

<https://doi.org/10.31631/2073-3046-2022-21-4-103-112>

Разработка иммуноферментной системы для выявления специфических IgG к коронавирусу SARS-COV-2 методом иммунного блоттинга в формате «line blot»

С. Г. Марданлы^{*1,2}, Т. В. Попова²

¹ ФГАОУ ВО Государственный гуманитарно-технологический университет, г. Орехово-Зуево

² ЗАО «ЭКОлаб», г. Электрогорск, Московская обл.

Резюме

Актуальность. Проблема своевременной и эффективной диагностики COVID-19 остается одной из основных проблем, стоящих перед здравоохранением. В связи с этим задача разработки тест-систем для этиологической диагностики COVID-19 сохраняет свою исключительную актуальность. **Цель.** Разработка иммуноферментной тест-системы для выявления специфических иммуноглобулинов класса G к коронавирусу SARS-COV-2 методом иммунного блоттинга в формате «line blot». **Методы.** Отработка технологических приемов получения компонентов тест-системы и предварительная оценка ее диагностической эффективности при исследовании сывороток крови пациентов с COVID-19, проходивших лечение в Первой Градской больнице имени Н. И. Пирогова Москвы, и сывороток здоровых доноров. **Результаты.** Исследование 104 образцов сыворотки крови больных COVID-19 и 100 образцов сыворотки крови здоровых доноров, предварительно протестированных методом ИФА на наличие IgG к SARS-CoV-2 при помощи тест-систем «Vitrotest SARS-CoV-2 IgG» фирмы «Vitrotest» (Украина) и «ИФА-SARS-CoV-2-AT-G» фирмы ЗАО «ЭКОлаб» (Россия), показало высокую диагностическую эффективность новой отечественной тест-системы. **Заключение.** Новая тест-система после прохождения процедуры государственной регистрации медицинского изделия может быть рекомендована в качестве подтверждающего теста при этиологической лабораторной диагностике COVID-19.

Ключевые слова: COVID-19, SARS-CoV-2, лабораторная диагностика, разработка, тест-система, лайн-блот

Конфликт интересов не заявлен.

Для цитирования: Марданлы С. Г., Попова Т. В. Разработка иммуноферментной системы для выявления специфических IgG к коронавирусу SARS-COV-2 методом иммунного блоттинга в формате «line blot». Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2022;21(4): 103-112. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2022-21-4-103-112>

The Development of ELISA-test System for Detection of Specific IgG to SARS-COV-2 Coronavirus by Immunoblotting (Line Blot)

SG Mardanly^{*1,2}, TV Popova²

¹ State University of Humanities and Technology, Orekhovo-Zuevo, Russia

² Closed Joint Stock Company EKOlabor (CJSC EKOlabor), Elektrogorsk, Moscow region, Russia

Abstract

Relevance. The problem of timely and effective diagnosis of COVID-19 remains one of the main problems facing healthcare. In this regard, the task of developing test systems for the etiological diagnosis of COVID-19 remains extremely relevant.

Purpose To develop ELISA test system for detection of G specific immunoglobulins to SARS-COV-2 coronavirus by immunoblotting (Line Blot). **Methods.** Elaboration of techniques for obtaining test components and preliminary assessment of its diagnostic effectiveness in blood serums from COVID-19 patients treated at N. I. Pirogov First Gratsky Hospital, Moscow, and serums from healthy human donors. **Results.** The study of 104 blood serum samples from COVID-19 patients and 100 blood serum samples from

* Для переписки: Марданлы Сейфаддин Гашимович, д. м. н., академик Российской академии медико-технических наук; профессор кафедры фармакологии и фармацевтических дисциплин ГГТУ; директор по науке ЗАО «ЭКОлаб». 142530, Московская обл., г. Электрогорск, ул. Буденного, д. 1-1а. +7 (909) 992- 14-94, ekolab-president@mail.ru. ©Марданлы С. Г. и др.

** For correspondence: Mardanly Seyfaddin G., Dr. Sci. (Med.), Academician of the Russian Academy of Medical Technical Sciences; Science Director, CJSC EKOlabor. 1-1a Budyonnogo St., Elektrogorsk, Moscow region, 142530, Russia. +7 (909) 992- 14-94, ekolab-president@mail.ru. ©Mardanly SG, et al.

healthy human donors, pre-tested by ELISA IgG to SARS-CoV-2 using «Vitrotest SARS-CoV-2 IgG» test systems (Vitrotest, Ukraine) and «ELISA-SARS-CoV-2-AB-G» (CJSC EKOlub, Russia) showed high diagnostic efficiency of the new test system. **Conclusion.** The new test system after state registration of the medical device can be recommended as a confirmatory test for the etiological laboratory diagnosis of COVID-19.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, laboratory diagnostics, development, test system, Line-Blot
No conflict of interest to declare.

For citation: Mardany SG, Popova TV. The Development of ELISA-test System for detection of specific IgG to SARS-CoV-2 Coronavirus by Immunoblotting (Line Blot). *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2022;21(4): 103-112 (In Russ.). <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2022-21-4-103-112>

Введение

В конце 2019 г. человечество столкнулось с новой коронавирусной инфекцией. По официальным данным, она вначале вызвала вспышку в китайской провинции Хубэй, которая затем переросла в пандемию, захватившую все регионы Земли. С 11.02.2020 г. ВОЗ присвоила ей название COVID-19 (Coronavirus disease 2019), а возбудитель получил название SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2) [1].

В настоящее время одной из основных проблем, стоящих перед здравоохранением в связи с этой пандемией, остается своевременная и эффективная диагностика инфекции и прогнозирование течения и исходов ее манифестных форм, в связи с чем задача разработки тест-систем для этиологической диагностики COVID-19 сохраняет свою исключительную актуальность.

В методических рекомендациях ВОЗ по профилактике, диагностике и лечению COVID-19 [2] и в соответствующих документах национальных органов здравоохранения (см., например, Временные методические рекомендации МЗ РФ [1]) отмечается, что основное значение для этиологической лабораторной диагностики этой инфекции имеет выявление РНК SARS-CoV-2 методом амплификации нуклеиновых кислот, а иммунохимические методы, в частности, для выявления антигена SARS-CoV-2 и иммуноглобулинов IgA, IgM и IgG к SARS-CoV-2, являются только дополнительными к комплексу молекулярно-генетических методов исследования.

