
В ПОМОЩЬ ВИРУСОЛОГУ

© ФЁДОРОВ А.Ю., ЖИРНОВ О.П., 2020



Метод оценки нейраминидазной активности препаратов RDE с помощью вируса гриппа

Фёдоров А.Ю.^{1,2}, Жирнов О.П.^{1,3}¹ Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, Москва, Россия;² ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, 119991, Москва, Россия;³ ООО «Русско-немецкая академия медицинских и биотехнологических наук», Инновационный Центр Сколково, 121205, Москва, Россия

Введение. Для определения уровня противовирусных антител в сыворотках крови людей и животных используют классическую реакцию торможения гемагглютинации (РТГА). При постановке РТГА требуется обработка исследуемых сывороток рецептор-разрушающим ферментом (RDE) для удаления сывороточных гликанов, нарушающих точность реакции РТГА. При использовании препаратов RDE для оптимизации их количества в РТГА необходимо знать их реальную нейраминидазную активность. В настоящей статье разработан простой и экономичный метод тестирования нейраминидазной активности рецептор-разрушающих препаратов с использованием стандартного лабораторного реагентного оснащения и оборудования.

Цель – разработать усовершенствованный простой и удобный метод для оценки активности нейраминидазы с помощью вируса гриппа.

Материал и методы. В основе метода лежит способность нейраминидазы гидролизовать остатки сиаловой кислоты на клеточной поверхности эритроцитов, что лишает эритроциты способности к агглютинации вирусом гриппа, так как именно к этим остаткам прикрепляется вирус, вызывая их агглютинацию.

Результаты и обсуждение. Разработан простой и удобный метод для оценки активности нейраминидазы способом двукратных разведений с эритроцитами человека или животных и последующей инкубацией с вирусом гриппа А для тестирования гемагглютинации.

Заключение. Метод позволяет точно оценить рецептор-разрушающую (нейраминидазную) активность препаратов RDE и сравнить их между собой, что необходимо для оптимизации постановки РТГА при мониторинге сывороток крови животных и людей, больных или переболевших острой респираторной вирусной инфекцией, в том числе гриппом. Разработанный метод может быть включён в регламент методических указаний для постановки РТГА при мониторинге гриппа и других острых респираторных вирусных инфекций в различных лабораториях.

Ключевые слова: вирус гриппа; РТГА; рецептор-разрушающий фермент, RDE; нейраминидаза; метод.

Для цитирования: Фёдоров А.Ю., Жирнов О.П. Метод оценки нейраминидазной активности препаратов RDE с помощью вируса гриппа. *Вопросы вирусологии.* 2020; 65(2): 113-118.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-2-113-118>.

Для корреспонденции: Жирнов Олег Петрович, д-р биол. наук, проф., член-корр. РАН, руководитель лаборатории вирусного патогенеза Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, Москва. E-mail: zhirnov@inbox.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов: формулирование цели, выполнение экспериментов, написание статьи – Жирнов О.П.; проведение экспериментов, подготовка рисунков – Фёдоров А.Ю.

Поступила 12.03.2020

Принята в печать 31.03.2020

Method for evaluating the neuraminidase activity of receptor-destroying enzyme (RDE) compounds using the influenza virus

Artem Yu. Fedorov^{1,2}, Oleg P. Zhirnov^{1,3}

¹D.I. Ivanovsky Institute of Virology, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russia;

²I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, 119991, Russia;

³Russian-German Academy of Medical and Biotechnological Sciences, Skolkovo Innovation Center, Moscow, 121205, Russia

Introduction. The classic hemagglutination inhibition reaction (RTGA) is used to determine the level of antiviral antibodies in human and animal serum specimens. During the performance of RTGA the tested sera must be treated with a receptor-destroying enzyme (RDE) to remove serum glycans that degrade the accuracy of the RTGA results. To optimize the amounts of RDE compounds used, it is necessary to know their real neuraminidase activity. This article describes a simple and economical method for testing the neuraminidase activity of receptor-destroying compounds using standard reagents and laboratory equipment.

