

УДК: 619:578.824.11:57.082.26 2022.07.21
DOI 10.52419/ISSN2072-2419.2022.4.53

АДАПТАЦИЯ ВИРУСА БЕШЕНСТВА ПРОИЗВОДСТВЕННОГО ШТАММА «ОВЕЧИЙ» ГНКИ К ПЕРЕВИВАЕМЫМ КУЛЬТУРАМ КЛЕТОК НГУК-1 И ВНК-21/13

Галеева А. Г.1 – к.в.н., ст. науч. сотрудник (0000-0003-2650-6459), Ефимова М. А.1,2 – д.б.н., вед. науч. сотрудник (0000-0001-8786-1310), Арсланова А.Ф.1 – к.в.н., ст. науч. сотрудник, Насыров Ш. М.1 – к.в.н., вед. науч. сотрудник, Ахмадеев Р.М.1 – к.в.н., вед. науч. сотрудник (0000-0002-1732-6977), Самсонов А. И.1 – к.в.н., вед. науч. сотрудник.
1 - ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», 2 - ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ

Ключевые слова: вирус бешенства, штамм «ОВЕЧИЙ» ГНКИ, культура клеток, НГУК-1, ВНК-21/13

Key words: rabies virus, strain of "SHEEP" GNKI, cell culture, NGUK-1, BHK-21/13



РЕФЕРАТ

Подбор оптимальной линии перевиваемой культуры клеток и адаптация к ней вируса бешенства позволяет исключить использование лабораторных животных, полностью контролировать процесс получения вирусосодержащего материала с высокой инфекционной активностью в больших количествах и с более быстрым и коротким производственным циклом. Адаптационный потенциал различных штаммов вируса бешенства существенно варьирует, в связи с этим целью исследования явилось изучение чувствительности производственного штамма вируса бешенства «Овечий» ГНКИ к перевиваемым культурам клеток НГУК-1 и ВНК-21/13. Адаптацию вируса бешенства к перевиваемым культурам клеток НГУК-1 и ВНК-21/13 осуществляли путем последовательного пассирования. Титр вируса рассчитывали по количеству флуоресцирующих фокусов, концентрацию антигена вируса бешенства определяли методом нИФА, патогенность вируса на уровне 11 пассажа на разных клеточных линиях – на белых мышах.

Установлено, что перевиваемая линия клеток ВНК-21/13 обеспечивала более быструю адаптацию вируса и достижение максимальных титров в течение 36-48 часов, тогда как линия НГУК-1 поддерживала относительно медленную репликацию - 96-120 часов. Оптимальная множественность инфицирования НГУК-1 и ВНК-21/13 составила 0,1 ККИД50/клетку, при этом титры штаммов вируса «Овечий» составили $4,11 \pm 0,26$ и $6,17 \pm 0,49$ Ig ККИД50/см³ соответственно. Репликация вируса в клетках ВНК-21/13 характеризовалась большей интенсивностью: антигенный титр вируса на всех пассажных уровнях в 1,5-2 раза ($p < 0,05$) превышал таковой в клетках НГУК-1. Положительная динамика накопления вирусного титра сохранялась до 8-9 пассажа, после чего данный показатель оставался стабильным до 11 пассажа включительно, сохраняя патогенность для белых мышей. Таким образом, установлено, что перевиваемая линия клеток ВНК-21/13 по репликативным возможностям значительно превосходит линию клеток НГУК-1 и может использоваться для наработки вирусного сырья для производства средств диагностики и специфической профилактики.

ВВЕДЕНИЕ

Вирус бешенства и родственные ему лиссавирусы обладают высоким тропизмом к нейронам периферической и центральной нервной системы *in vivo* [1]. В то же время *in vitro* вирус бешенства способен инфицировать многие типы и виды клеток, включая клетки ненервного происхождения, такие как клетки почек новорожденного сирийского хомячка (ВНК-21) [2], почек эмбриона коровы (MDBK), почек собаки (MDCK), почек африканской зеленой мартышки (Vero) [3], клетки эпителиоидной карциномы шейки матки (HeLa), фибробластов легких абортированного плода человека (MRC-5) [4], а также куриные эмбрионы [5].

