

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-136>



Адаптация МТТ-теста для определения нейтрализующих антител к вирусу SARS-CoV-2

Грачёва А.В., Корчевая Е.Р., Кудряшова А.М., Борисова О.В., Петруша О.А., Смирнова Д.И., Чернышова И.Н., Свитич О.А., Зверев В.В., Файзулов Е.Б. 

НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

Аннотация

Введение. Основным показателем специфической активности антител к вирусу SARS-CoV-2 является их способность нейтрализовать вирус. Тест на вируснейтрализующие антитела (ВНА) широко востребован в различных направлениях биомедицинских исследований.

Целью работы являлся подбор оптимальных условий для определения ВНА к вирусу SARS-CoV-2 по ингибированию цитопатогенного действия (ЦПД) в культуре клеток с возможностью как микроскопического, так и спектрофотометрического учёта результата.

Материалы и методы. Сыворотку крови реконвалесцентов COVID-19 и здоровых лиц ($n = 96$) изучали методом ИФА. Коронавирус SARS-CoV-2, штамм Dubrovka (номер GenBank: MW514307.1) выращивали в культуре клеток Vero CCL81 (ATCC). Идентификацию вируса проводили методами ОТ-ПЦР-РВ, ИФА и секвенирования по Сэнгеру. Результаты реакции нейтрализации (РН) учитывали по ЦПД микроскопически и в метилтетразолиевом (МТТ) тесте.

Результаты. От больного COVID-19 изолирован коронавирус SARS-CoV-2 и адаптирован к выращиванию в культуре клеток. При заражении низкой дозой ($MOI = 0,00001$) вирус вызывал выраженное ЦПД с выживаемостью клеток менее 3%, что позволяло учитывать результаты РН по ингибированию ЦПД. Сравнительный анализ сывороток в РН и методом ИФА показал достоверную корреляцию между титрами ВНА и титрами антител к RBD-домену S-белка (Спирмен $r = 0,714$; $p < 0,001$). Результаты определения ВНА с микроскопической и спектрофотометрической детекцией (тест МТТ) также достоверно коррелировали (Спирмен $r = 0,963$; $p < 0,05$).

Заключение. На основе адаптированного к культуре клеток Vero вируса SARS-CoV-2 разработана система оценки титра ВНА, позволяющая учитывать результат как с помощью микроскопического исследования, так и спектрофотометрически в МТТ-тесте. Применение теста МТТ позволяет автоматизировать учёт результатов РН, проводить статистическую обработку получаемых данных, снижает субъективизм при оценке результата. Являясь витальным красителем, МТТ выявляет только живые клетки, что повышает надёжность получаемых результатов по сравнению с другими красителями.

Ключевые слова: реакция нейтрализации, коронавирус SARS-CoV-2, МТТ-тест, вируснейтрализующие антитела

Этическое утверждение. Исследование проводилось при информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен этическим комитетом НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова.

Источник финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-04-60079.

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

Для цитирования: Грачёва А.В., Корчевая Е.Р., Кудряшова А.М., Борисова О.В., Петруша О.А., Смирнова Д.И., Чернышова И.Н., Свитич О.А., Зверев В.В., Файзулов Е.Б. Адаптация МТТ-теста для определения нейтрализующих антител к вирусу SARS-CoV-2. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2021;98(3): 253–265.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-136>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-136>

Adaptation of the MTT assay for detection of neutralizing antibodies against the SARS-CoV-2 virus

Anastasiia V. Gracheva, Ekaterina R. Korchevaya, Alexandra M. Kudryashova, Olga V. Borisova, Olga A. Petrusha, Daria I. Smirnova, Irina N. Chernyshova, Oksana A. Svitich, Vitaly V. Zverev, Evgeny B. Faizuloev[✉]

I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. The ability of SARS-CoV-2 antibodies to neutralize the virus is the primary indicator of their specific activity. The test for virus neutralizing antibodies (NAbs) is much needed in different biomedical studies.

The aim of the study is to find optimum conditions for microscopic and spectrophotometric detection of SARS-CoV-2 NAbs by inhibition of cytopathic effect (CPE) in cell cultures.

Materials and methods. Blood sera collected from COVID-19 convalescent patients and healthy individuals ($n = 96$) were tested using the ELISA method. The SARS-CoV-2 coronavirus, Dubrovka strain (GenBank accession no. MW514307.1) was grown in culture medium of Vero cell line CCL-81 (ATCC). Real-time RT-PCR, ELISA, and Sanger sequencing were used for detection of the virus. The results of the neutralization test (NT) were assessed through the microscopic examination for CPE and by the methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay.

Results. SARS-CoV-2 was isolated from a COVID-19 patient and adapted to grow in cell culture. At a low dose of infection ($MOI = 0.00001$), the virus caused a pronounced CPE with the cell viability less than 3%, thus making it possible to assess NT results by CPE inhibition. The NT and ELISA-based comparative study of sera showed positive correlation between virus NAb titers and Nab titers to S-protein RBD (Spearman's $r = 0.714$; $p < 0.001$). The results of NAbs microscopic and spectrophotometric detection (the MTT assay) also demonstrated positive correlation (Spearman's $r = 0.963$; $p < 0.05$).

Conclusion. The SARS-CoV-2 virus adapted to Vero cell culture served to develop a NAb titer assessment system, which can be used both in microscopic studies and for an MTT assay in spectrophotometric studies. The MTT assay provides automated reading of NT results, optimizes the statistical analysis of the obtained data, and minimizes subjectivity in assessment of results. Being a vital dye, MTT penetrates only viable cells, thus contributing to the reliability of the obtained results compared to other dyes.

Keywords: neutralization test, SARS-CoV-2 coronavirus, MTT assay, virus neutralizing antibodies

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.

Funding source. The research was carried out with the financial support of the RFBR in the framework of scientific project № 20-04-60079.

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

For citation: Gracheva A.V., Korchevaya E.R., Kudryashova A.M., Borisova O.V., Petrusha O.A., Smirnova D.I., Chernyshova I.N., Svitich O.A., Zverev V.V., Faizuloev E.B. Adaptation of the MTT assay for detection of neutralizing antibodies against the SARS-CoV-2 virus. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(3):253–265.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-136>

Введение

Новый коронавирус человека SARS-CoV-2, открытый в декабре 2019 г. в Китае, стал причиной пандемии, унесшей в мире за 2020 г. более 2 млн жизней. Исследования закономерностей иммунного ответа на инфекцию нового коронавируса являются ключевыми для разработки эффективных средств специфической профилактики и иммунотерапии. На сегодняшний день разработано и внедрено в практику лабораторной диагностики множество иммунохимических (преимущественно иммуноферментных) тест-систем для выявления и количественного определения специфических IgG- и IgM-антител к SARS-CoV-2 [1, 2]. Однако

эти тесты не позволяют оценить функциональную активность специфических антител, например их способность нейтрализовать вирус. Вируснейтрализующие антитела (ВНА) в основном направлены к рецепторсвязывающему домену (RBD) поверхностного гликопротеина S SARS-CoV-2 и при взаимодействии с ним блокируют способность вируса связываться с вирусным рецептором ACE2 на поверхности клетки мишени [3, 4] (рис. 1).