Такая трактовка, неоправданно занижающая значение иммунохимических методов, разделяется не всеми исследователями. Ряд авторов считают, что выявление специфических антител может иметь важное значение для объективной оценки тяжести заболевания, для понимания кинетики иммунного ответа на инфекцию и его связи с тяжестью и длительностью заболевания, для уточнения связи уровня антител с выработкой невосприимчивости к возбудителю, для диагностики и сортировки пациентов, обращающихся за медицинской помощью на более поздних стадиях заболевания, для отслеживания контактов и проведения сероэпидемиологических исследований, дающих представление о степени распространения COVID-19 [3–6]. Для выявления специфических

антител в настоящее время могут быть использованы методы иммуноферментного, а также иммунохемилюминесцентного анализа (ИФА и ИХЛА). И уже по состоянию на 25.08.2020 г. в Российской Федерации был зарегистрирован 51 набор реагентов для выявления специфических иммуноглобулинов к SARS-CoV-2 методами ИФА и ИХЛА [1].

Такое количество диагностических тестов, как указывают Antonio La Marca с соавт. [7], можно считать прямым ответом на экспоненциально разрастающуюся с развитием пандемии потребность в диагностике для обеспечения массового скрининга и тестирования групп высокого риска, а также для получения надежных данных о распространении инфекции. Но оно же явилось неизбежной причиной нередких расхождений в оценках одних и тех же образцов, полученных в разных лабораториях и при использовании тестов различных производителей по причине различий в технологиях производства и применения этих тестов [8–10]. Это существенно осложняет практическое использование средств диагностики, поскольку сегодня для повышения диагностической эффективности исследования его необходимо выполнять на нескольких тест-системах различных производителей с обязательным использованием парных сывороток, полученных с интервалом в одну–две недели.

Однако задача повышения эффективности лабораторной диагностики COVID-19 может быть решена, по нашему мнению, и менее экстенсивным путем – за счет более широкого использования преимуществ одной из последних модификаций ИФА – иммунного блоттинга (ИБ), позволяющего выявлять специфические иммуноглобулины к отдельным антигенам возбудителя.

Один из форматов ИБ, «Line Blot» (Лайн-блот, ЛБ), при котором на стрипы иммуносорбента в виде поперечных линий наносятся конкретные антигены возбудителя (или их рекомбинантные аналоги), предварительно охарактеризованные по их антигенной специфичности, позволяет делать заключение о наличии/отсутствии соответствующих специфических иммуноглобулинов без обязательного использования дополнительных диагностических тестов. При этом число тестов для ИБ, разработанных и внедренных в практику лабораторной диагностики COVID-19, несопоставимо

меньше числа соответствующих тестов для ПЦР-диагностики, ИФА в классических форматах и ИХЛА – так, в Российской Федерации до сих пор не зарегистрирован ни один тест для диагностики COVID-19, работающий на принципе ИБ. По этой причине разработка и внедрение в практику здравоохранения новых тест-систем для этиологической диагностики COVID-19 с использованием ИБ представляется достаточно актуальной.

Цель исследования – разработка и предварительные испытания диагностической эффективности нового набора реагентов для *in vitro* диагностики иммуноферментной тест-системы для выявления IgG к возбудителю COVID-19 методом ИБ в формате ЛБ*. Работа выполнена на основе опыта аналогичных исследований, накопленного в ЗАО «ЭКОлаб» при создании и производстве иммуноферментных тест-систем для диагностики ряда бактериальных и вирусных инфекций [12–16].

Материалы и методы

Для получения иммуносорбента использовали следующие рекомбинантные антигены SARS-CoV-2:

- полноразмерный нуклеокапсидный антиген, фирма «MyBioSource» (США), «Диапроф» (Украина), «Vitrotest» (Украина);
- RBD-антиген (Receptor-binding domain – рецептор-связывающий домен) S1-субъединицы spike-белка, фирма «MyBioSource» (США), «HyTest» (Финляндия);
- оболочечный антиген, фирма «MyBioSource» (США), «Диапроф» (Украина);
- мембранный антиген, фирма «ProSpec» (США), «Диапроф» (Украина).
- В качестве твердой фазы использовали нитроцеллюлозную мембрану с диаметром пор 0,45 мкм, фирма «GVS» (США).
- Для нанесения контрольных линий на иммуносорбент использовали:
- рекомбинантный антиген 2H-TRX фирмы ЗАО «ЭКОлаб», не содержащий антигенные детерминанты SARS-CoV-2, для контроля специфичности реакции;
- козы антигела против IgG человека фирмы ЗАО «ЭКОлаб» для контроля внесения образца;
- IgG человека фирмы АО НПО «Микроген» – для контроля внесения конъюгата.

Для проведения анализа методом ИБ были использованы:

- конъюгат козьих антител к IgG человека со щелочной фосфатазой фирмы «Jackson ImmunoResearch» (США) в сравнении с конъюгатом мышинных антител к IgG человека с пероксидазой хрена, фирма ЗАО «ЭКОлаб»;
- субстратный раствор BCIP/NBT (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/Nitro Blue Tetrazolium)

фирмы «Kem-En-Tec» (Дания) или субстратный раствор SeramunBlau for HRP фирмы «Seramun Diagnostica GmbH» (Германия).

В качестве положительного по наличию маркеров COVID-19 клинического материала использовали 104 сыворотки крови пациентов с COVID-19, проходивших лечение в Первой Градской больнице имени Н. И. Пирогова Москвы (диагноз был верифицирован путем обнаружения РНК SARS-CoV-2 методом ПЦР в назофарингеальных мазках).

Перед проведением исследования методом ИБ все образцы были протестированы методом ИФА на наличие IgG к SARS-CoV-2 при помощи тест-систем «Vitrotest SARS-CoV-2 IgG» фирмы «Vitrotest» (Украина), сконструированной с использованием нуклеокапсидного антигена SARS-CoV-2, и «ИФА-SARS-CoV-2-AT-G» фирмы ЗАО «ЭКОлаб», разработанной с использованием RBD-антигена SARS-CoV-2).

В качестве отрицательного по наличию маркеров COVID-19 клинического материала использовали 100 сывороток крови здоровых доноров, отобранных в 2018 г. и хранившихся при температуре минус 70 °С.

Результаты и обсуждение

Работа выполнена на основе опыта аналогичных исследований, накопленного в ЗАО «ЭКОлаб» при создании и производстве иммуноферментных тест-систем для диагностики ряда бактериальных и вирусных инфекций [12–16].

В процессе разработки были решены следующие задачи:

- проведен обзор литературы с целью выбора наиболее иммуногенных антигенов SARS-CoV-2 для приготовления иммуносорбента;
- отработаны условия нанесения (сорбции) антигенных и контрольных линий на нитроцеллюлозную мембрану и выбраны оптимальные сорбционные разведения;
- подобран состав реагентов для проведения анализа методом ИБ;
- оптимизирован протокол проведения анализа (время инкубаций, разведение образца);
- оценена чувствительность и специфичность разработанной тест-системы.

Самым важным этапом разработки стал выбор антигенов, специфичных SARS-CoV-2, для приготовления иммуносорбента.