Молекулярные механизмы адаптации вируса бешенства к репликации в клеточных культурах изучены недостаточно, но позволяют дифференцировать зависимые и независимые от рецепторов факторы. По некоторым данным, в качестве потенциальных участков связывания и внедрения вируса в клетку могут выступать углеводные фрагменты, фосфолипиды и сигнализированные ганглиозиды [6]. Белки вируса бешенства N (нуклеопротеин), P (фосфопротеин) и L (большая полимераза) необходимы для репликации и транскрипции вируса, белки M (матриксный белок), G (гликопротеин) участвуют в высвобождении инфекционных вирусных частиц посредством почкования на плазматической мембране [7].

Молекула адгезии нейронов (NCAM1), рецептор нейротрофина р75 (NGFR или р75NTR), никотиновый ацетилхолиновый рецептор (nAChR) и метаботропный рецептор глутамата подтипа 2 (mGluR2) были описаны как входные рецепторы вируса бешенства [8]. В первичных нейронах было продемонстрировано совместное проникновение интернализированных р75NTR и вирионов вируса бешенства в ретроградный аксональный транспортный механизм, что указывает на рецепторную роль р75NTR в процессе нейроинвазии. Хотя могут существовать дополнительные рецепторы, до сих пор неизвестно, способствуют ли они и в какой

степени инфицированию *in vivo*, распространению в нервной системе и ограничению репликации полевых изолятов вируса, неадаптированных к клеточной линии. Широкая панель ненейрональных клеточных линий, чувствительных к лабораторным штаммам вируса бешенства, указывает на существование универсальных рецепторов, поддерживающих вирусную инфекцию [9, 10].

Помимо задействования рецепторов, заражение клеток высоковирулентными уличными изолятами вируса бешенства может определяться потенциалом репликации и способностью вируса противодействовать врожденному иммунному ответу в конкретном типе клеток. Другим рецептор-независимым фактором является способность вируса бешенства в процессе адаптации к клеточной культуре приобретать дополнительные сайты N-гликозилирования в поверхностном гликопротеине G. Ямада с соавт. (2013) показали, что продукция вируса за счет повышенной экспрессии гена G может играть главную роль в адаптации к клеточной культуре [11]. Nitschel S. с соавт. (2021) установили, что точечные мутации в эктодомене гликопротеина вируса бешенства опосредуют адаптацию к клеточной культуре за счет улучшенного высвобождения вируса зависимым и независимым образом от клетки-хозяина, причем для приобретения адаптивных мутаций в гликопротеине G и на C-конце фосфопротеина P было достаточно десяти пассажей вируса [12].

Фиксированные штаммы и уличные изоляты вируса бешенства требуют периода адаптации к перевиваемым линиям клеток. Подбор оптимальной линии перевиваемой культуры клеток и адаптация к ней вируса бешенства позволяет исключить использование лабораторных животных, полностью контролировать процесс получения вирусосодержащего материала с высокой инфекционной активностью в больших количествах и с более быстрым и коротким производственным циклом. Поскольку адаптационный потенциал различных штаммов вируса бешенства

существенно варьирует, целью данного исследования явилась адаптация производственного штамма вируса бешенства «Овечий» ГНКИ к перевиваемым культурам клеток НГУК-1 и ВНК-21/13.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штамм вируса. В работе использовали производственный штамм фиксированного вируса бешенства «Овечий» ГНКИ с инфекционным титром 5,25 lg ЛД₅₀/0,1 см³ (коллекция штаммов микроорганизмов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», г. Казань).

Клеточные линии. В работе использованы перевиваемые клеточные культуры: НГУК-1, ВНК-21/13 (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», г. Казань). Клетки линий НГУК-1 и ВНК-21/13 культивировались в культуральных флаконах на среде Игла-МЕМ («ПанЭко», Россия) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки («Gibco», США), 20 мМ глутамина («ПанЭко», Россия), 10 мМ пенициллина-стрептомицина («ПанЭко», Россия) при +37 °С в атмосфере 5% CO₂. Адаптацию вируса бешенства к перевиваемым культурам клеток НГУК-1 и ВНК-21/13 осуществляли путем последовательного пассирования.