Пассивный перенос моноклональных антител, специфичных RBD-домену, чувствительным к инфекции SARS-CoV-2 животным (мыши, хомяки и макаки резусы) показал протективную активность этих препаратов [3–5]. Имеется также положитель-

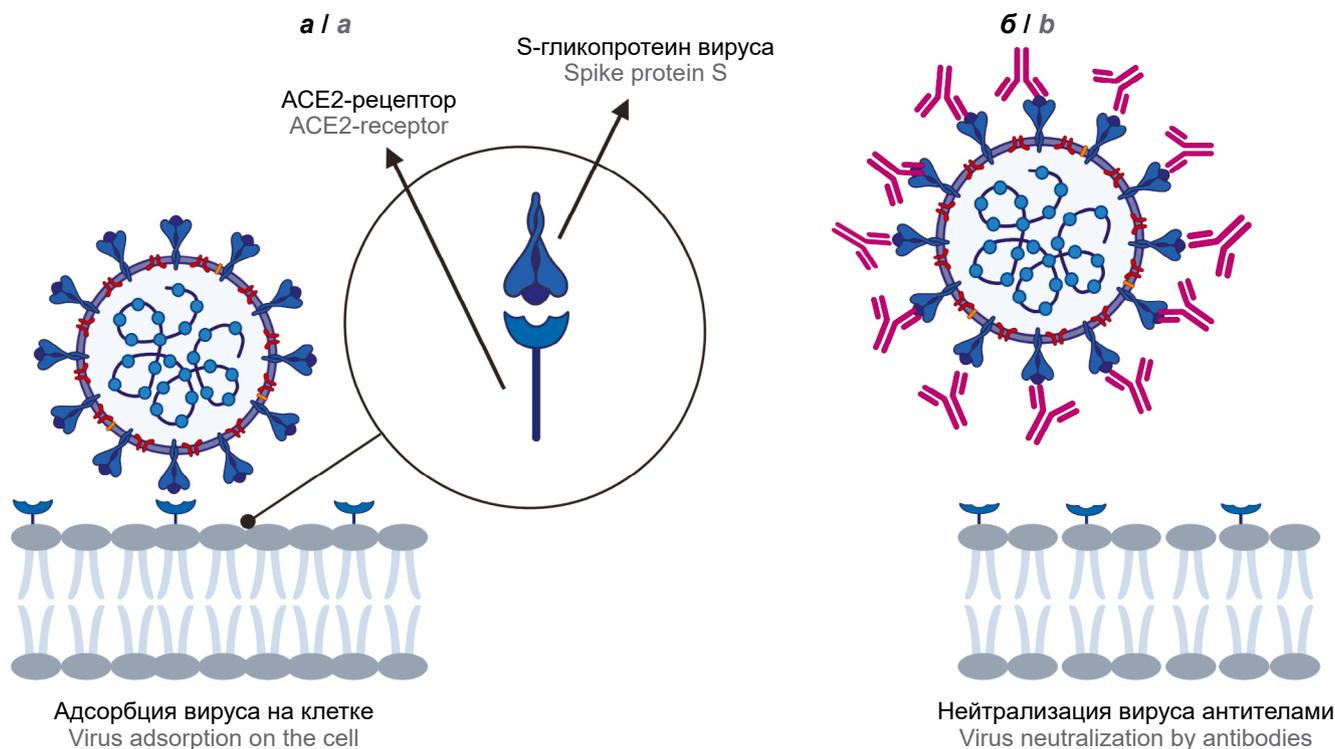


Рис. 1. Схематическое изображение нейтрализации вируса SARS-CoV-2 антителами.

a — адсорбция вириона на клетке-мишени SARS-CoV-2 путём образования связи между гликопротеином S вируса и клеточным ACE-рецептором; *b* — ВНА блокируют адсорбцию вируса на клетке-мишени.

Изображение выполнено в онлайн-программе BioRender. URL: <https://biorender.com>.

Fig. 1. Schematic representation of SARS-CoV-2 neutralization by antibodies.

a — virion adsorption on the SARS-CoV-2 target cell by binding the S glycoprotein and the ACE receptor; *b* — NABs inhibit the virus adsorption on the target cell.

The representation is created with BioRender's web-based software.

ный клинический опыт применения плазмы реконвалесцентов для лечения пациентов с COVID-19 [6, 7]. Наличие в препаратах плазмы крови реконвалесцентов и моноклональных антител ВНА является признаком их протективной активности. Основным показателем специфической активности большинства профилактических вакцин против COVID-19 также является наличие ВНА в сыворотке крови вакцинированных лиц [6]. Таким образом, тест на ВНА широко востребован в области биомедицинских исследований.

Традиционные методы оценки активности нейтрализующих SARS-CoV-2 антител основаны на способности ВНА ингибировать бляшкообразование или цитопатогенное действие (ЦПД) вируса на чувствительной культуре клеток [8]. Поскольку работа ведётся с вирулентным штаммом вируса, эти исследования выполняются в лабораториях, отвечающих требованиям безопасности работ с патогенными биологическими объектами II группы патогенности. Также описаны несколько альтернативных подходов к определению ВНА, не требующих работы с вирусом. Это «суррогатные» тест-системы, основанные на твердофазном ИФА с рекомбинантными пептидами RBD и ACE-рецептором [9, 10], использовании

псевдовиральных частиц на основе рекомбинантных вирусов и различных репортерных систем [11, 12]. Некоторые альтернативные подходы к определению ВНА позволяют получать результат значительно быстрее, чем методы, основанные на регистрации вирусного ЦПД. Однако, несмотря на отмеченные ограничения, традиционные методы титрования остаются «золотым стандартом» определения ВНА, поскольку наиболее точно моделируют естественный процесс нейтрализации вируса антителами. Важно отметить, что, вопреки устоявшемуся мнению, нейтрализующие SARS-CoV-2 антитела направлены не только к эпитопам RBD, но и к эпитопам других доменов белка S [5, 13, 14]. Таким образом, только традиционные культуральные методы оценки ВНА способны выявлять весь спектр циркулирующих в крови нейтрализующих SARS-CoV-2 антител, тогда как «суррогатные» тест-системы, основанные на твердофазном ИФА, выявляют только антитела, направленные к эпитопам RBD.

Целью работы являлся подбор оптимальных условий для определения ВНА к вирусу SARS-CoV-2 по ингибированию ЦПД в культуре клеток с возможностью как визуального, так и инструментального учёта результата.

Для достижения поставленной цели были поставлены следующие задачи:

- в чувствительной культуре клеток из клинического образца больного COVID-19 изолировать коронавирус SARS-CoV-2;
- путём пассирования в культуре клеток получить лабораторный штамм SARS-CoV-2, вызывающий полную гибель клеток при малых дозах заражения;
- разработать и апробировать методику оценки титра ВНА к SARS-CoV-2 с детекцией результата в колориметрическом метилтетразолиевом (МТТ) тесте.

Материалы и методы

Клинические образцы. Образцы сыворотки крови, полученные от реконвалесцентов COVID-19 и лиц, не болевших (серонегативных в ИФА), и мазок из ротоглотки пациента с подтверждённым диагнозом COVID-19 предоставлены Клинико-диагностическим центром НИИВС им. И.И. Мечникова. Работы с клиническим материалом проводились в соответствии с международными этическими нормами и с добровольного согласия обследуемых.

Вирус и культура клеток. Использовали лабораторный штамм коронавируса SARS-CoV-2 «Dubrovka» (GenBank: MW514307.1). Культивирование вируса проводили на клетках эпителия почки африканской зелёной мартышки Vero CCL81 (ATCC) (далее — клетки Vero). Клетки культивировали при 37°C в питательной среде DMEM на основе буфера Эрла («ПанЭко», Россия) с добавлением 5% эмбриональной телячьей сыворотки («Gibco»), 300 мкг/мл L-глутамин («ПанЭко»), 40 мкг/мл гентамицин («ПанЭко») в атмосфере с 5% CO₂.

Выявление РНК вируса. Выделение вирусной РНК из клинических и культуральных образцов проводили наборами реагентов «МагноСорб» («ИнтерЛабСервис», Россия) и «РеалБест экстракция 100» («Вектор-Бест», Россия). Вирус SARS-CoV-2 идентифицировали методом ПЦР-РВ с обратной транскрипцией (ОТ) набором реагентов «РеалБест РНК SARS-CoV-2» («Вектор-Бест»). Накопление вируса и репликацию вирусной РНК в культуре клеток контролировали с помощью количественной ОТ-ПЦР-РВ с набором праймеров и зондов к N-гену SARS-CoV-2 [15].

Для постановки реакции ОТ-ПЦР-РВ использовали набор реагентов «2,5x реакционная смесь для ПЦР-РВ с Tag-полимеразой» и обратную транскриптазу MMLV («Синтол»). Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала по 10 пмоль каждого праймера и 5 пмоль зонда, Taq ДНК-полимеразу, 30 ед. обратной транскриптазы. Температурно-временной режим: 45°C — 10 мин (1 цикл); 95°C — 5 мин (1 цикл); 95°C — 5 с, 55°C — 45 с (45 циклов). Реакцию проводили в амплификаторе ДТпрайм

(«ДНК-технология», Россия). Все праймеры и зонды синтезированы в «Синтол».

