

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ВАКЦИН И СЫВОРОТОК ИМ. И. И. МЕЧНИКОВА»

На правах рукописи



Черепович Богдан Сергеевич

**КОМПЛЕКСНАЯ ОЦЕНКА ПОСТИНФЕКЦИОННОГО И
ПОСТВАКЦИНАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА ПРОТИВ SARS-COV-2**

3.2.7. Иммунология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
академик РАН
Свитич Оксана Анатольевна

Москва – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1 Новая коронавирусная инфекция: открытие и общая характеристика SARS-CoV-2	14
1.2 Адаптивный иммунный ответ к SARS-CoV-2	23
1.2.1 Гуморальный иммунный ответ на SARS-CoV-2	25
1.2.2 Клеточный иммунный ответ при COVID-19	36
1.3 Вакцинные препараты против SARS-CoV-2.....	42
1.4 Методы оценки адаптивного иммунитета к SARS-CoV-2.....	47
1.4.1 Методы оценки гуморального иммунитета при COVID-19.....	47
1.4.2 Методы оценки клеточного иммунитета при COVID-19.....	56
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	63
2.1 Материалы	63
2.2 Методы.....	64
2.2.1 Метод культивирования и титрования SARS-CoV-2	64
2.2.2 Методы, использованные для оценки гуморального иммунитета к SARS-CoV-2	65
2.2.3 Методы, использованные для оценки Т-клеточного иммунитета к SARS-CoV-2	72
2.3 Статистические методы анализа	74
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	75
3.1 Изучение антитело-опосредованного иммунного ответа к SARS-CoV-2.....	75
3.1.1 Создание диагностических тест-систем для количественного и качественного анализа антител класса IgG к антигенам SARS-CoV-2.....	75
3.1.2 Изучение авидности IgG антител к RBD SARS-CoV-2 в группах вакцинированных и переболевших добровольцев	85
3.1.3 Создание, валидация и апробация суррогатного вируснейтрализующего теста для определения нейтрализующих антител, специфически блокирующих взаимодействие между RBD и ACE2	93
3.1.4 Сопоставление результатов трех ИФА-тестов с титрами вируснейтрализующих антител к SARS-CoV-2 у вакцинированных добровольцев	100

3.1.5 Оценка корреляции суррогатного вируснейтрализующего теста с реакцией нейтрализации на стадии доклинических испытаний вакцинного препарата против SARS-CoV-2	106
3.2 Изучение клеточно-опосредованного иммунного ответа к SARS-CoV-2.....	112
3.2.1 Разработка, валидация и апробация системы определения Т-клеточного иммунного ответа к SARS-CoV-2	113
3.2.2 Оценка Т-клеточного иммунного ответа при помощи ИГРА-теста на выборке добровольцев с гибридным иммунитетом	119
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	122
ВЫВОДЫ	129
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	131
ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ	132
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	134

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Пандемия, вызванная вирусом SARS-CoV-2, стала одним из самых значимых глобальных вызовов XXI века, существенно повлияв на здравоохранение, экономику и социальную сферу. Несмотря на успехи в разработке вакцин и методов лечения, вирус продолжает эволюционировать, что приводит к появлению новых вариантов, обладающих повышенной контагиозностью и устойчивостью к существующим мерам защиты [1]. В данных условиях понимание механизмов развития и функционирования иммунного ответа — как естественного (постинфекционного), так и индуцированного вакцинацией (поствакцинального) — приобретает особую значимость. Это знание является основой для разработки эффективных стратегий профилактики и контроля инфекции.

Особую важность приобретает комплексная оценка постинфекционного и поствакцинального иммунитета против SARS-CoV-2, поскольку данные исследований неоднозначны и не соответствуют каноническим представлениям о длительности и эффективности защиты. На сегодняшний день известно, что иммунный ответ на вирус включает как клеточные, так и гуморальные компоненты, каждый из которых играет свою роль в защите организма [2]. Однако характер и продолжительность этого ответа могут значительно варьироваться в зависимости от множества факторов, таких как возраст пациента, наличие сопутствующих заболеваний, тяжесть перенесенной инфекции, тип вакцины и время, прошедшее после вакцинации или заболевания [3].

Кроме того, появление новых вариантов SARS-CoV-2 ставит под сомнение эффективность существующего иммунитета, таких как антитела и Т-клетки, выработанные после контакта с исходным штаммом или вакцинами на его основе, могут быть недостаточно эффективными против новых вариантов вируса [4]. Это требует постоянного мониторинга изменений в иммунологическом профиле

населения и адаптации вакцинных платформ. Понимание динамики иммунного ответа также необходимо для прогнозирования рисков повторных инфекций, оценки необходимости ревакцинации и разработки персонализированных подходов к профилактике и лечению.

Изучение взаимодействия между постинфекционным и поствакцинальным иммунитетом представляет особую значимость в контексте долгосрочных последствий COVID-19. Известно, что у части пациентов после перенесенной инфекции развивается состояние, известное как "длительный COVID" (long COVID). Хотя точные механизмы этого явления еще полностью не изучены, ряд исследований указывает на возможную связь с дисфункцией иммунной системы [5]. Проведение углубленного анализа данных процессов не только позволит усовершенствовать подходы к медицинскому ведению пациентов, но и создаст основу для разработки новых терапевтических стратегий, направленных на снижение негативных последствий заболевания.

В связи с этим важным аспектом является разработка и оптимизация систем для комплексного изучения гуморального и клеточного иммунитета — как после перенесенной инфекции, так и после вакцинации. Эти системы позволят всесторонне изучить формирование популяционного иммунитета и послужат основой для разработки будущих стратегий борьбы с COVID-19.

Степень разработанности темы исследования

На сегодняшний день накоплен значительный объем данных, касающихся механизмов формирования иммунного ответа после перенесенного заболевания COVID-19 и вакцинации. Современные исследования показывают, что после перенесенной инфекции у большинства людей формируется как гуморальный (антителозависимый), так и клеточный иммунитет. Уровень антител к ключевым белкам вируса, таким как S-белок и его рецептор-связывающий домен (RBD), коррелирует с защитой от повторного заражения. Однако продолжительность и

стабильность этого иммунитета остаются предметом научных дискуссий. В научной литературе широко представлены данные об уровнях антител IgM, IgG и IgA в сыворотке крови у пациентов с различными формами заболевания, а также их корреляция с тяжестью течения COVID-19 [Xiaowei Li, 2020; Maria Clara Saad Menezes, 2021; Тотолян А.А. и соавт., 2023]. Особенно актуальны вопросы снижения уровня антител со временем и их способности нейтрализовать новые варианты вируса. Однако методологии оценки гуморального иммунитета часто ограничиваются стандартными серологическими тестами, которые фиксируют только наличие антител, но не всегда учитывают их функциональную активность, такую как способность нейтрализовать вирус или взаимодействовать с комплементом.

Что касается клеточного иммунитета, значительные усилия направлены на изучение роли CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов в защите от SARS-CoV-2 [Sekine et al., 2020; Tarke et al., 2021, Киселевский М.В. и соавт., 2022]. Тем не менее, существующие методы анализа клеточного иммунитета, такие как ELISpot или внутриклеточное окрашивание цитокинов, требуют стандартизации и унификации для обеспечения воспроизводимости результатов между лабораториями. Кроме того, вопросы долгосрочной персистенции иммунологической памяти, особенно у лиц, перенесших бессимптомное или легкое течение заболевания, остаются недостаточно изученными.

Таким образом, несмотря на значительный прогресс в понимании отдельных компонентов иммунного ответа на SARS-CoV-2, комплексная оценка гуморального и клеточного иммунитета требует усовершенствования современных диагностических методов и стандартизированных подходов. Разработка и внедрение оптимизированных тест систем для оценки адаптивного иммунитета имеют важное значение не только для исследовательских целей, но и для клинической практики, включая мониторинг эффективности вакцин и разработку терапевтических стратегий.

Цель и задачи исследования

Целью настоящей работы является оценка формирования постинфекционного и поствакцинального адаптивного иммунитета против SARS-CoV-2.

Реализация цели исследования включает в себя решение следующих **задач**:

1. Разработать и апробировать тесты для мониторинга гуморального иммунного ответа при COVID-19.
2. Изучить динамику созревания антител IgG к RBD SARS-CoV-2 у добровольцев с различным типом иммунитета.
3. Для оценки нейтрализующих SARS-CoV-2 антител разработать суррогатный вируснейтрализующий тест.
4. Провести сравнительную оценку метода классической вируснейтрализующей реакции с суррогатным вируснейтрализующим тестом на образцах пациентов с постинфекционным, поствакцинальным и гибридным иммунитетом против SARS-CoV-2, а также оценить возможность его применения на стадии доклинических испытаний вакцинных препаратов против SARS-CoV-2.
5. Разработать и адаптировать тест, для оценки клеточного иммунитета к SARS-CoV-2, основанный на принципе измерения IFN- γ , продуцируемого Т-клетками цельной крови в ответ на их стимуляцию специфическими антигенами.
6. Оценить клеточно-опосредованный иммунный ответ против SARS-CoV-2 в группах добровольцев с разным типом иммунитета.

Научная новизна

Впервые в рамках данного исследования было показано, что пациенты с гибридным иммунитетом (комбинация перенесенной инфекции и вакцинации) демонстрируют более высокие уровни IgG-антител к RBD SARS-CoV-2 по

сравнению с пациентами, перенесшими только первичную инфекцию. Однако анализ аффинности антител выявил, что в 91,2% случаев их созревание остается неполным, что выражается в недостаточной способности антител эффективно связываться с антигеном. Показано, что авидность антител коррелирует с тяжестью течения повторной инфекции COVID-19. Полученные данные свидетельствуют о важной роли качественных характеристик антител в защите организма от повторного заражения.

Впервые продемонстрирована возможность применения sVNT-теста для оценки протективного гуморального иммунитета на этапе доклинических испытаний вакцинных препаратов против SARS-CoV-2. Предложенный подход позволил провести оценку иммунного ответа на трех видах животных. Разработка данного теста значительно расширяет возможности скрининга и анализа эффективности вакцинных кандидатов.

Впервые было показано, что у трети многократно вакцинированных реконвалесцентов не наблюдается специфического клеточно-опосредованного иммунного ответа к коронавирусу, характеризующегося отсутствием продукции интерферона-гамма после стимуляции Т-лимфоцитов антигенами вируса в цельной крови.

Теоретическая и практическая значимость

Теоретическая значимость проведенного исследования заключается в углублении понимания механизмов формирования и функционирования адаптивного иммунного ответа на SARS-CoV-2. Разработанные тест-системы для качественного определения антител класса G и их авидности позволили получить новые данные о динамике созревания гуморального иммунитета, его зрелости и протективной способности. Исследование показало, что при формировании гуморального иммунитета против SARS-CoV-2, процесс созревания IgG-антител, к рецептор-связывающему домену коронавируса, остается неполным в большинстве

случаев. Полученные данные говорят о важности изучения не только общего количества антител, но и их качественных характеристик. Так, было установлено, что индекс avidности антител может служить важным маркером для прогнозирования тяжести повторного течения COVID-19.

Разработка суррогатного вируснейтрализующего теста для определения антител, блокирующих взаимодействие RBD и ACE2, внесла существенный вклад в методологию оценки нейтрализующего потенциала антител. Полученные данные подтвердили высокую корреляцию между результатами sVNT и классической реакции нейтрализации, что демонстрирует возможность использования альтернативных методов для изучения гуморального иммунитета. Продemonстрирована универсальность метода и возможность его использования для оценки иммуногенности кандидатов в вакцинные препараты на любых видах животных, а также в клинко-диагностической практике для мониторинга популяционного гуморального иммунитета против SARS-CoV-2. Универсальность метода sVNT также открывает перспективы для его применения при исследовании других вирусных инфекций.

Для изучения напряженности Т-клеточного иммунитета против нового коронавируса был разработан тест определения *in vitro* ответа иммунных клеток крови человека на их стимуляцию антигенами SARS-CoV-2. Разработанный тест может быть использован, как для научных исследований, так и специалистами здравоохранения для мониторинга клеточно-опосредованного иммунитета против SARS-CoV-2.

Методология и методы исследования

В исследовании адаптивного иммунитета были использованы образцы сывороток крови, полученных от добровольцев мужского и женского пола старше 18 лет, которые перенесли COVID-19 и/или были вакцинированы препаратом «ГамКовидВак». Также в работе были использованы образцы сывороток крови 3

видов животных. Все образцы были охарактеризованы при помощи сбора анамнеза и классических иммунологических и вирусологических методов. По полученным данным, на первом этапе исследования, были сформированы группы для создания новых иммунологических тестов для оценки формирования как гуморального, так и клеточного звеньев иммунитета. На всех этапах работы применялись различные методы статистической обработки результатов исследований. По результатам работы сформулированы выводы и практические рекомендации.

Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие в планировании экспериментальной части исследования, включая разработку методологии оценки гуморального и клеточного иммунитета против SARS-CoV-2, а также выбор методов анализа. По итогам работы, с участием автора были зарегистрированы два набора реагентов для качественного определения IgG против SARS-CoV-2, также был разработан универсальная тест-система определения антител, блокирующих взаимодействие RBD и ACE2, которая является аналогом реакции нейтрализации. Помимо разработанных тестов оценки гуморального иммунитета, автор работы является разработчиком теста, основанного на выявлении клеточно-опосредованного иммунного ответа на SARS-CoV-2 посредством измерения гамма-интерферона, продуцируемого Т-клетками цельной крови в ответ на их стимуляцию специфическими пептидами антигенов SARS-CoV-2. Соискатель принимал личное участие в проведении анализов и интерпретации полученных данных, включая статистическую обработку результатов. Самостоятельно выполнил написание обзорной части работы и глав собственных исследований по полученным результатам. Участвовал в подготовке и представлении результатов исследования на научных конференциях и семинарах. Автором самостоятельно и в соавторстве подготовлены 9 публикаций по теме исследования, включая статьи в рецензируемых журналах и тезисы конференций.

Положения выносимые на защиту

1. Процесс формирования антител класса IgG, направленных против рецептор-связывающего домена SARS-CoV-2, в 91,2% случаев характеризуется низкой авидностью, даже спустя значительное время после инфицирования или вакцинации, и не зависит от кратности контакта с антигеном. Исследования, проведенные на пациентах, перенесших инфекцию, вызванную исходным штаммом SARS-CoV-2 (Wuhan-Hu-1), показали, что индекс авидности IgG к RBD может служить прогностическим маркером риска тяжелого течения заболевания при повторных инфекциях.

2. Разработана и апробирована тест-система для определения антител, блокирующих взаимодействие RBD SARS-CoV-2 с ACE2-рецептором человека (суррогатный вируснейтрализующий тест). Установлена высокая степень корреляции с классической реакцией нейтрализации при анализе вируснейтрализующих антител у добровольцев с постинфекционным, поствакцинальным и гибридным иммунитетом, а также для трех видов животных: собак, трансгенных мышей и коров. Было установлено, что в среднем у 7,4% добровольцев с различным типом иммунитета отсутствовали вируснейтрализующие антитела.

3. Разработан и апробирован тест, основанный на способности Т-клеток иммунных к SARS-CoV-2 людей продуцировать IFN- γ в ответ на их стимуляцию антигенами SARS-CoV-2 в цельной крови.

4. Оценка клеточно-опосредованного иммунитета к SARS-CoV-2 показала, что у двух третей добровольцев с гибридным иммунитетом (постинфекционным и поствакцинальным) наблюдалась специфическая Т-клеточная реакция. Уровень этой реакции был выше у лиц, ревакцинированных за два месяца до исследования. Взаимосвязи между уровнем антител к рецептор-связывающему домену SARS-CoV-2 и уровнем стимулированного IFN- γ выявлено не было.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Направление диссертационного исследования соответствует п. 2 «Изучение механизмов врожденного и адаптивного иммунитета в норме и при патологии», п. 6 «Разработка и усовершенствование методов диагностики, лечения и профилактики инфекционных, аллергических и других иммунопатологических процессов» паспорта специальности, п. 9 «Разработка и усовершенствование методов оценки качества постинфекционного и поствакцинального иммунитета, эффективности и безопасности новых вакцинных препаратов» паспорта специальности» 3.2.7. Иммунология (медицинские науки).

Степень достоверности и апробации результатов работы

Основные положения диссертации были доложены и обсуждены на научно-практических конференциях: Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания (26–29 октября 2021 г., Сочи); Научная конференции с международным участием «New Approaches in the Field of Microbiology, Virology, Immunology and Epidemiology», посвященной 300-летию РАН (03–04 июня 2022 г., Москва); Научная конференция молодых ученых с международным участием «New Approaches in the Field of Microbiology, Virology, Immunology and Epidemiology», посвященная 300-летию РАН (20–21 апреля 2023 г., Москва); Всероссийская конференции: «COVID-19 – экспертный опыт работы в условиях пандемии и межковидный период. Все о диагностике, лечении, реабилитации пациентов. Коморбидный пациент — междисциплинарный подход» (10 октября 2023 г., Москва); Научная конференция молодых ученых с международным участием «New Approaches in the Field of Microbiology, Virology, Immunology and Epidemiology», посвященная 300-летию РАН (23–24 апреля 2024 г., Москва)

Апробация материалов диссертационного исследования проведена на совместной научной конференции отдела вирусологии им. О.Г. Анджапаридзе и

отдела иммунологии и аллергологии ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова (протокол №2 от 28 апреля 2025 г.) Обоснованность и достоверность выводов обеспечивается за счет продуманного выбора лабораторных методик и корректного использования методов статистической обработки данных. Выводы, сделанные в ходе исследования, соответствуют его целям и задачам, а также полностью подтверждаются результатами выполненной работы.