Aims of investigation. Design of an improved simple and convenient method for evaluating the neuraminidase activity using the flu virus.

Material and methods. Here, we propose a convenient method for evaluating the activity of neuraminidase by double-fold dilution procedure with human or animal erythrocytes followed by hemagglutination assay with influenza A virus.

Results and discussion. The method is based on the ability of neuraminidase to hydrolyze sialic acid residues on the cell surface of erythrocytes, that deprives red blood cells to be agglutinated with the flu virus, since these sialic glycans provide virus attachment and hemagglutination.

Conclusion. The designed method allows the accurate measurement of the receptor-destroying (neuraminidase) activity of RDE compounds and the comparison of the compounds with each other. This test is necessary to optimize the RTGA protocol when monitoring blood sera of animals and humans after influenza infection and/or Acute Respiratory diseases (ARD). The designed method can be included in the guidelines of regulations for the RTGA protocol, which is used in different laboratories to monitor the epidemic process of influenza and ARD infections.

Keywords: influenza virus; HAI; receptor destroying enzyme, RDE; neuraminidase; method.

For citation: Fedorov A.Yu., Zhirnov O.P. Method for evaluating the neuraminidase activity of receptor-destroying enzyme (RDE) compounds using the influenza virus. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology)*. 2020; 65(2): 113-118. (In Russian).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-2-113-118>

For correspondence: Oleg P. Zhirnov, Doctor of Biological Sciences, Professor, Corresponding Member of the RAS, Head of the Laboratory of Viral Pathogenesis of National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russia. E-mail: zhirnov@inbox.ru

Information about the authors:

Fedorov A.Yu., <https://orcid.org/0000-0001-7503-6444>

Zhirnov O.P., <https://orcid.org/0000-0002-3192-8405>

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Contribution: developed the idea, performed experiments and wrote the text of the article – Zhirnov O.P., performed experiments and took part in figure preparation – Fedorov F.Yu.

Received 12 March 2020

Accepted 31 March 2020

Введение

При осуществлении мониторинга гриппозной инфекции в природе наряду с выделением вирусных штаммов изучают уровень и профиль противовирусных антител в популяциях различных видов животных и у людей, используя классический метод торможения гемагглютинации (РТГА), который был разработан в прошлом столетии [1, 2]. Этот метод широко используется и в настоящее время для определения титров антител в сыворотках крови у различ-

ных хозяев, включая человека, как за рубежом [3], так и в России (Методические указания МУ 3.1.3490-17 «Изучение популяционного иммунитета к гриппу у населения Российской Федерации», утверждены Главным государственным санитарным врачом РФ 27 октября 2017 г.¹; далее – Методические указания МУ 3.1.3490-17),

Для разрушения неспецифических сиалосодержащих гликанов обычно применяют препараты ней-

¹Бюллетень нормативных и методических документов Госсанэпиднадзора. 2018. Вып. 1.

раминидазы, выделенной из нехолерного вибриона, так называемого рецептор-разрушающего фермента (RDE – Receptor Destroying Enzyme), который отщепляет остатки сиаловой кислоты и устраняет интерферирующий эффект неспецифических ингибиторных гликанов [4]. RDE гидролизует сывороточные сиалосодержащие соединения, которые интерферируют с исследуемыми антителами за взаимодействие с тестовым вирусом при постановке РТГА, и тем самым устраняет эффект фальш-торможения, не связанного с действием антител.

Для постановки РТГА требуется тестирование нейраминидазной активности исследуемых препаратов RDE для оптимизации её количества в РТГА. С этой целью обычно применяется колориметрический метод, требующий дорогостоящих специфических субстратов и приборного оснащения. В настоящей работе нами предложен простой и удобный метод оценки активности нейраминидазы, не требующий специальных реактивов и приборов. Метод назван нейраминидазным торможением реакции агглютинации эритроцитов человека вирусом гриппа, поскольку основан на способности вирусной нейраминидазы отщеплять остатки сиаловой кислоты с поверхности эритроцитов и предотвращать их агглютинацию вирусом гриппа.