Определение титра вируса бешенства. Титр вируса в образцах культуральной жидкости определяли быстрым культуральным методом на основе прямой иммунофлуоресценции, описанным Барковой с соавт. (2013) [13], с небольшими

модификациями. Для окрашивания использовали поликлональный флуоресцирующий антирабический глобулин (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»); титр вируса рассчитывали по количеству флуоресцирующих фокусов и выражали в lg ККИД₅₀/см³ (клеточная культуральная инфекционная доза). Дополнительно титр вируса на различных пассажных уровнях определяли путём внутримозгового заражения белых мышей и выражали в lg ЛД₅₀/0,1 см³. Концентрацию антигена вируса бешенства определяли методом непрямого иммуноферментного анализа (НИФА) с использованием «Набора для диагностики бешенства методом иммуноферментного анализа» (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ Statistica 6.0 («Statsoft», США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИССЛЕДОВАНИЙ

Для адаптации вируса бешенства шт. «Овечий» ГНКИ с целью получения вирусосодержащего материала были отобраны перевиваемые культуры клеток линий НГУК-1 и ВНК-21. В процессе репродукции вируса цитопатогенное действие на культурах клеток линии НГУК-1 проявлялось в виде мелкозернистой деструкции монослоя (до 40% – через 96 часов инкубации) и в виде симпластообразования на клетках линии ВНК-21, первичные признаки которого прослеживались на 2-е

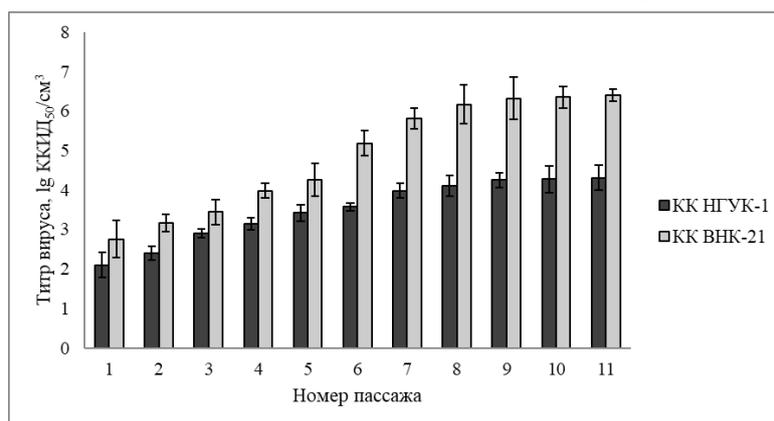


Рис. 1. Динамика изменения вирусного титра при пассировании вируса бешенства шт. «Овечий» ГНКИ на клеточных линиях НГУК-1 и ВНК-21/13.

Таблица 1

Динамика изменения антигенного титра в образцах культуральной жидкости в НИФА на разных пассажных уровнях.

Клеточная линия	Антигенный титр в НИФА, 1/п			
	1-3 пассажи	4-6 пассажи	7-9 пассажи	10-11 пассажи
ВНК-21/13	320-640	1280-2560	2560-5120	5120
НГУК-1	160-320	320-640	1280	1280-2560

Таблица 2

Динамика изменения инфекционного титра вируса бешенства.

Клеточная линия	Титр вируса на различных пассажных уровнях, lg ЛД ₅₀ /0,1 см ³			
	1-3 пассажи	4-6 пассажи	7-9 пассажи	10-11 пассажи
ВНК-21	3,42 ± 0,41	3,92 ± 0,20	4,92 ± 0,20	5,08 ± 0,20
НГУК-1	2,83 ± 0,27	3,33 ± 0,10	4,08 ± 0,37	4,50 ± 0,18

сутки инкубации; через 96 часов регистрировалось отслоение апоптотических клеток.

В результате эксперимента было установлено, что при МОИ 0,01 (multiplicity of infection — множественность инфицирования) ККИД50/клетку титр вируса бешенства в культурах клеток НГУК-1 и ВНК-21 на первом пассаже составил 1,25±0,13 и 2,50±0,22 lg ККИД50/см³ соответственно, а время культивирования до достижения 80% деструкции монослоя составило 6 и 4 суток. При увеличении множественности инфицирования до 0,1 ККИД50/клетку 80% деструкция монослоя в культурах клеток достигалась за 72 часа, при этом титр вируса бешенства на первом пассаже составил 2,1±0,32 и 2,76±0,47 lg ККИД50/см³ соответственно. Вероятно, это связано с тем, что почти все клетки инфицируются одновременно после заражения, что влияет на скорость роста клеток, в результате чего вирус проходит только один цикл репликации, накапливаясь в низком титре на протяжении всего периода инкубации. В процессе исследования было проведено по 11 последовательных пассажей вируса бешенства шт. «Овечий» ГНКИ на клеточных линиях НГУК-1 и ВНК-21. Динамика накопления вирусного титра при МОИ 0,1 ККИД50/клетку отражена на рисунке 1.