Публикации по теме диссертации

Результаты печатной работы представлены в 9 печатных работах, в том числе в 5 статьях, индексируемых в международных базах Web of Science, Scopus, PubMed и включенных в Перечень ВАК при Минобрнауки России и 4 публикациях в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 157 страницах текста, содержит 13 таблиц, 35 рисунков и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и обсуждение, заключение, выводы, применение результатов и научных выводов, список цитируемой литературы. Библиографический указатель включает 239 наименований, из них 11 отечественных и 228 иностранных источника.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Новая коронавирусная инфекция: открытие и общая характеристика SARS-CoV-2

В конце 2019 года мир столкнулся с новой угрозой, которая впоследствии переросла в одну из крупнейших пандемий XXI века. Первоначально неизвестный респираторный вирус был обнаружен в городе Ухань, Китай, где врачи начали фиксировать случаи тяжелой пневмонии с неясной этиологией.

К началу января 2020 года ученым удалось выделить возбудителя заболевания – новый коронавирус, который получил временное название 2019- nCoV (новый коронавирус 2019 года). Через некоторое время Международный комитет по таксономии вирусов дал вирусу официальное название SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2), отметив его генетическое и клиническое сходство с коронавирусом, стоявшим за эпидемией атипичной пневмонии в 2002–2003 годах. Болезнь, вызванная этим вирусом, получила название COVID-19 (Coronavirus Disease 2019).

Генетический анализ показал, что SARS-CoV-2 принадлежит к семейству коронавирусов, которые широко распространены среди животных и могут передаваться человеку. Исследования предполагают, что первичным источником инфекции могли быть летучие мыши, а промежуточным звеном — возможно, хорьки или другие животные, продаваемые на рынке морепродуктов в Ухане. Однако точная цепочка передачи до сих пор остается предметом научных споров [6].

SARS-CoV-2 — это РНК-содержащий вирус, который использует свои шиповидные белки (S-белок) для связывания с рецепторами ангиотензинпревращающего фермента 2 на поверхности клеток человека [7]. Эти рецепторы широко представлены в легких, сердце, почках и других органах, что объясняет широкий спектр симптомов, вызываемых вирусом. После проникновения в клетку вирус использует клеточный механизм для репликации

своей РНК и производства новых вирусных частиц [8]. Этот процесс приводит к повреждению клеток и запуску воспалительной реакции, которая может стать причиной острого респираторного дистресс-синдрома и других серьезных осложнений [8]. Особенностью SARS-CoV-2 является его высокая контагиозность, значительно усиливающаяся у мутировавших вариантов вируса. Основным путем передачи SARS-CoV-2 воздушно-капельный [9, 10].

Первые случаи за пределами Китая были зарегистрированы в январе 2020 года в Таиланде, Японии и Южной Корее. К февралю вирус достиг Европы и Северной Америки, а к марту пандемия охватила практически все страны мира. ВОЗ объявила вспышку SARS-CoV-2 пандемией 11 марта 2020 года, отметив чрезвычайно высокую скорость распространения вируса [11]. Страны приняли различные меры для борьбы с пандемией, включая карантин, закрытие границ, ограничение массовых мероприятий, обязательное ношение масок и др. Несмотря на эти усилия, число заражений и смертей продолжало расти. По данным ВОЗ, к концу 2022 года более 600 миллионов человек во всем мире были инфицированы SARS-CoV-2, а количество смертей превысило 6 миллионов.

Пандемия нанесла серьезный удар по мировой экономике, вызвав остановку ключевых отраслей, рост безработицы и спад ВВП. Массовые карантины и ограничения серьезно повлияли на туризм, авиацию и торговлю, а малый бизнес столкнулся с беспрецедентными трудностями. Образование перешло в онлайн-формат, что создало проблемы для учащихся и преподавателей, особенно в регионах с ограниченным доступом к технологиям. Одновременно с этим пандемия привела к тому, что наиболее уязвимые группы населения — пожилые люди, люди с хроническими заболеваниями и малообеспеченные семьи — оказались в наибольшей зоне риска [11].

С другой стороны, пандемия COVID-19 способствовала усилению международного сотрудничества в научной и медицинской сферах, а также внедрению новых технологий, что привело к относительно быстрой разработке вакцин против SARS-CoV-2 и оптимизации подходов к лечению пациентов с COVID-19.

Благодаря принятым мерам по всему миру, направленным на предотвращение распространения новой коронавирусной инфекции, в мае 2023 года ВОЗ объявила о завершении режима чрезвычайной ситуации в области общественного здравоохранения, введенного в январе 2020 года в связи с распространением COVID-19 [12]. Хотя было объявлено о завершении пандемии COVID-19 и снятии практически всех ограничительных мер, SARS-CoV-2 продолжает циркулировать в человеческой популяции и по сей день, продолжая мутировать и ускользать от иммунной системы человека [13]. По состоянию на начало 2025 года общее число случаев заболевания COVID-19 по данным ВОЗ во всем мире составляет порядка 700 000 000, при этом зарегистрировано около 7 000 000 смертей [14].

Общая характеристика SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 – сложный оболочечный вирус, имеющий сферическую форму вириона, диаметром от 50 до 150 нм, относящийся к семейству *Coronaviridae*, подсемейству *Orthocoronavirinae* и роду *Betacoronavirus* [15]. Его геном представлен одноцепочечной РНК положительной полярности (+ssRNA), длиной около 30 000 нуклеотидов, что делает его одним из крупнейших среди РНК-вирусов. Геном SARS-CoV-2 кодирует структурные и неструктурные белки, которые играют ключевую роль в жизненном цикле вируса [16]. Основными белками SARS-CoV-2 являются поверхностные белки S, E, мембранный белок M и нуклеокапсидный белок N, а также комплекс неструктурных белков (NSP), включая NSP1, NSP3, NSP12 (РНК-зависимая РНК-полимераза), NSP13 (хеликаза) и другие, которые участвуют в процессах репродукции вируса и подавлении иммунного ответа хозяина [17]. Особое внимание уделяется шиповидному белку (S), который состоит из двух субъединиц: S1 и S2 [17]. Субъединица S1 содержит рецептор-связывающий домен (RBD), ответственный за связывание с рецептором ACE2 клетки-хозяина, а субъединица S2 обеспечивает слияние вирусной оболочки с мембраной клетки [17].

На Рисунке 1 представлена организация генома SARS-CoV-2 и его схематичное строение.

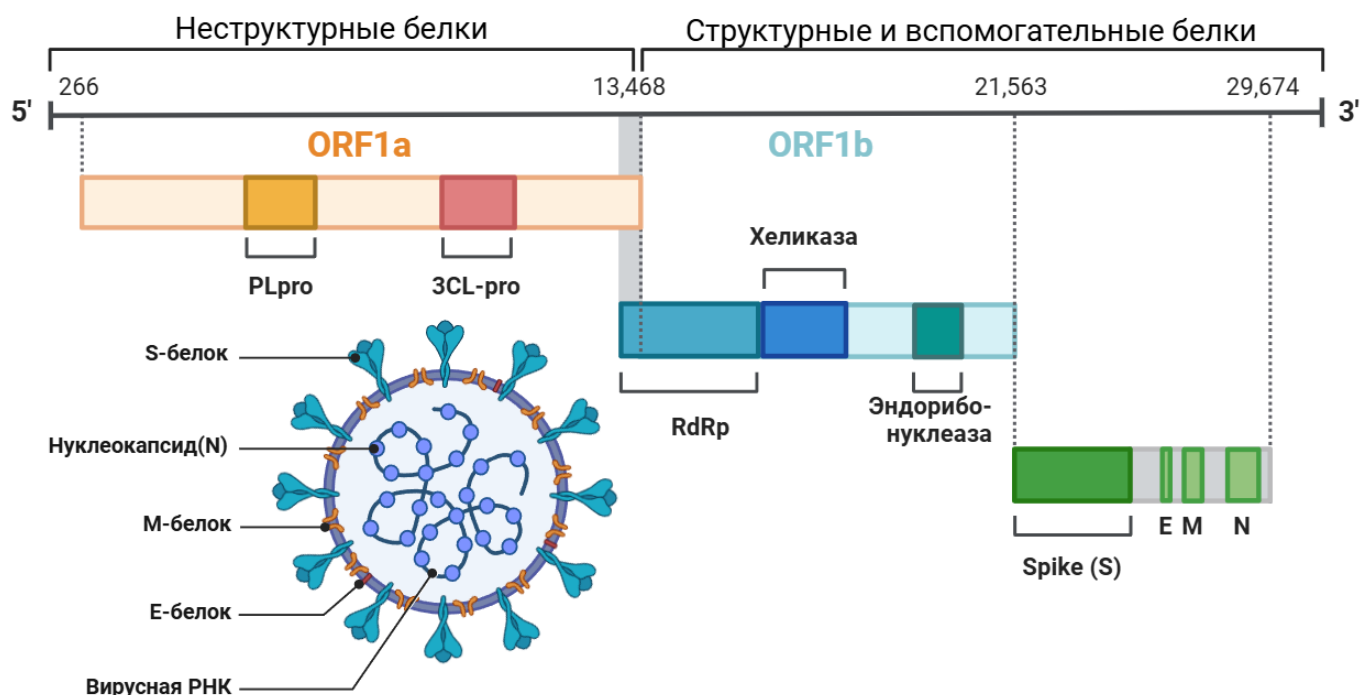


Рисунок 1 – Организация генома SARS-CoV-2 и схематичный рисунок строения вириона

Также в Таблице 1 представлены основные сведения о ключевых структурах нового коронавируса.

Таблица 1 – Ключевые компоненты SARS-CoV-2

Компонент	Описание	Функция/Значение
Геном	Одноцепочечная РНК (+ssRNA) длиной около 30 000 нуклеотидов.	Кодирует структурные и неструктурные белки, необходимые для репликации и сборки вируса [18].
S-белок (шиповидный белок)	Трансмембранный гликопротеин, расположен на поверхности вируса. Состоит из двух субъединиц: S1 и S2 [19].	Отвечает за связывание с рецептором ACE2 клетки-хозяина [20] и слияние мембран.
RBD (рецептор-связывающий домен)	Часть S1-субъединицы S-белка, которая непосредственно взаимодействует с рецептором ACE2.	Основной участок для прикрепления к клетке-хозяину. Цель для нейтрализующих антител.

Продолжение Таблицы 1

<i>N-белок</i> (нуклеокапсидный белок)	Структурный белок, связывающий вирусную РНК.	Участвует в упаковке генома, регуляции транскрипции и подавлении иммунного ответа [21].
<i>M-белок</i> (матриксный белок)	Наиболее распространённый структурный белок, формирующий оболочку вируса.	Участвует в сборке вириона и формировании его структуры [21].
<i>E-белок</i> (белок оболочки)	Мембранный белок, расположенный в липидной оболочке вируса.	Участвует в сборке вируса, ионной проводимости и патогенезе [21].
<i>Липидная оболочка</i>	Внешняя мембрана вируса, происходящая из клеточной мембраны хозяина.	Защищает вирусные белки и РНК, обеспечивает проникновение в клетку [22].
<i>NSP</i> (несструктурные белки)	Белки, кодируемые геномом вируса, но не входящие в состав зрелого вириона.	Участвуют в репликации РНК, модификации клетки-хозяина и подавлении иммунитета [21].
<i>ORF</i> (открытые рамки считывания)	Регионы генома, кодирующие дополнительные белки (например, ORF3a, ORF7a, ORF8).	Участвуют в патогенезе, подавлении иммунитета и взаимодействии с клеткой-хозяином [21].

Цикл размножения вируса SARS-CoV-2

Попадая в организм человека, SARS-CoV-2 связывается с рецептором клеток-хозяина ACE2 при помощи S-белка, а точнее, его рецептор-связывающего домена, который расположен в S1-части белка [23]. ACE2 — это пептидаза клеточной поверхности, которая гидролизует ангиотензин II и экспрессируется в большинстве органов, с особенно высокой экспрессией в эпителии легких и тонкого кишечника [20]. После связывания с рецептором ACE2 полноразмерный S-белок SARS-CoV-2 активируется путем протеолитического расщепления в сайтах S1/S2 и S2' при помощи клеточной протеазы TMPRSS2. Это приводит к слиянию мембран вируса и клетки-хозяина (Рисунок 2) [24].

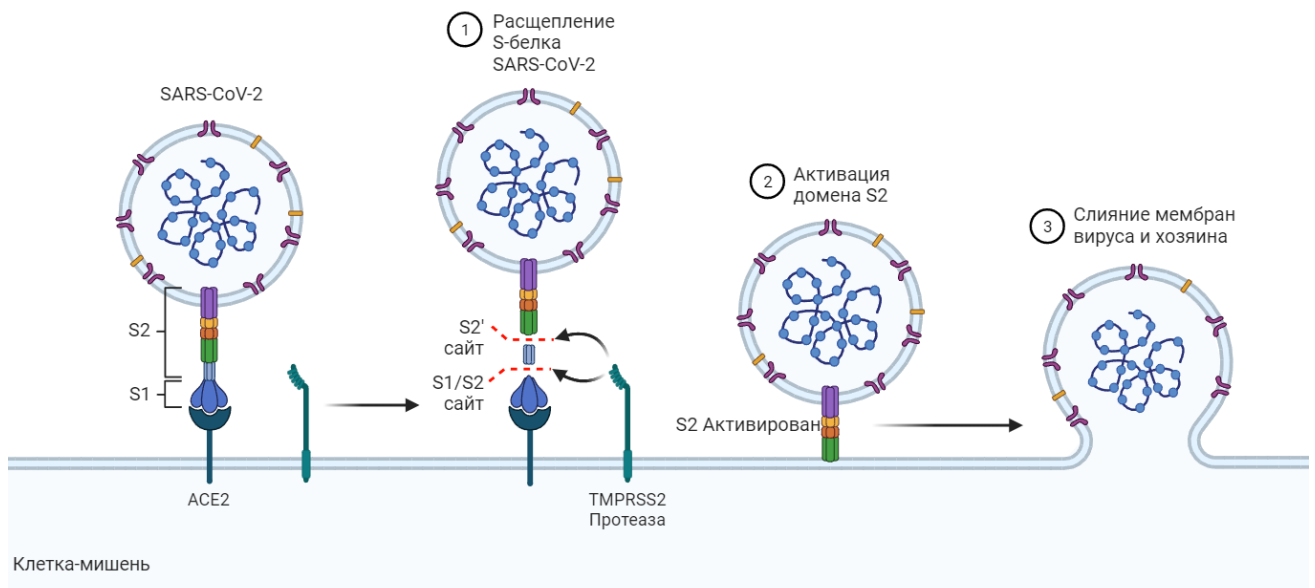


Рисунок 2 – Механизм взаимодействия с клетками-мишенями и проникновение SARS-CoV-2 в клетку-хозяина [17]

На Рисунке 3 представлен подробный жизненный цикл SARS-CoV-2.

На первом этапе (1) SARS-CoV-2 взаимодействует с рецепторами на поверхности клетки-хозяина и высвобождает РНК-геном в цитоплазму хозяина либо посредством эндоцитоза, либо через прямое слияние мембран [23]. После попадания в цитоплазму (2) геномная одноцепочечная РНК с (+) полярностью транслируется с использованием трансляционного аппарата хозяина, что приводит к образованию полипротеинов pp1a и pp1ab. Эти полипротеины котрансляционно расщепляются вирусными протеазами (PLpro и 3CLpro), что приводит к формированию компонентов комплекса РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp) (3) [25]. Комплекс RdRp использует геномную РНК в качестве матрицы для синтеза субгеномных и геномных РНК с (-) полярностью (4), которые, в свою очередь, служат матрицами для синтеза полноразмерных геномных РНК потомства с (+) полярностью и субгеномных мРНК (5) [26]. Процессы транскрипции и репликации происходят в извитых мембранах, прилегающих к двумембранным везикулам, которые происходят из шероховатого эндоплазматического ретикула [27].

Субгеномные мРНК транслируются в структурные и вспомогательные белки (6). Геномная РНК с (+) полярностью ассоциируется с нуклеокапсидным белком и отпочковывается в область ERGIC (эндоплазматический ретикулум –

промежуточный компартмент Гольджи). В ERGIC также встраиваются структурные белки S, E и M, которые транслируются из субгеномных мРНК с (+) полярностью (этапы 6 и 7) [28]. Сформированный вирион затем экспортируется из клетки через экзоцитоз (этапы 8 и 9) [29].

