодействуют с иммунной системой людей, перенесших заболевания, вызванные «сезонными» коронавирусами HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 и HCoV-NKU-1. При изучении перекрестного иммунитета у переболевших SARS Chan et al. было показано, что в части сывороток выявлялись антитела к антигенам коронавирусов HCoV-229E, HCoV-OC43 и HCoV-NL63 методом непрямой иммунофлуоресценции. Было обнаружено, что титры антител к этим вирусам менялись во

времени с течением заболевания. При этом у лиц, перенесших заболевания, вызванные HCoV-229E и HCoV-OC43, антитела, специфичные к антигенам SARS-CoV, обнаружены не были [24]. Остается неизвестным, будут ли такие антитела обладать нейтрализующими свойствами при повторном инфицировании «сезонными» коронавирусами или будут способствовать усилению инфекции.

Заключение

Показана возможность изоляции на культуре клеток Vero коронавируса SARS-CoV-2, циркулирующего в настоящее время в человеческой популяции. В очищенном инактивированном вирусном препарате изолята SARS-CoV-2/human/RUS/Nsk-FRCFTM-1/2020 сохраняется антигенная специфичность трех структурных вирусных белков (S, N и M), выявляемых антителами сывороток крови реконвалесцентов с диагнозом COVID-19. Инактивированный цельновиральный антиген изолята SARS-CoV-2/human/RUS/Nsk-FRCFTM-1/2020 может быть использован для изучения антигенных и иммуномодулирующих свойств вирусных белков, получения иммунных сывороток лабораторных животных, а также в качестве компонента тест-систем для выявления специфичных антител методом ИФА и иммуноблоттинга. Необходимо дальнейшее изучение актуальных изолятов коронавируса SARS-CoV-2, циркулирующего в Российской Федерации.

Литература

1. Virus Taxonomy: 2019 Release. EC 51, Berlin, Germany, July 2019. [Электронный ресурс]. URL: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (дата обращения 10.06.2020).
2. Masters, P.S. The molecular biology of coronaviruses / P.S. Masters // Adv. Virus. Res. — 2006. — Vol. 66. — P. 193-292. — doi: 10.1016/S0065-3527(06)66005-3.
3. Accessory proteins of SARS-CoV and other coronaviruses / D.X. Liu, T.S. Fung, K.K. Chong, et al. // Antiviral Res. — 2014. — Vol. 109. — P. 97-109. — doi: 10.1016/j.antiviral.2014.06.013.
4. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak — an update on the status / Y.R. Guo, Q.D. Cao, Z.S. Hong, et al. // Mil. Med. Res. — 2020. — Vol. 7. — N. 1. — P. 11. — doi: 10.1186/s40779-020-00240-0.
5. Вступительное слово Генерального директора ВОЗ на брифинге по COVID-19 для постоянных представителей — 12 марта 2020 г. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.who.int/ru/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-mission-briefing-on-covid-19---12-march-2020> (дата обращения 19.06.2020).
6. Virus Isolation from the First Patient with SARS-CoV-2 in Korea / W.B. Park, N.J. Kwon, S.J. Choi, et al. // J. Korean Med. Sci. — 2020 — Vol. 35. — N. 7. — e84. — doi: 10.3346/jkms.2020.35.e84.
7. Получение очищенного вируса Эбола / А.А. Чепурнов [и др.] // Вопросы вирусологии. — 1994. — Т. 39, № 6. — С. 254–257.
8. Разумов, И.А. Антигенные отличия дикого и адаптированного к морским свинкам штаммов вируса Эбола /

И.А. Разумов, Е.И. Казачинская, А.А. Чепурнов // Вопросы вирусологии. — 2010. — Т. 55. — № 6. — С. 35-38.

9. Взаимодействие фрагментов оболочечного белка вируса Зика с антителами сывороток людей, переболевших флавивирусными инфекциями / Д.В. Шаньшин [и др.] // Инфекция и иммунитет. — 2020. — Т. 10, № 1. — С. 73–82. — doi: 10.15789/2220-7619-AIO-805.

10. Казачинская, Е.И. Штамм гибридных клеток животного *Mus musculus* L. 5Н6 — продуцент моноклональных антител для выявления гликопротеина Е вируса Западного Нила; моноклональные антитела 5Н6, продуцируемые указанным штаммом гибридных клеток и иммуноферментный набор для выявления гликопротеина вируса Западного Нила с использованием указанных моноклональных антител / Е.И. Казачинская, И.А. Разумов, В.Б. Локтев // Патент на изобретение RU 2595429 C1, 27.08.2016. Заявка № 2015115059/10 от 21.04.2015.