Согласно литературным данным, геном коронавируса кодирует четыре основных структурных белка (антигена): белок нуклеокапсид (nucleocapsid, N), белок шипа (spike, S), белок мембраны (membrane, M) и белок оболочки (envelope, E), все из которых необходимы для получения полноценной вирусной частицы.

N-антиген является структурным компонентом спирального нуклеокапсид и играет важную роль в патогенезе вируса, репликации и упаковке РНК. Данный антиген является наиболее

* Настоящая работа является очередной в цикле исследований, посвященных серологической диагностике COVID-19 и начатым разработкой ИФТС для выявления специфических IgG к возбудителю этой инфекции [11].

консервативным по сравнению с другими белками вируса [17–19].

S-антиген играет ключевую роль в развитии инфекции и патогенезе вируса [20]. Он состоит из субъединиц S1 и S2. S1 содержит N-концевой домен (N-terminal domain, NTD) и рецептор-связывающий домен (receptor-binding domain, RBD), тогда как S2 содержит гептадные повторы 1 и 2 (heptad repeats HR1, HR2). При проникновении вируса в клетку RBD связывается с ангиотензин-превращающим ферментом 2 (angiotensin converting enzyme 2, ACE2), что приводит к запуску конформационных изменений в S-белке, ведущих к слиянию мембран, опосредованному через HR1 и HR2. Этот процесс завершается проникновением вируса в клетку-мишень. В отличие от других структурных белков, S-антиген является важной мишенью для индукции антител. Причем было установлено, что именно к RBD в организме человека, инфицированного SARS-CoV-2, вырабатываются вирус-нейтрализующие антитела [21,22].

Мембранный антиген представляет собой интегрированный в мембрану белок, который в процессе размножения вируса взаимодействует с нуклеокапсидным и S-белком [23,24] и играет центральную роль в морфогенезе и сборке вируса. М-антиген вызывает сильный гуморальный ответ, что может быть использовано при разработке вакцин против коронавирусов [25].

Оболочечный антиген является самым маленьким из основных структурных белков. Во время репликации он обильно экспрессируется внутри инфицированной клетки, но лишь небольшая часть включается в оболочку вириона. Е-антиген участвует в сборке и высвобождении вирионов [26].

Для конструирования тест-системы были выбраны все 4 структурных антигена SARS-CoV-2 поскольку, очевидно, все они играют важную роль в инфекционном процессе и индуцируют гуморальный ответ. Причем в случае с S-антигеном был выбран его фрагмент – RBD, как индуктор выработки вируснейтрализующих антител, поскольку выявление таких антител имеет важное значение в оценке иммунного статуса пациента.

Отработку условий получения иммуносорбента проводили на сорбционной машине фирмы «BioDot» (США), позволяющей в автоматическом режиме наносить отдельные линии на нитроцеллюлозную мембрану. Экспериментальным путем были подобраны следующие условия:

- 1) предварительная 20-минутная блокировка нитроцеллюлозных мембран перед сорбцией в фосфатно-солевом буферном растворе снижает появление неспецифических сигналов при исследовании заведомо отрицательных образцов сыворотки крови;
- 2) оптимальная продолжительность сорбции антигенов и контрольных линий на мембрану (она составила 22 часа). Менее продолжительная сорбция приводила к снижению активности

иммуносорбента, а более длительная – не давала усиления сигнала;

- 3) оптимальными условиями внешней среды для процесса сорбции являются температура воздуха 2-8 °С и влажность не более 60%. При повышении температуры и влажности ухудшается качество антигенных и контрольных линий;
- 4) 60-минутное блокирование мембран после сорбции в фосфатно-солевом буферном растворе, содержащем 10% бычьего сывороточного альбумина (БСА), значительно улучшает специфичность иммуносорбента.

С целью получения иммуносорбента были протестированы рекомбинантные антигены SARS-CoV-2 разных производителей. Каждый антиген разводили до разных конечных концентраций (от 0,01 мг/мл до 0,1 мг/мл) и наносили полученные разведения в виде отдельных линий на нитроцеллюлозную мембрану. После сорбции мембраны нарезали на отдельные тест-полоски (стрипы) и исследовали методом ИБ с использованием заведомо положительных и отрицательных сывороток крови человека. Критерием выбора оптимальной сорбционной концентрации служила хорошая чувствительность при отсутствии неспецифических сигналов.

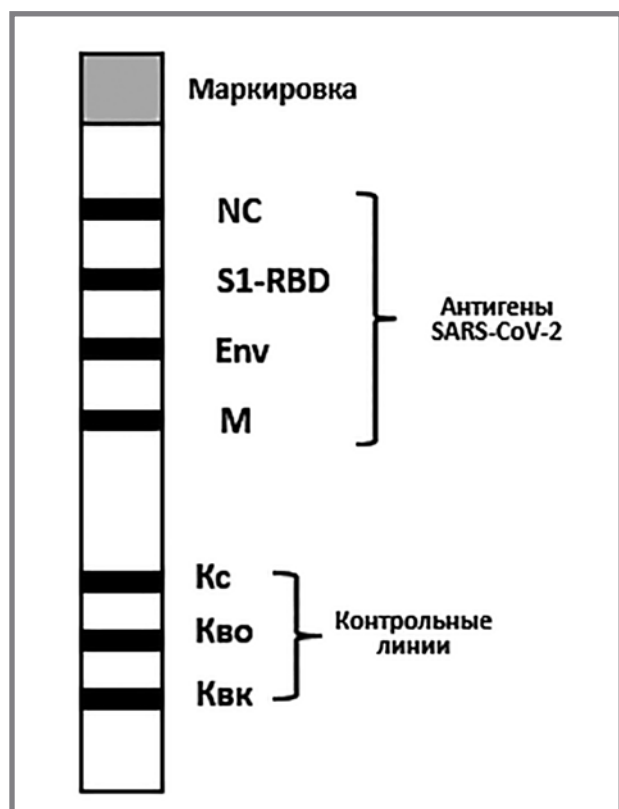
На основании анализа полученных результатов в отношении чувствительности и специфичности иммуносорбента было установлено:

- 1) нуклеокапсидные антигены всех исследованных производителей (фирмы «MyBioSource» (США), «Диапроф» (Украина), «Vitrotest» (Украина) обладают сопоставимо хорошей активностью и обеспечивают высокую чувствительность и специфичность иммуносорбента;
- 2) RBD-антигены обоих исследованных производителей (фирмы «MyBioSource» (США), «HyTest» (Финляндия) обладают сопоставимо хорошей активностью и обеспечивают высокую чувствительность и специфичность иммуносорбента;
- 3) оболочечный антиген фирмы «MyBioSource» (США) значительно лучше по соотношению чувствительность/специфичность, чем аналогичный антиген фирмы «Диапроф» (Украина);
- 4) мембранный антиген фирмы «Диапроф» (Украина) превосходит по соотношению чувствительность/специфичность аналогичный антиген фирмы «ProSpec» (США).