Согласно полученным результатам, последовательное накопление вируса бе-

шенства регистрировалось на обеих культурах клеток, показатель вирусного титра достигал максимума к 8-9 пассажиру (4,11±0,26 lg ККИД50/см³ на 9 пассаже для НГУК-1 и 6,17±0,49 lg ККИД50/см³ на 8 пассаже для ВНК-21/13). При последующем пассировании статистически значимых отличий в значениях данного показателя не выявлялось. Репродукция вируса характеризовалась большей интенсивностью на культуре клеток ВНК-21/13, где антигенный титр в 2-2,5 раза превышал таковой на культуре клеток НГУК-1 (табл. 1).

Результаты оценки патогенности вируса бешенства на уровне 11 пассажа на разных клеточных линиях показали, что вирус, адаптированный как к НГУК-1, так и к ВНК-21/13, не утратил патогенности для белых мышей. У зараженных мышей клинические признаки бешенства проявлялись на 5-е сутки после заражения, гибель мышей наблюдали на 7-8-е сутки (табл. 2), при этом продолжительность инкубационного периода варьировала от 12-15 суток на первом пассажном уровне (1-3 пассажи) до 5-7 суток – на третьем (7-9 пассажи).

Согласно результатам, представленным в таблице 2, наблюдалось планомерное увеличение титра инфекционности шт. «Овечий» ГНКИ на клеточных линиях НГУК-1 и ВНК-21/13 на протяжении 11 пассажей.

ВЫВОДЫ

Анализ способности штамма «Овечий» ГНКИ вируса бешенства к репликации на клеточных линиях НГУК-1 и ВНК-21/13 показал, что вирус на достаточном уровне реплицировался в обеих клеточных системах, однако максимальный выход вируса и сроки достижения деструкции монослоя варьировались в зависимости от вида линии клеток.

Оптимальная множественность инфицирования НГУК-1 и ВНК-21/13 составила 0,1 ККИД50/клетку, при этом титры штаммов вируса «Овечий» составили $4,11 \pm 0,26$ и $6,17 \pm 0,49$ lg ККИД50/см³ соответственно. Репликация вируса в клетках ВНК-21/13 характеризовалась большей интенсивностью: антигенный титр вируса на всех пассажных уровнях в 1,5-2 раза ($p < 0,05$) превышал таковой в клетках НГУК-1. Положительная динамика накопления вирусного титра сохранялась до 8-9 пассажа, после чего данный показатель оставался стабильным до 11 пассажа включительно.

Таким образом, установлено, что перемещаемая линия клеток ВНК-21/13 по репликативным возможностям значительно превосходит линию клеток НГУК-1 и может использоваться для наработки вирусного сырья для производства средств диагностики и специфической профилактики.

ADAPTATION OF THE RABIES VIRUS OF THE PRODUCTION STRAIN "SHEEP" GNKI TO THE TRANSPLANTED CULTURES OF NGUK-1 AND BHK-21/13 CELLS

Galeeva A. G. – Ph.D. of vet. sc., senior researcher¹, Efimova M. A. – D. of boill. sc., leading researcher^{1,2}, Arslanova A.F. – Ph.D. of vet. sc. senior researcher¹, Nasyrov Sh. M. – Ph.D., ved. sc. leading researcher¹, R.M. Akhmadeev – Ph.D., ved. sc. leading researcher¹, Samsonov A. I. – Ph.D., ved. sc. leading researcher¹

1 - Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, 2 - Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N.E. Bauman»

ABSTRACT

The selection of the optimal line of the transplanted cell culture and the adaptation of the rabies virus to it makes it possible to exclude the use of laboratory animals, fully control the process of obtaining virus-containing material with high infectious activity in large quantities and with a faster and shorter production cycle. The adaptive potential of various strains of rabies virus varies significantly, in this regard, the aim of the study was to study the sensitivity of the production strain of the rabies virus "Sheep" GNKI to the transplanted cultures of NGUK-1 and BHK-21/13 cells. The adaptation of the rabies virus to the transplanted cultures of NGUK-1 and VNK-21/13 cells was carried out by sequential passivation. The titer of the virus was calculated by the number of fluorescent foci, the concentration of rabies virus antigen was determined by the ELISA method, the pathogenicity of the virus at the level of 11 passages on different cell lines – on white mice.