Секвенирование S-гена SARS-CoV-2. Для секвенирования S-гена SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР амплифицировали фрагменты S-гена, используя набор праймеров собственного дизайна (табл. 1). Реакцию ОТ проводили в реакционной смеси объемом 100 мкл, содержащей буфер для ОТ («Синтол»), 20 пкмоль праймера CSr0, 24 мкл вирусной РНК, 50 ед. ОТ MMLV («Синтол») в режиме: 10 мин при 42°C, 2 мин при 95°C.

Реакцию ПЦР проводили в реакционной смеси объемом 50 мкл, содержащей «LongAmp™ Taq 2X Master Mix» («NEB»), 5 мкл кДНК, по 10 пкмоль праймеров F и R, в режиме: 94°C — 2 мин (1 цикл), 94°C — 60 с, 55°C — 40 с, 65°C — 100 с (40 циклов), 65°C — 10 мин (1 цикл), хранение при 4°C. Полученные ампликоны идентифицировали по подвижности методом электрофореза в 1% агарозном геле, очищали набором реагентов «Cleanup Mini» («Евроген», Россия).

Концентрацию ПЦР-продуктов оценивали спектрофотометрически и передавали с набором праймеров для секвенирования методом Сэнгера в ЗАО «Синтол». «Сборку» полноразмерного S-гена проводили в программе «VectorNTI 11.0.0» («Invitrogen Corp.»).

Культивирование коронавируса SARS-CoV-2. За 3 сут до заражения клетки Vero высевали в куль-

Таблица 1. Праймеры для амплификации и секвенирования S-гена SARS-CoV-2

Table 1. Primers for amplification and sequencing of the SARS-CoV-2 S gene

Праймер Primer	Последовательность Sequence
F CSf0	AGGGGTAAGTCTGTTATGTCTT
CSf1	TTCTTCTTCAGGTTGGACAGC
CSf2	ACATGCACCAGCAACTGTTT
CSf3	GGGCTGAACATGTCAACAAC
CSf4	AACAAATTTACAAAACACCACCAA
CSf5	GAACCAAAAATTGATTGCCA
CSf6	CTTCCCTCAGTCAGCACCTC
CSf7	CTCAATGAGGTTGCCAAGAA
R CSr0	GCTTGTATCGGTATCGTTGCAG
CSr1	TTGTGGTAATAAACACCCAAAAA
CSr2	TTTCCAGTTTGCCTGGAG
CSr3	CCTGTGCCTGTTAAACCATTG
CSr4	CGCCGAGGAGAATTAGTCTG
CSr5	TCTTGCTTGGTTTTGATGGA
CSr6	GACAAATGGCAGGAGCAGTT
CSr7	CCATGGCCATTTTATATACTGCT

туральные флаконы с вентилируемыми крышками («Corning») площадью 75 см² с кратностью пересева 1 : 5. На 3-и сутки, после достижения 100% монослоя, из флакона удаляли культуральную жидкость и добавляли вирусный материал при MOI = 0,01–0,0001 ТЦД₅₀ на клетку. Адсорбцию вируса проводили в CO₂-инкубаторе в течение 60 мин, затем добавляли поддерживающую среду (DMEM, L-глутамин — 300 мкг/мл, гентамицин — 40 мкг/мл, 1% эмбриональной телячьей сыворотки) и инкубировали при 37°C до проявления ЦПД в атмосфере с 5% CO₂. При появлении ЦПД вирусосодержащую культуральную жидкость собирали, осветляли центрифугированием, аликвотировали и хранили при –80°C.

Титрование вируса по конечной точке ЦПД.

Титр вируса SARS-CoV-2 определяли по конечной точке проявления ЦПД в культуре клеток Vero. Клетки Vero высевали в 96-луночные планшеты с кратностью пересева 1 : 5. Через 3 сут из лунок планшета удаляли ростовую среду, вносили последовательные 10-кратные разведения вируса в поддерживающей среде и инкубировали в течение 5 сут в CO₂-инкубаторе при 37°C. Учёт результатов титрования проводили визуально путём микроскопического исследования клеточного монослоя на наличие характерного ЦПД на 5-е сутки после заражения (округление и открепление клеток от монослоя). Титр вируса рассчитывали по методике [16] и выражали в lg ТЦД₅₀/мл.

ИФА на заражённых клетках (In-Cell ELISA). Клетки Vero, выращенные до 100% монослоя в 96-луночном планшете, заражали вирусом при MOI = 0,3. Через 24 ч клетки фиксировали в течение 15 мин раствором 8% параформальдегида, приготовленным на фосфатно-солевом буфере (ФСБ; pH 7,2), промывали дважды ФСБ, планшет хранили при 4°C до постановки ИФА. Перед проведением ИФА в лунки планшета вносили на 30 мин по 150 мкл 0,02 М ФСБ, содержащего 1% Тритона X-100, затем на 1 ч вносили блокирующий раствор (0,02 М ФСБ, содержащий 0,09% казеината натрия). После удаления блокирующего раствора в лунки планшета вносили по 100 мкл сыворотки крови в разведении 1 : 100 в 0,02 М ФСБ, содержащем 0,2% бычьего сывороточного альбумина, 0,05% Твин-20 и выдерживали в течение 1 ч при 37°C. После отмывки вносили по 100 мкл конъюгата моноклональных антител мыши к IgG человека с пероксидазой хрена. Повторяли этап инкубации и отмывки, затем вносили по 100 мкл 33 мМ цитратного буферного раствора pH 4,0, содержащего 0,01% перекиси водорода и 0,5 мМ 3,3',5,5'-тетраметилбензидина. Через 15 мин реакцию останавливали добавлением 50 мкл 2N серной кислоты, измеряли оптическую плотность (ОП) в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения 680 нм.

Определение антител к вирусу в ИФА. Определение антител класса G к RBD-домену коронавируса SARS-CoV-2 проводили с использованием набора реагентов «SARS-CoV-2-ИФА-IgG» (ООО «МедипалТех»).

За титр антител к SARS-CoV-2 принимали последнее разведение, при котором значение ОП образца было выше, чем порог отсечения в каждом исследовании.

МТТ-тест. Выживаемость клеток Vero, заражённых вирусом, оценивали с помощью витального красителя метилтиазолилтетразолия бромид (МТТ). На 5-е сутки после заражения в лунки с клетками 96-луночного планшета добавляли по 20 мкл раствора МТТ, 5 мг/мл («ПанЭко») и инкубировали при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ в течение 2 ч. Далее культуральную жидкость отбирали и добавляли в лунки по 100 мкл диметилсульфоксида («Sigma-Aldrich») в каждую лунку. С помощью планшетного спектрофотометра определяли ОП каждой лунки при 530 нм с учётом фоновых значений при 620 нм. Выживаемость клеток рассчитывали по формуле:

$$\text{Выживаемость} = \frac{\text{ОП}_{530} \text{ опытной пробы}}{\text{ОП}_{530} \text{ клеточного контроля}} \times 100\%,$$

где ОП₅₃₀ опытной пробы — среднее значение ОП₅₃₀ в лунках с заражёнными клетками; ОП₅₃₀ клеточного контроля — среднее значение ОП₅₃₀ в лунках с незаражённой клеточной культурой.

Реакция нейтрализации. Определение титра ВНА к SARS-CoV-2 проводили, как описано в работе [17], с модификациями. Образцы сывороток аликвотировали по 100 мкл и хранили при –20°C. Перед постановкой реакции нейтрализации (РН) сыворотку размораживали, прогревали при 56°C в течение 30 мин, готовили последовательные двукратные разведения поддерживающей средой. Разведения сывороток смешивали с равным объёмом вирусного материала SARS-CoV-2 в титре 2 × 10³ ТЦД₅₀/мл и инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 1 ч. Из 96-луночного планшета с 3-дневным монослоем клеток Vero удаляли среду, в лунки вносили смесь вируса и сыворотки в 4 повторях по 100 мкл (доза вируса — 100 ТЦД₅₀ на лунку) согласно схеме (табл. 2) и инкубировали в течение 5 сут при 37°C в атмосфере с 5% CO₂.

