

## Тест система для определения противовирусной активности препаратов прямого действия в культурах клеток в отношении SARS-CoV-2

<b>Мишень/тест-система</b>	Все стадии вирусной репликации, вирусные белки SARS-CoV-2
<b>Клеточная линия (при наличии)</b>	Vero CCL81 и культура карциномы легких человека Calu-3, обладающая природными рецепторами (ex vivo)
<b>Метод детекции</b>	модификация ИФА для определения противовирусной активности в культуре клеток (cell-ELISA), определение инфекционного титра вируса, количественное определение цитопатического эффекта вируса по жизнеспособности клеток при окраске формазанами (фотометрия)
<b>Активность</b>	
<b>Методы контроля</b>	Ингибирование Положительный контроль: препараты с доказанной активностью in vitro в отношении SARS-CoV-2 в культуре клеток Отрицательный контроль: вирусный контроль - реактивы, использованные для растворения используемого препарата

### Краткое описание тест-системы

#### 1 система- ингибирование инфекционного титра вируса

Оценивается снижение инфекционного титра вируса путем его титрования в культуре клеток в присутствии препарата по сравнению с таковым без препарата.

#### 2 система - модификация ИФА для определения противовирусной активности в культуре клеток (cell-ELISA)

Оценивается прямой эффект препаратов на экспрессию вирусных белков в культуре клеток при инкубации инфицированных клеток с препаратом

#### 3 система- количественное определение цитопатического эффекта вируса

Оценивается снижение цитопатического действия (ЦПД) вируса в культуре клеток при инкубации инфицированных клеток с препаратом визуально и количественно по жизнеспособности клеток при окрашивании их формазановыми красителями (МТТ, ХТТ)

### Протокол

№№	Процесс	Комментарии для каждой из систем см. ниже)*
1	Посев клеток Vero CCL81 и Calu-3 на 96-луночные планшеты, инкубация в атмосфере 5% CO <sub>2</sub> при 36°C до формирования полного монослоя	Одинаково для всех трех систем
2	Инфицирование клеток вирусом SARS-CoV-2, добавление препаратов в различных концентрациях и схемах	Одинаково для всех трех систем
3	Инкубация в атмосфере 5% CO <sub>2</sub> при 36°C	<b>1 система-</b> в течение 24-48 час <b>2 система</b> –в течение 24 час., <b>3 система-</b> в течение 5 суток до появления ЦПД

4	Определение эффекта, учет результатов	<p><b>1 система-</b> определение инфекционного титра супернатантов, отобранных после инкубации вируса в присутствии и отсутствии препаратов путем титрования их в культуре клеток</p> <p><b>2 система</b> –постановка ИФА с использованием антител к различным вирусным белкам</p> <p><b>3 система-</b> учет ЦПД в инфицированной культуре клеток в присутствии и отсутствии препаратов визуально и количественно по жизнеспособности клеток при окрашивании их формазановыми красителями ( МТТ, ХТТ)</p>
---	---------------------------------------	---

\***1 система** - ингибирование инфекционного титра вируса

**2 система** - модификация ИФА для определения противовирусной активности в культуре клеток (cell-ELISA)

**3 система** - количественное определение цитопатического эффекта вируса

### Интерпретация результатов

---

#### **1 система - ингибирование инфекционного титра вируса**

Препарат определяется как активный если при его добавлении к инфицированным клеткам происходит снижение инфекционного титра вируса на 2 log ТЦИД<sub>50</sub> по сравнению с вирусным контролем

#### **2 система**

Препарат определяется как активный если при его добавлении к инфицированным клеткам происходит ингибирование экспрессии вирусных белков (в данном случае, определяемой по оптической плотности) не менее, чем 30% по сравнению с вирусным контролем, определение **ингибирующей концентрации 50 ИК<sub>50</sub>**

#### **3 система - количественное определение цитопатического эффекта вируса**

Препарат определяется как активный если при его добавлении к инфицированным клеткам наблюдается увеличение жизнеспособности клеток (в данном случае, определяемой по оптической плотности после окраски клеток формазановыми красителями) не менее, чем на 30% по сравнению с вирусным контролем, проводится определение **ингибирующей концентрации 50 ИК<sub>50</sub>**

**Статистический анализ** Статистический анализ проводится с использованием R-Studio software (version 1.0.143). Оценка значения ИК<sub>50</sub> проводится с использованием asymptotics-based confidence intervals в программе Exell. Данные представляются как ИК<sub>50</sub> ± стандартное отклонение (SD). P-значения <0.05 рассматриваются как статистически значимые

#### **Ссылки на методику или ее аналоги, описанные в литературе (при наличии)**

---

Irina Leneva, Nadezhda Kartashova, Artem Poromov, et al. Antiviral Activity of Umifenovir In Vitro against a Broad Spectrum of Coronaviruses, Including the Novel SARS-CoV-2 Virus. Viruses 2021, 13 (8), 1665 [CrossRef] <https://doi.org/10.3390/v13081665>

Liu, J., Cao, R., Xu, M., Wang, X., Zhang, H., Hu, H., Li, Y., Hu, Z., Zhong, W., Wang, M. Hydroxychloroquine, a less toxic derivative of chloroquine, is effective in inhibiting SARS-CoV-2 infection in vitro. *Cell Discov.* **2020**, *6*, 16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Wang, M., Cao, R., Zhang, L., Yang, X., Liu, J., Xu, M., Shi, Z., Hu, Z., Zhong, W., Xiao, G. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell Res.* **2020**, *30*, 269–271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Gendrot, M., Andreani, J., Boxberger, M., Jardot, P., Fonta, I., Le Bideau, M., Duflot, I., Mosnier, J., Rolland, C., Bogreau, H., et al. Antimalarial drugs inhibit the replication of SARS-CoV-2: An in vitro evaluation. *Trav. Med. Infect. Dis.* **2020**, *37*, 101873. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

### **Препарат сравнения, использованный для валидации методики; результаты валидации**

---

Используются препараты с доказанной высокой противовирусной активностью в отношении SARS-CoV-2 в культуре клеток (ремдесивир, гидроксихлорохин)

#### **Ссылки:**

Liu, J., Cao, R., Xu, M., Wang, X., Zhang, H., Hu, H., Li, Y., Hu, Z., Zhong, W., Wang, M. Hydroxychloroquine, a less toxic derivative of chloroquine, is effective in inhibiting SARS-CoV-2 infection in vitro. *Cell Discov.* **2020**, *6*, 16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Wang, M., Cao, R., Zhang, L., Yang, X., Liu, J., Xu, M., Shi, Z., Hu, Z., Zhong, W., Xiao, G. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell Res.* **2020**, *30*, 269–271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

### **Дополнительные характеристики**

---

Количество вещества для проведения одного исследования	5 мг
Производительность тест-системы	5-10 веществ в неделю

---

### **Организация**

---

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» (**ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова**), Москва, Малый Казенный пер., 5а

---

### **Контактное лицо**

---

Ленева Ирина Анатольевна, д.б.н., зав.лаб экспериментальной вирусологии, ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, [wnyfd385@yandex.ru](mailto:wnyfd385@yandex.ru) тел +7-916-211-88-78

---