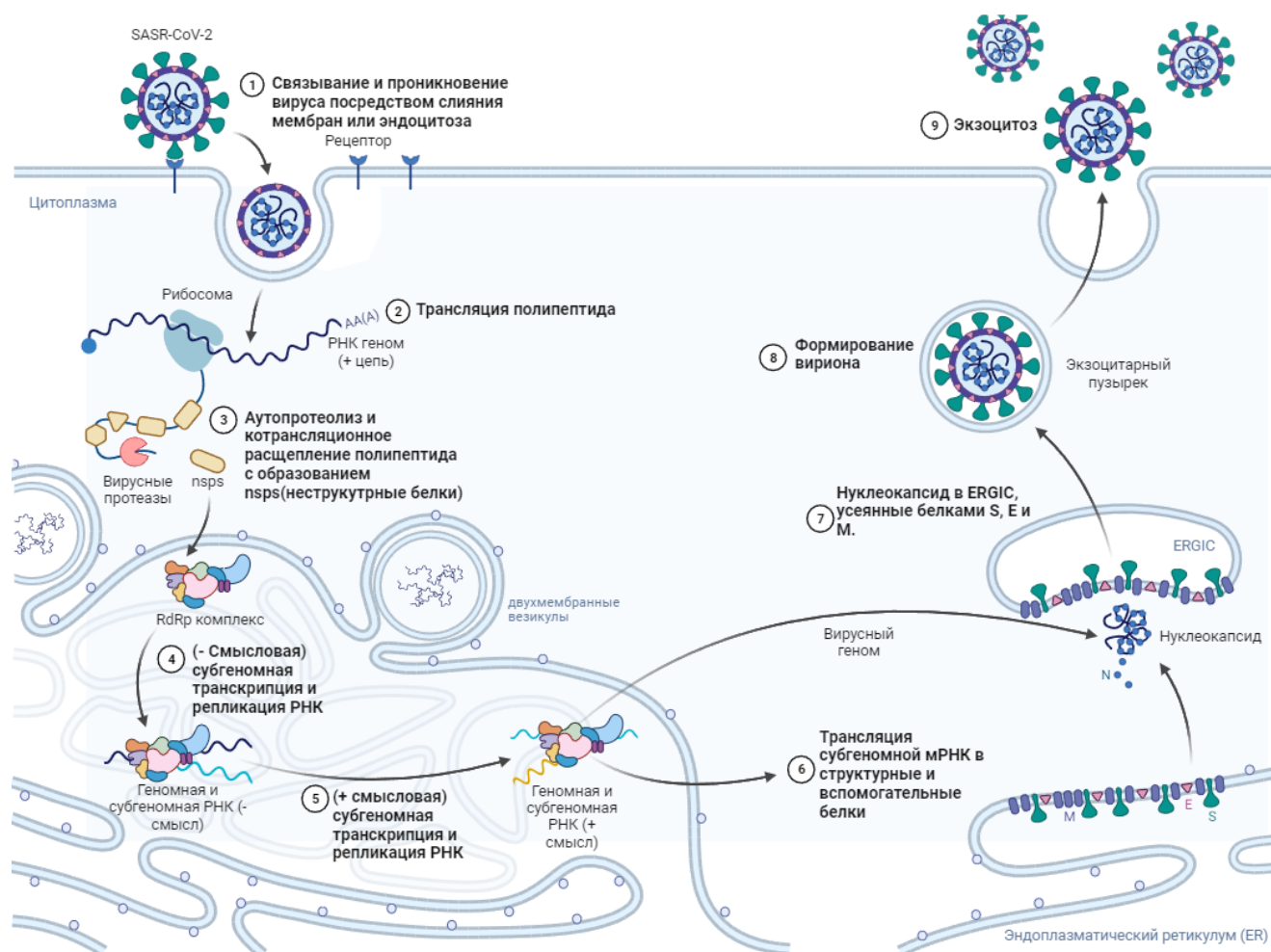


Рисунок 3 – Жизненный цикл SARS-CoV-2 [17]

Генетическая изменчивость SARS-CoV-2

Генетическая изменчивость SARS-CoV-2 представляет собой важный аспект его эволюции и распространения [30]. Вирус накапливает многочисленные мутации на разных стадиях жизненного цикла — от заражения хозяина до репликации внутри клеток [31]. Эти изменения могут существенно влиять на свойства вируса. Например, мутации в S-белке могут снижать эффективность иммунного ответа, позволяя вирусу ускользать от защитных механизмов организма [32]. Кроме того, мутации способны усиливать способность вируса связываться с

клетками человека, что увеличивает количество клеток, которые он способен инфицировать [33]. Хотя ACE2 остается основным рецептором для SARS-CoV-2, использование дополнительных рецепторов, таких как CD147 [34], гепарансульфат [35], NRP1 (Neuropilin-1) [36] и другие, значительно расширяет возможности вируса по проникновению в различные типы клеток. Это подчеркивает сложность взаимодействия SARS-CoV-2 с организмом хозяина и его способность адаптироваться к новым условиям.

В связи с этим особое внимание уделяется влиянию мутаций на взаимодействие вируса с клетками хозяина. К примеру, мутации в S-белке коронавируса приводят к неспособности уже сформировавшихся антител связывать новые варианты вируса, что способствует повторным заражениям. Анализируя спектр мутаций SARS-CoV-2 во время пандемии, ученые обнаружили, что нуклеотидные замены цитозина и гуанина на урацил происходят значительно чаще, чем обратные замены [37]. Это свидетельствует о том, что геном вируса еще не достиг генетического равновесия, что указывает на его недавнее появление в человеческой популяции и подчеркивает его активную эволюцию [38].

Среди наиболее известных штаммов SARS-CoV-2 выделяется первоначальный штамм «Ухань» (**Wuhan-Hu-1**), обнаруженный в Китае, который доминировал в начале пандемии, но был менее заразным по сравнению с последующими вариантами [39].

Позже появился вариант «Альфа» (**B.1.1.7**), впервые выявленный в Великобритании в сентябре 2020 года [40]. Этот вариант отличался повышенной контагиозностью (примерно на 43–90% выше, чем у исходного варианта вируса) и был связан с увеличением тяжести течения болезни, а также ростом уровня летальности на 55–71% в зависимости от исследований [41]. Вариант содержал около 17 мутаций, включая ключевую мутацию N501Y в рецептор-связывающем домене (RBD) S-белка, которая повышала его способность связываться с рецептором ACE2 [42]. Вариант «Альфа» доминировал в первой половине 2021 года.

Позже появился вариант **«Бета» (В.1.351)**, впервые выявленный в ЮАР в октябре 2020 года [43]. Этот вариант отличался повышенной заразностью — примерно на 50% выше, чем у исходного варианта вируса. Он вызывал опасения из-за своей способности частично уклоняться от иммунного ответа, включая антитела, выработанные после вакцинации или предыдущего заражения [44]. Мутация E484K (в белке S), в частности, снижала эффективность нейтрализации вируса антителами, что делало вирус более устойчивым к существующему иммунитету [32]. Несмотря на это, вариант «Бета» не смог стать доминирующим.

Аналогичным образом вариант **«Гамма» (Р.1)**, выявленный в декабре 2020 года в Бразилии, сочетал высокую заразность и устойчивость к вакцинам. Однако он не распространился широко за пределами Южной Америки [45].

Вариант **«Дельта» (В.1.617.2)**, впервые обнаруженный в октябре 2020 года в Индии, отличался значительно повышенной заразностью, которая превышала таковую у предыдущих вариантов вируса, включая вариант «Альфа», примерно на 40–60% [46]. Вариант «Дельта» быстро распространился по всему миру и стал доминирующим во второй половине 2021 года, вызывая новые волны заболеваемости даже в странах с высоким уровнем вакцинации [47]. Вариант «Дельта» содержал несколько ключевых мутаций, включая изменения в рецептор-связывающем домене (RBD) S-белка, таких как L452R и T478K, которые усиливали его способность связываться с рецептором ACE2 и частично уклоняться от иммунного ответа [48]. Исследования показали, что вариант «Дельта» был связан с более тяжелым течением заболевания, увеличением числа госпитализаций и уровня летальности [49].

Затем появился вариант **«Омикрон» (В.1.1.529)**, впервые выявленный в Южной Африке в ноябре 2021 года. Этот вариант отличался крайне высокой контагиозностью, хотя вызывал менее тяжелое течение болезни [50]. Особенностью варианта «Омикрон» стало наличие более 50 мутаций, многие из которых локализованы в S-белке, включая ключевые изменения в рецептор-связывающем домене (RBD), такие как мутации N501Y, K417N и E484A, которые значительно усиливали его способность связываться с рецептором ACE2 и

снижали эффективность нейтрализации антителами [51]. С начала 2022 года этот вариант стал доминирующим в мире [52]. По состоянию на декабрь 2024 года, самый распространенный вариант SARS-CoV-2 это JN.1, который является подвариантом «Омикрон» BA.2.86 [53].

Важно отметить, что мутации в SARS-CoV-2 оказывают значительное влияние на эволюцию вируса и его взаимодействия с иммунной системой хозяина. Эти изменения могут влиять на контагиозность, вирулентность и способность вируса уклоняться от иммунного ответа, что делает контроль за мутационным потенциалом вируса важнейшим аспектом в разработке эффективных вакцин и стратегий борьбы с инфекционными заболеваниями.

1.2 Адаптивный иммунный ответ к SARS-CoV-2

Иммунная система защищает организм на нескольких уровнях, начиная с физических барьеров, которые препятствуют проникновению патогенов. Если эти барьеры преодолены, в действие вступают компоненты врожденного иммунитета, обеспечивающие быстрый, но неспецифический ответ. В рамках этого механизма патогены распознаются, и активируется выработка интерферона I типа и других эффекторных молекул [54]. Благодаря этому процессу удается сдерживать размножение вирусов, формировать противовирусную среду в тканях и запускать адаптивный иммунитет. Именно адаптивный иммунитет отвечает за формирование специфического ответа, направленного против конкретного патогена, и его функционирование обеспечивается лимфоцитами — Т- и В-клетками.

Т-клетки играют ключевую роль в клеточном иммунитете (Рисунок 4Б) [55], а В-клетки отвечают за гуморальный иммунитет (опосредованный антителами, Рисунок 4А). При этом Т-клетки взаимодействуют с антигенами опосредованно через молекулы главного комплекса гистосовместимости (МНС): цитотоксические CD8⁺ Т-клетки распознают антигенные пептиды, связанные с МНС-I, а CD4⁺ Т-хелперы — с МНС-II. В отличие от них, В-клетки способны напрямую

распознавать антигены благодаря В-клеточным рецепторам (BCR) на своей поверхности [54]. Однако для того, чтобы эти клетки могли эффективно уничтожать патогены, требуется время — около 6-10 дней, необходимых для пролиферации и дифференцировки наивных клеток в эффекторные. После этого они начинают быстро и специфически уничтожать инфицированные клетки и вирусные частицы [54].

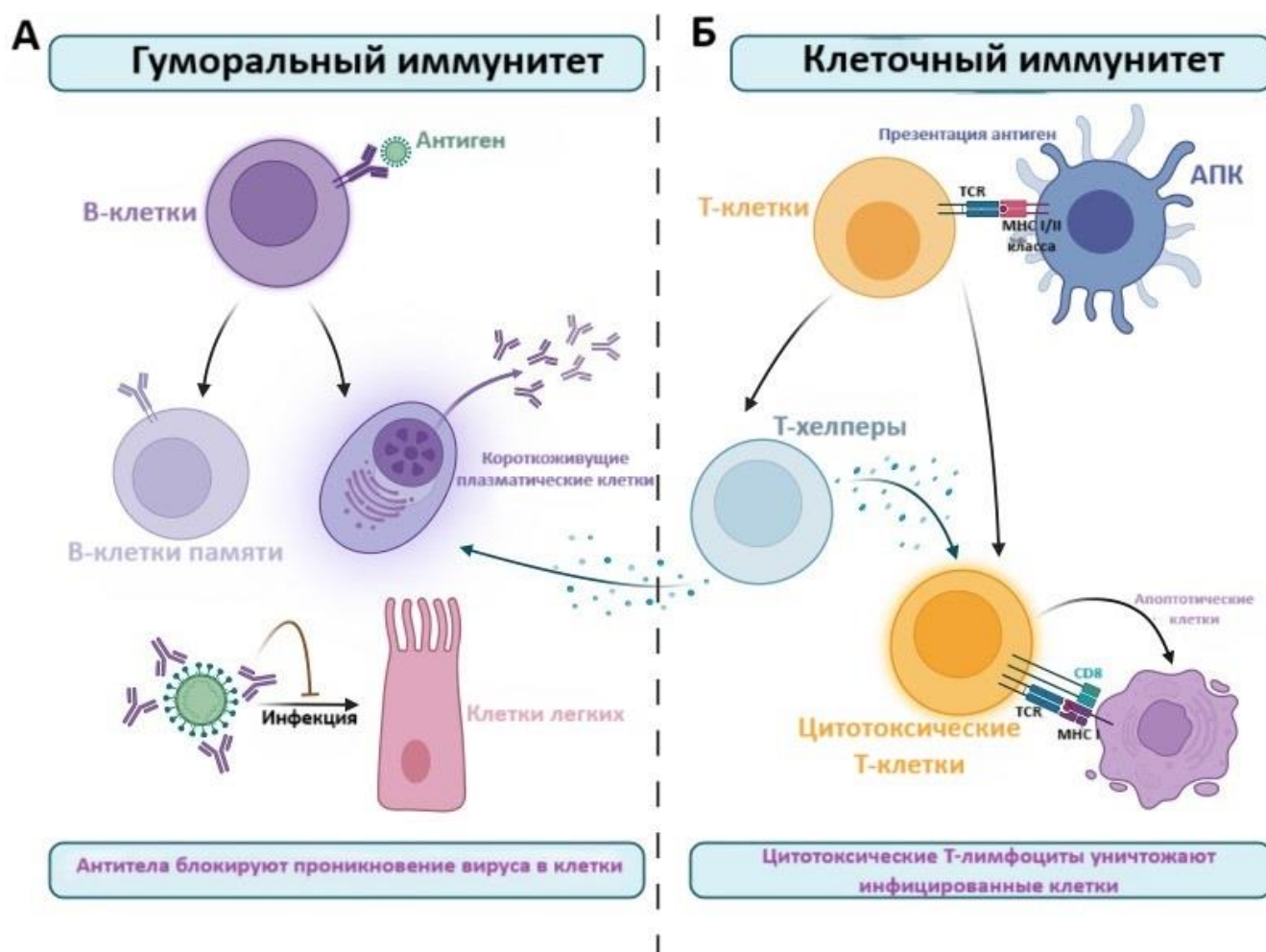


Рисунок 4 – Формирование адаптивного иммунитета: **А.** гуморального; **Б.** клеточного [56]

Ключевым преимуществом адаптивного иммунитета является формирование иммунологической памяти, которая включает $CD4^+$ Т-клетки, $CD8^+$ Т-клетки и В-клетки памяти. Гуморальный иммунитет действует преимущественно на внеклеточном уровне, предотвращая проникновение вирусов в клетки-хозяева [57], тогда как клеточный иммунитет борется с уже проникшими внутрь клеток патогенами [56]. Примером успешной работы этой системы может служить

реакция на SARS-CoV-2, хотя этот вирус обладает механизмами “уклонения” от иммунного ответа, подавляя интерфероны I и III типа [58, 59, 60]. Такие механизмы взаимодействия вируса с иммунной системой ведут к задержке активации адаптивного иммунитета, что может привести к тяжелому течению заболевания. Тем не менее, если адаптивный иммунитет активируется своевременно, он способствует легкому течению COVID-19 благодаря действию Т-клеток [61, 62, 63, 64] и антител [65].

Однако при задержке адаптивного ответа ситуация может ухудшиться из-за чрезмерной реакции врожденного иммунитета, который пытается компенсировать недостаток контроля над инфекцией. Это может привести к иммунопатологии, особенно в легких [66].

Таким образом, адаптивный иммунный ответ играет ключевую роль в защите организма от SARS-CoV-2. Этот процесс характеризуется способностью иммунной системы распознавать специфические антигены вируса, вырабатывать антитела и формировать клетки иммунологической памяти, которые обеспечивают длительную защиту от повторного заражения [2]. Адаптивный иммунитет при COVID-19 не только снижает тяжесть и продолжительность заболевания, но и минимизирует риск реинфекции [67]. Эффективность адаптивного иммунитета при этом зависит от множества факторов, таких как возраст, пол, общее состояние здоровья и индивидуальные особенности иммунной системы. Таким образом, понимание механизмов взаимодействия врожденного и адаптивного иммунитета остается ключевым для разработки стратегий борьбы с инфекциями, включая SARS-CoV-2.

1.2.1 Гуморальный иммунный ответ на SARS-CoV-2

Гуморальный иммунный ответ, сформировавшийся против SARS-CoV-2, включает два основных компонента: долгоживущие плазматические клетки и В-клетки памяти. Оба типа клеток развиваются в зародышевых центрах —

специализированных структурах в лимфоидных тканях, где происходит соматическая гипермутация и клональный отбор (Рисунок 5А) [54].

