



## Вирусингибирующая активность комплекса антигенов условно-патогенных бактерий в отношении коронавируса SARS-CoV-2

Свитич О.А.<sup>1</sup>, Нагиева Ф.Г.<sup>1✉</sup>, Курбатова Е.А.<sup>1</sup>, Баркова Е.П.<sup>1</sup>, Харченко О.С.<sup>1</sup>, Строева А.Д.<sup>1</sup>, Пашков Е.А.<sup>1</sup>, Лисаков А.Н.<sup>1</sup>, Грачева А.В.<sup>1</sup>, Потапова М.Б.<sup>2</sup>, Файзулоев Е.Б.<sup>1</sup>, Зверев В.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;

<sup>2</sup>Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия

### Аннотация

**Введение.** Комплекс антигенов условно-патогенных бактерий (КАУПБ) обладает протективным эффектом в отношении вируса гриппа птиц, вируса герпеса 2-го типа и других вирусов, вызывающих острые респираторные вирусные заболевания. В связи с пандемией COVID-19 актуально выяснить, обладает ли КАУПБ протективным эффектом в отношении коронавируса SARS-CoV-2.

**Цель работы** — изучить *in vitro* вирусингибирующую активность КАУПБ в отношении лабораторного штамма коронавируса SARS-CoV-2 Dubrovka.

**Материалы и методы.** В работе использовали клеточную линию Vero CCL-81, мононуклеарные клетки периферической крови человека (МКПК), мышинные моноклональные антиидиотипические антитела, структурно имитирующие биологические эффекты интерферонов (ИФН) человека, лабораторный штамм вируса SARS-CoV-2 Dubrovka. Инфекционную активность вируса определяли двумя методами: титрованием вируса методом предельных разведений на клеточных культурах с оценкой результатов по цитопатическому действию и методом бляшкообразования. Реакция ингибирования вируса поставлена *in vitro* на клеточной культуре, чувствительной к вирусу SARS-CoV-2, с внесением в клеточную культуру смеси определённой дозы вируса к двукратным разведениям КАУПБ после предварительного 2-часового взаимодействия препарата с вирусом при 4°C. Вирусингибирующую активность КАУПБ в отношении SARS-CoV-2 определяли по показателям функциональной активности  $\alpha/\beta$ - и  $\gamma$ -рецепторов ИФН ( $P_{\text{ИФН}}$ ) на МКПК человека, индуцированных *in vitro* КАУПБ и смесью КАУПБ с определённой дозой вируса SARS-CoV-2. Уровень экспрессии  $P_{\text{ИФН}}$  оценивали в реакции непрямой мембранной иммунофлуоресценции.

**Результаты.** Для выявления ингибирующего белка SARS-CoV-2 поставлена реакция гемагглютинации с эритроцитами кур, мышей, морских свинок и человека. В лизате клеток Vero CCL-81, инфицированных SARS-CoV-2 Dubrovka, обнаружены максимальная гемагглютинирующая активность с эритроцитами морской свинки и низкие титры гемагглютинации в вирусосодержащей жидкости. В реакции ингибирования вируса на культуре клеток Vero CCL-81 КАУПБ ингибировал 10 доз SARS-CoV-2 Dubrovka с титром 1 : 32 со 100% защитой клеточной культуры в течение 8 сут (период наблюдения). КАУПБ индуцировал экспрессию  $P_{\text{ИФН}}-\alpha/\beta$  и  $\gamma$  на мембранах МКПК человека при культивировании *in vitro* и снижал экспрессию  $P_{\text{ИФН}}-\alpha/\beta$  и  $\gamma$  при предварительном взаимодействии с SARS-CoV-2 Dubrovka.

**Заключение.** На основе экспериментальных исследований, включающих реакцию ингибирования вируса на культуре клеток, чувствительных к SARS-CoV-2 Dubrovka, и в реакции непрямой мембранной иммунофлуоресценции с использованием для детекции моноклональных антиидиотипических антител, имитирующих ИФН-подобные свойства, продемонстрировано, что КАУПБ обладает иммуномодулирующей и вирусингибирующей активностью.

**Ключевые слова:** комплекс антигенов условно-патогенных бактерий, мононуклеарные клетки периферической крови человека, культивирование *in vitro*, коронавирус SARS-CoV-2, интерфероновые рецепторы, экспрессия рецепторов, реакция ингибции вируса, иммуномодулирующий эффект

**Этическое утверждение.** Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Научно-исследовательского института вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова (протокол № 1 от 24.01.2023).

**Источник финансирования.** Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2021-676 от 28.07.2021).

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Для цитирования:** Свитич О.А., Нагиева Ф.Г., Курбатова Е.А., Баркова Е.П., Харченко О.С., Строева А.Д., Пашков Е.А., Лисаков А.Н., Грачева А.В., Потапова М.Б., Файзулоев Е.Б., Зверев В.В. Вирусингибирующая ак-

тивность комплекса антигенов условно-патогенных бактерий в отношении коронавируса SARS-CoV-2. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(2):143–152.  
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-309> EDN: <https://www.elibrary.ru/malutz>

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-309>

## Virus-inhibitory activity of the antigen complex of opportunistic pathogenic bacteria against SARS-CoV-2

Oksana A. Svitich<sup>1</sup>, Firaya G. Nagieva<sup>1✉</sup>, Ekaterina A. Kurbatova<sup>1</sup>, Elena P. Barkova<sup>1</sup>, Olga S. Kharchenko<sup>1</sup>, Alexandra D. Stroeveva<sup>1</sup>, Evgeny A. Pashkov<sup>1</sup>, Aleksey N. Lisakov<sup>1</sup>, Anastasiya V. Gracheva<sup>1</sup>, Mariia B. Potapova<sup>2</sup>, Evgeny B. Faizuloev<sup>1</sup>, Vitaly V. Zverev<sup>1</sup>

<sup>1</sup>I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

### Abstract

**Introduction.** The antigen complex of opportunistic pathogenic bacteria (ACOPB) has a protective effect against avian influenza viruses, herpes virus type 2, and other viruses that cause acute respiratory viral infections. In the context of the COVID-19 pandemic, an important task is to find out whether ACOPB has a protective effect against SARS-CoV-2.

The **purpose** of the study was to evaluate *in vitro* the ACOPB virus-inhibitory activity against the Dubrovka laboratory strain of SARS-CoV-2.

**Materials and methods.** The study was performed using Vero cell line CCL-81, human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), mouse monoclonal anti-idiotypic antibodies structurally mimicking biological effects of human interferons (IFNs), the Dubrovka laboratory strain of SARS-CoV-2. The infectivity of the virus was assessed by two methods: by virus titration using cell cultures and the limiting dilution method when the results are assessed by a cytopathic effect; the second method was a plaque assay. The *in vitro* virus inhibition test was performed using the cell culture susceptible to SARS-CoV-2; the mixture containing a specific dose of the virus and a two-fold dilution of ACOPB was transferred to the cell culture after the ACOPB medication had interacted with the virus at 4°C for 2 hours. The ACOPB virus-inhibitory activity against SARS-CoV-2 was assessed by the functional activity of  $\alpha/\beta$  and  $\gamma$  IFN receptors ( $R_{IFN}$ ) in human PBMCs induced *in vitro* by ACOPB and the ACOPB mixture with the specific dose of SARS-CoV-2. The  $R_{IFN}$  expression level was measured by the indirect membrane immunofluorescence test.