11. Sturman L.S. I. Structural Proteins: Effects of Preparative Conditions on the Migration of Protein in Polyacrylamide Gels. / L.S. Sturman. // J. Virol. — 1977. — Vol. 77. — N. 2. — P. 637-649. — doi: 10.1016/0042-6822(77)90488-3.

12. Dea S. Identification and Location of the Structural Glycoproteins of a Tissue Culture-Adapted Turkey Enteric Coronavirus. / S. Dea, S. Garzon, P. Tijssen // Arch Virol. — 1989. — Vol. 106. — N. 3-4. — P. 221-237. doi: 10.1007/BF01313955.

13. A complete sequence and comparative analysis of a SARS-associated virus (Isolate BJ01) / E.D. Qin, Q.Y. Zhu, M. Yu, et al. // Chin. Sci. Bull. — 2003. — N. 48. — P. 941-948. doi: 10.1007/BF03184203.

14. Rapid Development of an Inactivated Vaccine Candidate for SARS-CoV-19 / Q. Gao, L. Bao, M. Haiyan, et al. // Science. — 2020. — eabc1932. — doi: 10.1126/science.abc1932

15. Kuo L. Analyses of Coronavirus Assembly Interactions With Interspecies Membrane and Nucleocapsid Protein Chimeras. / L. Kuo, K.R. Hurst-Hess, C.A. Koetzner, et al. // J. Virol. — 2016. — Vol. 90. — N. 9. — P. 4357-4368. — doi: 10.1128/JVI.03212-15.

16. Liu X. Profile of Antibodies to the Nucleocapsid Protein of the Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS)-associated Coronavirus in Probable SARS Patients. / X. Liu, Y. Shi, P. Li, et al. // Clin. Diagn. Lab. Immunol. — 2004. — Vol. 11. — N. 1. — P. 227-228. — doi: 10.1128/cdli.11.1.227-228.2004.

17. van der Hoek L. Human coronaviruses: what do they cause? / L. van der Hoek // Antivir. Ther. — 2007. — Vol. 12. — N. 4. — Pt. B. — P. 651-658.

18. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses / E. de Wit, N. van Doremalen, D. Falzarano, et al. // Nat. Rev. Microbiol. — 2016. — Vol. 14. — N. 8. P. 523-534. — doi: 10.1038/nrmicro.2016.81.

19. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor / M. Hoffmann, H. Kleine-Weber, S. Schroeder, et al. // Cell. — 2020. — Vol. 181. — N. 2. — P. 271-280. — e8. — doi: 10.1016/j.cell.2020.02.052.

20. Use of viral lysate antigen combined with recombinant protein in Western immunoblot assay as confirmatory test for serodiagnosis of severe acute respiratory syndrome / M. Guan, H.Y. Chen, P.H. Tan, et al. // Clin. Diagn. Lab. Immunol. — 2004 — Vol. 11. — N. 6. P. 1148–1153. — doi: 10.1128/CDLI.11.6.1148-1153.2004.

21. Antibody responses to individual proteins of SARS coronavirus and their neutralization activities / M. Qiu, Y. Shi, Z. Guo, et al. // Microbes Infect./Institut Pasteur. — 2005. — Vol. 7. — N. (5-6). — P. 882-889. — doi: 10.1016/j.micinf.2005.02.006.

22. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses

during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study / K.K. To, O.T. Tsang, W.S. Leung, et al. // Lancet Infect. Dis. — 2020. — Vol. 20. — N. 5. — P. 565-574. — doi: 10.1016/S1473-3099(20)30196-1.

23. Profile of IgG and IgM antibodies against severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) / J. Qu, C. Wu, X. Li, et al. // Clin. Infect. Dis. — 2020. — ciae489. — doi: 10.1093/cid/ciae489.

24. Serological responses in patients with severe acute respiratory syndrome coronavirus infection and cross-reactivity with human coronaviruses 229E, OC43, and NL63. / K.H. Chan, V.C. Cheng, P.C. Woo, et al. // Clin. Diagn. Lab. Immunol. — 2005. Vol. 12. — N. 11. — P. 1317-1321. — doi: 10.1128/CDLI.12.11.1317-1321.2005.

References

1. Virus Taxonomy: 2019 Release. EC 51, Berlin, Germany, July 2019. International website [Internet]. Available from: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (10.06.2020).

2. Masters, P.S. The molecular biology of coronaviruses / P.S. Masters // Adv. Virus. Res. — 2006. — Vol. 66. — P. 193-292. — doi: 10.1016/S0065-3527(06)66005-3.