It was found that the transplanted BHK-21/13 cell line provided a faster adaptation of the virus and the achievement of maximum titers within 36-48 hours, whereas the NGUK-1 line maintained relatively slow replication and ensured the achievement of maximum titers after 96-120 hours. The optimal multiplicity of infection with NGUK-1 and BHK-21/13 was 0.1 KKID50/cell, while the titers of the "Sheep" virus strains were 4.11 ± 0.26 and 6.17 ± 0.49 lg KKID50/cm³, respectively. Virus replication in BHK-21/13 cells was characterized by greater intensity: the antigenic titer of the virus at all passage levels was 1.5-2 times ($p < 0.05$) higher than that in NGUK-1 cells. The positive dynamics of the accumulation of the viral titer persisted until passage 8-9, after which this indicator remained stable until passage 11 inclusive. The results of the assessment of the pathogenicity of the rabies virus at the level of passage 11 on different cell lines showed that the virus adapted to both NGUK-1 and BHK-21/13 has not lost pathogenicity for white mice. Thus, it was found that the transplanted BHK-21/13 cell line significantly exceeds the NGUK-1 cell line in terms of

replicative capabilities and can be used to develop viral raw materials for the production of diagnostic tools and specific prevention.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- 1.Абрамова, Е.Г. Разработка стандартного образца предприятия активности антирабического иммуноглобулина для применения в реакции нейтрализации вируса на культуре клеток Vero / Е.Г. Абрамова, Ю.К. Гаврилова, С.В. Генералов и др. // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. - 2022. - 22(1). - С. 38-48.
- 2.Шишков, А.В. Динамика адаптации вируса бешенства вакцинного штамма "RV-97" к монослойной культуре клеток ВНК-21/13" / А.В. Шишков, А.А. Пяткина, Б.Л. Манин // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2021. - №2 (54). - С. 157-164.
- 3.Rourou, S. Adaptation of Vero cells to suspension growth for rabies virus production in different serum free media / S. Rourou, M. Ben Zakkour, H. Kallel // Vaccine. - 2019. - 37(47). - p. 6987-6995.
- 4.Yang, X. Interferon Inhibition Enhances the Pilot-Scale Production of Rabies Virus in Human Diploid MRC-5 Cells / X. Yang, M. Wan, L. Cai, A. Hou, B. Sun, Y. Zhou, F. Gao, W. Su, C. Jiang // Viruses. - 2021. - 14 (1):49.
- 5.Guo, C. The adaptation of a CTN-1 rabies virus strain to high-titered growth in chick embryo cells for vaccine development / C. Guo, C. Wang, S. Luo, et al. // J Virol. - 2014. -11: 85.
- 6.Lafon, M. Rabies virus receptors / M. Lafon // Journal of Neurovirology. - 2005. - 11(1). - p. 82-87.
- 7.Li, C. Deficient Incorporation of Rabies Virus Glycoprotein into Virions Enhances Virus-Induced Immune Evasion and Viral Pathogenicity / C. Li, H. Zhang, L. Ji, X. Wang et al. // Viruses. - 2019. - 4. - 11 (3):218.
- 8.Wang, J. Metabotropic glutamate receptor subtype 2 is a cellular receptor for rabies virus /J. Wang, Z. Wang, R. Liu et al. // PLoS Pathog. - 2018. -14:e1007189.
- 9.Potratz, M. Astrocyte Infection during Rabies Encephalitis Depends on the Virus

Strain and Infection Route as Demonstrated by Novel Quantitative 3D Analysis of Cell Tropism / M. Potratz, L. Zaeck, M. Christen et al. // Cells. - 2020. - 9:412.