Материал и методы

Вирусы гриппа. Использовали вирусы гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) и A/WSN/34 (H1N1), которые выращивали на 9-дневных куриных эмбрионах [5].

Препараты рецептор-разрушающего фермента (RDE). Изучали два препарата RDE, полученного из нехолерного вибриона (Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной, Россия; RDE_{НИЭМ}) и культуры холерного вибриона Огава типа 558 (Denka Seiken, Япония; RDE_{Seik}).

Рабочий раствор эритроцитов. Использовали свежие образцы крови курицы, морской свинки, кролика, мыши, а также I и III группы крови человека. Эритроциты трижды промывали фосфатным буфером (10 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 7,2; 2,7 mM KCl; 137 mM NaCl) (ФБ) при 1000 об/мин в течение 5 мин при 4 °С. Рабочий раствор эритроцитов готовили на ФБ с концентрацией 1% по объёму эритроцитов.

Определение концентрации белка. Для определения концентрации белка в препаратах RDE использовали колориметрический метод Бредфорда [6]. Реакцию ставили в объёме 200 мкл, используя в качестве количественного стандарта сравнения бычий сывороточный альбумин (ICN Pharmaceuticals, США). Реакцию ставили в формате 96-луночных планшетов, в объёме 200 мкл, реакцию регистрировали на спектрофотометре Пикон, модель 136086 (ЗАО «Пикон»; Россия) при длине волны 595 нм [7].

Определение рецептор-разрушающей активности препаратов RDE. Уровень рецептор-разрушающей активности препаратов RDE оценивали с помощью реакции торможения агглютинации эритроцитов посредством нейраминидазного разрушения их рецепторов. Для этого готовили двукратные разведе-

ния исследуемых препаратов RDE (нейраминидазы) в объёме 25 мкл и к полученным разведениям добавляли 25 мкл 1% суспензии эритроцитов определённого вида животных или человека. Приготовленные эритроцитарно-нейраминидазные смеси инкубировали при 37 °С в течение 120 мин. После этого в исследуемые разведения добавляли равный объём вируса гриппа A/Aichi 2/68 (H3N2) либо A/WSN/34 (H1N1) в количестве 8 ГАЕ, смеси перемешивали и планшеты инкубировали при 4 °С в течение 1–2 ч для развития реакции агглютинации эритроцитов вирусом. Исследовали эритроциты I и III групп крови человека, мыши, курицы, кролика, морской свинки. Активность RDE оценивали по её разведению в последней лунке, в которой не наблюдалось гемагглютинации. Положительным считалось последнее разведение, в котором отсутствовала гемагглютинация. Величину рецептор-разрушающей активности препаратов нейраминидазы определяли в рецептор-разрушающих единицах (PPE), количество которых равнялось обратному титру последнего разведения, в котором не наблюдалось агглютинации эритроцитов в условиях реакции.

Расчёт нейраминидазной активности. Рецептор-разрушающую активность препаратов RDE учитывали по разведению в последней лунке, в которой не наблюдалось гемагглютинации. Величину рецептор-разрушающей активности препарата нейраминидазы определяли в единицах PPE. Для более точного анализа и учёта реакции использовали параллельные ряды двукратных разведений исследуемого RDE, когда титрование начинали с различного начального разведения: 1:2, 1:3, 1:5.