**Results.** Hemagglutination assay using chicken, mouse, guinea pig, and human red blood cells was performed for detection of the SARS-CoV-2 inhibitory protein. The lysate of Vero CCL-81 cells infected with SARS-CoV-2 Dubrovka demonstrated the highest hemagglutination activity with guinea pig red blood cells and low titers of hemagglutination in the virus-containing fluid. The virus inhibition test in the Vero CCL-81 cell culture demonstrated that ACOPB inhibited 10 doses of SARS-CoV-2 Dubrovka with the titer 1 : 32, providing 100% protection of the cell culture for 8 days (the monitoring period). ACOPB induced  $\alpha/\beta$  and  $\gamma$   $R_{IFN}$  expression on membranes of human PBMCs in *in vitro* cultures and decreased  $R_{IFN}$   $\alpha/\beta$  and  $\gamma$  expression after its interaction with SARS-CoV-2 Dubrovka.

**Conclusion.** The experimental studies including the virus inhibition test in the cell culture susceptible to SARS-CoV-2 Dubrovka and the indirect membrane immunofluorescence assay using monoclonal anti-idiotypic antibodies mimicking IFN-like properties demonstrated that ACOPB had both an immunomodulatory and a virus-inhibitory effect.

**Keywords:** antigen complex of opportunistic pathogenic bacteria, human peripheral blood mononuclear cells, *in vitro* culture, SARS-CoV-2 coronavirus, interferon receptors, receptor expression, virus inhibition test, immunomodulatory effect

**Ethics approval.** The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera (protocol No. 1, January 24, 2023).

**Funding.** The study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Agreement No. 075-15-2021-676 of 28/7/2021).

**Conflict of interest.** The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

**For citation:** Svitich O.A., Nagieva F.G., Kurbatova E.A., Barkova E.P., Kharchenko O.S., Stroeveva A.D., Pashkov E.A., Lisakov A.N., Gracheva A.V., Potapova M.B., Faizuloev E.B., Zverev V.V. Virus-inhibitory activity of the antigen complex of opportunistic pathogenic bacteria against SARS-CoV-2. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2023;100(2):143–152.  
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-309> EDN: <https://www.elibrary.ru/malutz>

## Введение

В последние десятилетия достигнут значительный прорыв в исследованиях клеточных и молекулярных механизмов иммунитета. Пересмотрены ранее сложившиеся представления о роли врождённого иммунитета в реализации резистентности к широкому кругу патогенов и активации адаптивного иммунитета. Установлено, что одним из инструментов управления системой врождённого иммунитета могут быть некоторые микробные антигены (липополисахариды, пептидогликан, белковые антигены клеточной стенки и др.) [1, 2].

Активация TLR-опосредованных механизмов врождённого иммунитета через лиганды Toll-подобных рецепторов приводит к защите организма от различного рода патогенов. Комплекс антигенов условно-патогенных бактерий (КАУПБ) используется для активации врождённого иммунитета и защиты от вирусных инфекций. Ранее была дана экспериментальная оценка протективного эффекта препарата КАУПБ в отношении вируса гриппа птиц серотипа H5N2, вируса герпеса 2-го типа [3–5]. КАУПБ применяется для профилактики и лечения острых респираторных заболеваний, хронических воспалительных заболеваний верхних и нижних дыхательных путей, бронхиальной астмы, атопического дерматита, поллиноза, латексной аллергии и др. В клинических исследованиях показано, что иммунотерапия пациентов при использовании КАУПБ на фоне базисной терапии приводила к коррекции фагоцитарной активности мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК), повышению синтеза интерферонов (ИФН)- $\alpha$  и - $\gamma$  и др. [6–9].

Коронавирусная инфекция, вызвавшая в 2019 г. пандемию, связанная с вирусом SARS-CoV-2. Тяжёлое течение и летальные исходы при данной инфекции связаны с поражением лёгких, сердечно-сосудистой системы, почек, центральной нервной системы. В связи с этим создаются новые противовирусные как терапевтические, так и профилактические лекарственные средства [10–12].

**Целью** работы являлось изучение *in vitro* вирусингибирующего действия КАУПБ в отношении штамма коронавируса SARS-CoV-2 Dubrovka.

## Материалы и методы

Работа выполнена с использованием штаммов коллекции центра коллективного пользования НИИВС им. И.И. Мечникова при финансовой поддержке Минобрнауки России (Соглашение № 075-15-2021-676 от 28.07.2021).

КАУПБ — препарат нового поколения, несущий набор антигенов — активаторов экспрессии рецепторов на клетках системы врождённого иммунитета (Toll-подобных рецепторах 1/2, 4, 5, 2/6, 9), что обуславливает её эффективность против широкого круга патогенов и аллергии. При конструировании

препарата использованы антигенные компоненты, извлечённые из *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*.

### Клеточные культуры

В работе использовали перевиваемую клеточную линию Vero CCL-81 почек зелёных мартышек из American Type Culture Collection. Клетки культивировали в питательной среде DMEM/F12 («PanEco») с 5% эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС; «HyClone») и 40 мкг/мл гентамицина.

МКПК получали от доноров с 1-й группой крови и положительным резусом. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов.

Моноклональные антиидиотипические антитела к рецепторам ИФН ( $P_{\text{ИФН}}$ )- $\alpha$  и - $\gamma$  получали путём введения мышинных лимфоцитарных гибридом, продуцирующих антитела к «внутренним образом» человеческих ИФН- $\alpha/\beta$  и - $\gamma$ , сингенным мышам линии BALB/c с последующим получением и очисткой асцитических жидкостей, содержащих указанные антитела [14, 15].

### Коронавирус SARS-CoV-2

Вариант вируса SARS-CoV-2 Dubrovka получили путём изоляции вируса в культуре клеток Vero из клинического образца. С этой целью использовали мазок из ротоглотки пациентки в возрасте 61 года, в котором методом полимеразной цепной реакции с обратной транскриптазой в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ) выявлено высокое содержание РНК вируса SARS-CoV-2 (8,82 Ig ТЦД<sub>50</sub>/мл). Впоследствии у пациентки развилось заболевание с клиническими признаками COVID-19: кашель, одышка, фебрильная температура, потеря вкуса и обоняния. При компьютерной томографии органов грудной полости выявлено характерное уплотнение лёгочной ткани с общей площадью поражения с обеих сторон 50% и поставлен диагноз: COVID-19, вирус идентифицирован (U07.1, МКБ-10); внебольничная пневмония. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентки.

Клиническим материалом заразили культуру клеток Vero и инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение 5 сут до появления признаков цитопатического действия (ЦПД), проявляющегося в округлении клеток, после чего проводили следующий пассаж. С целью идентификации вируса материал, полученный на разных пассажных уровнях, анализировали на наличие РНК SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР-РВ с праймерами к гену *N* на 2, 7, 14 и 21-м пассажах в культуральной жидкости выявлена РНК коронавируса SARS-CoV-2 в высокой концентрации (9,0; 9,7; 9,2 и 9,9 Ig копий РНК/мл соответственно). Таксономическая принадлежность изолята к виду SARS-

CoV-2 (клада GH) была установлена путём секвенирования гена *S* (идентификационный номер GenBank MW514307) [13].