- 10.Takahashi, T. Genetic and Phenotypic Characterization of a Rabies Virus Strain Isolated from a Dog in Tokyo, Japan in the 1940s / T. Takahashi, M. Inukai, M. Sasaki et al. // Viruses. - 2020. - 12:914.
- 11.Yamada, K. Addition of a single N-glycan to street rabies virus glycoprotein enhances virus production / K. Yamada, K. Noguchi, D. Nonaka, et al. // J. Gen. Virol. - 2013. - 94. - p. 270-275.
12. Nitschel, S. Point Mutations in the Glycoprotein Ectodomain of Field Rabies Viruses Mediate Cell Culture Adaptation through Improved Virus Release in a Host Cell Dependent and Independent Manner. / S. Nitschel, L. Zaeck, M., Potratz et al. // Viruses. - 2021. - V.13. - (10):1989.
13. Баркова, И.П. Быстрый культуральный метод для индикации антигенов вируса бешенства в инфицированных клеточных культурах / И.П. Баркова, Ф.Г. Нагиева, В.Г. Никулина, А.Н. Лисаков // Инфекция и иммунитет. - 2013. - Т. 3. - № 4. - С. 323-326.

REFERENCES

- 1.Abramova, E.G. Development of a standard sample of the activity of an anti-rabies immunoglobulin for use in the virus neutralization reaction on Vero cell culture / E.G. Abramova, Yu.K. Gavrilova, S.V. Generalov et al. // Biopreparations. Prevention, diagnosis, treatment. - 2022. - 22(1). - Pp. 38-48. [in Russ.]
- 2.Shishkov, A.V. Dynamics of adaptation of rabies virus vaccine strain "RV-97" to monolayer cell culture VNK-21/13" / A.V. Shishkov, A.A. Pyatkina, B.L. Manin // Bulletin of the Ulyanovsk State Agricultural Academy. - 2021. - №2 (54). - Pp. 157-164. [in Russ.]
- 3.Rourou, S. Adaptation of Vero cells to suspension growth for rabies virus production in different serum free media / S. Rourou, M. Ben Zakkour, H. Kallel // Vaccine. - 2019. - 37(47). - p. 6987-6995.
- 4.Yang, X. Interferon Inhibition Enhances the Pilot-Scale Production of Rabies Virus in

- Human Diploid MRC-5 Cells / X. Yang, M. Wan, L. Cai, A. Hou, B. Sun, Y. Zhou, F. Gao, W. Su, C. Jiang // *Viruses*. – 2021. - 14 (1):49.
5. Guo, C. The adaptation of a CTN-1 rabies virus strain to high-titered growth in chick embryo cells for vaccine development / C. Guo, C. Wang, S. Luo, et al. // *J Virol*. – 2014. – 11: 85.
6. Lafon, M. Rabies virus receptors / M. Lafon // *Journal of Neurovirology*. – 2005. - 11(1). – p. 82–87.
7. Li, C. Deficient Incorporation of Rabies Virus Glycoprotein into Virions Enhances Virus-Induced Immune Evasion and Viral Pathogenicity / C. Li, H. Zhang, L. Ji, X. Wang et al. // *Viruses*. – 2019. – 4. - 11 (3):218.
8. Wang, J. Metabotropic glutamate receptor subtype 2 is a cellular receptor for rabies virus / J. Wang, Z. Wang, R. Liu et al. // *PLoS Pathog*. – 2018. -14:e1007189.
9. Potratz, M. Astrocyte Infection during Rabies Encephalitis Depends on the Virus Strain and Infection Route as Demonstrated by Novel Quantitative 3D Analysis of Cell Tropism / M. Potratz, L. Zaeck, M. Christen et al. // *Cells*. – 2020. – 9:412.
10. Takahashi, T. Genetic and Phenotypic Characterization of a Rabies Virus Strain Isolated from a Dog in Tokyo, Japan in the 1940s / T. Takahashi, M. Inukai, M. Sasaki et al. // *Viruses*. – 2020. - 12:914.
11. Yamada, K. Addition of a single N-glycan to street rabies virus glycoprotein enhances virus production / K. Yamada, K. Noguchi, D. Nonaka, et al. // *J. Gen. Virol*. – 2013. – 94. – p. 270–275.
12. Nitschel, S. Point Mutations in the Glycoprotein Ectodomain of Field Rabies Viruses Mediate Cell Culture Adaptation through Improved Virus Release in a Host Cell Dependent and Independent Manner. / S. Nitschel, L. Zaeck, M., Potratz et al. // *Viruses*. – 2021. – V.13. – (10):1989.
13. Barkova, I.P. Rapid culture method for the indication of rabies virus antigens in infected cell cultures / I.P. Barkova, F.G. Nagieva, V.G. Nikulina, A.N. Lisakov // *Infection and immunity*. - 2013. – Vol. 3. – No. 4. – pp. 323-326. [in Russ.]