Помимо исследуемых образцов, в РН предусматривали следующие контроли: клеточный контроль (КК — незаражённая клеточная культура), вирусный контроль (ВК — клетки, заражённые рабочим разведением вируса), контроль сыворотки (КС — сыворотка в разведении 1 : 20), контроль дозы (КД — пятикратные разведения вируса).

Учёт результата РН проводили визуально путём микроскопического исследования клеток либо спектрофотометрически в колориметрическом тесте

Таблица 2. Схема расположения образцов в 96-луночном планшете при постановке РН**Table 2.** Arrangement of samples in the 96-well plate during NT

Разведение сыворотки Serum dilution	Сыворотка 1 / Serum-1				Сыворотка 2 / Serum-2				Контроли / Controls			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 : 20									КД / DC			
1 : 40												
1 : 80												
1 : 160												
1 : 320								КК-1 / CS-1		КК-2 / CS-2		
1 : 640								КК / CC		ВК / VC		
1 : 1280												
1 : 2560												

МТТ. В целях защиты персонала перед измерением ОП планшет в открытом виде с разных сторон обрабатывали в течение 5 мин ультрафиолетом в боксе микробиологической безопасности. При визуальном учёте нейтрализующим титром сыворотки считали обратное значение её последнего разведения, в котором признаков ЦПД не обнаруживалось в 2 или более лунках. В тесте МТТ учёт нейтрализующего титра проводили спектрофотометрически и считали по последнему разведению, при котором показатель среднего значения ОП₅₃₀₋₆₂₀ (далее — ОП₅₃₀) был равен или превышал значения порогового показателя (ПП), определённого по формуле:

$$ПП = \frac{ОП_{530} КК - ОП_{530} ВК}{2},$$

где ОП₅₃₀ КК — среднее значение ОП₅₃₀ в контрольных лунках с незаражённой клеточной культурой; ОП₅₃₀ ВК — среднее значение ОП₅₃₀ в контрольных лунках, содержащих рабочее разведение вируса.

Значения контрольных показателей учитывали следующим образом: КК — клеточный монослой в контрольных лунках должен быть сохранён полностью. ВК — полная дегенерация монослоя клеток в результате ЦПД вируса. Значения ОП₅₃₀ ВК должны быть не выше 0,2, а отношение ОП₅₃₀ КК/ОП₅₃₀ ВК должно быть не менее 8.

Статистическая обработка данных. Статистическую значимость разницы титров антител, учтённых разными методами, оценивали с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Достоверной считали разницу при $p < 0,05$ и $p < 0,001$. Качественную оценку показателей проводили по шкале Чеддока, обработку результатов — с помощью программ «Microsoft Excel», «GraphPadPrism».

Требования к безопасности работ. Все работы с вирусом SARS-CoV-2 проводили в условиях, отвечающих требованиям безопасности работ с патогенными биологическими объектами II 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 ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора.

Результаты

Вирус SARS-CoV-2, используемый для постановки РН, получали 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 ОТ-ПЦР-РВ выявлено высокое содержание РНК вируса SARS-CoV-2 (8,82 lg копий/мл). Впоследствии у пациентки развилось заболевание с клиническими признаками COVID-19: кашель, одышка, фебрильная температура, потеря вкуса и обоняния. Компьютерная томография органов грудной полости показала характерное уплотнение лёгочной ткани с общей площадью поражения с обеих сторон 50%. Поставлен диагноз «COVID-19, вирус идентифицирован (U07.1, МКБ 10), внебольничная двусторонняя полисегментарная вирусная пневмония».

Клиническим материалом заразили культуру клеток Vero и инкубировали её в CO₂-инкубаторе в течение 5 сут до появления признаков 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 N-гену [15]. На 2, 7, 14 и 21-м пассажах в культуральной жидкости выявлена РНК коронавируса SARS-CoV-2 в высокой концентрации (9; 9,7; 9,2 и 9,9 lg копий/мл соответственно). Методом In-Cell ELISA установлено, что нативный вирусный антиген, полученный в заражённых клетках Vero, реагировал с сыворотками реконвалесценто́в COVID-19 и не реагировал с сыворотками не болевших людей.

Таксономическая принадлежность изолята к виду *Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus* и коронавирусу SARS-CoV-2 (кла-

да GH) была установлена путём секвенирования S-гена (GenBank: MW161041.1) и полного генома (GenBank: MW514307.1) с последующим филогенетическим анализом (рис. 2). Выделенному штамму вируса присвоено название «Dubrovka». Последовательность S-гена штамма Dubrovka имела 99,2% сходство со штаммом Wuhan-Hu-1, ставшим причиной эпидемии в г. Ухане (КНР) в декабре 2019 г. Особенностью штамма Dubrovka является делеция в S-гене размером в 27 нт (кодирует в S-белке синтез 9 аминокислот с 68 по 76 а.о. — YMSLGPMVL), по сравнению с S-геном штамма Wuhan-Hu-1, чем и объясняется относительно высокий уровень различий (0,8%) между этими штаммами. Важно отметить, что упомянутая делеция была выявлена в геноме штамма Dubrovka после 1-го пассажа в культуре клеток Vero и сохранялась на 40-м пассажном уровне. В GenBank обнаружено только 2 штамма SARS-CoV-2, выявленных в феврале и марте 2020 г. в Бельгии и Тайване (GenBank: MW368439.1, MT479224.1) и имеющих аналогичную делецию.

При пассировании вируса в культуре клеток Vero титр вируса возрастал (от 4,3 lg ТЦД₅₀/мл на 2-м пассаже до 9,0 lg ТЦД₅₀/мл на 30-м пассаже), а ЦПД становилось всё более выраженным. При визуальном учёте доля погибших клеток на 5-е сутки после заражения повышалась с увеличением пассажного уровня (рис. 3).

В МТТ-тесте показано, что если при заражении вирусом 2-го пассажа выживаемость клеток Vero составляла 92%, то уже к 14-му пассажу достигала минимального уровня (2–4%) (рис. 4).

Таким образом, адаптированный к культуре клеток Vero штамм SARS-CoV-2 при малых дозах заражения вызывал выраженное ЦПД, которое без труда можно детектировать при микроскопическом исследовании монослоя. На основе созданной индикаторной системы была отработана и апробирована РН. Изучена зависимость значения титра ВНА от дозы заражения клеток. С этой целью сыворотка реконвалесцента COVID-19 с высоким титром антител к вирусу SARS-CoV-2 была исследована в РН при 4 дозах заражения: 200, 100, 50 и 25 ТЦД₅₀

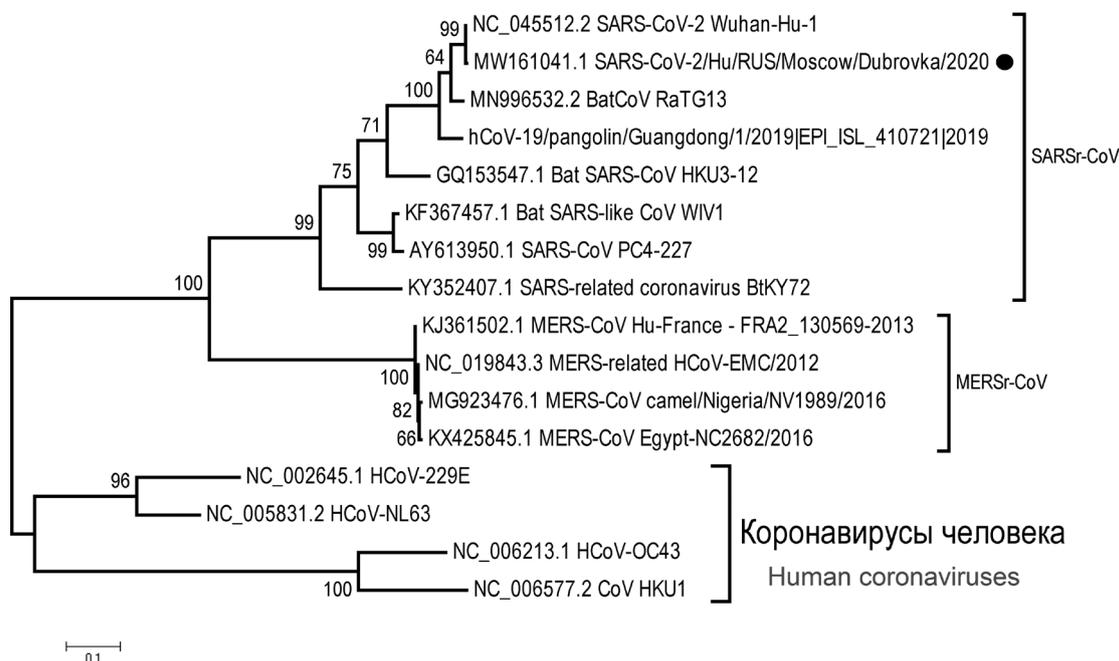


Рис. 2. Дендрограмма, построенная на основе сравнения нуклеотидных последовательностей S-гена (3794 н.) штамма SARS-CoV-2 Dubrovka, коронавирусов, патогенных для человека, и филогенетически родственных им штаммов коронавирусов животных.