Следующим этапом разработки стал подбор состава реагентов для проведения анализа методом ИБ.

Были исследованы конъюгаты антител к IgG человека с разными ферментными метками (конъюгат козьих поликлональных антител со щелочной фосфатазой и конъюгат мышинных моноклональных антител с пероксидазой хрена) и соответствующие каждой метке субстратные растворы. По результатам проведенных испытаний значительной разницы по чувствительности и специфичности выявлено не было. Однако при использовании фосфатазного конъюгата в паре с субстратным раствором BCIP/

Рисунок 1. Стандартная схема нанесения антигенов SARS-CoV-2 и контрольных линий на стрип
Figure 1. Standard scheme for applying SARS-CoV-2 antigens and control lines to the strip



NBT окрашивание антигенных и контрольных линий при исследовании положительных образцов было более четким, в связи с чем выбор был сделан в пользу данных реагентов.

Относительно состава разводящего и промывающего растворов было установлено, что использование в качестве основы трис-солевого буферного раствора (ТСБР) предпочтительнее, чем фосфатно-солевого буферного раствора по причине лучшей специфичности. При этом обязательным оказалось добавление в ТСБР белковых компонентов (сухого молока и лизата обработанных ультразвуком клеток *E. coli*) для снижения вероятности появления неспецифических сигналов.

Далее был отработан протокол проведения анализа. Экспериментальным путем было установлено оптимальное время инкубации стрипов иммуносорбента с исследуемым образцом (оно составило 1 ч 30 мин), с конъюгатом (1 ч), с субстратным раствором (10 мин). Было подобрано количество промывок между стадиями (оно составило 3 раза

по 5 мин). Было выбрано оптимальное разведение образца (оно составило 1:50).

Итогом разработки стала тест-система «Лайн-Блот-SARS-CoV-2-AT-G» следующего состава:

- Иммуносорбент – полоски (стрипы) из нитроцеллюлозной мембраны с нанесенными на них в виде отдельных поперечных полос рекомбинантными антигенами SARS-CoV-2 (рис. 1):
- NC (nucleocapsid antigen – ядерный антиген),
- S1-RBD (S1 субъединица spike-антигена шипов оболочки, несущая рецептор-связывающий домен),
- Env (envelope antigen – оболочечный антиген),
- M (membrane antigen – мембранный антиген);
- контрольные линии:
 - рекомбинантным антигеном, не содержащим антигенные детерминанты SARS-CoV-2
 - для контроля специфичности реакции (Kc);
 - козьими антителами против IgG человека – для контроля внесения образца (Kво);
 - IgG человека – для контроля внесения конъюгата (Квк).
- Контрольный отрицательный образец (K⁻) – сыворотка крови человека, не содержащая антитела к SARS-CoV-2, инактивированная.
- Контрольный положительный образец (K⁺) – сыворотка крови человека, содержащая антитела класса G к SARS-CoV-2, инактивированная.
- Раствор для разведения образцов (РРО).
- 5-кратный концентрат промывочного раствора [ПР(x5)].
- Конъюгат – козы антитела против IgG человека, конъюгированные со щелочной фосфатазой.
- Окрашивающий раствор – раствор 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфата и нитроглубого тетразолия.

Результаты исследования учитываются только при условии соответствия окраски полос контрольных образцов требованиям, представленным в таблице 1.

Результаты исследования образцов интерпретируются следующим образом:

- положительный результат (+) – выявлены антитела к NC-антигену и/или к S1-RBD-антигену, независимо от наличия или отсутствия антител к антигенам Env и M;
- неопределенный результат (+/-) – выявлены антитела к антигенам Env и/или M;
- отрицательный результат (-) – не выявлены антитела ни к одному из антигенов.

Таблица 1. Требования к окрашиванию полос, соответствующих контрольным образцам
Table 1. Requirements for the coloring of strips corresponding to control samples

Контрольный образец Control sample	Полосы иммуносорбента Immunosorbent strips						
	NC	S1-RBD	Env	M	Kc	Kво	Квк
K ⁻	–	–	–	–	–	+	+
K ⁺	+	+	+	+	–	+	+

Practical Aspects of Epidemiology and Vaccine Prevention

Таблица 2. Результаты исследования образцов сыворотки крови на наличие IgG к SARS-CoV-2 в ИФА и ИБ
Table 2. Results of the study of blood serum samples for the presence of IgG to SARS-CoV-2 in ELISA and IB

SARS-CoV-2 ОТ-ПЦР SARS-CoV-2 RT-PCR	Результаты исследования в: The results of the study in:								
	ИФА с использованием: ELISA using:				ИБ IB				
	«Vitrotest SARS-CoV-2 IgG» ОП _{кр} = 0,313 «Vitrotest SARS-CoV-2 IgG» OD _{кр} = 0,313		«ИФА-SARS-CoV-2-AT-G» ОП _{кр} = 0,25 «ELISA-SARS-CoV-2-AB-G» OD _{кр} = 0.25		Антитела к антигену Antibodies to the antigen				Σ
	ОП _{обр} OD _{sample}	Σ	ОП _{обр} OD _{sample}	Σ	NC S1-	RBD	Env	M	
+	3,536	+	3,064	+	+	+	+	-	+
+	3,536	+	3,047	+	+	+	+	-	+
+	0,029	-	0,048	-	-	-	-	-	-
+	3,482	+	2,173	+	+	+	+	-	+
+	3,309	+	2,085	+	+	+	+	-	+
+/-	3,691	+	3,615	+	+	+	+	-	+
+	3,001	+	0,786	+	+	+	+	+	+
+	0,534	+	0,064	-	+	-	-	+	+
+	3,591	+	2,363	+	+	+	+	-	+
+	3,523	+	2,537	+	+	+	+	-	+
+	3,572	+	2,438	+	+	+	+	+	+
+	3,602	+	2,722	+	+	+	+	+	+
+	3,584	+	2,101	+	+	+	+	+	+
+	3,546	+	3,92	+	+	+	+	+	+
+	0,849	+	0,291	+	+	+	-	-	+
+	3,35	+	0,971	+	+	+	+	+	+
+	2,145	+	1,614	+	+	+	-	-	+
+	0,041	-	0,045	-	-	-	-	-	-
+	3,499	+	1,323	+	+	+	+	+	+
+	0,277	-	0,714	+	+	+	-	-	+
+	3,203	+	3,663	+	+	+	+	+	+
+	3,518	+	3,176	+	+	+	+	+	+
+	0,156	-	0,629	+	+	+	-	+	+
+	3,481	+	0,342	+	+	+	-	+	+
+	0,242	-	0,161	-	-	-	-	-	-
+	0,038	-	0,11	-	-	-	-	-	-
+	0,023	-	0,082	-	-	-	-	-	-
+	3,165	+	2,332	+	+	+	+	+	+
+	0,159	-	0,079	-	-	-	-	-	-
+	2,848	+	0,825	+	+	+	-	+	+
+	3,517	+	2,46	+	+	+	+	+	+
+	2,657	+	1,204	+	+	+	+	+	+
+	3,311	+	2,435	+	+	+	+	+	+