Определение нейраминидазной активности по гидролизу нейраминидазного субстрата. Для прямого сравнения нейраминидазной активности исследуемых препаратов RDE оценивали способность расщеплять флуорогенный субстрат нейраминовой кислоты MuNANA (Sigma, США). В качестве стандарта использовали очищенную нейраминидазу холерного вибриона фирмы Behring (Германия), имеющую активность 0,04Е на 1 мкг белка. За единицу активности (Е) принимали отщепление 1 ммоль нейраминовой кислоты от субстрата за 1 мин в условиях используемой реакции. Готовили двукратные разведения препаратов RDE в объёме 120 мкл ФБ, содержащего 0,1 mM CaCl₂, добавляли 50 мкл 0,04 mM раствора MuNANA (2-(4-methylumbelliferyl)-a-D-N-acetylneuraminic acid (Sigma; Cat No. M8639) и инкубировали 60 мин при 37 °С. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл раствора, содержащего 75% этанола и 25 mM NaOH. Количество отщеплённой нейраминовой кислоты определяли по интенсивности потока флуоресценции 460 нм при возбуждении 360 нм на флуориметре для микропланшетов Synergy™ HT (Bio-Tek Instruments, США) [8].

Результаты

Во многих вирусологических исследованиях используют препараты RDE, обладающие нейраминидазной активностью, разрушающей клеточные

Характеристики рецептор-разрушающей и нейраминидазной активности препаратов RDE

Characteristics of receptor-destroying and neuraminidase activity of RDE compounds

Препарат RDE Compound RDE	Титр рецептор-разрушающей активности ¹ Titer of receptor-destroying activity ¹	Концентрация белка в препарате, мг/мл ² Protein concentration in the sample (mg/ml) ²	Специфическая рецептор-разрушающая активность, PPE/мг ³ Specific receptor-destroying activity (RDU/mg) ³	Нейраминидазная активность препарата, Е/мг ⁴ Neuraminidase activity of the sample (U/mg of protein) ⁴
RDEниэм RDEniem	1:128	0,037 ± 0,015	3460	31,5
RDEсеик RDEseik	1:16	0,015 ± 0,003	1067	8,4

Примечание. ¹Активность RDE титровали методом двукратных разведений с эритроцитами I группы крови человека, как описано в материалах и методах; ² концентрацию белка в препаратах RDE определяли методом Бредфорда, используя в качестве стандарта БСА [7]. Стандартная ошибка величины средней рассчитана в программе Excel по алгоритму $Fx = \text{стандотклон.}G$; ³ специфическую рецептор-разрушающую активность рассчитывали в условных единицах (PPE) на 1 мг белка в исследуемом препарате RDE, как описано в материалах и методах; ⁴ нейраминидазную активность препаратов определяли прямым флуориметрическим методом с субстратом нейраминовой кислоты MuNANA, как описано в материалах и методах (см. рис. 2). В качестве препарата сравнения использовали очищенную нейраминидазу холерного вибриона фирмы Behring (Германия), имеющую активность 40Е на 1 мг белка.

Note. ¹ Titration of RDE activity was performed by double dilution procedure with human red blood cells of group I, as described in the materials and methods; ² the protein concentration in RDE compounds was determined by the Bradford method, using the BSA standard [7]. The standard deviation error was calculated in the Excel program using the $Fx = \text{standdeviation algorithm.}G$; ³ specific receptor-destroying activity was calculated in arbitrary units (receptor destroying units; RDU) per mg of protein in the analyzed RDE compounds, as described in the materials and methods; ⁴ the neuraminidase activity of the analyzed compounds was determined by direct fluorimetric method with a fluorogenic substrate of neuraminic acid MuNANA, as described in the materials and methods (see Fig.2). As a comparison drug, we used purified neuraminidase compound of a cholera Vibrio from Behring (Germany), which has the activity of 40 U per mg of protein.

гликопротеидные рецепторы. Наиболее часто применяют нейраминидазу при определении титров противогриппозных антител в сыворотках человека и животных методом РТГА [1–3]. В этом методе RDE используется для удаления неспецифических гликанов сыворотки, содержащих остатки сиаловой кислоты, которые мешают определению точных титров вирус-специфических антител, так как нарушают взаимодействие референс-вируса и эритроцитов, на котором основан тест РТГА.