В описании штаммов указан идентификационный номер GenBank или GISAID и название штамма. Дерево построено методом максимального правдоподобия и трехпараметрической эволюционной модели «Tamura-Nei» в программе «MEGA 5». Цифры над узлами дендрограммы — доля (в %) из 1000 альтернативных деревьев, поддерживающих данную группу. Штамм Dubrovka отмечен значком •. SARSr-CoV — представители вида Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus; MERSr-CoV — представители вида Middle East respiratory syndrome-related coronavirus.

Fig. 2. The phylogenetic tree built on the comparison of nucleotide sequences of the S-gene (3794) of the SARS-CoV-2 Dubrovka strain, coronaviruses pathogenic for humans and phylogenetically related coronavirus strains of animals.

The description of strains includes the GenBank or GISAID strain identifier and the name of a strain. The tree was built with the maximum likelihood method and Tamura-Nei three-parameter evolution model by using the MEGA 5 program. The numbers above the tree nodes show the proportion (%) of 1,000 alternative trees supporting this group. The Dubrovka strain is marked by the • sign.

SARSr-CoV — representatives of the species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus;
MERSr-CoV — representatives of the species Middle East respiratory syndrome-related coronavirus.

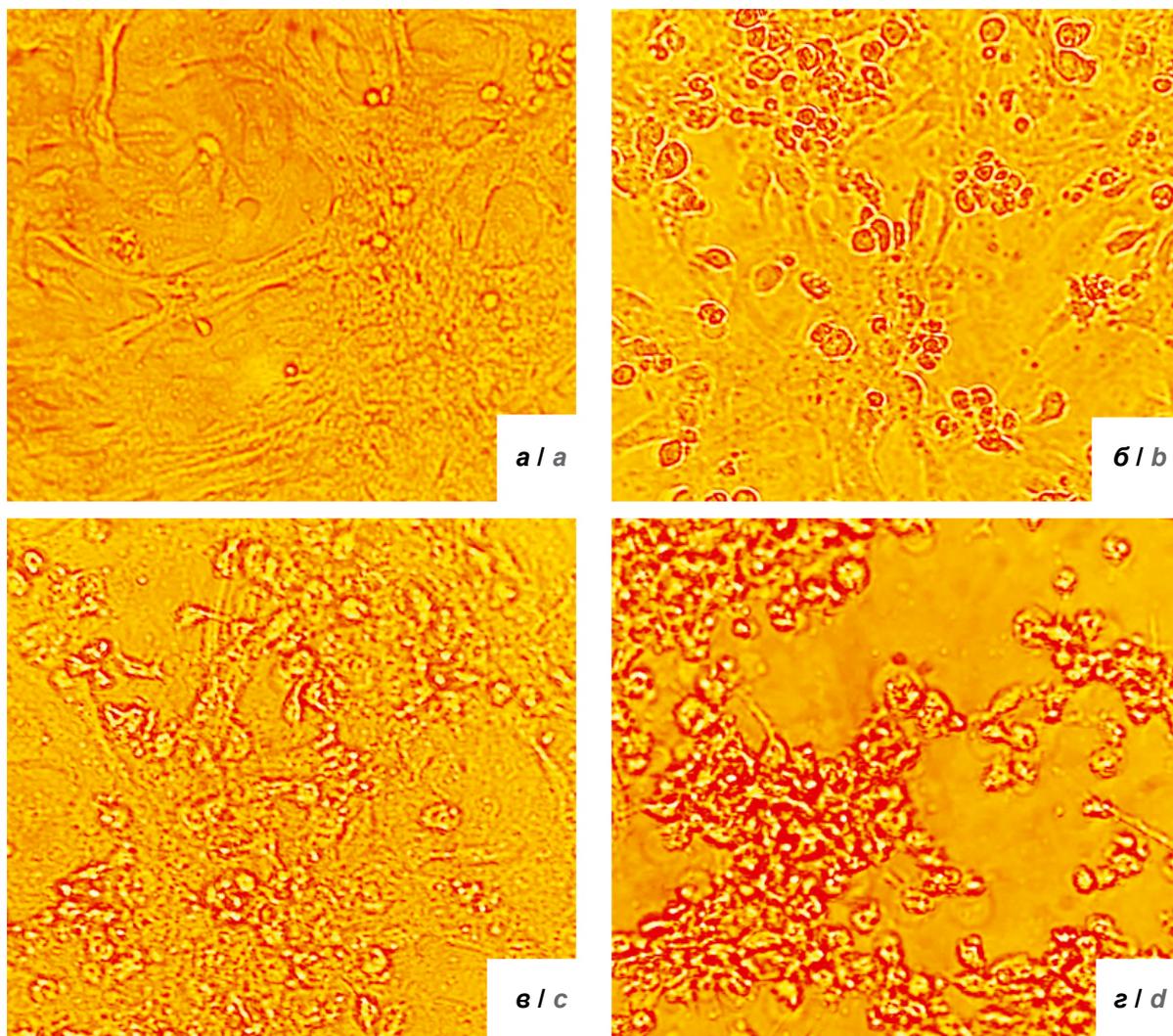


Рис. 3. ЦПД в клетках Vero на 5-е сутки после заражения вирусом разных пассажных уровней.

a — незаражённые клетки; *b* — 2-й пассаж; *c* — 7-й; *d* — 21-й.

Fig. 3. CPE in Vero cells on day 5 post-infection with the virus of different passage levels.

a — uninfected cells; *b* — 2nd passage; *c* — 7th passage; *d* — 21st passage.

на лунку. В результате значения титра ВНА закономерно распределились в обратной зависимости от дозы заражения и составили 160, 320, 640 и 1280 соответственно. В дальнейшей работе мы использовали в РН дозу 100 ТЦД₅₀ на лунку, поскольку в известных нам научных публикациях применялась эта доза [16, 18, 19].

Далее было проведено исследование в РН сывороток крови, охарактеризованных ранее по содержанию антител к SARS-CoV-2. Было исследовано 46 образцов, содержащих IgG антитела к вирусу в диапазоне разведений (титр) от 1 : 200 до >1 : 3200 (рис. 5, *a*). Для контроля специфичности также исследовали 20 сывороток пациентов, не содержащих антитела к SARS-CoV-2. Титры ВНА достоверно коррелировали (Спирмен $r = 0,714$; $p < 0,001$) с титрами, полученными в ИФА. Все сыворотки, охарактеризованные как отрицательные в ИФА, также

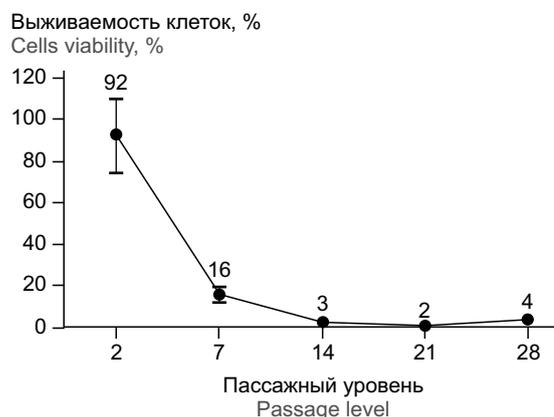


Рис. 4. Выживаемость клеток Vero на 5-е сутки после заражения вирусом в зависимости от пассажного уровня вируса, MOI = 0,0001.

Fig. 4. Viability of Vero cells on day 5 post-infection depending on a passage level of the virus, MOI = 0.0001.