Инфекционную активность вируса определяли двумя методами: методом предельных разведений на клеточных культурах, выращенных на 48-луночных планшетах («Thermo Scientific/Nunc»), по ЦПД и методом бляшкообразования (БОЕ<sub>50</sub>) [18] в нашей модификации. Оба метода определения инфекционной активности вирусов, вызывающих ЦПД в культуре клеток в виде округления клеток, требуют подтверждения другим методом оценки инфекционности вируса для дифференциации ЦПД от апоптоза клеток.

Десятикратные разведения вирусосодержащей жидкости (ВСЖ) готовили с разведения 10<sup>-1</sup> до 10<sup>-8</sup> с использованием поддерживающей питательной среды DMEM с 2% ЭТС. Из 48-луночных планшетов с монослоем клеток Vero CCL-81 удаляли ростовую среду, монослой клеток однократно промывали раствором Хэнкса. Затем каждое разведение ВСЖ вносили по 0,2 мл в 6 лунок планшета, в контрольные лунки — по 0,2 поддерживающей питательной среды. Контакт ВСЖ с клетками продолжался в инкубаторе в течение 1 ч при 36,5°C и 5% CO<sub>2</sub>. После завершения контакта в каждую лунку планшета, включая лунки с контрольными клетками, вносили по 0,8 или 0,9 мл поддерживающей среды (среда DMEM без сыворотки).

Результаты титрования учитывали на 4–5-е сутки с начала заражения клеточной культуры. За титр вируса принимали максимальное разведение вируса, вызывающее ЦПД в 50% инфицированных клеточных культур при отсутствии деструкции клеток в неинфицированных клеточных культурах.

Для подготовки к исследованию методом бляшкообразования клеточную культуру Vero CCL-81 выращивали на 12-луночных планшетах в ростовой питательной среде. После формирования сплошного монослоя клеток через 24–48 ч питательную среду удаляли, клеточный монослой промывали раствором Хэнкса. Десятикратные разведения ВСЖ по 0,1 или 0,2 мл вносили в центр 3 лунок. Незаражённой оставляли 1 лунку для контроля клеточной культуры. Контакт вируса с клетками продолжался в инкубаторе 1,5 ч при 36,5°C и 5% CO<sub>2</sub>. Затем из всех лунок, включая контрольную, удаляли остатки жидкости и вносили туда по 2 мл агарового покрытия, состоящего из 0,5% агара Noble и питательной среды DMEM с 4% ЭТС. После застывания агарового покрытия при комнатной температуре планшеты культивировали в инкубаторе при 36,5°C и 5% CO<sub>2</sub>. На 5-е сутки культивирования на агаровое покрытие наносили по 1 мл 10% раствора трихлоруксусной кислоты или 3% раствора параформальдегида и культивировали в инкубаторе в течение 1 ч. После фиксации клеток агаровое

покрытие удаляли встряхиванием, монослой клеток промывали проточной водой, панель высушивали и в лунки вносили по 1 мл 0,1% раствора генцианвиолета и оставляли на 2–3 мин. Затем панель промывали проточной водой и подсушивали. В каждой лунке подсчитывали количество бляшек. Устанавливали среднее число бляшек из 3 лунок для каждого разведения вируса. Титр вируса выражали в логарифмах БОЕ<sub>50</sub>/0,1мл, вычисленной по формуле:

$$X = A \times B/0,2,$$

где *X* — титр в БОЕ в 1 мл; *A* — среднее количество бляшек; *B* — разведение вируса; 0,2 — объём инокулята (в мл), внесённого в 1 лунку.

#### Реакция гемагглютинации

Под термином «гемагглютинация» подразумевается способность некоторых вирусов избирательно вызывать агглютинацию эритроцитов отдельных видов млекопитающих и птиц. Вирусы проявляют свои гемагглютинирующие свойства избирательно в отношении эритроцитов определённых видов животных. Для одних вирусов круг этих животных широк, для других — весьма ограничен. Имеется определённая зависимость между инфекционными и гемагглютинирующими свойствами вируса. Не безразличным для результатов реакции гемагглютинации (РГА) является источник вируса. Гемагглютинирующие свойства вируса проявляются не во всяком вирусосодержащем материале. Например, вирус гриппа с помощью РГА может быть обнаружен как в смыве из носоглотки больного человека (нерегулярно), так и в эмбриональных тканевых культурах, а также во взвеси инфицированных мышечных лёгких [16].

РГА применяли для оценки наличия или отсутствия вирусного гемагглютинина в инфицированных SARS-CoV-2 клетках и в ВСЖ. Для этой цели использовали четыре вида эритроцитов: куриные, мышинные, морской свинки и человека. В основе реакции лежала агглютинация эритроцитов вирусным гемагглютинирующим антигеном. Постановка РГА проводилась в круглодонных 96-луночных планшетах («SPL Life Sciences, Ltd.») и состояла из двукратного разведения антигенов в физиологическом растворе в объёме 100 мкл и внесения в каждое разведение равного объёма 0,25% взвеси эритроцитов. Контакт образцов с эритроцитами осуществляли при 4°C в течение 1,0–1,5 ч до оседания эритроцитов в контрольных лунках и затем учитывали РГА. За гемагглютинирующий титр вируса принимали наибольшее разведение антигена, при котором ещё наблюдается агглютинация.

#### Реакция ингибции репликации вируса

Многие виды микроорганизмов продуцируют биологические соединения, активные в отношении вирусов. Так, спорообразующие бактерии *Bacillus pumilus* при культивировании на оптимальной пи-

тательной среде NEW продуцируют биологически активные соединения, обладающие антивирусной активностью в отношении энтеровирусов (полиовируса 1-го типа, Коксаки В (1–6), ЕСНО-3 и ЕСНО-6 [17]).

Для препарата КАУПБ выбрана схема эксперимента по выявлению внеклеточного вирулицидного действия препарата *in vitro* в отношении SARS-CoV-2. Предварительно было установлено отсутствие вирулицидного действия КАУПБ *in vitro* в отношении 100 доз (2,5 lg БОЕ<sub>50</sub>/0,2 мл SARS-CoV-2 при титре вируса 4,55 lg БОЕ<sub>50</sub>/0,2 мл).