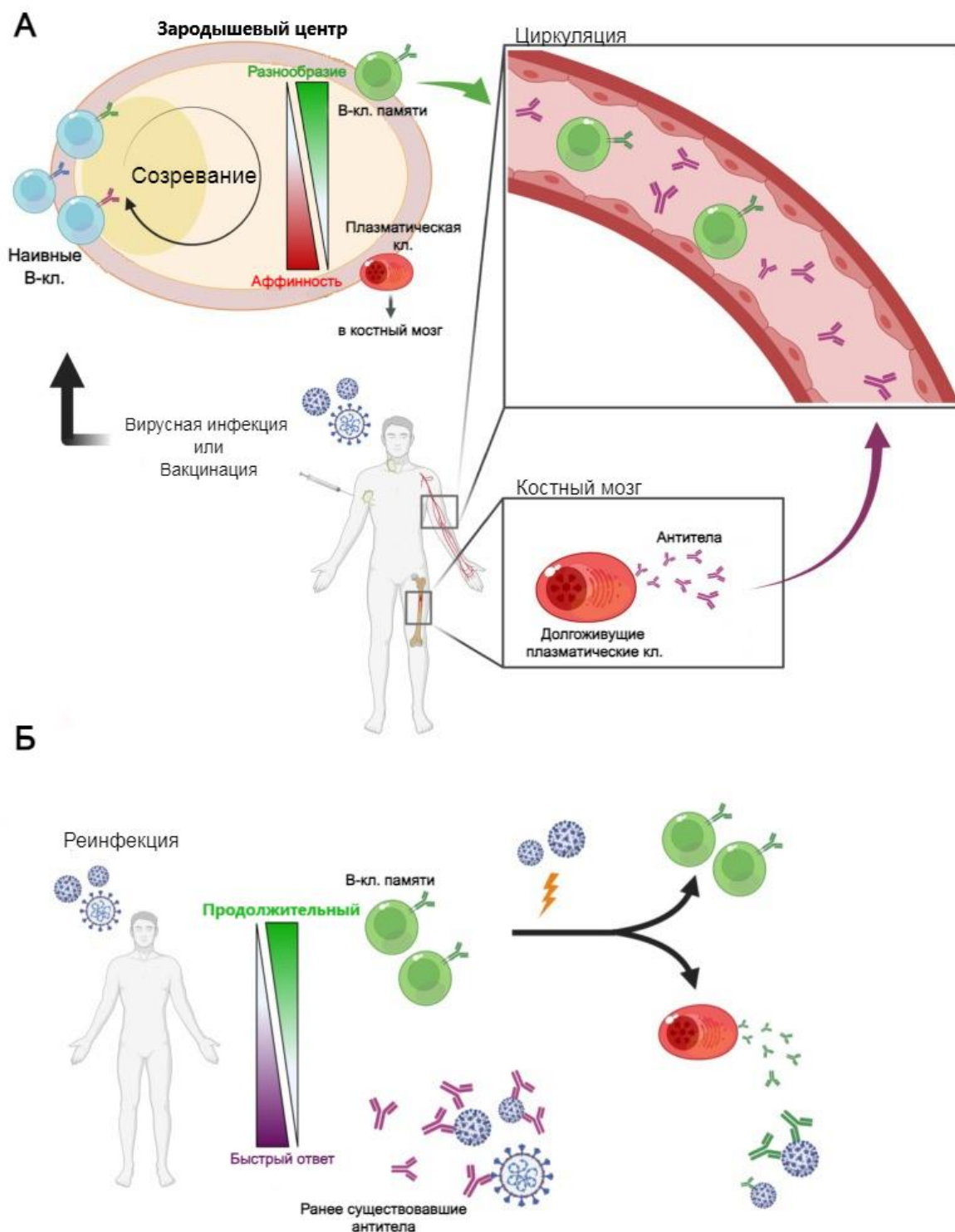


Рисунок 5 – Гуморальные иммунные реакции памяти: **А.** Первичный иммунный ответ; **Б.** Вторичный иммунный ответ (реакция памяти)

Соматическая гипермутация представляет собой процесс, при котором в генах антител возникают случайные мутации, что приводит к изменению их

аффинности к антигену. Клональный отбор, в свою очередь, обеспечивает выживание только тех клеток, которые продуцируют антитела с высокой аффинностью. Долгоживущие плазматические клетки секретируют антитела в кровотоки, обеспечивая длительную защиту организма, тогда как В-клетки памяти остаются в состоянии готовности и быстро активируются при повторном контакте с антигеном, усиливая иммунный ответ [54].

В-клетки памяти экспрессируют высокоаффинные рецепторы к антигену и способны быстро реагировать на повторное воздействие патогена, дифференцируясь в плазматические клетки. Эти плазматические клетки секретируют антитела, обеспечивая немедленный защитный ответ против антигенов. Однако их роль в долгосрочном иммунитете ограничена во времени, в отличие от В-клеток памяти, которые сохраняются в организме и обеспечивают дополнительный уровень защиты при повторном заражении (Рисунок 5Б).

В случае с SARS-CoV-2 первыми появляется изотип IgM (Рисунок 6), за ним следует IgA, пик которого приходится на 2–3-ю неделю после появления симптомов, затем наблюдается их снижение, и, наконец, наблюдается появление антител IgG, которые сохраняются в течение нескольких месяцев после появления симптомов [68, 69]. Уровень антител IgM быстро снижается примерно через 20 дней после заражения и становится неопределяемым в среднем через 60 дней после заражения (Рисунок 6) [70, 71]. Такая динамика IgM позволяет предположить, что их диагностическая значимость наиболее высока при выявлении текущей или недавней инфекции в течение первых 1–2 недель после заражения. Однако у некоторых пациентов, особенно при тяжелом течении болезни, IgM могут сохраняться до 10–12 недель [69, 72, 73]. Иммуноглобулины IgG имеют ключевое значение для серологических исследований благодаря их высокому сродству к антигену, способности нейтрализовать вирусы, активировать комплемент и обеспечивать долгосрочный иммунитет после реконвалесценции и/или вакцинации. Действительно, серологические исследования других коронавирусов человека, в том числе SARS-CoV-1 и MERS-CoV, показали, что антитела класса IgG обладают большей специфичностью по сравнению с IgM, сохраняются

значительно дольше по сравнению с IgM и IgA [74, 75] и тесно связаны с нейтрализацией вируса и результатами лечения пациентов [65, 76].

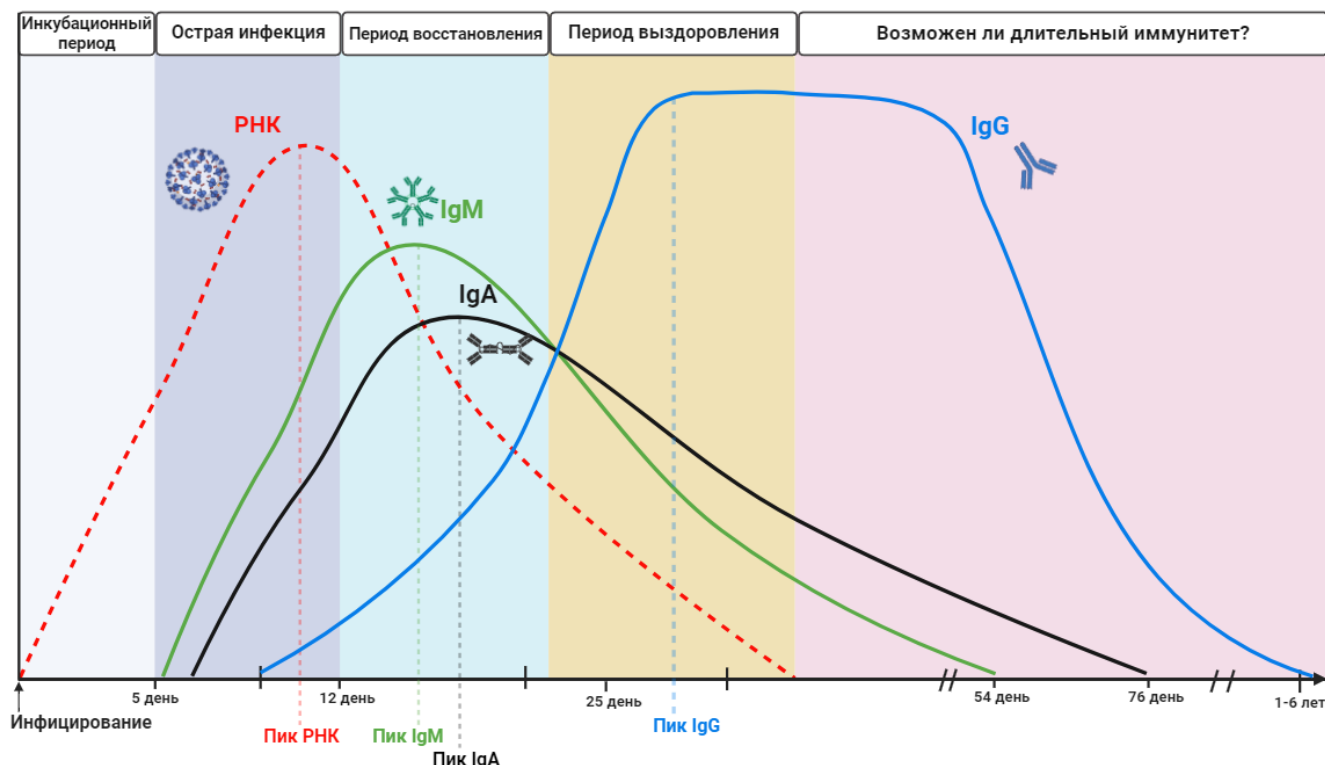


Рисунок 6 – Динамика иммунного ответа на SARS-CoV-2: временные изменения уровней антител и фазы восстановления

При острой инфекции, вызванной SARS-CoV-2, переключение класса антител с IgM на IgG происходит относительно быстро. Среднее время обнаружения IgG составляет от 7 до 14 дней после заражения (Рисунок 6) [69, 73, 77, 78, 79]. Антитела класса IgG достигают пика примерно на 25-й день после инфицирования и снижаются значительно медленнее, чем антитела класса IgM [70, 80]. Подклассы IgG антител играют важную роль в специфическом иммунном ответе против SARS-CoV-2, при этом доминирующими подклассами являются IgG1 и IgG3. Именно эти подклассы обладают наиболее выраженной способностью к активации комплемента и взаимодействию с Fc-рецепторами иммунных клеток [81]. Исследования показали, что IgG1 составляет около 80% всех специфических антител к RBD-домену SARS-CoV-2, тогда как IgG3 составляет примерно 15-20%, а IgG2 и IgG4 представлены в значительно меньших количествах [81]. Уровень циркулирующих антител IgG к SARS-CoV-2 зависит от тяжести заболевания, его исхода, а также от используемых в серологических тестах антигенов. Например,

одно из исследований показало значительное снижение уровня IgG в течение 8 недель как при симптоматическом течении COVID-19, так и при бессимптомной инфекции; при этом 40% бессимптомных пациентов и 12,9% пациентов с симптомами становились серонегативными в течение этого периода наблюдения [78]. Эти данные подтверждаются другими исследованиями, демонстрирующими снижение уровня IgG через несколько недель после вакцинации [82, 83]. Тем не менее, большинство исследований указывают, что уровень антител IgG остается относительно стабильным в течение 3–5 месяцев после вакцинации или перенесенной инфекции [70, 80, 83, 84, 85, 86, 87, 88].

Эффективность иммунного ответа во многом определяется способностью антител, выработанных против нативных вирусных антигенов во время естественной инфекции или против антигенов, входящих в состав вакцинного препарата, нейтрализовать вирус. Эти антитела могут либо циркулировать в крови, обеспечивая немедленную защиту, либо вырабатываться *de novo* плазматическими клетками при повторном контакте с вирусом [89]. Антитела играют ключевую роль в нейтрализации вируса, предотвращая повторное заражение, а также в распознавании вирусных антигенов, экспрессируемых на поверхности инфицированных клеток, что запускает эффекторные механизмы иммунной системы. В случае коронавирусов основными мишенями для большинства антител являются S-белок и нуклеокапсидный белок [90, 91].

S-белок играет ключевую роль в жизненном цикле коронавируса, обеспечивая присоединение вируса к клеткам и его проникновение внутрь. Антитела, нацеленные на этот белок, особенно на его рецептор-связывающий домен, обладают мощной нейтрализующей активностью [65, 92, 93, 94, 95, 96]. Благодаря этому S-белок стал основной мишенью для большинства современных вакцин [97]. Однако, будучи расположенным на поверхности вируса и легко распознаваемым нейтрализующими антителами, S-белок подвергается селективному давлению, что способствует возникновению мутаций, обеспечивающих устойчивость к существующим антителам. Склонность S-белка к мутациям может ограничить его использование в серологических анализах и

вакцинах в будущем, поскольку антитела, специфичные к текущему варианту вируса, могут не связываться с мутировавшими эпитопами. Это может привести к снижению эффективности вакцин и увеличению числа ложноотрицательных результатов в серологических тестах.

Вторым по значимости вирусным белком является N-белок, который связывает геном вирусной РНК и содержится в вирионе. Этот белок выполняет множество функций, включая упаковку вирусной РНК, транскрипцию и репликацию вируса. Поскольку N-белок активно продуцируется во время инфекции, он вызывает выработку большого количества антител. Это делает его подходящей мишенью для серологических анализов [94, 98, 99, 100]. Однако следует учитывать, что N-белок не участвует в проникновении вируса в клетку и защищен от воздействия антител вирусной оболочкой. В связи с этим большинство антител, направленных против N-белка, вряд ли обладают нейтрализующими свойствами [101]. Это подтверждается результатами исследования, показавшего, что иммунизация N-белком SARS-CoV вызывает выработку антител с неопределяемой нейтрализующей активностью [102].

Как было описано ранее, у людей инфицированных SARS-CoV-2, вырабатываются антитела, включая нейтрализующие, что свидетельствует об формировании протективного иммунитета [70, 78, 84, 87]. Эти данные согласуются с результатами исследований на приматах, не относящихся к человекообразным, где воздействие SARS-CoV-2 обеспечивало защиту от повторного заражения без клинических проявлений благодаря наличию нейтрализующих антител [103, 104]. Однако важно отметить, что сохранение антител IgG не всегда коррелирует с сохранением нейтрализующих антител. В большинстве исследований отмечается снижение уровня нейтрализующих антител через три месяца после вакцинации, причем тяжесть заболевания существенно влияет на скорость этого снижения, так в одном из исследований у 40% перенесших COVID-19 в бессимптомной форме пациентов после реконвалесценции уровень IgG был отрицательным, а у 12,9% пациентов с симптоматическим течением инфекции — положительным [65, 70, 71, 78, 84, 105].

В то же время исследования показали, что титры нейтрализующих антител остаются стабильными в период от 75 дней до 6 месяцев после выздоровления от COVID-19 у людей с различной степенью тяжести заболевания [80, 87, 106, 107, 108]. В исследовании Wajnberg A. с соавторами были проанализированы образцы крови 30 000 человек на наличие антител к SARS-CoV-2. Результаты продемонстрировали относительно стабильные титры антител IgG к S-белку в течение пяти месяцев, причем эти титры коррелировали с уровнем нейтрализации вируса [80]. Подобные выводы были подтверждены когортным исследованием в Китае, где в течение шести месяцев наблюдения у 70% пациентов сохранялись антитела IgG к антигенам S и N, а также стабильность титров нейтрализующих антител [106].

Одним из факторов, влияющих на динамику нейтрализующих антител в определённых группах населения, является высокая распространенность вируса в конкретном географическом регионе или среди отдельных подгрупп населения, таких как медицинские работники. Регулярное повторное воздействие вируса может способствовать поддержанию повышенного уровня антител, включая нейтрализующие антитела. Вторым фактором может служить сохранение антигенов в тканях или их наличие в виде иммунных комплексов на поверхности фолликулярных дендритных клеток, что обеспечивает длительную стимуляцию иммунной системы. В работе Gaebler C. и соавторы [109] подтвердили наличие N-белка SARS-CoV-2 в энтероцитах кишечника у 5 из 14 человек через 4 месяца после реконвалесценции. Данные исследования могут свидетельствовать о том, что развитие В-клеток памяти продолжается у выздоровевших людей в течение длительного периода после заражения [109]. В этот период происходят соматические мутации в генах антител, что приводит к выработке нейтрализующих антител с повышенной аффинностью. Это позволяет предположить, что даже при снижении уровня нейтрализующих антител со временем повторное воздействие вируса, вероятно, активирует В-клетки памяти, вызывая быстрый и высокоэффективный гуморальный ответ.