В работе проводили сравнительное исследование двух нейраминидазных препаратов (RDE) производства РФ и Японии. Для оценки уровня рецептор-разрушающей активности готовили двукратные разведения исследуемых препаратов нейраминидазы в объёме 25 мкл и к полученным разведениям добавляли 25 мкл 1% суспензии эритроцитов определённого вида животных, а также человека. Приготовленные эритроцитарно-нейраминидазные смеси инкубировали при 37 °С в течение 120 мин для удаления сиаловых рецепторов на поверхности эритроцитов. После этого в исследуемые разведения добавляли равный объём вируса гриппа A/Aichi 2/68 (H3N2) либо A/WSN/34 (H1N1) в количестве 8 ГАЕ, смеси перемешивали и планшеты инкубировали при 4 °С в течение 1 ч для развития реакции агглютинации эритроцитов вирусом.

Результаты тестирования рецептор-разрушающей активности препаратов RDE с эритроцитами I и III группы крови человека показаны на рис. 1. Приводятся ряды двукратных разведений RDE, с которыми последовательно инкубировали эритроциты и вирус гриппа А. Как видно, эритроциты после обработки RDE теряли способность агглютинироваться вирусом гриппа А. Уровень активности RDE оценивали по последнему разведению, при котором ещё не происходило агглютинации эритроцитов. Как показано на рис. 1, последними без агглютинации были лун-

ки 6 и 3 для российского и японского препаратов RDE, что соответствовало разведениям 1:128 и 1:32 соответственно. Величину рецептор-разрушающей активности препаратов нейраминидазы определяли в PPE по последнему разведению, в котором не наблюдалось агглютинации эритроцитов в условиях реакции (см. таблицу).

Для более точного сравнения активности препаратов RDE определяли специфическую нейраминидазную активность методом прямой колориметрической реакции в расчёте на количество белка в препарате. С этой целью использовали метод Бредфорда и флуоресцентный метод прямого определения нейраминидазной активности. Результаты типичного эксперимента по определению удельной нейраминидазной активности приведены в таблице и на рис. 2. Удельная RDE активность составляла 3,5 и 1,1 PPE на 1 мкг белка у российского и японского препаратов соответственно, что хорошо коррелировало с величинами нейраминидазной активности, полученными прямым измерением по расщеплению нейраминидазного субстрата (см. рис. 2). Эти наблюдения подтверждают достоверность предложенного метода оценки RDE с помощью вируса гриппа и позволяют сделать вывод о высокой активности RDE российского препарата, что позволяет брать меньшее белковое количество RDEниэм по сравнению с препаратом RDEсеик для обработки сывороток крови при постановке РТГА.

Обсуждение

В настоящей работе предложен простой метод оценки нейраминидазной активности препаратов RDE с использованием эритроцитов человека и лабораторного вируса гриппа А. В основе метода лежит способность нейраминидазы гидролизовать остатки сиаловой кислоты на клеточной поверхности эритроцитов разных видов животных и человека. Такое удаление сиаловой кислоты лишает эритроциты способности