SARS-CoV-2 ОТ-ПЦР SARS-CoV-2 RT-PCR	Результаты исследования в: The results of the study in:								
	ИФА с использованием: ELISA using:				ИБ IB				
	«Vitrotest SARS-CoV-2 IgG» ОП _{кр} = 0,313 «Vitrotest SARS-CoV-2 IgG» OD _{cr} =0,313		«ИФА-SARS-CoV-2-AT-G» ОП _{кр} = 0,25 «ELISA-SARS-CoV-2-AB-G» OD _{cr} = 0.25		Антитела к антигену Antibodies to the antigen				Σ
	ОП _{обр} OD _{sample}	Σ	ОП _{обр} OD _{sample}	Σ	NC S1-	RBD	Env	M	
+	3,522	+	1,731	+	+	+	+	+	+
+	0,081	–	0,098	–	–	–	–	–	–
+	0,052	–	0,044	–	–	–	–	–	–
+	3,468	+	3,89	+	+	+	+	+	+
+	0,744	+	0,73	+	+	+	–	+	+
+	0,066	–	0,149	–	–	–	–	–	–
+	3,424	+	1,843	+	+	+	+	+	+
+	0,495	+	0,265	+	+	+	–	–	+
+	3,58	+	1,722	+	+	+	+	+	+
+	3,545	+	1,515	+	+	+	+	+	+
+	3,544	+	3,33	+	+	+	+	–	+
+	0,078	–	0,131	–	–	–	–	–	–
+	0,323	+	1,79	–	–	–	–	–	–
+	0,087	–	0,058	–	–	–	–	–	–
+	3,567	+	2,705	+	+	+	+	+	+
+	1,042	+	1,193	+	+	+	–	+	+
+	3,378	+	2,725	+	+	+	+	+	+
+	0,042	–	0,054	–	–	–	–	–	–
+	3,592	+	1,804	+	+	+	+	+	+
+	0,138	–	0,132	–	–	–	–	–	–
+	0,073	–	0,103	–	–	–	–	–	–
+	3,606	+	3,753	+	+	+	+	+	+
+	1,743	+	1,845	+	+	+	+	–	+
+	0,313	+/-	0,036	–	–	–	–	–	
+	1,569	+	1,199	+	+	+	–	–	+
+	0,147	–	0,288	+	–	+	–	–	+
+	0,112	–	0,142	–	–	–	–	–	–
+	1,169	+	0,355	+	+	+	–	–	+
+	3,634	+	3,733	+	+	+	–	–	+
+	3,627	+	3,775	+	+	+	–	+	+
+	0,184	–	0,294	+	–	+	–	–	+
+	2,705	+	1,629	+	+	+	–	–	+
+	1,876	+	1,608	+	+	+	–	–	+
+	0,234	–	0,098	–	–	–	–	–	–
+	3,507	+	1,622	+	+	+	–	+	+

SARS-CoV-2 ОТ-ПЦР SARS-CoV-2 RT-PCR	Результаты исследования в: The results of the study in:								
	ИФА с использованием: ELISA using:				ИБ IB				Σ
	«Vitrotest SARS-CoV-2 IgG» ОП _{кр} = 0,313 «Vitrotest SARS-CoV-2 IgG» OD _{cr} =0,313		«ИФА-SARS-CoV-2-AT-G» ОП _{кр} = 0,25 «ELISA-SARS-CoV-2-AB-G» OD _{cr} = 0.25		Антитела к антигену Antibodies to the antigen				
	ОП OD _{обр sample}	Σ	ОП OD _{обр sample}	Σ	NC S1-	RBD	Env	M	
+	0,224	–	1,334	+	+	+	–	–	+
+	1,355	+	0,1	–	+	–	–	–	+
+	3,252	+	3,874	+	+	+	–	–	+
+	1,981	+	1,548	+	+	+	–	–	+
+	3,602	+	1,351	+	+	+	–	+	+
+	0,98	+	1,406	+	+	+	–	–	+
+	0,033	–	0,073	–	–	–	–	–	–
+	0,504	+	1,684	+	+	+	–	–	+
+	1,605	+	0,349	+	+	+	–	–	+
+	0,059	–	0,051	–	–	–	–	–	–
+	0,697	+	0,325	+	+	+	–	+	+
+	0,541	+	1,493	+	+	+	–	–	+
+	0,448	+	0,285	+	+	+	–	–	+
+	3,434	+	3,749	+	+	+	–	+	+
+	0,044	–	1,581	+	–	+	–	-	+
+	0,02	–	0,063	–	–	–	–	–	–
+	2,228	+	1,403	+	+	+	+	+	+
+	3,03	+	0,821	+	+	+	–	+	+
+	0,309	+	2,351	+	+	+	–	+	+
+	2,122	+	2,465	+	+	+	–	–	+
+	0,513	+	2,499	+	+	+	–	–	+
+	1,195	+	0,407	+	+	+	–	+	+
+	0,072	–	0,091	–	–	–	–	–	–
+	3,494	+	3,77	+	+	+	–	–	+
+	0,811	+	0,314	+	+	+	–	+	+
+	0,348	+	0,393	+	+	+	–	–	+
+	0,259	–	0,427	+	+	+	–	–	+
+	3,677	+	3,54	+	+	+	–	–	+
+	0,056	–	0,039	–	–	–	–	–	–
+	2,796	+	3,632	+	+	+	+	–	+
+	0,215	–	0,048	–	–	–	–	–	–
+	1,783	–	0,102	–	–	–	–	–	–
+	0,472	+	2,437	+	+	+	–	–	+
+	3,588	+	3,862	+	+	+	–	+	+
+	3,346	+	0,097	–	+	–	+	+	+

SARS-CoV-2 ОТ-ПЦР SARS-CoV-2 RT-PCR	Результаты исследования в: The results of the study in:								
	ИФА с использованием: ELISA using:				ИБ IB				Σ
	«Vitrotest SARS-CoV-2 IgG» ОП _{кр} = 0,313 «Vitrotest SARS-CoV-2 IgG» OD _{cr} =0,313		«ИФА-SARS-CoV-2-AT-G» ОП _{кр} = 0,25 «ELISA-SARS-CoV-2-AB-G» OD _{cr} = 0.25		Антитела к антигену Antibodies to the antigen				
	ОП _{обр} OD _{sample}	Σ	ОП _{обр} OD _{sample}	Σ	NC S1-	RBD	Env	M	
	+	1,795	+	0,094	–	+	–	–	