Реакция ингибции репликации вируса (ИРВ) поставлена на двух 24-луночных планшетах с монослоем клеток Vero CCL-81. На одном планшете поставлена реакция ИРВ, на другом — протитрован SARS-CoV-2. В среде ДМЕМ без сыворотки приготовлены двукратные разведения препарата КАУПБ (разведения с 1 : 2 до 1 : 32). В каждое разведение добавлен SARS-CoV-2, равный по объёму 10 дозам (3,5 lg ТЦД<sub>50</sub>/0,2 мл или 3,55 lg БОЕ<sub>50</sub>/0,2 мл при титре вируса 4,5 lg ТЦД<sub>50</sub>/0,2 мл и 4,55 БОЕ<sub>50</sub>/0,2 мл). Контакт препарата КАУПБ с вирусом проходил при 4°C в течение 2 ч с периодическим встряхиванием ингредиентов. По завершении контакта каждое разведение смеси препарата с вирусом вносили по 0,2 мл на 24-луночный планшет, однократно промытый раствором Хэнкса. Каждое разведение смеси вносили в 4 лунки планшета, в 2 лунках поставлен контроль клеток, и в других 2 лунках — контроль 10 доз вируса. Контакт вируса с клетками проводили в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub> в течение 1,5 ч, затем во все лунки 24-луночных планшетов вносили по 0,8 мл поддерживающей среды ДМЕМ и продолжали культивирование. После установления литической деструкции клеток в лунках с контролем 10 доз вируса (как правило, на 2–3-и сутки с начала инфицирования), учитывали результаты реакции ИРВ. За титр реакции ИРВ принимали то максимальное разведение препарата, при котором наблюдается 100% защита клеток от SARS-CoV-2.

#### Непрямой мембранный иммунофлуоресцентный анализ

МКПК выделяли из венозной гепаринизированной (20 ЕД/мл) крови человека в градиенте плотности фиколла 1,077 г/см<sup>3</sup> («PanEco») путём центрифугирования в течение 25 мин при 1500 об/мин. Отбирали клеточную фракцию и трижды промывали её охлаждённым фосфатно-буферным раствором, осадок клеток ресуспендировали в питательной среде ДМЕМ/F12 с 2% ЭТС с таким расчётом, чтобы в лунке было не менее 1 млн лимфоцитов. Взвесь лимфоцитов по 1 мл распределяли в лунки 12-луночных планшетов.

За 2 ч до выделения лимфоцитов из венозной крови к 0,2 мл двукратных разведений КАУПБ вно-

сили равный объём 10 доз SARS-CoV-2 и оставляли на контакт при 4°C с периодическим встряхиванием смеси.

В лунки 12-луночных планшетов с лимфоцитами вносили по 0,1 мл 3 разведения (1 : 10, 1 : 20 и 1 : 40) КАУПБ и по 0,1 мл смеси КАУПБ с SARS-CoV-2. После внесения препаратов из лунок извлекали пробы образцов лимфоцитов в разные временные интервалы, начиная с 1 ч, в объёме 5 мкл (3 образца на каждый временной отрезок) и наносили равномерно на предметные стёкла с окнами, образцы клеток высушивали при комнатной температуре в течение ночи. Затем образцы фиксировали дважды фильтрованным 3% параформальдегидом с 0,2% бычьим сывороточным альбумином в течение 1 ч при комнатной температуре. Фиксатор дважды промывали фосфатно-буферным раствором и проводили блокировку образцов 10% нормальной козлиной сывороткой в течение 1 ч. Далее на каждое окно с образцами препаратов наносили по 20 мкл мышинных моноклональных антиидеотипических антител для ИФН-α/β и -γ и инкубировали во влажной камере в течение 1 ч при 36,5°C в термостате. После завершения контакта с антителами и двукратной промывки и просушивания на образцы наносили антимишинный ФИТЦ-конъюгат в рабочем разведении («BioRad»). Инкубация — 1 ч во влажной камере. ФИТЦ-конъюгат перед использованием разводили в 0,1% растворе сапонина на растворе Хэнкса с 0,01 М HEPES-буфером. После завершения контакта препаратов с конъюгатом предметные стекла промывали дважды раствором Хэнкса и подсушивали.

Уровень экспрессии Р<sub>ИФН</sub>-α/β- и -γ на МКПК оценивали под люминесцентным микроскопом «Optica» (Италия) под масляной иммерсией с объективом 100 и окуляром 10 по процентному соотношению светящихся лимфоцитов на 200 анализируемых клеток (в повторах на каждый временной отрезок).

ВСЖ была обработана по E. Norrby [19]. К 100 мл ВСЖ добавляли 2 мл Твин-80, разведённого 1 : 10. Смесь встряхивали на льду в течение 5–10 мин. К смеси добавляли эфир в количестве, равном 1/2 объёма обрабатываемой смеси. Смесь встряхивали 15–20 мин, затем центрифугировали 20 мин при 3000 об/мин. После центрифугирования смесь расслоилась, мутноватую плёнку наверху аккуратно протыкали пипеткой, чтобы не взмутить, и отсасывали нижний слой. Раствор оставляли на 24 ч при комнатной температуре во флаконе с ватно-марлевой пробкой для испарения эфира. Затем проверяли гемагглютинирующий титр антигена, разливали по ампулам (1,0 мл) и сушили. Высушенный антиген хранится в холодильнике несколько лет без потери активности. В качестве контроля использовали культуральную жидкость из неинфицированных клеток, приготовленную по той же методике.

### Статистическая обработка данных

Статистическую значимость полученных данных определяли с помощью U-критерия Манна–Уитни. Разница считалась достоверной при уровне статистической значимости  $p \leq 0,05$ . Показатели достоверности рассчитывали с использованием программного обеспечения «GraphPad Prism 4» («Graph Red»).

### Требования к безопасности работ

Все работы с коронавирусом SARS-CoV-2 проводили в условиях, отвечающих требованиям безопасности работ с патогенными биологическими объектами 11-й группы патогенности. Сотрудники, работающие с вирусом, прошли инструктаж по технике безопасности и имеют действующее удостоверение о повышении квалификации по программе «Бактериология. Вирусология. Биологическая безопасность», выданное Российским противочумным институтом «Микроб» Роспотребнадзора.

### Результаты

На 1-м этапе работы исследовали наличие или отсутствие гемагглютинирующих свойств вируса SARS-CoV-2 Dubrovka. С этой целью в РГА было изучено проявление гемагглютинирующих свойств вируса в отношении эритроцитов куриных, мышинных, морской свинки и человека с использованием взвеси клеток Vero CCL-81, инфицированных SARS-CoV-2 Dubrovka, и ВСЖ с инфицированными клетками.

Представленные в **табл. 1** результаты четко демонстрируют наличие гемагглютинирующих свойств SARS-CoV-2 Dubrovka в инфицированных клетках и низкие титры в ВСЖ, возможно, в связи с действительно низкой концентрацией гемагглютина или из-за неспецифической маскировки этого феномена. Максимальная гемагглютинирующая активность проявляется в лизате инфицированных клеток с эритроцитами морских свинок.

Результаты РГА демонстрируют, что клеточные линии Vero CCL-81, инфицированные SARS-CoV-2

Dubrovka, содержат вирусный гемагглютинин — один из важных вирусных белков, являющихся мишенью для антивирусных препаратов.

Для постановки реакции ИПВ важно точно установить дозу SARS-CoV-2 Dubrovka, используемую для ИПВ антивирусным препаратом КАУПБ. Инфекционную дозу вируса определяли методом предельного разведения на клеточной культуре Vero CCL-81 и методом бляшкообразования на тех же клеточных культурах.