3. Accessory proteins of SARS-CoV and other coronaviruses / D.X. Liu, T.S. Fung, K.K. Chong, et al. // Antiviral Res. — 2014. — Vol. 109. — P. 97-109. — doi: 10.1016/j.antiviral.2014.06.013.

4. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak — an update on the status / Y.R. Guo, Q.D. Cao, Z.S. Hong, et al. // Mil. Med. Res. — 2020. — Vol. 7. — N. 1. — P. 11. — doi: 10.1186/s40779-020-00240-0.

5. WHO Director-General's opening remarks at the Mission briefing on COVID-19 — 12 March 2020. International website [Internet]. URL: <https://www.who.int/ru/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-mission-briefing-on-covid-19---12-march-2020> (available 19.06.2020).

6. Virus Isolation from the First Patient with SARS-CoV-2 in Korea / W.B. Park, N.J. Kwon, S.J. Choi, et al. // J. Korean Med. Sci. — 2020 — Vol. 35. — N. 7. — e84. — doi: 10.3346/jkms.2020.35.e84.

7. Isolation of purified Ebola virus / A.A. Chepurinov, N.V. Merzlikin, E.I. Ryabchikova et al. // Vopr. Virusol. — 1994. — Vol. 39. — N. 6. — P. 254-257. [in Russian]

8. Razumov I.A. Antigenic differences in wild-type and guinea pig-adapted Ebola virus strains / I.A. Razumov, E.I. Kazachinskaja, A.A. Chepurinov // Vopr. Virusol. — 2010. — Vol. 55. — N. 6. — P. 35-38. [in Russian]

9. An interaction of Zika virus envelope fragments with serum antibodies derived from subjects after flavivirus infections / D.V. Shanshin, A.Yu. Bakulina, E.I. Kazachinskaja et al. // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet — 2020. — Vol. 10. — N. 1. — P. 73–82. — doi: 10.15789/2220-7619-AIO-805. [in Russian]

10. Kazachinskaja, E.I. Strain of hybrid animal cells *Mus musculus* L. 5H6 — producer of monoclonal antibodies for detecting glycoprotein E of West Nile virus, 5H6 monoclonal antibodies produced by said strain of hybrid cells, and immunoenzymometric kit for detecting glycoprotein E of West Nile virus using said monoclonal antibodies / E.I. Kazachinskaja, I.A. Razumov, V.B. Loktev // Patent RU 2595429 C1, 27.08.2016. Application № 2015115059/10 at 21.04.2015. [in Russian]

11. Sturman L.S. I. Structural Proteins: Effects of Preparative Conditions on the Migration of Protein in Polyacrylamide Gels. / L.S. Sturman. // J. Virol. — 1977. — Vol. 77. — N. 2. — P. 637-649. — doi: 10.1016/0042-6822(77)90488-3.