Примечания: ОП_{кр} – критическая оптическая плотность; ОП_{обр} – оптическая плотность, полученная при исследовании образца пациента; Σ – итоговый результат исследования образца в ИФА и ИБ; «+» – положительный результат исследования: для ОТ-ПЦР – в образце выявлена ДНК возбудителя; для ИФА – ОП_{обр} больше ОП_{кр} – в образце выявлены специфические антитела; для ИБ наличие антител к конкретному антигену и общий положительный результат исследования; «+/-» – сомнительный результат исследования (в ПЦР и ИФА); «–» – отрицательный результат исследования: для ИФА – ОП_{обр} меньше ОП_{кр} – в образце не выявлены специфические антитела; для ИБ – отсутствие антител к конкретному антигену и общий отрицательный результат исследования.
Notes: OD_{cr} – critical optical density; OD_{sample} is the optical density obtained during the examination of the patient's sample; Σ – the final result of the study of the sample in the IFA and IB; «+» is a positive result of the study: for RT-PCR, the DNA of the pathogen was detected in the sample; for ELISA – OD_{sample} > OD_{cr} – specific antibodies were detected in the sample; for IB, the presence of antibodies to a specific antigen and the overall positive result of the study; «+/-» – doubtful result of the study (in PCR and ELISA); «–» – negative result of the study: for ELISA – OD_{sample} < OD_{cr} – no specific antibodies were detected in the sample; for IB – the absence of antibodies to a specific antigen and the overall negative result of the study.

Чувствительность и специфичность разработанной тест-системы была исследована на клиническом материале. В таблице 2 приведены сводные данные исследования образцов сыворотки крови пациентов с COVID-19 на наличие IgG к SARS-CoV-2 в ИФА и ИБ. Они демонстрируют высокую корреляцию оценок образцов в ИФА с использованием обеих тест-систем, как по значениям ОП, так и по итоговым оценкам тестов (коэффициенты корреляции 0,75 и 0,74). Показана высокая корреляция итоговых оценок в ИФА и ИБ (коэффициенты корреляции 0,87 и 0,91) и практически отсутствие каких-либо зависимостей между результатами ПЦР и ИФА, а также между результатами ПЦР и ИБ (коэффициенты корреляции 0,02–0,34).

Все 100 образцов сыворотки крови здоровых доноров, отобранных в 2018 г., при исследовании в разработанной тест-системе показали отрицательный результат (отсутствие окрашивания антигенных линий), что свидетельствует о хорошей специфичности тест-системы.

При анализе полученных результатов следует обратить внимание на тот факт, что в некоторых исследованных образцах присутствуют антитела к N-антигену и отсутствуют к S1-RBD-антигену и, наоборот, есть антитела к S1-RBD-антигену и нет к N-антигену. Очевидно, это может быть связано с особенностями иммунного ответа каждого конкретного пациента. Однако получение достоверного результата исследования данных образцов

становится возможным только при использовании метода ИБ, поскольку скрининговые тест-системы, сконструированные только на одном антигене, не способны выявить образцы, содержащие антитела к другим антигенам.

К сожалению, зачастую производители скрининговых тест-систем не указывают в инструкциях по применению информацию об используемых антигенах, что не позволяет сотрудникам лабораторной службы понять, антитела к каким белкам вируса они обнаружили. В связи с этим применение метода ИБ как подтверждающего теста является перспективным направлением в лабораторной диагностике COVID-19.

Заключение

Разработанная иммуноферментная тест-система «Лайн-Блот-SARS-CoV-2-AT-G» для выявления специфических IgG к коронавирусу SARS-CoV-2 методом иммунного блоттинга в формате «Лайн-блот» показала хорошую чувствительность при исследовании сывороток крови, полученных от больных COVID-19 и хорошую специфичность при исследовании образцов, полученных от здоровых доноров.

Новая тест-система после прохождения процедуры государственной регистрации медицинского изделия может быть рекомендована в качестве подтверждающего теста при этиологической лабораторной диагностике COVID-19.

Литература

1. Временные методические рекомендации МЗ РФ (Версия 11 от 07.05.2021). «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)». Доступно по: http://xn--80aefpebagmfbic0a.xn--p1ai/ai/doc/872/attach/Bmr_COVID-19_compressed.pdf. Ссылка активна на 24.02.2022.
2. Диагностическое тестирование для определения вируса SARS-CoV-2: Временные рекомендации, 11 сентября 2020 г. Доступно по: <https://www.euro.who.int/ru/health-topics/health-emergencies/coronavirus-covid-19/publications-and-technical-guidance/2020/diagnostic-testing-for-sars-cov-2-interim-guidance-11-september-2020>. Ссылка активна на 24.02.2022.
3. Ozcurumez M., Ambrosch A., Frey O., et al. SARS-CoV-2 antibody testing – questions to be asked. J. Allergy Clin. Immunol. 2020. Vol. 146, N1. P. 35–43. DOI: 10.1016/j.jaci.2020.05.020
4. Sethuraman N., Stanleyraj S., Ryo A. Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. JAMA. 2020. Vol. 323, N22. P. 2249–2251. DOI: 10.1001/jama.2020.8259.