Титр вируса SARS-CoV-2 при оценке по ЦПД составил  $4,50 \lg \text{ТЦД}_{50}/0,2 \text{ мл}$ , по методу бляшкообразования —  $4,55 \text{ БОЕ}_{50}/0,2 \text{ мл}$ . Реакция ИПВ поставлена с 10 дозами вируса, титр вируса составил  $3,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/0,2 \text{ мл}$  или  $3,5 \lg \text{БОЕ}_{50}/0,2 \text{ мл}$  (**рисунк**).

КАУПБ при взаимодействии с 10 дозами вируса SARS-CoV-2 Dubrovka обладал вирусингибирующей активностью в разведении 1 : 32 со 100% защитой клеток на протяжении 8 сут культивирования (период наблюдения).

Для подтверждения вирусингибирующей активности КАУПБ в отношении SARS-CoV-2 Dubrovka были поставлены эксперименты по выявлению уровней экспрессии  $P_{\text{ИФН}}-\alpha/\beta$ - и  $-\gamma$  на мембранах МКПК человека. Параллельно с помощью данной методики выясняли генез протективной активности бактериальных антигенов, входящих в состав КАУПБ. В качестве высокоспецифичного маркера в данном эксперименте выступали мышинные моноклональные антиидиотипические антитела, имитирующие биологические свойства ИФН- $\alpha/\beta$  и  $-\gamma$  человека, т.е. антирецепторные антитела.

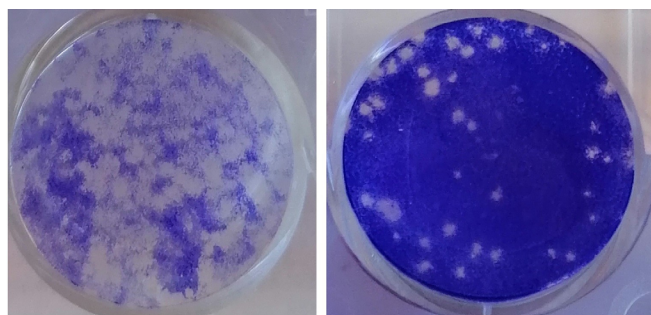
Предварительно нами было установлено, что при индукции МКПК *in vitro* КАУПБ экспрессия  $P_{\text{ИФН}}-\alpha/\beta$  и  $-\gamma$  более эффективно начинается с разведения препарата 1 : 10, или при концентрации 10 мкг препарата. В связи с этим было принято решение выяснить оптимальную дозу КАУПБ, индуцирующую *in vitro* максимальную экспрессию  $P_{\text{ИФН}}$  на мембранах МКПК.

**Таблица 1.** Гемагглютинирующая активность вируса SARS-CoV-2 Dubrovka

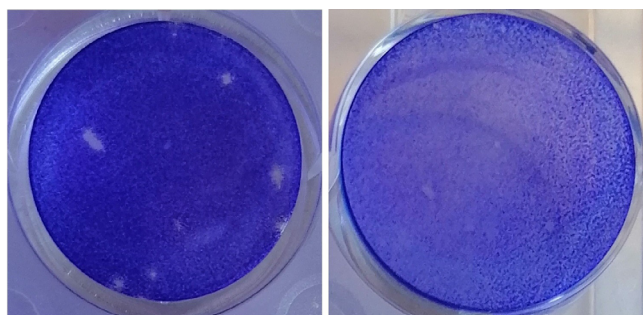
**Table 1.** Hemagglutinating activity of SARS-CoV-2 Dubrovka

Исследуемые образцы Studied specimens	Титр вируса в РГА с 0,25% взвесью эритроцитов Virus titer in HA with 0.25% suspension of red blood cells			
	куриных chicken	мышинных mouse	морской свинки guinea pig	человека human
Лизат инфицированных клеток Vero CCL-81 Lysate of infected Vero CCL-81 cells	1 : 64	1 : 16	> 1 : 256	1 : 32
ВСЖ с клеток Vero CCL-81 VCF from Vero CCL-81 cells	1 : 16	1 : 2	1 : 2	1 : 2
Неинфицированные клетки Vero CCL-81 Uninfected Vero CCL-81 cells	0	0	0	0
Контроль эритроцитов Red blood cell control	0	0	0	0

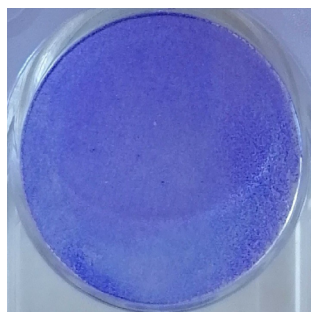




Vero CCL-81, SARS-CoV-2 Dubrovka,  $10^{-2}$       Vero CCL-81, SARS-CoV-2 Dubrovka,  $10^{-3}$



Vero CCL-81, SARS-CoV-2 Dubrovka,  $10^{-4}$       Vero CCL-81, SARS-CoV-2 Dubrovka,  $10^{-5}$



Vero CCL-81, KK

Бляшкообразование на монослое клеток Vero CCL-81, инфицированных коронавирусом SARS-CoV-2 Dubrovka.  
Plaque assay in the Vero CCL-81 cell monolayer infected with SARS-CoV-2 Dubrovka.

В табл. 2 отражены данные уровня экспрессии  $P_{\text{ИФН}}-\alpha/\beta$  на МКПК человека, индуцированной разными разведениями препарата, а также смесью КАУПБ с 10 дозами коронавируса SARS-CoV-2, предварительно взаимодействующих в течение 2 ч при 4°C до введения в культивируемые лимфоциты.

Анализ уровня экспрессии  $P_{\text{ИФН}}-\alpha/\beta$ , индуцированных на мембранах лимфоцитов КАУПБ, показывает (табл. 2), что более эффективная индукция всеми разведениями препарата начинается с 6 ч с момента индукции, достигает максимума к 24–30 ч и затем постепенно снижается. При этом все дозы препарата вызывают на мембранах лимфоцитов *in vitro* индукцию  $P_{\text{ИФН}}-\alpha/\beta$ , т.е. синтез ИФН- $\alpha/\beta$  человека. Необходимо отметить, что максимальный синтез ИФН- $\alpha/\beta$  при *in vitro* исследованиях достигается

при разведении препарата 1 : 20, т.е. при концентрации препарата в 5 мкг.

Уровень экспрессии  $P_{\text{ИФН}}-\alpha/\beta$ , индуцируемых на мембранах лимфоцитов *in vitro* смесью КАУПБ с SARS-CoV-2 Dubrovka, снижается начиная с 6 ч с момента индукции и продолжается на протяжении всего периода исследования (табл. 2). Максимальное снижение уровня экспрессии  $P_{\text{ИФН}}-\alpha/\beta$  достигается к 30 ч с момента индукции, наиболее эффективное снижение уровня экспрессии отмечается при индукции лимфоцитов смесью КАУПБ с коронавирусом в разведении 1 : 20, или 5 мкг ( $p \leq 0,05$ ). Полученные результаты означают, что КАУПБ ингибирует репликацию SARS-CoV-2 Dubrovka, нейтрализуя его инфекционную активность. Этот вывод был подтверждён результатами реакции ИРВ, поставленной в культуре клеток Vero CCL-81, чувствительных к SARS-CoV-2 Dubrovka.