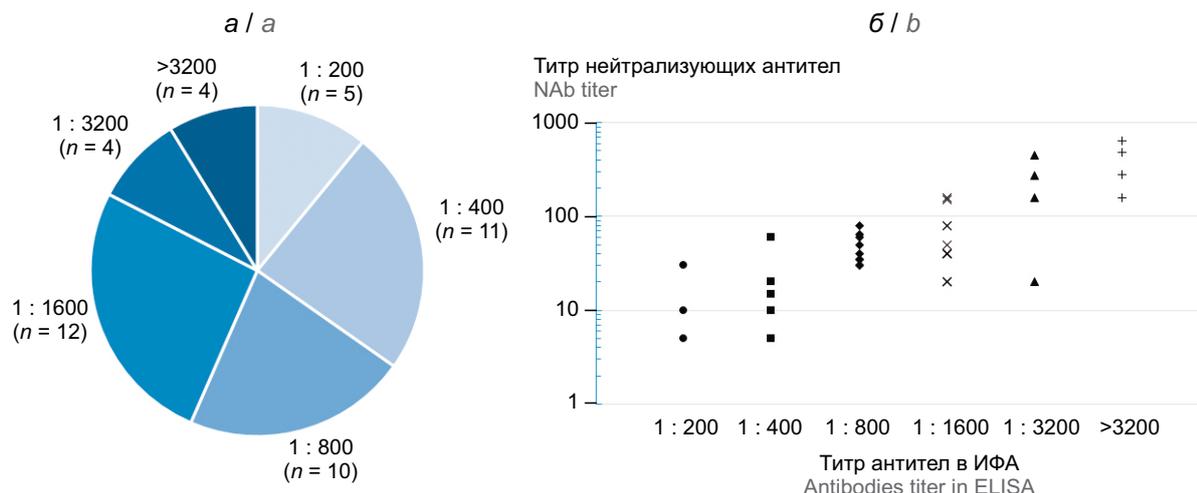


Рис. 5. Распределение сывороток, в которых обнаружены IgG-антитела к SARS-CoV-2, по титрам (предельному разведению сыворотки; а) и корреляционная связь между титрами ВНА и суммарных антител к SARS-CoV-2 в сыворотках крови реконвалесцентов COVID-19 ($n = 46$; б).

Спирмен $r = 0,714$; $p < 0,001$.

Fig. 5. Distribution of sera with detected IgG antibodies against SARS-CoV-2 by titers (the limiting dilution of the serum; а) and correlative relationship between the Nab titers and total antibodies against SARS-CoV-2 in the COVID-19 convalescent sera ($n = 46$; б).

Spearman's $r = 0.714$; $p < 0.001$.

показали полное отсутствие вируснейтрализации. Более половины сывороток с титрами в диапазоне от 1 : 200 до 1 : 400 обладали нейтрализующей активностью; только в одной сыворотке с титром 1 : 800 ВНА обнаружены не были, тогда как все сыворотки с титрами от 1 : 1600 до >1 : 3200 обладали нейтрализующей активностью (рис. 5, б).

Далее были отработаны условия спектрофотометрической детекции результатов РН в тесте МТТ. При постановке РН с последующим окрашиванием МТТ визуальное исследование планшет с

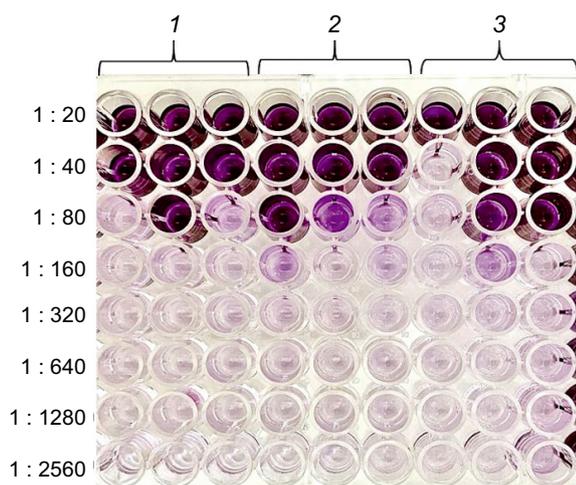


Рис. 6. МТТ-тест для учёта РН.

Цифры 1, 2, 3 сверху означают номер сыворотки; слева указаны значения разведений сывороток.

Fig. 6. MTT assay for NT assessment.

Numbers 1, 2, and 3 at the top mean the serum reference number; the values of serum dilutions are shown on the left.

МТТ показало, что лунки с разведениями сывороток, содержащими защитный титр ВНА, окрашивались в темно-фиолетовый цвет, что полностью согласовывалось с микроскопической оценкой состояния клеток. С увеличением степени разведения сывороток окраска в лунках исчезала, что свидетельствует о гибели клеток при недостаточной для нейтрализации вируса концентрации ВНА. В МТТ-тесте отношение $ОП_{530}$ в лунках с незаражёнными SARS-CoV-2 клетками (КК) к $ОП_{530}$ в заражённых клетках (ВК) в среднем составляло 28 ± 16 , что позволяет надёжно оценивать вирус-опосредованное ЦПД. На рис. 6 представлен пример детекции результатов РН в МТТ-тесте, позволяющий оценить титр ВНА в сыворотке 1 (1 : 40), сыворотках 2 и 3 (1 : 80).

Всего в РН со спектрофотометрической детекцией в МТТ-тесте было исследовано 30 сывороток. В 16 сыворотках реконвалесцентов COVID-19 были выявлены ВНА к SARS-CoV-2 в разных титрах, тогда как 14 серонегативных в ИФА сывороток не содержали ВНА. Данные, полученные при визуальном микроскопическом учёте и в МТТ-тесте (табл. 3), достоверно коррелировали, коэффициент корреляции по Спирмену (r) составил 0,963 ($p < 0,05$), что соответствует весьма высокой связи между признаками по шкале Чеддока.

Обсуждение

Определение нейтрализующих антител к SARS-CoV-2 имеет решающее значение для понимания возможного защитного иммунного ответа. В настоящем исследовании разработаны методичес-

Таблица 3. Сравнение результатов РН при микроскопическом учёте и МТТ-тесте (сыворотки реконвалесценто́в COVID-19)

Table 3. Comparison of NT results from microscopic examination and MTT assay (COVID-19 convalescent sera)

Номер сыворотки Serum number	Титр ВНА / NAb titer	
	микроскопический учет microscopic accounting	МТТ-тест MTT-test
1	640	640
2	640	640
3	20	40
4	20	40
5	20	20
6	20	20
7	40	40
8	20	40
9	20	0
10	80	40
11	40	80
12	80	80
13	320	320
14	1280	1280
15	160	160
16	80	80

кие подходы к оценке титра ВНА к SARS-CoV-2, в основе которых лежит РН с микроскопической либо спектрофотометрической оценкой выживаемости клеток Vero. Оба этих подхода к учёту результата РН возможны при условии получения выраженного ЦПД вируса в культуре клеток.

Вирус SARS-CoV-2, полученный на ранних пассажных уровнях (от 2 до 7), при заражении культуры клеток приводил к округлению и частичной гибели клеток при высоких дозах заражения, тогда как при низких дозах ЦПД было невыраженным, что затрудняет визуальный учёт ЦПД. Длительная адаптация вируса к культуре клеток Vero позволила получить выраженное ЦПД, что не только снижает субъективизм при микроскопическом учёте результата, но и позволяет успешно учитывать результаты РН в колориметрическом тесте МТТ, визуально оценивая окрашенные лунки планшета, либо спектрофотометрически.

Инструментальный учёт обеспечивает получение результата в числовом формате, что позволяет проводить программную статистическую обработку результата и, что немаловажно, снижает нагрузку на органы зрения работника. Преимуществом МТТ-теста является его доступность в использовании: результаты теста можно учитывать с помощью планшетного спектрофотометра, что не требует дорогостоящего оборудования и реагентов для ис-

пользования иных методов определения жизнеспособности клеток [20–22].