Practical Aspects of Epidemiology and Vaccine Prevention

5. Watson J, Richter A, Deeks J. Testing for SARS-CoV-2 antibodies. *BMJ*. 2020. Vol. 370. P. m3325. DOI: 10.1136/bmj.m3325
6. Du Z, Zhu F, Guo F, et al. Detection of antibodies against SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *J. Med. Virol.* 2020. Vol. 92, N10. P. 1735–1738. DOI: 10.1002/jmv.25820
7. La Marca A, Capuzzo M, Paglia T, et al. Test-ing for SARS-CoV-2 (COVID-19): a systematic review and clinical guide to molecular and serological in-vitro diagnostic assays. *Reprod. Biomed. Online*. 2020. Vol. 41, N3. P. 483–499. DOI: 10.1016/j.rbmo.2020.06.001
8. McAndrews K.M., Dowlatshahi D.P., Dai J., et al. Heterogeneous an-tibodies against SARS-CoV-2 spike receptor binding domain and nucleocapsid with implications for COVID-19 immunity. *JCI Insight*. 2020. Vol. 5, N18, e142386. P. 1–14. DOI: 10.1172/jci.insight.142386
9. Sethuraman N, Stanleyraj S, Ryo A. Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. *JAMA*. 2020. Vol. 323, N22. P. 2249–2251. DOI: 10.1001/jama.2020.8259
10. Haselmann V, Özçürümek M.K., Klawonn F, et al. Results of the first pilot external quality assessment (EQA) scheme for anti- SARS-CoV2-antibody testing. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2020. Vol. 58, N12. P. 2121–2130. DOI: 10.1515/cclm-2020-1183
11. Марданлы С. Г., Авдонина А. С., Мамедова С. Г. Разработка иммуноферментной тест-системы для выявления антител класса IgG к возбудителю COVID-19 в сыворотке (плазме) крови человека. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020. Т. 65, №11. С. 683–687. DOI: 10.17116/klindermat202019041465
12. Марданлы С. Г. Разработка и испытания новых иммуноферментных тест систем для диагностики токсоплазмоза. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2009. № 2. С. 35–37.
13. Марданлы С. Г. Эпидемиологический надзор за инфекциями TORCH группы на основе современных технологий лабораторной диагностики. Дисс..... д-ра мед. наук. Москва; 2016. Доступно на: <http://www.dslb.net/epidemiologia/jepidemiologicheskij-nadzor-za-infekcijami-torch-gruppy-na-osnove-sovremennyh.html>. Ссылка активна на 24 февраля 2022.
14. Марданлы С. Г., Симонов В. В., Авдонина А. С. Производство наборов реагентов для клинической лабораторной диагностики иммунохимическими методами. Орехово-Зуево: ГТТУ. 2017.
15. Марданлы С. Г., Симонова Е. Г., Симонов В. В. Инфекции ToRCH-группы: клиническая лабораторная диагностика, эпидемиологический надзор и контроль. Москва: Транзит-ИКС. 2018.
16. Марданлы С. Г., Симонова Е. Г., Симонов В. В. Герпесвирусные инфекции: этиология и патогенез, клиника и лабораторная диагностика, эпидемиология и профилактика. Орехово-Зуево: ГТТУ. 2020.
17. Hui Penga, Li-tao Yanga, Ling-yun Wangb, et al. Long-lived memory T lymphocyte responses against SARS coronavirus nucleocapsid protein in SARS-recovered patients. *Virology*. 2006. Vol. 351, N2. P. 466–475. DOI: 10.1016/j.virol.2006.03.036.
18. Hiscox J.A., Wurm T., Wilson L., et al. The coronavirus infectious bronchitis virus nucleoprotein localizes to the nucleolus. *J. Virol.* 2001. Vol. 75, N1. P. 506–512. DOI: 10.1128/JVI.75.1.506–512.2001.
19. Narayanan K., Chen C.J., Maeda J., Makino S. Nucleocapsid independent specific viral RNA packaging via viral envelope protein and viral RNA signal. *J. Virol.* 2003. Vol. 77, N5. 2922–2927. DOI: 10.1128/jvi.77.5.2922–2927.2003.
20. Ning Wang, Jian Shang, Shibo Jiang, Lanying Du. Subunit vaccines against emerging pathogenic human coronaviruses. *Front. Microbiol.* 2020; Vol. 11, art. 298. Доступно на: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles>. DOI: 10.3389/fmicb.2020.00298. Ссылка активна на 24.02.2022.
21. Brouwer Ph.J.M., Caniels T.G., van der Straten K., et al. Potent neutralizing antibodies from COVID-19 patients define multiple targets of vulnerability. *Science*. 2020. Vol. N6504. P. 369: 643–650. DOI: 10.1126/science.abc5902.
22. Rui Shi, Chao Shan, Xiaomin Duan, et al. A human neutralizing anti-body targets the receptor-binding site of SARS-CoV-2. *Nature*. 2020. Vol. 584, N7819. P. 120–124. DOI: 10.1038/s41586-020-2381-y.
23. Narayanan K., Maeda A., Maeda J., Makino S. Characterization of the coronavirus M protein and nucleocapsid interaction in infected cells. *J. Virol.* 2000. Vol. 74, N17. P. 8127–8134. DOI: 10.1128/jvi.74.17.8127–8134.2000.
24. Opstelten D.J., Raamsman M.J., Wolfs K., et al. Envelope glycoprotein interactions in coronavirus assembly. *J. Cell. Biol.* 1995. Vol. 131, N2. P. 339–349. DOI: 10.1083/jcb.131.2.339.
25. Jun Liu, Yeping Sun, Jianxun Qi, et al. The Membrane Protein of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Acts as a Dominant Immunogen Revealed by a Clustering Region of Novel Functionally and Structurally Defined Cyto-toxic T-Lymphocyte Epitopes. *J. Infect. Dis.* 2010. Vol. 202, N8. P. 1171–1180. DOI: 10.1086/656315.
26. Schoeman D., Fielding B.C. Coronavirus envelope protein: current knowledge. *J. Virol.* 2019. Vol. 16, N1. P. 69. DOI: 10.1186/s12985-019-1182-0