12. Dea S. Identification and Location of the Structural Glycoproteins of a Tissue Culture-Adapted Turkey Enteric Coro-

- navirus. / S. Dea, S. Garzon, P. Tijssen // Arch Virol. — 1989. — Vol. 106. — N. 3-4. — P. 221-237. doi: 10.1007/BF01313955.
13. A complete sequence and comparative analysis of a SARS-associated virus (Isolate BJ01) / E.D. Qin, Q.Y. Zhu, M. Yu, et al. // Chin. Sci. Bull. — 2003. — N. 48. — P. 941-948. doi: 10.1007/BF03184203.
14. Rapid Development of an Inactivated Vaccine Candidate for SARS-CoV-19 / Q. Gao, L. Bao, M. Haiyan, et al. // Science. — 2020. — eabc1932. — doi: 10.1126/science.abc1932
15. Kuo L. Analyses of Coronavirus Assembly Interactions With Interspecies Membrane and Nucleocapsid Protein Chimeras. / L. Kuo, K.R. Hurst-Hess, C.A. Koetzner, et al. // J. Virol. — 2016. — Vol. 90. — N. 9. — P. 4357-4368. — doi: 10.1128/JVI.03212-15.
16. Liu X. Profile of Antibodies to the Nucleocapsid Protein of the Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS)-associated Coronavirus in Probable SARS Patients. / X. Liu, Y. Shi, P. Li, et al. // Clin. Diagn. Lab. Immunol. — 2004. — Vol. 11. — N. 1. — P. 227-228. — doi: 10.1128/cdli.11.1.227-228.2004.
17. van der Hoek L. Human coronaviruses: what do they cause? / L. van der Hoek // Antivir. Ther. — 2007. — Vol. 12. — N. 4. — Pt. B. — P. 651-658.
18. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses / E. de Wit, N. van Doremalen, D. Falzarano, et al. // Nat. Rev. Microbiol. — 2016. — Vol. 14. — N. 8. P. 523-534. — doi: 10.1038/nrmicro.2016.81.
19. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TM-PRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor / M. Hoffmann, H. Kleine-Weber, S. Schroeder, et al. // Cell. — 2020. — Vol. 181. — N. 2. — P. 271-280. — e8. — doi: 10.1016/j.cell.2020.02.052.
20. Use of viral lysate antigen combined with recombinant protein in Western immunoblot assay as confirmatory test for serodiagnosis of severe acute respiratory syndrome / M. Guan, H.Y. Chen, P.H. Tan, et al. // Clin. Diagn. Lab. Immunol. — 2004 — Vol. 11. — N. 6. P. 1148–1153. — doi: 10.1128/CDLI.11.6.1148-1153.2004.
21. Antibody responses to individual proteins of SARS coronavirus and their neutralization activities / M. Qiu, Y. Shi, Z. Guo, et al. // Microbes Infect./Institut Pasteur. — 2005. — Vol. 7. — N. (5-6). — P. 882-889. — doi: 10.1016/j.micinf.2005.02.006.
22. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study / K.K. To, O.T. Tsang, W.S. Leung, et al. // Lancet Infect. Dis. — 2020. — Vol. 20. — N. 5. — P. 565-574. — doi: 10.1016/S1473-3099(20)30196-1.
23. Profile of IgG and IgM antibodies against severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) / J. Qu, C. Wu, X. Li, et al. // Clin. Infect. Dis. — 2020. — ciae489. — doi: 10.1093/cid/ciae489.
24. Serological responses in patients with severe acute respiratory syndrome coronavirus infection and cross-reactivity with human coronaviruses 229E, OC43, and NL63. / K.H. Chan, V.C. Cheng, P.C. Woo, et al. // Clin. Diagn. Lab. Immunol. — 2005. Vol. 12. — N. 11. — P. 1317-1321. — doi: 10.1128/CDLI.12.11.1317-1321.2005.

Авторский коллектив:

Чепурнов Александр Алексеевич — ведущий научный сотрудник отдела экспериментального моделирования и патогенеза инфекционных заболеваний Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины Сибирского отделения РАН, д.б.н., профессор; тел.: 8(383)335-94-05, e-mail: alexa.chepurnov@gmail.com

Шаршов Кирилл Александрович — заведующий лабораторией моделирования и мониторинга инфекционных процессов Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины Сибирского отделения РАН, к.б.н.; тел.: 8(383)335-94-05, e-mail: sharshov@yandex.ru

Казачинская Елена Ивановна — ведущий научный сотрудник отдела экспериментального моделирования и патогенеза инфекционных заболеваний Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины Сибирского отделения РАН, д.б.н.; тел.: 8(383)335-94-05, e-mail: lena.kazachinskaia@mail.ru

Кононова Юлия Владимировна — старший научный сотрудник отдела экспериментального моделирования и патогенеза инфекционных заболеваний Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины Сибирского отделения РАН, к.б.н.; тел.: 8(383)335-94-05, e-mail: yuliakononova07@yandex.ru

Казачкова Евгения Александровна — младший научный сотрудник лаборатории моделирования и мониторинга инфекционных процессов Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины Сибирского отделения РАН; тел.: 8(383)335-94-05, e-mail: evgesha_c@mail.ru

Хрипко Ольга Павловна — старший научный сотрудник отдела экспериментального моделирования и патогенеза инфекционных заболеваний Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины Сибирского отделения РАН, к.б.н.; тел.: 8(383)335-94-05, e-mail: khripkoolga@gmail.com;

Юрченко Ксения Сергеевна — старший научный сотрудник лаборатории моделирования и мониторинга инфекционных процессов Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины Сибирского отделения РАН, к.б.н.; тел.: 8(383)335-94-05, e-mail: xenia7yurchenko@gmail.com;

Алексеев Александр Юрьевич — заведующий лабораторией разработки и испытания фармакологических средств Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины Сибирского отделения РАН, к.б.н.; тел.: 8(383)335-94-05; e-mail: al-alexok@ngs.ru

Воевода Михаил Иванович — Врио директора Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины Сибирского отделения РАН, д.м.н., профессор, академик РАН; тел.: 8(383)333-65-37, e-mail: director@centercem.ru

Шестопалов Александр Михайлович — заведующий отделом экспериментального моделирования и патогенеза инфекционных заболеваний Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины Сибирского отделения РАН, д.б.н., профессор; тел.: 8(383)335-94-05, e-mail: shestopalov2@mail.ru