Данные результаты чётко демонстрируют, что КАУПБ является эффективным иммуномодулирующим препаратом и одновременно обладает вирусингибирующим эффектом. Этот вывод подтверждается и данными, относящимися к синтезу уровня  $P_{\text{ИФН}}-\gamma$  (табл. 3). Уровень экспрессии  $P_{\text{ИФН}}-\gamma$ , т.е. синтез иммунного ИФН лимфоцитами, индуцированными *in vitro* КАУПБ, а также смесью препарата с SARS-CoV-2 Dubrovka происходила по тем же принципам, что и индукция  $P_{\text{ИФН}}-\alpha/\beta$ . Анализ данных, представленных в табл. 3, показывает, что КАУПБ в изучаемых концентрациях вызывает *in vitro* на мембранах лимфоцитов, культивируемых *in vitro*, экспрессию  $P_{\text{ИФН}}-\gamma$  начиная с 6 ч с момента индукции и до 50 ч (период наблюдения). Активно экспрессируются  $P_{\text{ИФН}}-\gamma$  с 24 до 44 ч с момента индукции КАУПБ с максимальной индукцией при концентрациях 10 и 5 мкг. Экспрессия  $P_{\text{ИФН}}-\gamma$  снижается при индукции лимфоцитов препаратом КАУПБ после предварительного 2-часового взаимодействия с SARS-CoV-2 Dubrovka, что свидетельствует о вирусингибирующей активности КАУПБ.

## Обсуждение

КАУПБ используется для эффективной профилактики и лечения большинства хронических заболеваний верхних и нижних дыхательных путей. Установлен протективный эффект применения КАУПБ при вирусных инфекциях — гриппозной и герпетической. В связи с пандемией COVID-19 появилась необходимость выяснить, обладает ли данный препарат протективным эффектом при профилактике и лечении коронавирусной инфекции человека. Для решения данной проблемы использовали отечественный штамм коронавируса SARS-CoV-2 Dubrovka, изолированный от больного COVID-19 и адаптированный к культуре клеток Vero CCL-81.

В РГА в клеточной культуре Vero CCL-81, инфицированной SARS-CoV-2 штамм Dubrovka, были

**Таблица 2.** Экспрессия  $R_{\text{иФН}}-\alpha/\beta$  (%) на МКПК человека, индуцированных *in vitro* КАУПБ и комплексом КАУПБ с SARS-CoV-2 штамм Dubrovka, ч  
**Table 2.** Expression of  $R_{\text{иФН}}-\alpha/\beta$  (%) in human PBMCs induced *in vitro* by ACOPB and ACOPB with SARS-CoV-2 Dubrovka strain, hours

Время индукции, ч Induction time, hours	Разведение КАУПБ (доза)   ACOPB dilution (dose)												Контроль (средние значения) $R_{\text{иФН}}-\alpha$ Control (mean values) $R_{\text{иФН}}-\alpha$	
	1 : 10 (10 мкг   µg)			1 : 20 (5 мкг   µg)			1 : 40 (2,5 мкг   µg)			снижение, % decrease, %	снижение, % decrease, %	МКПК human peripheral blood mononuclear cells	SARS-CoV-2	
	КАУПБ ACOPB	КАУПБ + SARS-CoV-2 ACOPB + SARS-CoV-2	снижение, % decrease, %	КАУПБ ACOPB	КАУПБ + SARS-CoV-2 ACOPB + SARS-CoV-2	снижение, % decrease, %	КАУПБ ACOPB	КАУПБ + SARS-CoV-2 ACOPB + SARS-CoV-2	снижение, % decrease, %					
1	0,7 ± 0,001	0,4 ± 0,02	0,3*	0,5 ± 0,04	0,3 ± 0,01	0,2*	0,5 ± 0,03	0,2 ± 0,07	0,3*	0,60 ± 0,03	0,60 ± 0,05			
6	3,1 ± 0,05	2,6 ± 0,01	0,5*	4,1 ± 0,09	2,4 ± 0,04	1,7*	2,8 ± 0,1	2,0 ± 0,04	0,8*					
24	5,3 ± 0,07	3,8 ± 0,04	1,5*	7,8 ± 0,08	6,0 ± 0,07	1,8*	7,3 ± 0,01	5,0 ± 0,09	2,3*					
30	6,0 ± 0,09	5,0 ± 0,07	1,0*	10,0 ± 0,05	6,0 ± 0,05	4,0*	6,5 ± 0,04	5,0 ± 0,03	1,5*					
44	3,5 ± 0,01	2,5 ± 0,09	1,0*	8,0 ± 0,04	5,5 ± 0,07	2,5*	3,0 ± 0,03	2,5 ± 0,05	0,5*					
48	3,0 ± 0,08	2,0 ± 0,04	1,0*	5,0 ± 0,02	3,0 ± 0,04	2,0*	3,0 ± 0,05	2,0 ± 0,02	1,0*					
50	2,5 ± 0,01	2,0 ± 0,06	0,5*	4,5 ± 0,02	3,0 ± 0,03	1,5*	3,0 ± 0,05	1,5 ± 0,03	1,5*					

Примечание | Note. \* $p \leq 0,05$ .

**Таблица 3.** Экспрессия  $R_{\text{иФН}}-\gamma$  (%) на МКПК человека, индуцированных *in vitro* КАУПБ и комплексом КАУПБ с SARS-CoV-2 штамм Dubrovka, ч  
**Table 3.** Expression of  $R_{\text{иФН}}-\gamma$  (%) in human PBMCs induced *in vitro* by ACOPB and the ACOPB and SARS-CoV-2 Dubrovka strain mixture, hours

Время индукции, ч Induction time, hours	Разведение КАУПБ (доза)   ACOPB dilution (dose)												Контроль (средние значения) $R_{\text{иФН}}-\alpha$ Control (mean values) $R_{\text{иФН}}-\alpha$	
	1 : 10 (10 мкг   µg)			1 : 20 (5 мкг   µg)			1 : 40 (2,5 мкг   µg)			снижение, % decrease, %	снижение, % decrease, %	МКПК human peripheral blood mononuclear cells	SARS-CoV-2	
	КАУПБ ACOPB	КАУПБ + SARS-CoV-2 ACOPB + SARS-CoV-2	снижение, % decrease, %	КАУПБ ACOPB	КАУПБ + SARS-CoV-2 ACOPB + SARS-CoV-2	снижение, % decrease, %	КАУПБ ACOPB	КАУПБ + SARS-CoV-2 ACOPB + SARS-CoV-2	снижение, % decrease, %					
1	0,6 ± 0,07	0,6 ± 0,05	0	0,6 ± 0,04	0,8 ± 0,03	0	0,7 ± 0,02	0,6 ± 0,05	0,1*	0,57 ± 0,03	0,55 ± 0,03			
6	2,4 ± 0,01	2,4 ± 0,09	0	3,8 ± 0,05	3,2 ± 0,05	0,6*	3,4 ± 0,01	3,0 ± 0,07	0,4*					
24	4,5 ± 0,03	3,5 ± 0,01	1,0*	5,5 ± 0,02	4,5 ± 0,06	1,0*	4,8 ± 0,04	3,8 ± 0,03	1,0*					
30	6,5 ± 0,01	3,5 ± 0,09	3,0*	7,5 ± 0,05	3,5 ± 0,05	4,0*	4,0 ± 0,07	3,0 ± 0,04	1,0*					
44	4,5 ± 0,02	3,0 ± 0,03	1,0*	5,0 ± 0,01	3,5 ± 0,05	1,5*	4,0 ± 0,06	3,0 ± 0,01	1,0*					
48	3,5 ± 0,03	2,5 ± 0,02	1,0*	4,0 ± 0,07	2,5 ± 0,07	1,5*	3,5 ± 0,01	2,5 ± 0,05	1,0*					
50	3,0 ± 0,05	2,5 ± 0,09	0,5*	3,5 ± 0,04	2,5 ± 0,01	1,0*	3,0 ± 0,07	2,0 ± 0,06	1,0*					