Факторы, влияющие на продолжительность гуморального иммунитета к SARS-CoV-2, такие как индивидуальные особенности организма, тип иммунизации, вирусная нагрузка и мутации вируса, остаются недостаточно изученными. Тем не менее, снижение титров антител не обязательно свидетельствует об ослаблении или нарушении иммунитета. Снижение уровня антител после завершения острой инфекции является естественным процессом, связанным с затуханием активности короткоживущих плазматических клеток, которые больше не требуются для поддержания немедленного иммунного ответа [110, 111]. Период полураспада IgG в сыворотке составляет около 26 дней [112]. Без пополнения антител за счет плазматических клеток их уровень естественным образом снижается. Таким образом, тяжелое течение COVID-19, вероятно, способствует формированию более длительной защиты у выздоравливающих пациентов, тогда как легкие формы заболевания могут приводить к кратковременному стерильному иммунитету (полное отсутствие вируса в организме). Следует отметить, что адаптивный иммунитет формирует иммунологическую память, которая не только предотвращает повторное заражение, но и снижает тяжесть заболевания при повторном контакте с вирусом.

Антитела как маркеры тяжести и прогноза COVID-19

Антитела могут служить маркерами тяжести и прогноза COVID-19, так как их уровни, нейтрализующая активность и эффективность коррелируют с клиническими исходами, включая выживаемость пациентов. Исследования показывают, что более высокие титры антител чаще ассоциируются с тяжелым течением заболевания и неблагоприятными исходами [113]. У пациентов с тяжелой формой инфекции уровни антител значительно выше, чем у пациентов с легкой или среднетяжелой формами. Напротив, при легком течении болезни иммунный ответ остается умеренным и сбалансированным, не вызывая избыточной активации [113].

Дополнительные исследования подтверждают, что тяжелые случаи COVID-19 связаны с повышенным уровнем антител к рецептор-связывающему домену и S-белку вируса [100, 114]. Предполагается, что активация иммунитета и

усиленная продукция антител экстрафолликулярными В-клетками (специализированными клетками, продуцирующими антитела вне фолликулов) могут способствовать развитию тяжелых форм заболевания [115]. Избыточная выработка антител может запускать чрезмерные воспалительные реакции и неконтролируемую репликацию вируса через FcR- или комплемент-зависимые механизмы, известные как антителозависимое усиление инфекции [116].

Многочисленные исследования подчеркивают, что уровни нейтрализующих антител играют ключевую роль в определении клинических исходов у пациентов с COVID-19. Повышенный уровень таких антител чаще наблюдается у пациентов с тяжелой формой заболевания [100, 105, 114, 117, 118]. Это может быть связано как с защитной функцией антител, так и с их потенциальной ролью в развитии иммунопатологических процессов.

Авидность антител класса G к RBD SARS-CoV-2

Показано, что антитела, способные блокировать взаимодействие RBD SARS-CoV-2 с рецептором ACE2, обладают нейтрализующим эффектом. Важной характеристикой таких антител является их авидность: чем она выше, тем успешнее они вытесняют RBD из связи с ACE2, предотвращая тем самым проникновение вируса в клетку [119].

Под авидностью антител понимают меру прочности их связывания с антигеном, обусловленную совокупностью всех взаимодействий между антителами и эпитопами. В рамках традиционных иммунологических концепций, считается, что эта характеристика возрастает в процессе иммунного ответа [120]. Процесс формирования устойчивого иммунитета, известный как созревание антител класса G, приводит к повышению авидности антител, а соответствующих им В-клеток — к состоянию иммунологической памяти. При повторной инфекции плазматические клетки начинают экспрессировать высокоавидные антитела, минуя заново все стадии селекции. Типичная схема развития и созревания компонентов гуморального иммунитета представлена на Рисунке 7.

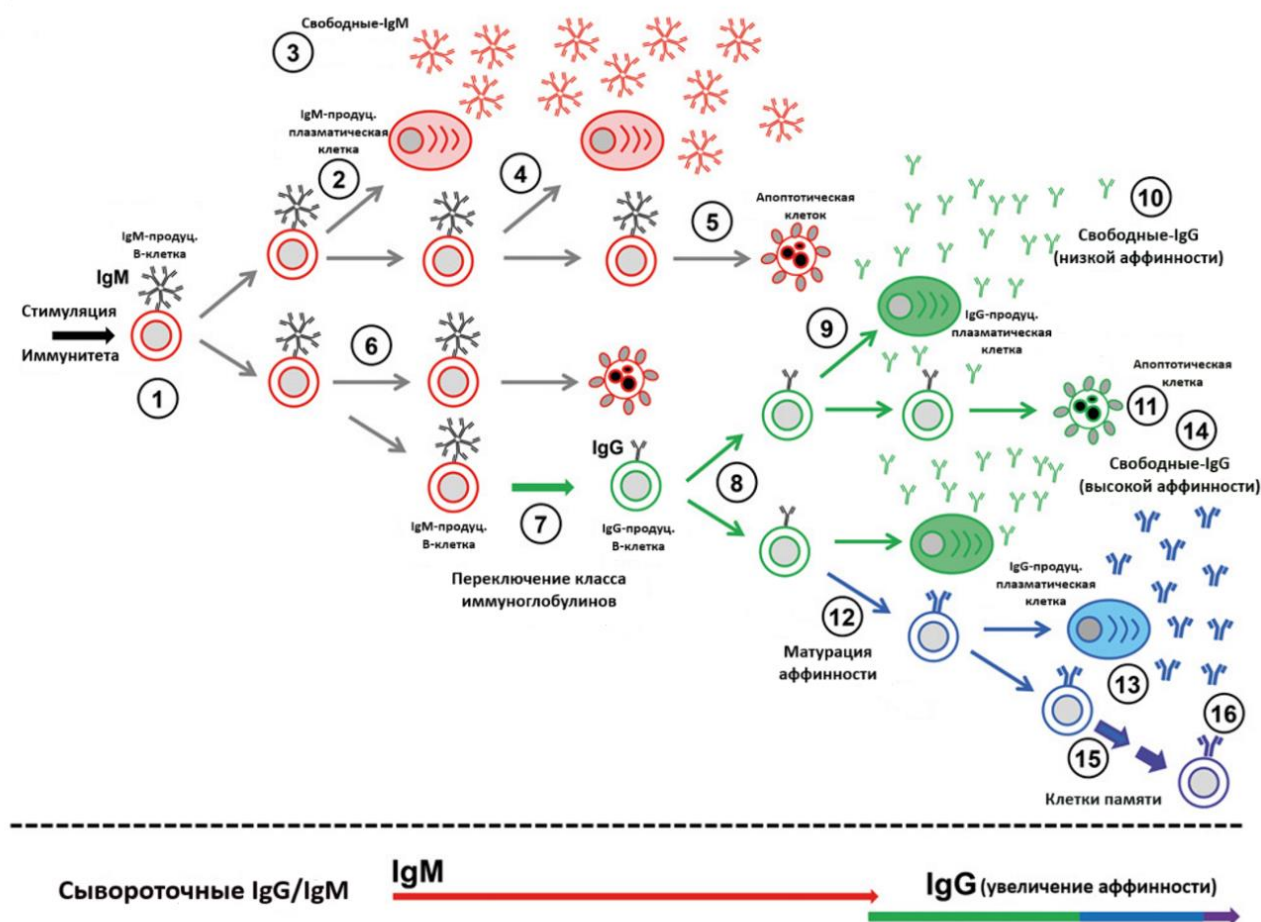


Рисунок 7 – Классические представления о процессе селекции (созревания) В- клеток, продуцирующих IgM, а вслед за ними – IgG антитела [120]

Одним из способов оценки авидности является анализ степени высвобождения IgG, связанного с антигеном, при воздействии хаотропного агента, такого как мочеви́на. Сравнение результатов между обработанными мочевиной и необработанными образцами позволяет определить индекс авидности [121].

В клинической практике индекс авидности применяется как показатель недавнего первичного инфицирования. Определение низкоавидных антител для этих целей регламентируется как отечественными, так и международными клиническими рекомендациями, в частности, в рамках диагностики краснухи [122], цитомегаловирусной инфекции [123], вирусных энцефалитов [124], токсоплазмоза [125] и ряда других заболеваний [126, 127].

Существует доказанная взаимосвязь между силой связывания антител (авидностью) и уровнем защиты организма после перенесенного заболевания или

вакцинации. Эта связь подтверждена многочисленными исследованиями различных инфекций. Согласно научным данным, у людей и животных с низкоавидными антителами риск заражения существенно выше по сравнению с теми, у кого вырабатываются высокоавидные антитела. Такие результаты были получены при изучении различных заболеваний, включая ветряную оспу [128], цитомегаловирусную инфекцию [129], корь [130], лихорадку денге [131], респираторно-синцитиальную инфекцию [132], а также в экспериментах на обезьянах с вирусом иммунодефицита человека [133, 134].

В большинстве случаев для изученных инфекций цикл созревания антител завершается в течение 3 месяцев. Критерием полного созревания является образование высокоаффинных (аффинно-зрелых) антител, которые обеспечивают длительную или пожизненную защиту. Количественно это соответствует индексу авидности более 50%. В диагностике COVID-19 определение индекса авидности выполняет те же задачи, что и для других вирусных инфекций: установление сроков предшествующей иммунизации (включая дифференциацию первичного и повторных заражений). Однако наиболее важной задачей является оценка протективности приобретенного иммунитета.

В работе Struck F. и соавторов [135] было показано, что после заражения SARS-CoV-2 наблюдалась нетипичная кинетика авидности антител. Первоначальный быстрый рост авидности вскоре сменился непрерывным плато на уровне низкой или средней авидности. Высокая авидность была зафиксирована лишь в редких случаях. Даже спустя год после появления клинических симптомов подавляющее большинство пациентов не продемонстрировали выработку IgG с высокой авидностью к нуклеокапсидному белку SARS-CoV-2. Более того, у 68% пациентов не были обнаружены IgG с высокой авидностью к рецептор-связывающему домену SARS-CoV-2. Эти данные свидетельствуют о неполном созревании антител после естественного заражения SARS-CoV-2 и согласуются с результатами, полученными другими исследовательскими группами [136, 137, 138, 139, 140, 141]. Неполное созревание авидности также было выявлено в значительной доле случаев сезонных коронавирусных инфекций [120, 142]. Это

позволяет предположить, что данное явление может быть характерной особенностью иммунного ответа на коронавирусы.

Таким образом, для антител класса IgG к RBD коронавируса SARS-CoV-2 определение индекса их авидности является важным показателем формирования устойчивого и протективного иммунитета. Это особенно значимо в контексте массовой вакцинации населения, где необходимо оценивать как эффективность вакцинации, так и длительность формируемого иммунного ответа.

Гуморальный иммунитет к SARS-CoV-2, основанный на выработке антител, является ключевым показателем эффективности противовирусного ответа и может служить маркером протективности приобретенного иммунитета. Тем не менее, это лишь один из компонентов адаптивной иммунной системы, обеспечивающей защиту организма от вирусных инфекций. После проникновения вируса внутрь клеток хозяина основная роль в противовирусной защите переходит к клеточному иммунитету. Т-лимфоциты не только уничтожают инфицированные клетки, но и координируют долгосрочные иммунные реакции, обеспечивая комплексный и устойчивый ответ против SARS-CoV-2.

1.2.2 Клеточный иммунный ответ при COVID-19

Как было упомянуто ранее, клеточно-опосредованный иммунитет играет ключевую роль в борьбе с вирусом после его проникновения в клетку. Цитотоксические CD8⁺ Т-клетки напрямую уничтожают инфицированные клетки, тогда как CD4⁺ Т-клетки координируют иммунный ответ, выделяя цитокины, которые активируют другие компоненты иммунной системы, включая CD8⁺ Т-клетки, В-клетки и макрофаги [143]. В случае COVID-19 презентация эпитопов SARS-CoV-2 Т-клеткам сильно варьирует у разных людей. Это обусловлено главным образом полиморфизмом генов HLA (Human Leukocyte Antigens), что определяет способность иммунной системы распознавать вирусные эпитопы и, как следствие, влияет на вариабельность тяжести течения болезни.

В отличие от гуморального иммунитета, роль Т-клеточного ответа в защите от SARS-CoV-2 изучена менее подробно. Это связано с методологическими трудностями, такими как: сложность оценки активности Т-клеток; необходимость анализа субпопуляций Т-клеток и механизмов их взаимодействия с эпитопами, презентруемыми молекулами HLA.

Тем не менее, существующие исследования демонстрируют, что Т-клетки, специфичные к антигенам SARS-CoV-2, играют ключевую роль в борьбе с COVID-19 [62, 144, 145, 146, 147].

Влияние антигенов SARS-CoV-2 на Т-клеточную активность

Учитывая антигенные свойства вируса SARS-CoV-2, предполагалось, что Т-клетки будут эффективно реагировать на инфекцию и способствовать её элиминации. Так, у большинства пациентов с COVID-19, включая тех, кто перенес как легкую, так и тяжелую формы заболевания, обнаруживались активированные CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоциты [145, 148]. Антигены SARS-CoV-2 активируют различные субпопуляции CD4⁺ Т-клеток, такие как, хелперные клетки 1-го типа (Th1), клетки Th17, фолликулярные хелперные клетки (Tfh), регуляторные Т-клетки (Tregs) и цитотоксические CD4⁺ Т-клетки (CD4 CTL), играющие важную роль в координации иммунного ответа [149]. Основными мишенями для Т-клеток являются следующие белки: S-белок, мембранный белок (M), нуклеокапсидный белок (N), неструктурный белок 3 (nsp3, кодируемый ORF1ab) и белок ORF3a, которые критически важны для жизненного цикла SARS-CoV-2 [145, 150]. Важным аспектом долгосрочного иммунитета является формирование Т-клеток памяти. Исследования подтверждают, что Т-клетки памяти, специфичные к SARS-CoV-2, могут сохраняться у переболевших в течение как минимум одного года, а возможно, и дольше [151, 152].

У реконвалесцентов и вакцинированных против SARS-CoV-2 наблюдался устойчивый Т-клеточный ответ [153, 154, 155]. Антигенспецифические Т-клетки обнаруживались не только в периферической крови, но и в тканях лимфатических узлов и слизистых оболочек после вакцинации [156, 157]. Так, при изучении мРНК-вакцины против SARS-CoV-2 было показано, что реакции Т-лимфоцитов

достигают пика примерно через месяц после первой дозы, затем снижаются и стабилизируются через 3–4 месяца. Это связано с формированием долгоживущих Т-клеток памяти, обеспечивающих длительный иммунитет [153, 156]. Кроме того, третья (бустерная) доза вакцины значительно усиливает Т-клеточный ответ по сравнению с уровнем после второй дозы [158, 159]. У реконвалесцентов вакцинация вызывает более быструю Т-клеточную реакцию по сравнению с ранее неинфицированными людьми, но конечный уровень ответа остается сопоставимым [153]. Специфические для SARS-CoV-2 Т-клетки активно экспрессируют цитокины, такие как IFN- γ , IL-2, TNF- α , и хемокины, играющие ключевую роль в регуляции функций Т-клеток [62, 145, 149, 160, 161, 162]. Важно отметить, что Т-клетки памяти, индуцированные как инфекцией, так и вакцинацией, сохраняют способность к продукции цитокинов на протяжении длительного времени [161, 162], а также могут дифференцироваться в стволовые Т-клетки памяти, что обеспечивает долгосрочную иммунологическую защиту [152, 154, 163].

Роль Т-клеточных иммунных реакций в защите организма от SARS - CoV-2

При изучении роли Т-клеток в защите от SARS-CoV-2 накапливается всё больше доказательств их ключевого значения в противовирусном иммунитете. В частности, у пациентов с легким течением COVID-19 и быстрой элиминацией вируса чаще наблюдались повышенные уровни Т-клеток, специфичных к SARS-CoV-2. Эти клетки активно продуцировали интерферон-гамма (IFN- γ) и активировались на ранних этапах инфекции [161]. В то же время у пациентов со сниженным количеством CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток наблюдалась более высокая смертность, даже при нормальном уровне В-клеток [164]. Это подчеркивает важность как хелперных (CD4⁺), так и цитотоксических (CD8⁺) Т-клеток в борьбе с вирусом. Дополнительное свидетельство значимости Т-клеточного звена иммунитета было получено при изучении больных с агаммаглобулинемией. У таких пациентов течение COVID-19 часто характеризовалось длительной персистенцией вируса, но менее выраженной симптоматикой [165, 166, 167]. Этот феномен указывает на то, что Т-клеточный иммунитет может компенсировать

недостаточность гуморального ответа, обеспечивая защиту от тяжелых форм заболевания.

Среди всех подгрупп CD4⁺ Т-клеток фолликулярные Т-хелперы (Tfh) играют ключевую роль в формировании гуморального иммунного ответа. Исследования показали, что у пациентов с летальным исходом при COVID-19 наблюдались нарушения функции Tfh-клеток и процесса формирования зародышевых центров, что подчеркивает их важность для защиты от SARS-CoV-2 [168]. В частности, доля Tfh1-клеток, специфичных к SARS-CoV-2, — подгруппы Tfh, характеризующейся экспрессией хемокинового рецептора CXCR3, — коррелировала с уровнем нейтрализующих антител против SARS-CoV-2 [169, 170, 171]. Это свидетельствует о значительном положительном влиянии данных клеток на иммунный ответ при COVID-19. Помимо участия в гуморальном иммунитете, CD4⁺ Т-клетки также играют ключевую роль в активации, пролиферации и функциональной активности CD8⁺ Т-клеток, что необходимо для элиминации клеток, инфицированных SARS-CoV-2.