В колориметрическом тесте МТТ живые клетки восстанавливают жёлтый раствор метилтиазолилтетразолия бромидом с помощью НАДФ-Н-зависимой оксидоредуктазной системы, что приводит к образованию нерастворимых фиолетовых кристаллов формазана, в то время как в мертвых клетках этого не происходит [21, 22]. В связи с этим МТТ-тест имеет преимущество перед методом оценки выживаемости клеток, основанным на окрашивании клеток кристаллическим фиолетовым, который неизбирательно окрашивает как живые, так и мёртвые клетки [23].

В работе продемонстрирована возможность снижения заражающей дозы вируса при постановке РН в 4 раза — со 100 до 25 ТЦД₅₀ на лунку, что повышает чувствительность РН в 4 раза. Следует отметить, что штамм Dubrovka, хорошо адаптированный к культуре клеток, обеспечивает получение выраженного ЦПД и при более низких дозах заражения (менее 25 ТЦД₅₀ на лунку), что повышает ресурс увеличения чувствительности РН.

Малые разведения исследуемых сывороток (1 : 20 и 1 : 40) могут проявлять цитотоксичность, что снижает точность оценки титра ВНА. Важным условием получения надёжного результата РН, особенно при учёте результатов в тесте МТТ, является взятие крови натощак, что минимизирует вероятность токсического эффекта компонентов сывороток на клетки, и обязательное применение контроля сыворотки (внесение в клетки сыворотки в разведении 1 : 20 без вируса).

Заключение

На основе адаптированного к культуре клеток Vero вируса SARS-CoV-2 разработана система оценки титра ВНА, позволяющая учитывать результат как микроскопически, так и с помощью планшетного спектрофотометра в МТТ-тесте. Колориметрический учёт результата позволяет проводить статистическую обработку получаемых данных, что снижает субъективизм при учёте результата и нагрузку на органы зрения, возникающую при микроскопическом учёте. Таким образом, МТТ-тест представляет собой эффективный, производительный подход к автоматизированному учёту результатов РН. Являясь витальным красителем, МТТ выявляет только живые клетки, что повышает надёжность получаемых результатов по сравнению с другими красителями. Разработанные методические подходы имеют большой потенциал практического применения при определении напряжённости противовирусного иммунитета (естественного и поствакцинального), оценке специфической активности плазмы доноров — реконвалесценто́в COVID-19, применяемой для экстренной профилактики и лечения заболева-

ния, а также при испытаниях вакцин и диагностических тест-систем в качестве «золотого стандарта» определения ВНА.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Deeks J.J., Dinnes J., Takwoingi Y., Davenport C., Spijker R., Taylor-Phillips S., et al. Antibody tests for identification of current and past infection with SARS-CoV-2. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2020; 6(6): CD013652. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD013652>
- Mekonnen D., Mengist H.M., Derbie A., Nibret E., Munshea A., He H., et al. Diagnostic accuracy of serological tests and kinetics of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 antibody: A systematic review and meta-analysis. *Rev. Med. Virol.* 2020; e2181. <https://doi.org/10.1002/rmv.2181>
- Zost S.J., Gilchuk P., Case J.B., Binshtein E., Chen R.E., Nkolola J.P., et al. Potently neutralizing and protective human antibodies against SARS-CoV-2. *Nature.* 2020; 584(7821): 443–9. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2548-6>
- Rogers T.F., Zhao F., Huang D., Beutler N., Burns A., He W.T., et al. Isolation of potent SARS-CoV-2 neutralizing antibodies and protection from disease in a small animal model. *Science.* 2020; 369(6506): 956–63. <https://doi.org/10.1126/science.abc7520>
- Chi X., Yan R., Zhang J., Zhang G., Zhang Y., Hao M., et al. A neutralizing human antibody binds to the N-terminal domain of the Spike protein of SARS-CoV-2. *Science.* 2020; 369(6504): 650–5. <https://doi.org/10.1126/science.abc6952>
- Brown B.L., McCullough J. Treatment for emerging viruses: Convalescent plasma and COVID-19. *Transfus. Apher. Sci.* 2020; 59(3): 102790. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2020.102790>
- Баклаушев В.П., Аверьянов А.В., Сотникова А.Г., Перкина А.С., Иванов А.В., Юсубалиева Г.М. и др. Предварительные итоги исследования безопасности и эффективности плазмы реконвалесцентов в терапии COVID-19. *Клиническая практика.* 2020; 11(2): 38–50. <https://doi.org/10.17816/clinpract35168>
- Vanderheiden A., Edara V.V., Floyd K., Kauffman R.C., Mantus G., Anderson E., et al. Development of a rapid focus reduction neutralization test assay for measuring SARS-CoV-2 neutralizing antibodies. *Curr. Protoc. Immunol.* 2020; 131(1): e116. <https://doi.org/10.1002/cpim.116>
- Tan C.W., Chia W.N., Qin X., Liu P., Chen M.I., Tiu C., et al. A SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test based on antibody-mediated blockage of ACE2-spike protein-protein interaction. *Nat. Biotechnol.* 2020; 38(9): 1073–8. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0631-z>
- Meyer B., Reimerink J., Torriani G., Brouwer F., Godeke G.J., Yerly S., et al. Validation and clinical evaluation of a SARSCoV-2 surrogate virus neutralisation test (sVNT). *Emerg. Microbes Infect.* 2020; 9(1): 2394–403. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1835448>
- Nie J., Li Q., Wu J., Zhao C., Hao H., Liu H., et al. Establishment and validation of a pseudovirus neutralization assay for SARS-CoV-2. *Emerg. Microbes Infect.* 2020; 9(1): 680–6. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1743767>
- Schmidt F., Weisblum Y., Muecksch F., Hoffmann H.H., Michailidis E., Lorenzi J.C.C., et al. Measuring SARS-CoV-2 neutralizing antibody activity using pseudotyped and chimeric viruses. *J. Exp. Med.* 2020; 217(11): e20201181. <https://doi.org/10.1084/jem.20201181>
- Brouwer P.J.M., Caniels T.G., van der Straten K., Snitselaar J.L., Aldon Y., Bangaru S., et al. Potent neutralizing antibodies from COVID-19 patients define multiple targets of vulnerability. *Science.* 2020; 369(6504): 643–50. <https://doi.org/10.1126/science.abc5920>
- Liu L., Wang P., Nair M.S., Yu J., Rapp M., Wang Q., et al. Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike. *Nature.* 2020; 584(7821): 450–6. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2571-7>
- Chan J.F., Yip C.C., To K.K., Tang T.H., Wong S.C., Leung K.H., et al. Improved molecular diagnosis of COVID-19 by the novel, highly sensitive and specific COVID-19-RdRp/Hel real-time reverse transcription-PCR assay validated in vitro and with clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 2020; 58(5): e00310-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.00310-20>
- Ramakrishnan M.A. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World J. Virol.* 2016; 5(2): 85–6. <https://doi.org/10.5501/wjv.v5.i2.85>
- Gao Q., Bao L., Mao H., Wang L., Xu K., Yang M., et al. Development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2. *Science.* 2020; 369(6499): 77–81. <https://doi.org/10.1126/science.abc1932>
- Logunov D.Y., Dolzhikova I.V., Zubkova O.V., Tukhvatulin A.I., Shcheblyakov D.V., Dzharullaeva A.S., et al. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia. *Lancet.* 2020; 396(10255): 887–97. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31866-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31866-3)
- Chan J.F., Zhang A.J., Yuan S., Poon V.K., Chan C.C., Lee A.C., et al. Simulation of the clinical and pathological manifestations of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in a golden Syrian hamster model: implications for disease pathogenesis and transmissibility. *Clin. Infect. Dis.* 2020; 71(9): 2428–46. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa325>
- Haddad E.E., Whitfill C.E., Ricks C.A., Fredericksen T., Rowe D., Owen L., et al. Adaptation of the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay for the determination of virus-neutralizing antibodies using the virus-neutralization assay. *Avian Dis.* 1994; 38(4): 755–61.
- Müller J.A., Harms M., Schubert A., Mayer B., Jansen S., Herbeuval J.P., et al. Development of a high-throughput colorimetric Zika virus infection assay. *Med. Microbiol. Immunol.* 2017; 206(2): 175–85. <https://doi.org/10.1007/s00430-017-0493-2>
- Heldt C.L., Hernandez R., Mudiganti U., Gurgel P.V., Brown D.T., Carbonell R.G. A colorimetric assay for viral agents that produce cytopathic effects. *J. Virol. Methods.* 2006; 135(1): 56–65. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.01.022>
- Feoktistova M., Geserick P., Leverkus M. Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2016; 2016(4): pdb.prot087379. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087379>