Примечание | Note. \* $p \leq 0,05$ .



установлены высокий титр геагглютинаина, являющегося мишенью для противовирусных препаратов, — более 1 : 256 и низкое его содержание в ВСЖ.

Для постановки реакции ИРВ КАУПБ необходимо установить точный титр вируса. SARS-CoV-2 оттитрован двумя методами: методом предельных разведений в культуре клеток Vero CCL-81 и методом бляшкообразования на этой же клеточной культуре. Вирусингибирующий титр КАУПБ с 10 дозами SARS-CoV-2 составил 1 : 32 со 100% защитой клеток в течение 8 сут (период наблюдения).

Далее необходимо было выяснить, чем обусловлен протективный эффект КАУПБ. Известно, что ИФН в организме необходимы для полного выражения иммунного ответа на антигенный стимул и что любой антиген является интерфероногеном [10]. Ранее нами с помощью мышинных моноклональных антиидиотипических антител, структурно имитирующих ИФН- $\alpha/\beta$  и  $-\gamma$  человека, показано, что активация иммунной системы, связанная с инфекцией, отражается на уровне экспрессии  $P_{\text{ИФН}}-\alpha/\beta$  и  $-\gamma$  на иммунокомпетентных клетках человека [12, 13]. В реакции непрямой мембранной иммунофлуоресценции показано, что КАУПБ при введении в культивируемые лимфоциты человека *in vitro* индуцирует  $P_{\text{ИФН}}-\alpha/\beta$  и  $-\gamma$ , что свидетельствует об эффективном иммуномодулирующем эффекте препарата.

В случае предварительного взаимодействия КАУПБ с 10 дозами коронавируса SARS-CoV-2 штамм Dubrovka в течение не менее 2 ч и с последующим внесением этого комплекса в культивируемые *in vitro* лимфоциты происходит снижение уровня экспрессии  $P_{\text{ИФН}}-\alpha/\beta$  и  $-\gamma$ . Данный результат свидетельствует о том, что КАУПБ обладает вирусингибирующим эффектом и протективный эффект препарата обеспечивается синтезируемыми в организме эндогенными ИФН- $\alpha/\beta$  и  $-\gamma$ .

#### СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Ахматова Н.К. Молекулярные и клеточные механизмы действия иммуномодуляторов микробного происхождения на функциональную активность эффекторов врожденного иммунитета: Автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. М.; 2006. Akhmatova N.K. *Molecular and cellular mechanisms of action of immunomodulators of microbial origin on the functional activity of the effectors of innate immunity*: Diss. Moscow; 2006.
2. Пашенко М.В., Пинегин Б.В. Физиология клеток врожденной иммунной системы: дендритные клетки. *Иммунология*. 2006;27(6):368–78. Pashenkov M.V., Pinegin B.V. Cell physiology of innate immune system: dendritic cells. *Immunology*. 2006;27(6):368–78. EDN: <https://www.elibrary.ru/hykkzd>
3. Егорова Н.Б., Курбатова Е.А., Ахматова Н.К., Семенова И.Б. Протективная активность Иммуновак — ВП-4 в отношении вируса гриппа птиц H5N2 при разных методах введения. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2011;88(1): 49–53. Egorova N.B., Kurbatova E.A., Akhmatova N.K., Semenova I.B. Protective activity of immunovacvp-4 vaccine against avian influenza virus H5N2 administered by different methods. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2011;88(1):49–53. EDN: <https://www.elibrary.ru/qbbzxs>
4. Егорова Н.Б., Курбатова Е.А., Семенова И.Б. *Вакцины и вакцинация: национальное руководство*. М.; 2011:693–714. Egorova N.B., Kurbatova E.A., Semenova I.B. *Vaccines and Vaccination: National Guidelines*. Moscow; 2011:693–714.
5. Гладько О.В., Егорова Н.Б., Масюттова С.А. и др. Иммуно-терапия генитального герпеса поликомпонентной вакциной ВП-4. *Военно-медицинский журнал*. 2002;323(5):73–6. Glad'ko O.V., Egorova N.B., Masyutova S.A., et al. Immunotherapy of genital herpes with a multicomponent VP-4 vaccine. *Military Medical Journal*. 2002;323(5):73–6.
6. Чучалин А.Г., Осипова Г.Л., Егорова Н.Б. и др. Контролируемые исследования по эффективности поликомпонентной вакцины при иммунотерапии у больных хроническими обструктивными заболеваниями органов дыхания. *Пульмонология*. 1995;(2):55–61. Chuchalin A.G., Osipova G.L., Egorova N.B., et al. Controlled studies on the effectiveness of a multicomponent vaccine in immunotherapy in patients with chronic obstructive respiratory diseases. *Russian Pulmonology*. 1995;(2):55–61. EDN: <https://www.elibrary.ru/xctiqb>
7. Немыкина О.Е., Егорова Н.Б., Щербаклова Б.В. и др. Оптимизация лечения атопического дерматита с помощью иммунотерапии. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2005;85(4):53–7. Nemykina O.E., Egorova N.B., Shcherbakova B.V., et al. Optimization of treatment of atopic dermatitis with the help of immunotherapy. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2005;85(4):53–7. EDN: <https://www.elibrary.ru/ymzeiw>
8. Антонова Л.П., Маркова Т.П., Курбатова Е.А. Применение поликомпонентной вакцины ВП-4 комбинированным назально-подкожным методом в лечении больных бронхиальной астмой и хроническим обструктивным бронхитом. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2004;84(6):36–40. Antonova L.P., Markova T.P., Kurbatova E.A. Application of polycapponent vaccine VP-4 by combined nasal-subcutaneous method in the treatment of patients with bronchial asthma and chronic obstructive bronchitis. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2004;84(6):36–40.
9. Немыкина О.Е., Егорова Н.Б., Курбатова Е.А. и др. Иммунологические показатели при терапии атопического дерматита у детей поликомпонентной вакциной Иммуновак ВП-4. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2005; 85(5):45–9. Nemykina O.E., Egorova N.B., Shcherbakova B.V., et al. Immunological characteristics in the therapy of atopic dermatitis in children with polycapponent vaccine Immunovac ВП-4. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2005;85(5):45–9. EDN: <https://www.elibrary.ru/hsuwwp>
10. Hu B., Guo H., Zhou P., Shi Z.L. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat. Rev. Microbiol.* 2021;19(3):141–54. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>
11. Harrison A.G., Lin T., Wang P. Mechanisms of SARS-CoV-2 transmission and pathogenesis. *Trends Immunol.* 2020;41(12): 1100–5. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.10.004>
12. Tu Y.F., Chien C.S., Yarmishyn A.A., et al. A review of SARS — CoV-2 and the ongoing clinical trials. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(7):2657. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21072657>
13. Грачева А.В., Корчевая Е.Р., Кудряшова А.М. и др. Адаптация МТТ – теста для определения нейтрализующих антител к вирусу SARS-CoV-2. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021;98(3):253–65. Gracheva A.V., Korchevaya E.R., Kudryashova A.M., et al. Adaptation of the MTT assay for detection of neutralizing antibodies against the SARS-CoV-2 virus. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2021;98(3):253–65. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-136> EDN: <https://www.elibrary.ru/jglovv>