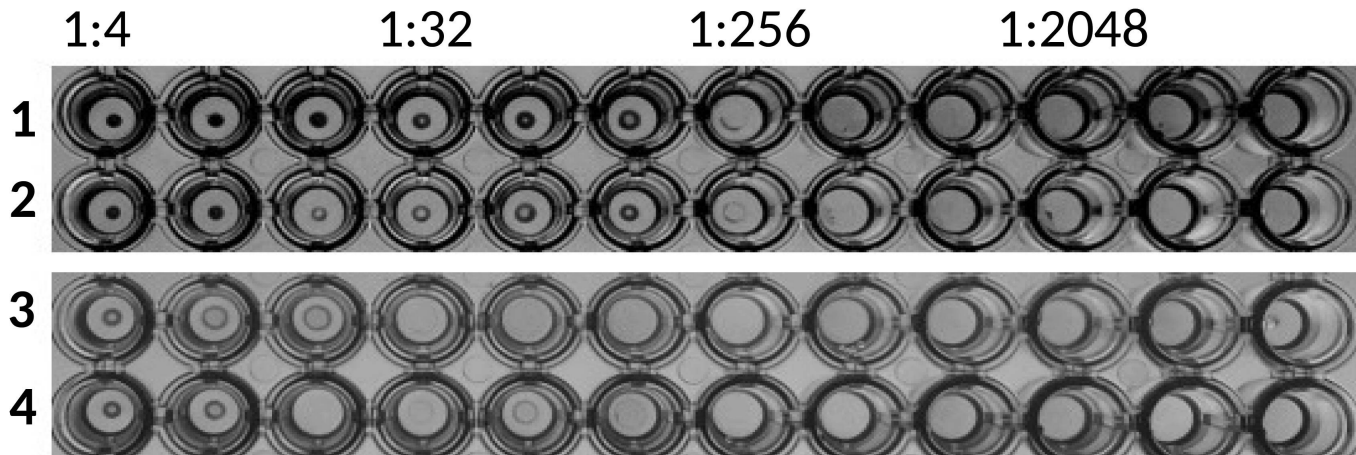


Рис. 1. Определение активности препаратов RDE методом нейраминидазного торможения реакции гемагглютинации вирусом гриппа. Двукратные разведения препаратов RDE инкубировали с 1% суспензией эритроцитов человека I (ряды 1, 3) и III (2, 4) группы крови. Полученные смеси инкубировали 90 мин при 37 °С и в смеси вносили 8 ГАЕ вируса A/Aichi/2/68 (H3N2) либо A/WSN/34 (H1N1) и инкубировали 2 ч при 4 °С. Планшеты фотографировали при дневном свете.

Fig. 1. Determination of the activity of RDE compounds by neuraminidase activity inhibition in the reaction of hemagglutination by the influenza virus.

Two-fold dilutions of RDE compounds were prepared, which were incubated with a 1% suspension of human red blood cells of group 1 (rows 1, 3) and group 3 (2, 4). Then, the resulting mixtures were incubated for 90 minutes at 37 °C and 8 HAE of A/Aichi/2/68 (H3N2) or A/WSN/34 (H1N1) viruses were added to the mixture and incubated for 2 hours at 4 °C. The plates were photographed under day light.

к агглютинации вирусом гриппа человека, так как именно к этим остаткам прикрепляется вирус, вызывая их агглютинацию в мультিকлеточные комплексы (так называемая гемагглютинация). Метод позволяет оценить рецептор-разрушающую (нейраминидазную) активность препаратов RDE и сравнить их между собой, что бывает необходимо для оптимизации постановки РТГА при мониторинге сывороток крови животных и людей, больных или переболевших гриппозной инфекцией. По сравнению с биохимическим колориметрическим тестированием со специфическим субстратом предлагаемый метод обладает рядом достоинств. К таковым относятся простота методики, отсутствие в протоколе исследования дорогостоящих реагентов и приборов, необходимость простого лабораторного инструментария и возможность выполнения в любой биохимической лаборатории.

Утверждён технический регламент постановки РТГА для определения титров антивирусных антител в сыворотках крови людей при различных заболеваниях гриппом и сходными инфекциями (Методические указания МУ 3.1.3490-17). В сельском хозяйстве реакция РТГА широко применяется для изучения инфицированных сельскохозяйственных животных и птиц актуальными вирусами гриппа H5N1, H7N5, H9N2, H5N8 и др. В указанном регламенте прописан этап обработки исследуемых сывороток препаратом RDE для удаления неспецифических сиалосодержащих ингибиторов (приложение № 2 к Методическим указаниям МУ 3.1.3490-17). Однако в нём отсутствует методика тестирования и стандартизации этого фермента на этапе обработки сывороток RDE при постановке РТГА. Учитывая важность обработки ис-

следуемых сывороток данным ферментом, регламент может быть дополнен настоящим тестом на активность фермента RDE, что будет способствовать более точному определению титров антивирусных антител в исследуемых сыворотках крови человека и животных и повышению оптимизации стандарта применения РТГА в различных лабораториях. Для обработки сыворотки крови животных или человека при постановке РТГА в качестве базового режима можно рекомендовать применение не менее 10 PPE на 1 мл обрабатываемого разведения сыворотки при инкубации в течение 60–120 мин при 37 °С.