References

1. Vremennye metodicheskie rekomendacii MZ RF (Versija 11 ot 07.05.2021). «Profilaktika, diagnostika i lechenie novoj koronavirusnoj infekcii (COVID-19)». Available at: http://xn--80aespebagmfbcl0a.xn--p1ai/ai/doc/872/attach/Bmr_COVID-19_compressed.pdf. Accessed: 24.02.2022 (In Russ).
2. Diagnosticheskoe testirovanie dlja opredelenija virusa SARS-CoV-2: Vremennye rekomendacii, 11 sentjabrja 2020 g. Available at: <https://www.euro.who.int/ru/health-topics/health-emergencies/coronavirus-covid-19/publications-and-technical-guidance/2020/diagnostic-testing-for-sars-cov-2-interim-guidance-11-september-2020>. Accessed: 24.02.2022. (In Russ).
3. Ozcurumez M, Ambrosch A, Frey O, et al. SARS-CoV-2 antibody testing — questions to be asked. *J Allergy Clin Immunol*. 2020; 146(1):35–43. DOI: 10.1016/j.jaci.2020.05.020.
4. Sethuraman N, Stanleyraj S, Ryo A. Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. *JAMA*. 2020; 323(22): 2249–51. DOI: 10.1001/jama.2020.8259.
5. Watson J, Richter A, Deeks J. Testing for SARS-CoV-2 antibodies. *BMJ*. 2020; 370:m3325. DOI: 10.1136/bmj.m3325.
6. Du Z, Zhu F, Guo F, et al. Detection of antibodies against SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *J Med Virol*. 2020; 92(10):1735–8. DOI: 10.1002/jmv.25820.
7. La Marca A, Capuzzo M, Paglia T, et al. Test-ing for SARS-CoV-2 (COVID-19): a systematic review and clinical guide to molecular and serological in-vitro diagnostic assays. *Reprod Biomed Online*. 2020;41(3):483–99. DOI: 10.1016/j.rbmo.2020.06.001.
8. McAndrews KM, Dowlatshahi DP, Dai J, et al. Heterogeneous antibodies against SARS-CoV-2 spike receptor binding domain and nucleocapsid with implications for COVID-19 immunity. *JCI Insight*. 2020; 5(18): e142386. P. 1–14. DOI: 10.1172/jci.insight.142386.
9. Sethuraman N, Stanleyraj S, Ryo A. Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. *JAMA*. 2020; 323 (22): 2249–51. DOI: 10.1001/jama.2020.8259
10. Haselmann V, Özçürümek MK, Klawonn F, et al. Results of the first pilot external quality assessment (EQA) scheme for anti- SARS-CoV2-antibody testing. *Clin Chem Lab Med*. 2020; 58(12): 2121–30. DOI: 10.1515/cclm-2020-1183
11. Mardany SG, Avdonina AS, Mamedova SG. Development of an enzyme immunoassay system for the detection of IgG class antibodies to the COVID-19 pathogen in human serum (plasma). *Klinicheskaja laboratornaja diagnostika*. 2020; 65 (11): 683–7 (In Russ). DOI: 10.17116/klindermat202019041465
12. Mardany SG. Development and testing of new enzyme immunoassay systems for the diagnosis of toxoplasmosis. *Klinicheskaja laboratornaja diagnostika* 2009; 2: 35–7 (In Russ).
13. Mardany SG. Epidemiological surveillance of TORCH group infections based on modern laboratory diagnostic technologies. [dissertation]. Moscow; 2016. Available at: <http://www.dslb.net/epidemiologia/jepidemiologicheskij-nadzor-za-infekcijami-torch-gruppy-na-osnove-sovremennyh.html>. Accessed: 24.02.2022 (In Russ).
14. Mardany SG, Simonov VV, Avdonina AS. Production of reagent kits for clinical laboratory diagnostics by immunochemical methods. *Orehovo-Zuevo: GGTU*; 2017, 208 (In Russ).
15. Mardany SG, Simonova EG, Simonov VV. Torch-group infections: clinical laboratory diagnostics, epidemiological surveillance and control. Moscow:Tranzit-IKS; 2018, 282 (In Russ).
16. Mardany SG, Simonova EG, Simonov VV. Herpesvirus infections: etiology and pathogenesis, clinic and laboratory diagnostics, epidemiology and prevention. *Orehovo-Zuevo: GGTU*; 2020, 316 (In Russ).
17. Hui Penga, Li-tao Yanga, Ling-yun Wangb, et al. Long-lived memory T lymphocyte responses against SARS coronavirus nucleocapsid protein in SARS-recovered patients. *Virology*. 2006; 351: 466–75
18. Hiscox JA, Wurm T, Wilson L, et al. The coronavirus infectious bronchitis virus nucleoprotein localizes to the nucleolus. *J Virol*. 2001; 201: 506–12. DOI: 10.1128/JVI.75.1.506–512.2001
19. Narayanan K, Chen CJ, Maeda J, Makino S. Nucleocapsid independent specific viral RNA packaging via viral envelope protein and viral RNA signal. *J Virol*. 2003; 77: 2922–27. DOI: 10.1128/jvi.77.5.2922–2927.2003
20. Ning Wang, Jian Shang, Shibo Jiang, Lanying Du. Subunit vaccines against emerging pathogenic human coronaviruses. *Front Microbiol*. 2020; 11: 298. DOI: 10.3389/fmicb.2020.00298
21. Brouwer PhJM, Caniels TG, van der Straten K, et al. Potent neutralizing antibodies from COVID-19 patients define multiple targets of vulnerability. *Science*. 2020; 369: 643–50. DOI: 10.1126/science.abc5902
22. Rui Shi, Chao Shan, Xiaomin Duan, et al. A human neutralizing antibody targets the receptor-binding site of SARS-CoV-2. *Nature*. 2020; 584: 120–4. DOI: 10.1038/s41586-020-2381-y
23. Narayanan K, Maeda A, Maeda J, Makino S. Characterization of the coronavirus M protein and nucleocapsid interaction in infected cells. *J Virol*. 2000; 74(17): 8127–34. DOI: 10.1128/jvi.74.17.8127–8134.2000
24. Opstelten DJ, Raamsman MJ, Wolfs K, et al. Envelope glycoprotein interactions in coronavirus assembly. *J Cell Biol*. 1995; 131(2): 339–49. DOI: 10.1083/jcb.131.2.339
25. Jun Liu, Yeping Sun, Jianxun Qi, et al. The Membrane Protein of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Acts as a Dominant Immunogen Revealed by a Clustering Region of Novel Functionally and Structurally Defined Cytotoxic T-Lymphocyte Epitopes. *J Infect Dis*. 2010; 202(8): 1171–80. DOI: 10.1086/656315
26. Schoeman D, Fielding BC. Coronavirus envelope protein: current knowledge. *J Virol*. 2019; 16 (1): 69. DOI: 10.1186/s12985-019-1182-0

Об авторах

- **Сейфаддин Гашимович Марданлы** – д. м. н., академик Российской академии медико-технических наук; профессор кафедры фармакологии и фармацевтических дисциплин ГТТУ; директор по науке ЗАО «ЭКОлаб». +7 (909) 992-14-94, ekolab-president@mail.ru. ORCID: 0000-0002-4556-135X.
- **Татьяна Владимировна Попова** – к. х. н., профессор, заведующий кафедрой фармакологии и фармацевтических дисциплин, Государственный гуманитарно-технологический университет, фармацевтический факультет. 142611, Московская область, Орехово-Зуево, улица Зелёная, 22. +7 (965) 328-23-58, tvpopova45@yandex.ru. ORCID 0000-0003-0426-3126.

Поступила: 01.06.2022. Принята к печати: 07.07.2022.

Контент доступен под лицензией CC BY 4.0.

About the Authors

- **Seyfaddin G. Mardany** – Dr. Sci. (Med.), Academician of the Russian Academy of Medical Technical Sciences; Professor at the Department of Pharmacology and Pharmaceutical Sciences, State University of Humanities and Technology; Science Director, CJSC EKOLAB. +7 (909) 992-14-94, ekolab-president@mail.ru. ORCID: 0000-0002-4556-135X.
- **Tatyana V. Popova** – Cand. Sci. (Chemical), Professor, Head of the Department of Pharmacology and Pharmaceutical Disciplines, State University of Humanities and Technology (GGTU), Faculty of Pharmacy. 22, Zelenaya Street, Orekhovo-Zuevo, Moscow Region, Russia, 142611. +7 (965) 328-23-58, tvpopova45@yandex.ru. ORCID 0000-0003-0426-3126.

Received: 01.06.2022. Accepted: 07.07.2022.

Creative Commons Attribution CC BY 4.0.