Специфические для SARS-CoV-2 CD8⁺ Т-клетки обнаруживаются примерно у 70% пациентов с COVID-19 через месяц после заражения [67, 162]. Однако спустя восемь месяцев этот показатель снижается до ~50% [67, 162]. Помимо данных, полученных от пациентов с COVID-19, исследования на приматах также подтверждают ключевую роль CD8⁺ Т-клеток в формировании иммунного ответа. Например, истощение CD8⁺ Т-клеток у выздоровевших макак частично нивелировало защитный эффект естественного иммунитета против повторного заражения SARS-CoV-2 [172, 173]. В другом исследовании на макаках, иммунизированных назальной вакциной на основе белков N, М и Е (что минимизирует влияние нейтрализующих антител), было показано, что количество антиген-специфичных CD8⁺ Т-клеток отрицательно коррелирует с вирусной нагрузкой при заражении [174].

Таким образом, эффективная координация между CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитами играет ключевую роль в противодействии SARS-CoV-2, обеспечивая как уничтожение инфицированных клеток, так и формирование долгосрочного

иммунитета. Однако успешность этого взаимодействия во многом определяется генетическими особенностями организма, в частности, полиморфизмом генов главного комплекса гистосовместимости (HLA). Эти гены кодируют молекулы HLA, которые ответственны за распознавание и презентацию вирусных антигенов иммунной системе. В отличие от В-клеточных рецепторов, которые связывают нативные антигены, Т-клеточные рецепторы распознают пептидные эпитопы только в комплексе с молекулами HLA. Высокая степень полиморфизма генов HLA обуславливает значительное разнообразие Т-клеточных ответов у разных людей, что может влиять на индивидуальную восприимчивость к вирусу и эффективность иммунного ответа.

Молекулы HLA класса I экспрессируются практически на всех клетках организма [175]. Они презентуют пептидные фрагменты, включая пептиды вирусного происхождения, цитотоксическим Т-лимфоцитам (CD8⁺ Т-клеткам) [176] которые, в свою очередь, распознают инфицированные клетки и уничтожают их [177].

Молекулы HLA класса II экспрессируются на антигенпрезентирующих клетках (АПК), таких как дендритные клетки, макрофаги и другие [178]. АПК поглощают SARS-CoV-2, после чего вирусные белки подвергаются процессингу с образованием коротких пептидов. Эти пептиды презентуются циркулирующим Т-хелперам (CD4⁺ Т-клеткам) в комплексе с молекулами HLA класса II. Активированные Т-хелперы, в свою очередь, координируют иммунный ответ, стимулируя другие компоненты иммунной системы, включая цитотоксические Т-клетки и В-клетки, что обеспечивает развитие адаптивного иммунитета [179].

Различные аллели HLA обладают разной способностью связывать и презентовать вирусные пептиды, что напрямую влияет на эффективность иммунного ответа [180]. Например, аллель *HLA-B46:01* характеризуется низким сродством к пептидам SARS-CoV-2, что может снижать способность иммунной системы эффективно распознавать данный вирус. Напротив, аллель *HLA-B15:03* демонстрирует высокое сродство к консервативным пептидам коронавируса, обеспечивая более мощный и специфичный Т-клеточный ответ [181, 182].

Таким образом, роль HLA в иммунном ответе на SARS-CoV-2 является сложной и значительно варьируется среди разных людей вследствие обширного генетического разнообразия генов HLA. Понимание этих различий может способствовать разработке новых стратегий лечения и профилактики COVID-19, включая оптимизацию диагностических методов, совершенствование вакцинных подходов и создание персонализированных терапевтических решений.

Влияние различных вариантов SARS-CoV-2 на Т-клеточный ответ

Вследствие мутаций каждый новый вариант SARS-CoV-2 приобретает определённые изменения, которые могут влиять на его биологические свойства. Эти изменения могут повышать контагиозность вируса или усиливать способность вызывать более тяжёлые клинические проявления по сравнению с предшествующими вариантами. Среди всех известных на данный момент вариантов вируса - «Омикрон» и его подварианты отличаются наибольшей контагиозностью, значительным количеством мутаций и, как следствие, повышенной способностью уклоняться от иммунного ответа, сформированного в результате предыдущих инфекций или вакцинации [52, 183, 184].

Вариант «Омикрон» начал распространяться в конце 2021 года и быстро вытеснил ранее доминировавший вариант «Дельта». В отличие от предыдущих вариантов SARS-CoV-2, которые содержали менее 10 мутаций в S-белке, «Омикрон» характеризуется более чем 30 мутациями. Почти половина из них сосредоточена в рецептор-связывающем домене (RBD). Как и ожидалось, эти мутации значительно снизили эффективность гуморального иммунитета, сформированного против предыдущих вариантов [185, 186]. Тем не менее, у лиц, вакцинированных препаратами на основе S-белка оригинального штамма (Wuhan-Hu-1) или перенесших инфекцию, вызванную предыдущими вариантами, Т-клеточный иммунный ответ против «Омикрона» в значительной степени сохранился [185, 186, 187]. Исследования эпитопов показали, что большинство ранее идентифицированных Т-клеточных эпитопов как S-белка, так и других белков SARS-CoV-2 остаются консервативными в большинстве вызывающих озабоченность вариантов, включая «Омикрон» [185, 188, 189]. Гуморальный

иммунный ответ в основном направлен на S-белок, что создает условия для накопления мутаций именно в этом белке. В то же время Т-клетки распознают короткие фрагменты белков (эпитопы), происходящие из различных вирусных белков, включая те, которые не относятся к S-белку. Эти белки менее подвержены мутациям, что делает их эпитопы более стабильными и распознаваемыми иммунной системой при заражении большинством вариантов SARS-CoV-2.

Таким образом, гуморальный и клеточный иммунитет представляют собой два взаимодополняющих механизма защиты организма от SARS-CoV-2. Гуморальный иммунитет обеспечивает выработку специфических антител, которые нейтрализуют свободные вирусные частицы, тогда как клеточный иммунитет играет ключевую роль в уничтожении инфицированных клеток и формировании долгосрочной иммунологической памяти. Однако, как уже отмечалось, при COVID-19 могут возникать нарушения в работе этих механизмов, особенно у пациентов с тяжелым течением болезни. Учет особенностей иммунного ответа имеет критически важное значение при разработке современных вакцинных препаратов, которые должны стимулировать как гуморальный (антительный), так и клеточный (Т-клеточный) иммунитет, чтобы обеспечить более надежную и комплексную защиту от вируса.

1.3 Вакцинные препараты против SARS-CoV-2

Разработка препаратов и вакцинации против коронавируса сыграла ключевую роль в борьбе с пандемией. Были созданы профилактические препараты на основе различных технологических платформ, каждая из которых обладает уникальными характеристиками. Особое внимание уделялось выбору наиболее иммуногенных антигенов, которые способны вызывать сильный и длительный иммунный ответ. Для SARS-CoV-2 основным мишенью стал S-белок, играющий ключевую роль в проникновении вируса в клетки человека. Этот антиген стал

основой для большинства вакцин, так как он, как предполагалось, обеспечивает высокую специфичность и эффективность в формировании защиты от вируса.

Рассмотрим основные типы вакцин против SARS-CoV-2 (Рисунок 8):

1. **Вакцины на основе мРНК.** Технология мРНК-вакцин основана на использовании матричной рибонуклеиновой кислоты (мРНК), которая кодирует белок патогена. В случае вакцин против COVID-19 мРНК содержит информацию, необходимую для синтеза S-белка коронавируса. После введения в организм мРНК-вакцина задействует клеточные механизмы, запуская производство фрагментов коронавирусного S-белка. Эти фрагменты распознаются иммунной системой, что приводит к активации как гуморального, так и клеточного иммунного ответа. Среди преимуществ мРНК-вакцин можно отметить быстроту разработки, что особенно важно при быстром распространении новых инфекций, высокую иммуногенность, обеспечивающую эффективное формирование иммунного ответа, и безопасность производства, поскольку технология исключает работу с живыми патогенами. Однако у мРНК-вакцин есть и недостатки: они требуют сверхнизких температур для хранения, что создает сложности для их транспортировки и использования в отдаленных регионах, могут вызывать временные побочные эффекты, а также имеют ограниченный опыт долгосрочного применения, что требует дальнейших исследований для оценки продолжительности защиты и безопасности. Примерами таких вакцин являются Pfizer-BioNTech (BNT162b2) и Moderna (mRNA-1273) [190].

Вакцинные платформы

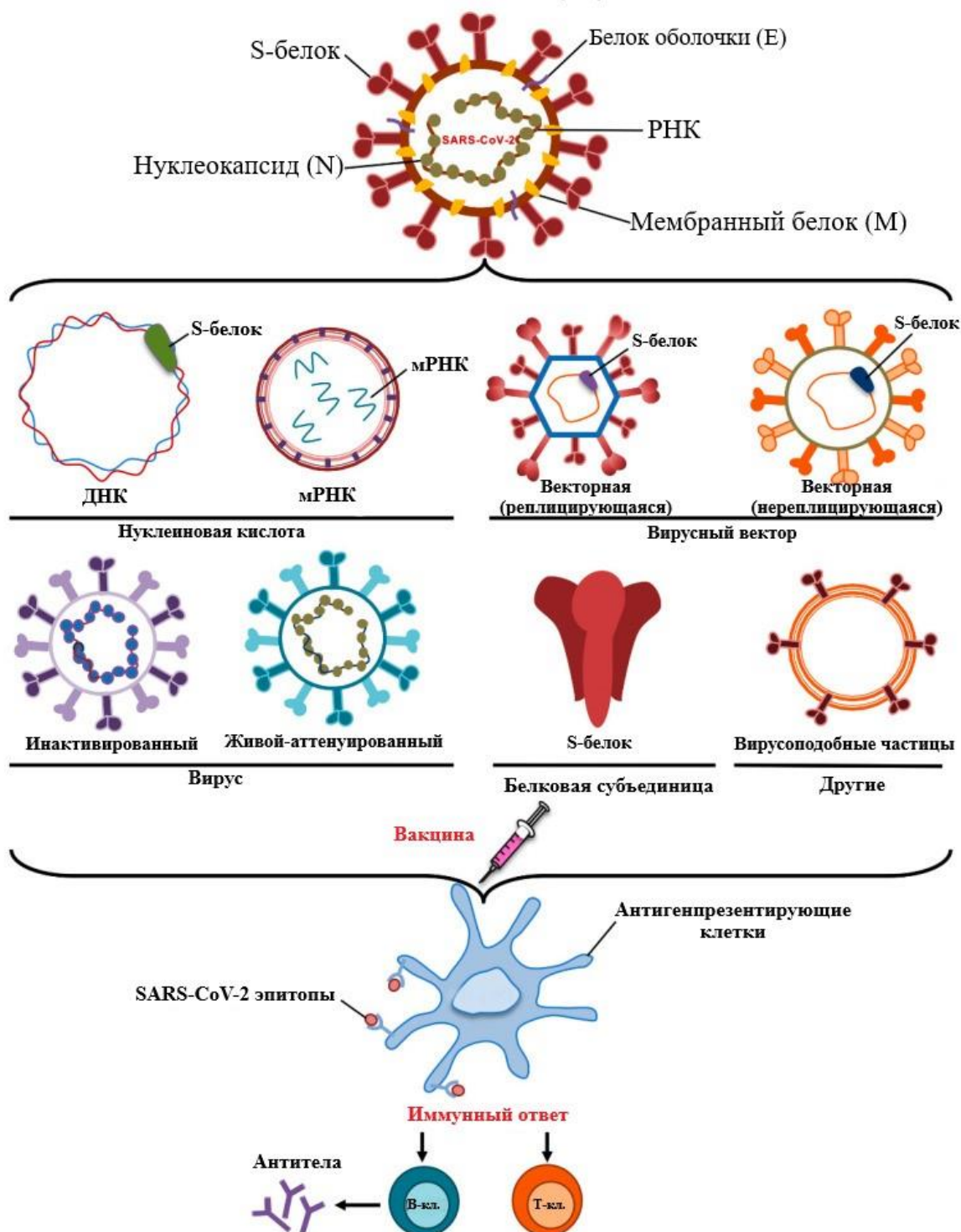


Рисунок 8 – Типы вакцинных препаратов против SARS-CoV-2 [190]

2. Вирусные нереплицирующиеся векторные вакцины.

Вакцины этого типа представляют собой платформы, использующие вирусы, которые либо полностью неспособны к репликации, либо значительно ослаблены (аттенуированы), в качестве векторов для доставки генетического материала,

кодирующего целевой антиген [190]. Вирусные векторы обладают высокой иммуногенностью и способны активировать как клеточный (Т-клеточный), так и гуморальный (В-клеточный) иммунный ответ. Однако их основным недостатком является наличие предсуществующего иммунитета против самого вектора, что может снижать эффективность вакцинации. Для минимизации этого эффекта разработчики часто используют редкие или модифицированные вирусы, которые редко встречаются в человеческой популяции [190]. Примерами таких вирусных векторов служат аденовирусы, вирус осповакцины, вирус Ньюкаслской болезни, альфавирусы и лентивирусы. Одним из наиболее известных примеров подобной вакцины является препарат «Гам-КОВИД-Вак» (торговое название «Спутник V»), разработанный в НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи [191]. Согласно клиническим исследованиям, эта вакцина демонстрирует высокую эффективность в предотвращении тяжелых форм COVID-19 [192, 193]. Однако важно учитывать, что реальная эффективность может варьироваться в зависимости от популяции, условий применения и циркулирующих вариантов вируса [190].

3. Инактивированные вирусные вакцины. Инактивированные вирусные вакцины являются одним из наиболее традиционных подходов к разработке вакцинных препаратов [190]. Эти вакцины производятся путем выращивания вируса в клеточных культурах с последующей его инаktivацией физическими или химическими средствами. Ключевое преимущество таких вакцин заключается в том, что они содержат полный набор компонентов вирусной частицы, что позволяет иммунной системе распознавать множество антигенов одновременно, усиливая тем самым иммунный ответ и обеспечивая более широкую защиту [194]. Однако у данного типа вакцин есть и недостатки. В частности, их производство требует работы с живым вирусом, что предполагает использование лабораторий с высоким уровнем биобезопасности. Кроме того, процесс наработки вируса с достаточным титром может быть сложным, трудоемким и дорогостоящим. Примерами инактивированных вакцин являются «CoronaVac» (разработана в Китае) и «КовиВак» (разработана в России) [194].

4. Рекомбинантные белковые вакцины. Рекомбинантные белковые вакцины содержат специфические белки, выделенные из патогенов и предназначенные для активации защитного иммунного ответа [190]. Для их производства применяются различные системы экспрессии белков, включая бактериальные клетки (например, *E. coli*), клетки насекомых и клеточные линии млекопитающих [190]. Каждая система имеет свои преимущества: бактериальные системы обеспечивают быстрое и экономичное производство, тогда как системы на основе клеток млекопитающих позволяют получать белки с посттрансляционными модификациями, близкими к естественным. Основное преимущество рекомбинантных белковых вакцин заключается в возможности их производства без использования живого вируса, что обеспечивает высокую безопасность и технологическую гибкость. Наиболее часто в качестве антигенов используются шиповидный белок (S-белок) или его функциональные фрагменты, включая домены S1, S2 и рецептор-связывающий домен [195]. Эти компоненты играют ключевую роль в проникновении вируса в клетки-хозяева, что делает их основными мишенями для нейтрализующих антител. Создание рекомбинантных белков, способных индуцировать устойчивый защитный иммунитет, связано с рядом технологических и финансовых трудностей, таких как обеспечение правильного фолдинга, очистки и стабилизации белков. Кроме того, для усиления иммунного ответа часто требуется использование адъювантов. Примером такой вакцины является NVX-CoV2373, разработанная в США, которая основана на рекомбинантном S-белке, собранном в виде наночастиц, и включает адъювант Matrix-M для усиления иммунного ответа [195].

Все упомянутые платформы и созданные на их основе вакцины показали высокую эффективность в клинических испытаниях. Однако уровень защиты может варьироваться в зависимости от циркулирующих вариантов SARS-CoV-2, что обусловлено высоким уровнем мутаций вируса [196]. Со временем уровень антител и клеточного иммунитета может снижаться, что делает бустерную вакцинацию необходимой для поддержания долгосрочной защиты [197]. Несмотря на высокую эффективность, вакцины против COVID-19 не обеспечивают

абсолютной защиты от заражения и передачи вируса. Это связано с высокой мутационной активностью SARS-CoV-2, которая может приводить к появлению новых вариантов, снижающих эффективность существующих вакцинных препаратов.