Заслуживает внимания выбор эритроцитов для использования в предлагаемом методе. При изучении препаратов RDE наиболее стабильные и воспроизводимые результаты получены с эритроцитами человека. Эритроциты кролика оказались непригодными, так как не агглютинировались использованными вирусами гриппа А. Результаты, полученные с эритроцитами морской свинки, курицы и мыши оказались менее воспроизводимыми. Эритроциты данных видов проявляли повышенную резистентность к действию RDE и требовали более продолжительной инкубации для полного гидролиза сиаловых рецепторов, что усложняло методику и снижало точность определения. Обнаруженный феномен вариабельности в чувствительности к RDE у эритроцитов различных животных, вероятно, обусловлен различиями как в соотношении N- или O-гликановых рецепторов, обладающих связью типа α 2-3 и/или α 2-6 галактозы (или ацетилгалактозамина) с остатками N-ацетил-нейраминовой кислоты, так и в стерической доступности самих рецепторов для RDE на поверхности эритроцитов раз-

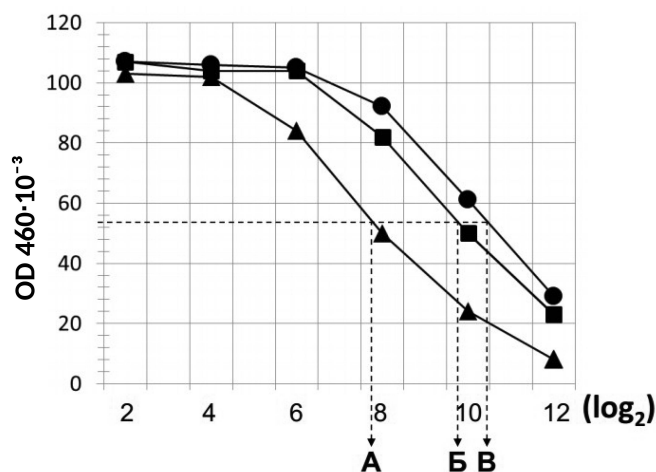


Рис. 2. Определение нейраминидазной активности препаратов RDE прямым колориметрическим методом с флуоресцентным субстратом.

Готовили четырёхкратные разведения препаратов RDE с начальной концентрацией белка 500 нг/мл для каждого исследуемого препарата: seik (▲), niem (■) и Behring (●). В каждое разведение вносили флуорогенный субстрат MuNANA, инкубировали 60 мин и определяли интенсивность флуоресценции при 460 нм (ось ординат), как описано в методах. По оси абсцисс откладывали двоичный логарифм величины обратного разведения препаратов RDE. Специфическую активность препаратов рассчитывали посредством сравнения количества белка в пробе на уровне 50% интенсивности OD460 (горизонтальная линия), принимая в качестве стандарта сравнения RDEBehring, имеющей известную нейраминидазную активность 40Е на 1 мг белка (проба А). Препараты RDEнием (Б) и RDEсеик (В) имели нейраминидазную активность 31,5 и 8,5 Е/мг соответственно.

Fig. 2. Determination of neuraminidase activity of RDE compounds by direct calorimetric method with a fluorescent substrate.

Four-fold dilutions of RDE compounds were prepared, with an initial protein concentration of 500 ng/ml for each tested drug: seiken (▲), niem (■), and behring (●). A fluorogenic MuNANA substrate was added to each dilution, incubated for 60 minutes, and the fluorescence intensity was determined at 460 nm (ordinate axis), as described in the methods. The binary logarithm of the reverse dilution of RDE compounds was outlined at the abscissa axis. The specific activity of the drugs was calculated by comparing the amount of protein in the sample at the level of 50% of the OD460 intensity (horizontal line), using the RDE/Behring as a comparison standard, which has a known neuraminidase activity of 40U per mg of protein (sample A). The RDE compounds niem (B) and seiken (C) had 31.5 and 8.5 U/mg, respectively.