14. Баркова Е.П., Нагиева Ф.Г., Кузнецов В.П. и др. Экспрессия рецепторов для человеческих интерферонов альфа и гамма на поверхности мононуклеарных клеток периферической крови при некоторых вирусных инфекциях. *Вопросы вирусологии*. 1998;43(6):16–8. Barkova E.P., Nagieva F.G., Kuznetsov V.P., et al. Expression of receptors for human interferons alpha and gamma on the surface of peripheral blood mononuclear cells in some viral infections. *Problems of Virology*. 1998;43(6):16–8. EDN: <https://www.elibrary.ru/wiapnb>
15. Лисаков А.Н., Нагиева Ф.Г., Баркова Е.П. и др. Исследование *in vitro* интерфероновых рецепторов иммунокомпетентных клеток при экспериментальных гриппозных инфекциях. *Инфекция и иммунитет*. 2015;5(3):273–8. Lisakov A.N., Nagieva F.G., Barkova E.P., et al. The immunocompetent cells receptors research under experimental influenza infection *in vitro*. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2015;5(3):273–8. DOI: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2015-3-273-278> EDN: <https://www.elibrary.ru/ukjjpgj>
16. Шубладзе А.К., Гайдамович С.Я. *Краткий курс практической вирусологии*. М.;1954:92–3. Shubladze A.K., Gaidamovich S.Ya. *A Short Course of Practical Virology*. Moscow;1954:92–3.
17. Михайлова Н.А., Нагиева Ф.Г., Гринько О.Н., Зверев В.В. Изучение противовирусной активности спорообразующих бактерий *Bacillus pumilus* (штамм Пашков) при экспериментальной энтеровирусной инфекции *in vitro*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2010;87(2):69–74. Mikhaylova N.A., Nagieva F.G., Grinko O.M., Zverev V.V. Experimental study of antiviral activity of spore-forming bacterium *Bacillus pumilus* "Pashkov". *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2010; 87(2):69–74. EDN: <https://www.elibrary.ru/rurigl>
18. Bracci N., Pan H.C., Lehman C., et al. Improved plaque assay for human coronaviruses 229 E and OC43. *PeerJ*. 2020;8:e10639. DOI: <https://doi.org/10.7717/peerj.10639>
19. Norrby E. Hemagglutination by measles virus. 4. A simple procedure for production of high potency antigen for hemagglutination-inhibition (HI) tests. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1962; 111:814–8. DOI: <https://doi.org/10.3181/00379727-111-27930>

### Информация об авторах

**Свитич Оксана Анатольевна** — д.м.н., член-корр. РАН, зав. отделом иммунологии и аллергологии, директор НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1757-8389>

**Нагиева Фирая Галиевна** — д.м.н., доцент, зав. лаб. гибридных клеточных культур отдела вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, [fgn42@yandex.ru](mailto:fgn42@yandex.ru), <https://orcid.org/0000-0001-8204-4899>

**Курбатова Екатерина Алексеевна** — д.м.н., проф., зав. лаб. терапевтических вакцин НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-4474-7531>

**Баркова Елена Петровна** — к.б.н., в.н.с. лаб. гибридных клеточных культур отдела вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3369-8869>

**Харченко Ольга Сергеевна** — н.с. лаб. ДНК-содержащих вирусов отдела вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2169-9610>

**Строева Александра Дмитриевна** — м.н.с. лаб. гибридных клеточных культур отдела вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-4179-931X>

**Пашков Евгений Алексеевич** — м.н.с. лаб. молекулярной иммунологии отдела иммунологии и аллергологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5682-4581>

**Лисаков Алексей Николаевич** — н.с. лаб. гибридных клеточных культур отдела вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9374-5842>

**Грачева Анастасия Вячеславовна** — м.н.с. лаб. молекулярной вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8428-4482>

**Потапова Мария Борисовна** — аспирант кафедры кожных венерических болезней им. В.А. Рахманова ПМГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9647-1322>

**Файзулоев Евгений Бахтиерович** — к.б.н., зав. лаб. молекулярной вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7385-5083>

**Зверев Виталий Васильевич** — д.б.н., проф., академик РАН, зав. лаб. молекулярной биотехнологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5808-2246>

**Участие авторов.** Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 30.11.2022;  
принята к публикации 12.02.2023;  
опубликована 28.04.2023

### Information about the authors

**Oksana A. Svitich** — D. Sci. (Med.), Prof., Corresponding Member of RAS, Head, Department of immunology and allergology, Director, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1757-8389>

**Firaya G. Nagieva** — D. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Head, Laboratory of hybrid cell cultures, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, [fgn42@yandex.ru](mailto:fgn42@yandex.ru), <https://orcid.org/0000-0001-8204-4899>

**Ekaterina A. Kurbatova** — D. Sci. (Med.) Prof., Head, Laboratory of therapeutic vaccine, I. Mechnikov Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4474-7531>

**Elena P. Barkova** — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of hybrid cell cultures, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3369-8869>

**Olga S. Kharchenko** — researcher, Laboratory of DNA viruses, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2169-9610>

**Alexandra D. Stroevea** — junior researcher, Laboratory of hybrid cell cultures, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4179-931X>

**Evgeny A. Pashkov** — junior researcher, Laboratory of molecular immunology, Department of immunology and allergology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5682-4581>

**Alexey N. Lisakov** — researcher, Laboratory of hybrid cell cultures, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9374-5842>

**Anastasiya V. Gracheva** — junior research, Laboratory of molecular virology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8428-4482>

**Mariia B. Potapova** — postgraduate student, Department of skin and venereal diseases named after V.A. Rakhmanov, Sechenov University, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9647-1322>

**Evgeny B. Faizuloev** — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of molecular virology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7385-5083>

**Vitaly V. Zverev** — D. Sci. (Biol.), Prof., Academician of RAS, Head, Laboratory of molecular biotechnology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5808-2246>

**Author contribution.** All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

The article was submitted 30.11.2022;  
accepted for publication 12.02.2023;  
published 28.04.2023