Наконец, хотя вакцины играют ключевую роль в борьбе с распространением SARS-CoV-2, они не являются универсальным решением проблемы. Для эффективного предотвращения дальнейшего распространения вируса необходим комплексный подход, включающий постоянный эпидемиологический надзор, своевременное выявление новых вариантов вируса, разработку обновленных вакцинных препаратов, совершенствование мер общественного здравоохранения, а также создание новых или оптимизацию существующих методов оценки адаптивного иммунитета.

1.4 Методы оценки адаптивного иммунитета к SARS-CoV-2

Понимание механизмов адаптивного иммунного ответа человека на SARS-CoV-2 имеет ключевое значение для оценки способности организма противостоять инфекции и развивать долгосрочный иммунитет. В этой связи одной из важнейших задач современных исследований является разработка и оптимизация методов для всесторонней оценки как гуморального, так и клеточного звеньев иммунной системы.

1.4.1 Методы оценки гуморального иммунитета при COVID-19

Оценка гуморального иммунитета к SARS-CoV-2 проводится с использованием методов, направленных на выявление антител, которые иммунная система вырабатывает в ответ на инфекцию, вызванную SARS-CoV-2, или после вакцинации против данного патогена.

Основным подходом для анализа гуморального иммунного ответа являются серологические тесты. Эти методы позволяют как качественно, так и количественно определять уровни специфических антител различных классов — IgA, IgM, IgG или суммарных антител — направленных против ключевых антигенов SARS-CoV-2. Основными мишенями для таких тестов служат полноразмерный шиповидный (S-) белок, его рецептор-связывающий домен (RBD), а также нуклеокапсидный (N-) белок.

Наиболее распространенные типы серологических тестов схематично представлены на Рисунке 9 и включают: *Иммуноанализы латерального потока (LFIA)*, *Хемилюминесцентный иммуноанализ (CLIA)*, *Иммуноферментный анализ (ELISA)*.

Иммуноферментный анализ

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) — это метод, основанный на специфическом связывании исследуемого вещества с антителами или антигенами, которые маркируются ферментными метками. После добавления субстрата фермент катализирует реакцию, в результате которой генерируется измеримый сигнал. Этот метод широко применяется для выявления антител классов IgG, IgM и IgA к ключевым антигенам SARS-CoV-2, таким как шиповидный белок (S), его рецептор-связывающий домен и нуклеокапсидный белок (N). ELISA характеризуется высокой чувствительностью и специфичностью, простотой выполнения, высокой пропускной способностью и возможностью получения количественных результатов.

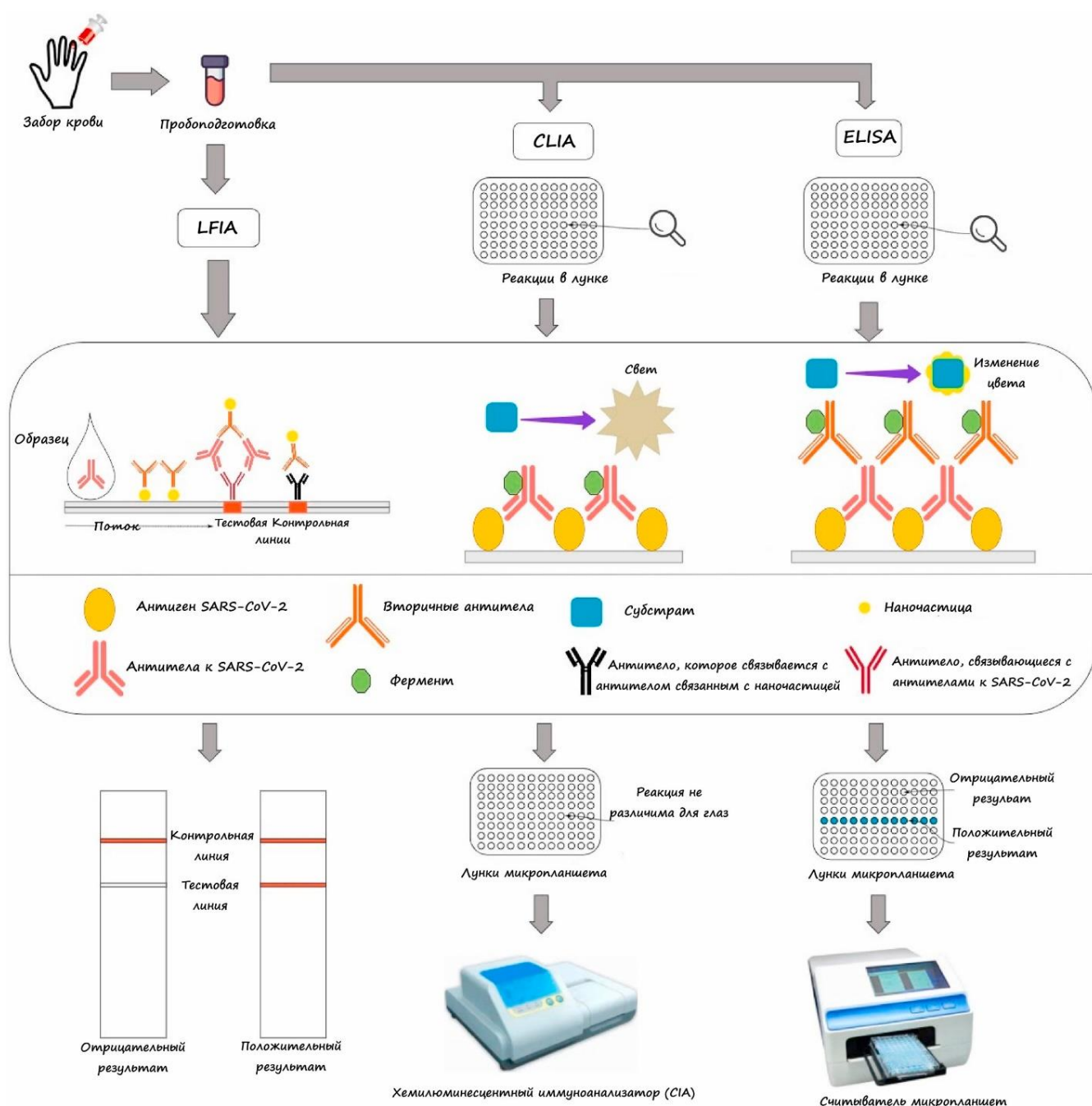


Рисунок 9 – Схемы серологических анализов LFIA, CLIA и ELISA для выявления антител к SARS-CoV-2 [198]

Эти преимущества делают его незаменимым инструментом в диагностике инфекционных заболеваний, иммунологии и биохимии [199]. Тем не менее, метод имеет ряд ограничений. ELISA требует значительного времени для выполнения, зависит от качества используемых реагентов, может проявлять кросс-реактивность, а также нуждается в специальном оборудовании и строгих условиях хранения реагентов. В клинической практике этот метод активно используется для подтверждения сероконверсии после перенесенной инфекции или вакцинации. При

этом тесты на антитела класса IgG к RBD SARS-CoV-2 демонстрируют высокую корреляцию с уровнем нейтрализующих антител [200].

Хемилюминесцентный иммуноанализ

CLIA (Chemiluminescent Immunoassay) — это метод иммуноанализа, основанный на использовании химических реакций, приводящих к испусканию света, для детекции антител или антигенов. Этот метод аналогичен ELISA, но вместо измерения цветной реакции в CLIA оценивается интенсивность светового сигнала. В основе CLIA лежит применение меченых молекул (например, ферментов или люминесцентных соединений), которые при взаимодействии с аналитом излучают свет. Такой подход обеспечивает более высокую чувствительность и специфичность анализа [201]. По сравнению с ELISA, CLIA обладает рядом преимуществ, включая повышенную чувствительность, более широкий диапазон обнаружения, быстроту выполнения (обычно 30–60 минут) и возможность автоматизации для одновременной обработки большого количества образцов. Однако стоит отметить, что оборудование и реагенты для CLIA являются более дорогостоящими и сложными в использовании, а их доступность может быть ограничена.

Иммуноанализы латерального потока

LFIA (Lateral Flow Immunoassay) основан на принципе тонкослойной хроматографии. В процессе анализа биологический образец (например, кровь или слюна) мигрирует по тест-полоске, где взаимодействует с мечеными антителами или антигенами. Результаты визуализируются в виде окрашенных полос на тест-полоске [201]. LFIA отличается быстротой выполнения, простотой использования, портативностью, низкой стоимостью и длительным сроком хранения реагентов. Эти характеристики делают данный метод особенно подходящим для применения в условиях, удаленных от лабораторий. Однако LFIA имеет ограничения: чувствительность тестов составляет в среднем 70–90%, они предоставляют в основном качественные результаты и могут давать ложноположительные или ложноотрицательные ответы. Кроме того, данный метод подходит не для всех

типов анализов. Исследования показали, что LFIA-тесты наиболее эффективны для выявления IgG через 2–3 недели после появления симптомов [202].

В таблице 2 представлена сравнительная характеристика рассмотренных тестов.

Таблица 2 – Сравнительный анализ распространенных типов серологических тестов

Метод	Чувствительность	Специфичность	Время выполнения	Оборудование	Стоимость
ELISA	>90%	>95%	2–4 часа	Планшетный ридер	Средняя
CLIA	>95%	>98%	30–60 минут	Специальное	Высокая
LFIA	70–90%	85–95%	10–30 минут	Не требуется	Низкая

Выбор метода зависит от конкретной задачи. Например, ELISA и CLIA предпочтительны для точной оценки иммунного ответа в лабораторных условиях, тогда как LFIA больше подходит для быстрого скрининга.

ELISA, CLIA и LFIA являются важными инструментами для диагностики SARS-CoV-2 и оценки гуморального иммунитета. Каждый из этих методов обладает уникальными преимуществами и ограничениями, что делает их взаимодополняющими. ELISA и CLIA обеспечивают высокую точность и хорошо подходят для детальных лабораторных исследований, тогда как LFIA предлагает быстрый и доступный способ диагностики, особенно при внелабораторном использовании. Для достижения наилучших результатов важно учитывать цель исследования и условия его проведения.

Вышеописанные методы применяются для определения антител к SARS-CoV-2. Однако для характеристики специфичных к коронавирусу В- и Т-клеток используются другие подходы, такие как ELISpot и проточная цитометрия.

Проточная цитометрия и анализ ELISpot

Эти методы применяются для идентификации В-клеток, специфичных к SARS-CoV-2, а также для изучения их роли в продукции антител. Проточная цитометрия позволяет идентифицировать и количественно оценивать данные клетки [203], тогда как анализы ELISpot обеспечивают возможность

количественного измерения специфичных к SARS-CoV-2 В-клеток памяти, даже при снижении уровня антител [204].

Хотя вышеописанные методы способны выявлять антитела у вакцинированных или переболевших индивидуумов, полученные данные не всегда коррелируют с уровнем защитного иммунитета против SARS-CoV-2. Более точную оценку гуморального иммунитета обеспечивают анализы на нейтрализацию вируса и их модификации. Однако такие методы являются более трудоемкими и длительными.

Существует три основных типа методов обнаружения нейтрализующих антител, которые схематично представлены на Рисунке 10. Эти методы включают: *Реакцию нейтрализации вируса в культуре клеток (РН)*, *Тест на нейтрализацию псевдовирусов (pVNT)*, *Иммуноферментные суррогатные вируснейтрализующие тесты (sVNT)*.

Реакция нейтрализации вируса в культуре клеток

РН является одним из классических методов оценки способности антител или других агентов ингибировать репликацию вируса. Этот тест основан на взаимодействии специфических антител с вирусными частицами, что предотвращает их связывание с клетками-мишенями и последующую инфекцию. В эксперименте используются культуры клеток, чувствительные к исследуемому вирусу, и варианты SARS-CoV-2, которые добавляются к клеткам в присутствии сыворотки или моноклональных антител (Рисунок 10Б).

Одним из ключевых преимуществ РН является её высокая специфичность и возможность количественной оценки нейтрализующих антител. Однако этот метод имеет ряд ограничений. Во-первых, он требует использования живого вируса, что делает его трудоёмким и длительным. Во-вторых, выполнение РН требует специализированных биобезопасных условий, что дополнительно ограничивает её

доступность [205].

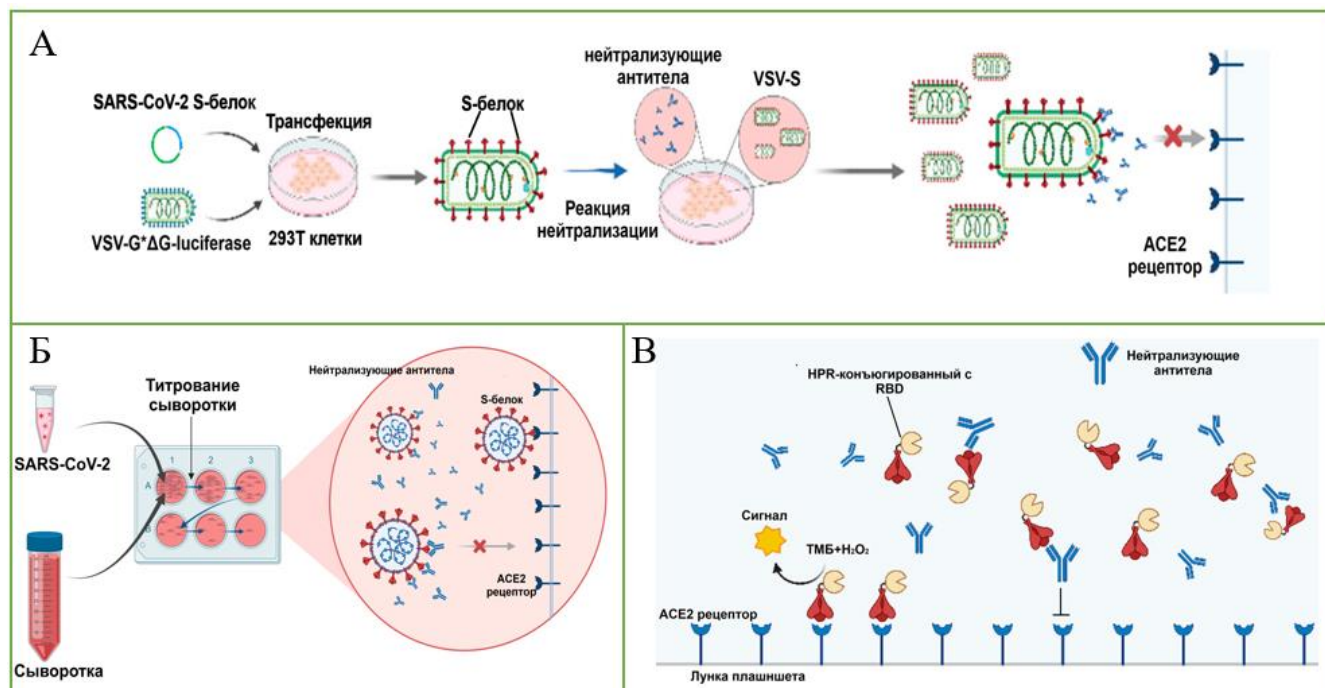


Рисунок 10 – Схемы серологических анализов для выявления, нейтрализующих SARS-CoV-2 антител: **А.** Тест на нейтрализацию псевдовирuсов (pVNT); **Б.** Реакция нейтрализации вируса в культуре клеток (PH); **В.** Иммуноферментный суррогатный вируснейтрализующий тест (sVNT)

Тест на нейтрализацию псевдовирuсов

pVNT представляет собой современный подход, позволяющий оценить нейтрализующую активность антител без использования патогенного вируса (Рисунок 10А). Псевдовирuсы — это модифицированные вирусные частицы, несущие гены, кодирующие белки оболочки целевого вируса (например, S-белок SARS-CoV-2), но лишённые патогенных свойств [205]. Эти частицы обычно создаются на основе лентивирусов или вируса везикулярного стоматита (VSV).

Метод pVNT широко применяется для изучения иммунного ответа на вакцины и инфекции, так как он относительно безопасен и, следовательно, менее требователен к условиям биобезопасности по сравнению с традиционной реакцией нейтрализации. Кроме того, псевдовирuсы легко адаптируются для исследования нейтрализующих антител к новым вариантам SARS-CoV-2. Однако pVNT имеет определённые ограничения. Например, результаты тестирования могут не

полностью воспроизводить взаимодействие SARS-CoV-2 с клетками-мишенями, что снижает корреляцию с реальной защитой в организме человека.

Иммуноферментные суррогатные вируснейтрализующие тесты

sVNT являются аналогами методов PH и pVNT. Независимо от того, используется ли живой вирус или псевдовирус, при тестировании их нейтрализации возникают некоторые общие трудности. Во-первых, нейтрализующая способность антител в значительной степени зависит от состояния вируса или его титра, а также от типа клеток и условий, используемых при проведении анализа. Если вирус и клетки находятся в неоптимальном состоянии, воспроизводимость результатов может быть низкой [206]. Исследования показали, что различные белки SARS-CoV-2, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP), могут напрямую связываться с рецептором ACE2, и существует дозозависимое специфическое связывание между ACE2 и RBD или S1 доменом, но не с нуклеокапсидным (N) белком [207].