личного происхождения [9, 10]. С учётом полученных результатов можно рекомендовать эритроциты человека как наиболее подходящие для предлагаемого теста нейраминидазного торможения гемагглютинации.

Заключение

Предложен простой метод оценки нейраминидазной активности препаратов RDE с использованием эритроцитов человека и лабораторного вируса гриппа А. В основе метода лежит способность нейраминидазы отщеплять остатки сиаловой кислоты на клеточной поверхности эритроцитов разных видов животных и человека, что лишает эритроциты способности

к агглютинации вирусом гриппа человека. Метод позволяет оценить рецептор-разрушающую (нейраминидазную) активность препаратов RDE и сравнить их между собой, что бывает необходимо для оптимизации постановки РТГА при мониторинге сывороток крови животных и людей, больных или переболевших гриппозной инфекцией. Метод прост в исполнении, не требует дорогих реагентов и оборудования и доступен для любой вирусологической лаборатории.

Благодарность. Авторы выражают благодарность проф. Е.И. Бурцевой и проф. Е.И. Исаевой из Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (Москва) и канд. биол. наук С.Н. Норкиной из Научно-производственного объединения «НАРВАК» (Москва) за полезное обсуждение работы, а также А.И. Чернышову из ФГА-ОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России за техническую помощь.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1-4, 6-10 см. REFERENCES)

- Жирнов О.П. Биохимические вариации цитолитического действия ортомиксо- и парамиксовирусов в культуре клеток из легочной опухоли человека. *Биохимия*. 2017; 82(9): 1345-53.

REFERENCES

- Hirst G.K. The quantitative determination of influenza virus and antibodies by means of red cell agglutination. *J. Exp. Med.* 1942; 75(1): 49-64. DOI: <http://doi.org/10.1084/jem.75.1.49>
- Salk J.E. Simplified procedure for titrating hemagglutinating capacity of influenza virus and the corresponding antibody. *J. Immunol.* 1944; 49(2): 87-98.
- Liebowitz D., Gottlieb K., Kolhatkar N.S., Garg S.J., Asher J.M., Nazareno J., et al. Efficacy, immunogenicity, and safety of an oral influenza vaccine: a placebo-controlled and active-controlled phase 2 human challenge study. *Lancet Infect. Dis.* 2020; 20(4): 435-44. DOI: [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30584-5](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30584-5)
- Burnett F.M., Stone J.D. The receptor destroying enzyme of *Vibrio Cholerae*. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 1947; 25: 227-33.
- Zhirnov O.P. Biochemical variations in cytolitic activity of ortho- and paramyxoviruses in human lung tumor cell culture. *Biochemistry (Mosc)*. 2017; 82(9): 1048-54. DOI: <http://doi.org/10.1134/S0006297917090085>
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72(1-2): 248-54. DOI: <http://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Ernst O., Zor T. Linearization of the Bradford protein assay. *J. Vis. Exp.* 2010; (38): pii 1918. DOI: <http://doi.org/10.3791/1918>
- Leang S.K., Hurt A.C. Fluorescence-based neuraminidase inhibition assay to assess the susceptibility of influenza viruses to the neuraminidase inhibitor class of antivirals. *J. Vis. Exp.* 2017; (122): e55570. DOI: <http://doi.org/10.3791/55570>
- Viswanathan K., Chandrasekaran A., Srinivasan A., Raman R., Sasisekharan V., Sasisekharan R. Glycans as receptors for influenza pathogenesis. *Glycoconj J.* 2010; 27(6): 561-70. DOI: <http://doi.org/10.1007/s10719-010-9303-4>
- Mayr J., Lau K., Lai J.C.C., Gagarinov I.A., Shi Y., McAtamney S., et al. Unravelling the role of o-glycans in influenza a virus infection. *Sci. Rep.* 2018; 8(1): 16382. DOI: <http://doi.org/10.1038/s41598-018-34175-3>