REFERENCES

- Deeks J.J., Dinnes J., Takwoingi Y., Davenport C., Spijker R., Taylor-Phillips S., et al. Antibody tests for identification of current and past infection with SARS-CoV-2. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2020; 6(6): CD013652. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD013652>
- Mekonnen D., Mengist H.M., Derbie A., Nibret E., Munshea A., He H., et al. Diagnostic accuracy of serological tests and kinetics of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 antibody: A systematic review and meta-analysis. *Rev. Med. Virol.* 2020; e2181. <https://doi.org/10.1002/rmv.2181>
- Zost S.J., Gilchuk P., Case J.B., Binshtein E., Chen R.E., Nkolola J.P., et al. Potently neutralizing and protective human anti-

- bodies against SARS-CoV-2. *Nature*. 2020; 584(7821): 443–9. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2548-6>
4. Rogers T.F., Zhao F., Huang D., Beutler N., Burns A., He W.T., et al. Isolation of potent SARS-CoV-2 neutralizing antibodies and protection from disease in a small animal model. *Science*. 2020; 369(6506): 956–63. <https://doi.org/10.1126/science.abc7520>
 5. Chi X., Yan R., Zhang J., Zhang G., Zhang Y., Hao M., et al. A neutralizing human antibody binds to the N-terminal domain of the Spike protein of SARS-CoV-2. *Science*. 2020; 369(6504): 650–5. <https://doi.org/10.1126/science.abc6952>
 6. Brown B.L., McCullough J. Treatment for emerging viruses: Convalescent plasma and COVID-19. *Transfus. Apher. Sci.* 2020; 59(3): 102790. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2020.102790>
 7. Baklaushev V.P., Aver'yanov A.V., Sotnikova A.G., Perkina A.S., Ivanov A.V., Yusubalieva G.M., et al. Safety and efficacy of convalescent plasma for COVID-19: the preliminary results of a clinical trial. *Klinicheskaya praktika*. 2020; 11(2): 38–50. <https://doi.org/10.17816/clinpract35168> (in Russian)
 8. Vanderheiden A., Edara V.V., Floyd K., Kauffman R.C., Mantus G., Anderson E., et al. Development of a rapid focus reduction neutralization test assay for measuring SARS-CoV-2 neutralizing antibodies. *Curr. Protoc. Immunol.* 2020; 131(1): e116. <https://doi.org/10.1002/cpim.116>
 9. Tan C.W., Chia W.N., Qin X., Liu P., Chen M.I., Tiu C., et al. A SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test based on antibody-mediated blockage of ACE2-spike protein-protein interaction. *Nat. Biotechnol.* 2020; 38(9): 1073–8. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0631-z>
 10. Meyer B., Reimerink J., Torriani G., Brouwer F., Godeke G.J., Yerly S., et al. Validation and clinical evaluation of a SARS-CoV-2 surrogate virus neutralisation test (sVNT). *Emerg. Microbes Infect.* 2020; 9(1): 2394–403. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1835448>
 11. Nie J., Li Q., Wu J., Zhao C., Hao H., Liu H., et al. Establishment and validation of a pseudovirus neutralization assay for SARS-CoV-2. *Emerg. Microbes Infect.* 2020; 9(1): 680–6. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1743767>
 12. Schmidt F., Weisblum Y., Muecksch F., Hoffmann H.H., Michailidis E., Lorenzi J.C.C., et al. Measuring SARS-CoV-2 neutralizing antibody activity using pseudotyped and chimeric viruses. *J. Exp. Med.* 2020; 217(11): e20201181. <https://doi.org/10.1084/jem.20201181>
 13. Brouwer P.J.M., Caniels T.G., van der Straten K., Snitselaar J.L., Aldon Y., Bangaru S., et al. Potent neutralizing antibodies from COVID-19 patients define multiple targets of vulnerability. *Science*. 2020; 369(6504): 643–50. <https://doi.org/10.1126/science.abc5902>
 14. Liu L., Wang P., Nair M.S., Yu J., Rapp M., Wang Q., et al. Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike. *Nature*. 2020; 584(7821): 450–6. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2571-7>
 15. Chan J.F., Yip C.C., To K.K., Tang T.H., Wong S.C., Leung K.H., et al. Improved molecular diagnosis of COVID-19 by the novel, highly sensitive and specific COVID-19-RdRp/Hel real-time reverse transcription-PCR assay validated in vitro and with clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 2020; 58(5): e00310-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.00310-20>
 16. Ramakrishnan M.A. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World J. Virol.* 2016; 5(2): 85–6. <https://doi.org/10.5501/wjv.v5.i2.85>
 17. Gao Q., Bao L., Mao H., Wang L., Xu K., Yang M., et al. Development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2. *Science*. 2020; 369(6499): 77–81. <https://doi.org/10.1126/science.abc1932>
 18. Logunov D.Y., Dolzhenko I.V., Zubkova O.V., Tukhvatulin A.I., Shcheblyakov D.V., Dzharullaeva A.S., et al. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia. *Lancet*. 2020; 396(10255): 887–97. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31866-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31866-3)
 19. Chan J.F., Zhang A.J., Yuan S., Poon V.K., Chan C.C., Lee A.C., et al. Simulation of the clinical and pathological manifestations of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in a golden Syrian hamster model: implications for disease pathogenesis and transmissibility. *Clin. Infect. Dis.* 2020; 71(9): 2428–46. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa325>
 20. Haddad E.E., Whitfill C.E., Ricks C.A., Fredericksen T., Rowe D., Owen L., et al. Adaptation of the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay for the determination of virus-neutralizing antibodies using the virus-neutralization assay. *Avian Dis.* 1994; 38(4): 755–61.
 21. Müller J.A., Harms M., Schubert A., Mayer B., Jansen S., Herbeuval J.P., et al. Development of a high-throughput colorimetric Zika virus infection assay. *Med. Microbiol. Immunol.* 2017; 206(2): 175–85. <https://doi.org/10.1007/s00430-017-0493-2>
 22. Heldt C.L., Hernandez R., Mudiganti U., Gurgel P.V., Brown D.T., Carbonell R.G. A colorimetric assay for viral agents that produce cytopathic effects. *J. Virol. Methods*. 2006; 135(1): 56–65. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.01.022>
 23. Feoktistova M., Geserick P., Leverkus M. Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2016; 2016(4): pdb.prot087379. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087379>

Информация об авторах

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

Корчевая Екатерина Романовна — м.н.с. лаб. молекулярной вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6417-3301>

Кудряшова Александра Михайловна — н.с. лаб. медицинской биотехнологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-2575-0898>

Борисова Ольга Васильевна — к.х.н., зав. лаб. медицинской биотехнологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7664-2945>

Петруша Ольга Александровна — м.н.с. лаб. молекулярной вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5022-7962>

Information about the authors

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

Ekaterina R. Korchevaya — junior researcher, Laboratory of molecular virology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6417-3301>

Alexandra M. Kudryashova — researcher, Laboratory of medical biotechnology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-2575-0898>

Olga V. Borisova — Cand. Sci. (Chem.), Head, Laboratory of medical biotechnology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7664-2945>

Olga A. Petrusheva — junior researcher, Laboratory of molecular virology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5022-7962>

Смирнова Дарья Ильинична — м.н.с. лаб. молекулярной вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7325-0834>

Чернышова Ирина Николаевна — с.н.с. лаб. биосинтеза иммуноглобулинов НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5053-2433>

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

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>

Файзулов Евгений Бахтиерович[✉] — к.б.н., зав. лаб. молекулярной вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, faizuloev@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7385-5083>

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 24.02.2021;
принята к публикации 07.04.2021;
опубликована 25.05.2021

Daria I. Smirnova — junior researcher, Laboratory of molecular virology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7325-0834>

Irina N. Chernyshova — senior researcher, Laboratory biosynthesis of immunoglobulins, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5053-2433>

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

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

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

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 24.02.2021;
accepted for publication 07.04.2021;
published 25.05.2021