Иммуноферментные суррогатные вируснейтрализующие тесты представляют собой современный и упрощённый подход для оценки нейтрализующих антител против вирусов. Этот метод был разработан как альтернатива традиционным тестам на нейтрализацию вирусов в культуре клеток. Принцип работы sVNT заключается в имитации взаимодействия между вирусом и клеткой организма, не используя живой вирус и клеточные культуры. Вместо этого тест основан на конкурентном связывании антител с рекомбинантными белками вируса [208, 209].

Основной механизм sVNT представлен на Рисунке 10В и заключается в моделировании ключевого этапа инфицирования: взаимодействия вирусного белка (например, S-белка SARS-CoV-2) с клеточным рецептором (например, ACE2). Антитела, специфичные к вирусному белку, могут блокировать это взаимодействие, предотвращая связывание вируса с клеткой. В тесте используется следующая последовательность реакций:

1. **Конкурентное связывание:** рекомбинантный вирусный белок (например, RBD S-белка) и антитела из образца крови пациента конкурируют за

связывание с клеточным рецептором (например, ACE2), который иммобилизован на планшете;

2. **Оценка блокировки:** если антитела успешно связываются с вирусным белком, они предотвращают его взаимодействие с рецептором. Это приводит к снижению сигнала в тесте, что указывает на наличие нейтрализующих антител;
3. **Детекция сигнала:** для обнаружения взаимодействия используются ферментативные метки (например, HRP – пероксидаза хрена), которые генерируют цветную реакцию. Интенсивность сигнала обратно пропорциональна уровню нейтрализующих антител.

sVNT имеет ряд преимуществ по сравнению с другими методами оценки нейтрализации. Прежде всего, тест отличается высокой безопасностью, так как не требует использования живых вирусов, что позволяет проводить его в стандартных лабораторных условиях [210]. Важным фактором является и простота метода: он не предполагает применения сложного оборудования или наличия специализированных навыков у персонала, что делает его доступным для широкого круга лабораторий. Скорость выполнения sVNT также играет ключевую роль — результаты теста можно получить в течение нескольких часов, что значительно быстрее, чем при использовании традиционных методов нейтрализации вирусов. Благодаря своей эффективности и высокой производительности, тест легко поддается автоматизации, что обеспечивает возможность массового скрининга населения. Наконец, стандартизация процесса достигается за счет использования рекомбинантных белков и стандартизованных реагентов, что минимизирует вариабельность между различными лабораториями и повышает надежность получаемых данных.

Хотя перечисленные выше методы способны определять вируснейтрализующие антитела, появления новых вариантов SARS-CoV-2, позволяют коронавирусу ускользать от сформировавшегося гуморального иммунитета. В этой связи критически важно развивать и оптимизировать методологии для анализа Т-клеточного иммунитета, который представляет собой

ключевой компонент долгосрочной защиты и может компенсировать ограниченную эффективность гуморального ответа против мутировавших вариантов.

1.4.2 Методы оценки клеточного иммунитета при COVID-19

В отличие от гуморального иммунитета, сложная природа клеточного иммунитета не позволяет использовать единый тест для его количественной оценки. В клинических исследованиях и при разработке вакцин традиционно применяются различные методы анализа, такие как ELISpot, ИФА (иммуноферментный анализ) и проточная цитометрия. За годы их применения протоколы были значительно усовершенствованы, автоматизированы и адаптированы для мультиплексного анализа, что позволяет решать более сложные задачи иммунофенотипирования. При этом исходные материалы и подходы к количественному определению в каждом из этих методов различаются, а значит, у каждого из них есть свои преимущества и ограничения.

Оценка клеточного иммунитета к SARS-CoV-2 осуществляется при помощи методов, предназначенных для:

- 1) обнаружения специфичных к SARS-CoV-2 Т-клеток посредством анализа репертуара TCR (т.е. секвенирования TCR и использования МНС-тетрамеров) (Рисунок 11А); и
- 2) обнаружения функциональной активации Т-клеток (т.е. на основе стимуляции вирусными пептидами *ex vivo* и последующего анализа, Рисунок 11Б).

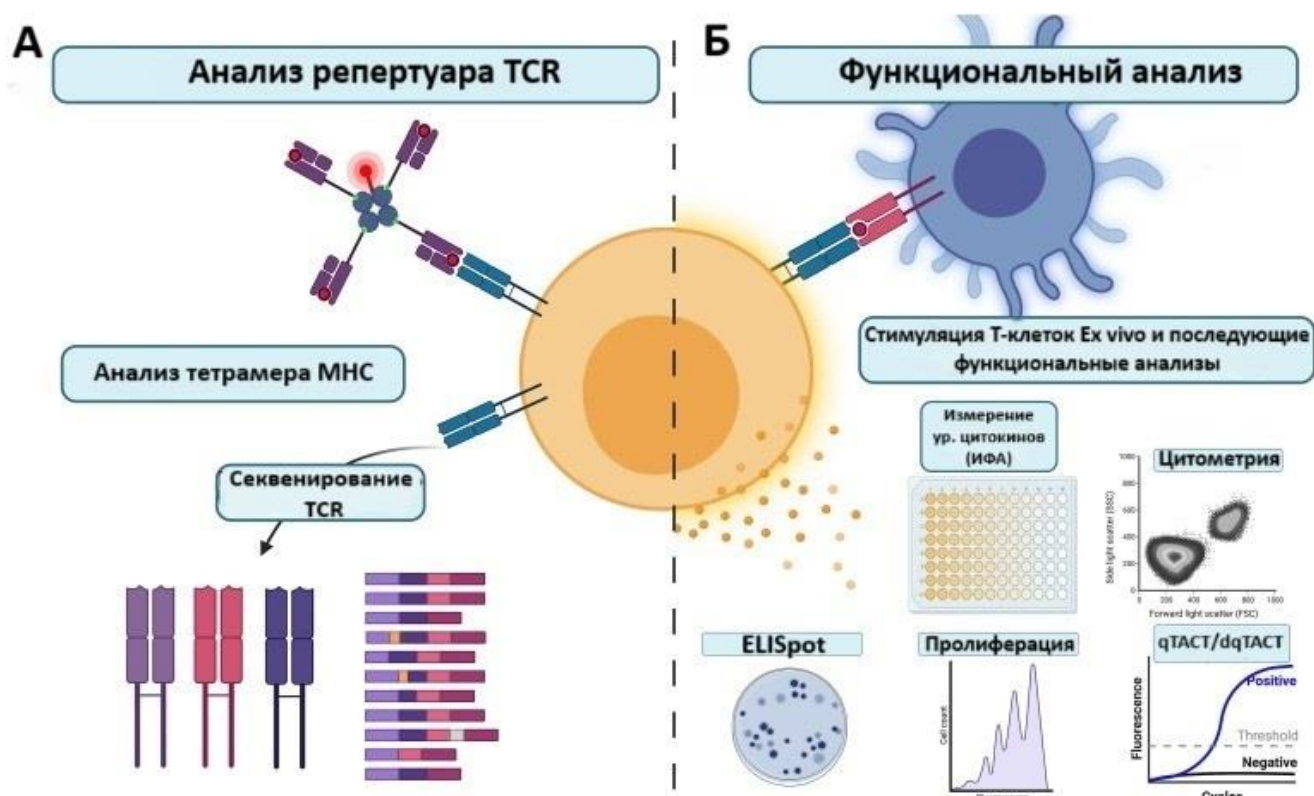


Рисунок 11 – Основные подходы для оценки клеточного иммунитета к SARS- CoV- 2: **А.** анализ репертуара Т-клеточных рецепторов; **Б.** Функциональный анализ Т-клеток [56]

Анализы для оценки разнообразия TCR

1) Использование тетрамерных пептидов-МНС

Эта технология основана на способности тетрамерных комплексов, состоящих из флуоресцентно меченых молекул МНС-пептида (тетрамеры МНС), связываться с TCR, расположенными на поверхности антиген-специфичных Т-клеток. Подобное взаимодействие позволяет проводить прямую визуализацию, количественную оценку и характеристику данных клеток методом проточной цитометрии.

2) Использование NGS-секвенирования

Технология секвенирования следующего поколения (NGS) была адаптирована для исследований клеточного иммунитета, особенно в контексте пандемии COVID-19. Это привело к разработке теста T-Detect COVID, созданного компаниями Adaptive Biotechnologies и Microsoft [211]. Исследователи провели

секвенирование гена TCR-beta у здоровых и инфицированных лиц, чтобы идентифицировать TCR-последовательности, специфичные для SARS-CoV-2.

Анализы для оценки функциональной активности Т-клеток

Эти анализы основаны на характеристике функциональной активации антигенспецифичных Т-клеток. В основе методов лежит детекция секреции специфических цитокинов (например, IFN- γ) активированными *ex vivo* Т-клетками. Для проведения анализов используются пептиды длиной 8–15 аминокислотных остатков, полученные из различных белков SARS-CoV-2. Эти пептиды добавляют к выделенным моноклеарным клеткам периферической крови (МНК) или непосредственно к цельной крови, после чего проводят инкубацию. Такая процедура позволяет индуцировать активацию антигенспецифичных Т-клеток, которые затем могут быть количественно оценены и охарактеризованы с различной степенью детализации.

1) Метод ELISpot - считается "золотым стандартом" для функциональной количественной оценки Т-клеток. Этот метод позволяет количественно определять Т-клетки с разрешением на уровне одной клетки [212, 213]. Принцип работы ELISpot заключается в следующем. Стимулированные клетки инкубируют в планшете, покрытом антителами, специфичными к определенным цитокинам (например, интерферону-гамма). Клетки, распознающие антиген, секретируют соответствующие цитокины. Эти цитокины связываются с иммобилизованными антителами на поверхности планшета. Затем связанные цитокины обнаруживаются с помощью вторичных биотинилированных антител. В результате формируются индивидуальные пятна, каждое из которых соответствует одной антигенспецифичной Т-клетке.

Основные преимущества ELISpot включают высокую точность, быстрое выполнение анализа (в течение 24 часов), возможность централизованного проведения исследования (МНК могут быть криоконсервированы и транспортированы) и относительно низкую стоимость (нет необходимости в дорогостоящем оборудовании или реагентах).

Основными ограничениями данного метода являются необходимость выделения МНК, что требует технически сложного этапа подготовки образцов, а также риск неэффективных или нестандартизированных процедур замораживания/размораживания. После криоконсервации жизнеспособность и функциональная активность МНК могут снижаться, что негативно влияет на результаты анализа [214].

2) Interferon Gamma Release Assay (IGRA) основан на принципе выявления иммунного ответа на SARS-CoV-2 посредством измерения гамма-интерферона, продуцируемого Т-клетками. Метод включает несколько этапов:

А. Стимуляция лимфоцитов: процесс начинается со стимуляции Т-лимфоцитов в гепаринизированной цельной крови пациента. Стимуляция проводится с использованием специфических пептидов, соответствующих антигенным эпитопам вируса SARS-CoV-2. Эти пептиды предназначены для активации CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов, участвующих в клеточно-опосредованном иммунитете против вируса [215, 216, 217].

Б. Определение IFN-γ: после стимуляции плазменная фракция образца крови анализируется на наличие IFN-γ. Этот цитокин секретируется активированными Т-клетками в ответ на вирусные пептиды. Обнаружение IFN-γ указывает на то, что Т-клетки пациента распознали антигены SARS-CoV-2 [215, 217].

Содержание IFN-γ в плазме крови определяется количественно с помощью иммуноферментного анализа. Метод предполагает использование антител, специфичных к IFN-γ, для улавливания и измерения концентрации цитокина в образце. Процесс включает связывание IFN-γ с антителом, иммобилизованным на планшете, с последующим добавлением вторичного антитела, конъюгированного с ферментом, и субстрата для получения ферментативной реакции, интенсивность которой пропорциональна количеству присутствующего IFN-γ [215, 217].

В. Интерпретация результатов: результаты интерпретируются на основе порогового значения, установленного для уровней IFN-γ. Положительный результат указывает на то, что пациент ранее подвергался воздействию SARS-CoV-2, и у него сформировался иммунный ответ,

опосредованный Т-клетками. Отрицательный результат свидетельствует об отсутствии специфической активации Т-клеток в ответ на антигены SARS-CoV-2. Это может быть обусловлено как отсутствием предшествующей инфекции, так и недостаточной эффективностью клеточного иммунного ответа [215, 217].

Для проведения IGRA требуется минимальное оборудование, например, микропланшетный ридер для интерпретации их колориметрических результатов, которые преобразуются в концентрацию цитокинов с помощью последовательно разбавленной стандартной кривой известных концентраций. Дополнительным преимуществом этого анализа является то, что после стимуляции цельной крови образцы сыворотки можно заморозить и сохранить для последующего использования.

3) Проточная цитометрия. Анализы IGRA и ELISpot просты в выполнении, однако предоставляют лишь базовые данные о клеточном иммунитете. Проточная цитометрия, напротив, используется для детального иммунофенотипирования. Несмотря на разнообразие подходов к проведению этого анализа, его основная задача — характеристика отдельных клеток на основе их пролиферации, а также наличия поверхностных и внутриклеточных маркеров. Исследования могут выполняться как на периферических мононуклеарных клетках крови, так и на цельной крови.

Наиболее распространенные параметры проточной цитометрии включают окрашивание поверхностных маркеров и внутриклеточных цитокинов. Эти методы позволяют идентифицировать антигенспецифические Т-клетки на основе внеклеточных и внутриклеточных белков. В отличие от IGRA, где измеряется общая концентрация цитокинов, проточная цитометрия обеспечивает точную идентификацию типов клеток, секретирующих определенные молекулы, что значительно повышает точность анализа [218].

Проточная цитометрия широко применялась в исследованиях по изучению COVID-19. Этот метод помогает понять, какие субпопуляции Т-клеток находятся под усиленной или пониженной регуляцией, а также позволяет выполнять функциональные анализы (например, оценку истощения Т-клеток). Проточная

цитометрия является важным инструментом для детального анализа активации или подавления различных подтипов Т-клеток и других иммунных клеток в ответ на инфекцию. Однако этот метод имеет свои ограничения. Он требует высокого уровня квалификации исследователей, тщательного планирования эксперимента и значительных затрат — как на реагенты, так и на оборудование. Кроме того, количество образцов, которые можно проанализировать за один раз, ограничено, что делает проточную цитометрию малоприменимой для массового скрининга населения. Тем не менее, она остается незаменимым инструментом для небольших исследований, ориентированных на решение конкретных биологических вопросов, которые могут стать основой для диагностики и лечения пациентов.

Каждый из рассмотренных методов имеет свои преимущества и ограничения. ELISpot и IGRA обеспечивают быстрые, масштабируемые и минимально трудоемкие данные о клеточном иммунитете, хотя их возможности фенотипической характеристики ограничены. Проточная цитометрия, напротив, позволяет глубоко изучать типы и подтипы Т-клеток, но ее сложность и высокая стоимость ограничивают широкое применение. Выбор метода зависит от конкретных целей исследования: от быстрого скрининга до детального анализа иммунного ответа.

Таким образом, литературный обзор современных исследований в области комплексной оценки постинфекционного и поствакцинального иммунитета против SARS-CoV-2 демонстрирует значительное разнообразие подходов и методологий, применяемых для изучения механизмов защиты организма. Анализируя данные о динамике гуморального и клеточного иммунитета, становится очевидным, что как перенесенная инфекция, так и вакцинация формируют многоуровневый иммунный ответ, который может значительно варьироваться у разных индивидуумов. Это подчеркивает важность учета факторов, таких как возраст, исходное состояние здоровья, наличие коморбидных заболеваний и генетическая предрасположенность.

Однако остаются открытые вопросы, требующие дальнейшего изучения, включая длительность защиты, влияние новых вариантов вируса на эффективность иммунного ответа, а также потенциальные долгосрочные последствия постинфекционного состояния и вакцинации. Развитие унифицированных критериев оценки иммунного статуса, внедрение новых технологий мониторинга и более глубокое понимание взаимодействия между компонентами иммунитета позволят оптимизировать стратегии профилактики и лечения, направленные на борьбу с COVID-19. Таким образом, комплексный подход к изучению иммунного ответа остается ключевым направлением научных исследований в контексте глобального здравоохранения.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы

Для изучения гуморального и клеточного иммунного ответа к SARS-CoV-2 были использованы образцы сыворотки крови и цельной крови добровольцев обоих полов старше 18 лет полученные в период 2017–2023 годов с различным анамнезом по отношению к COVID-19. Количество отрицательных и положительных образцов, по отношению к COVID-19, используемых в работе составило 147 и 453, соответственно. Группа положительных образцов включала в себя образцы плазмы/цельной крови добровольцев, переболевших COVID-19 и/или прошедших курс вакцинации. Серологические образцы были любезно предоставлены ООО «МедипалТех», а также получены на базе клинического центра «НИИВС им. И.И. Мечникова».

Исследование также включало использование сывороток крови животных для оценки гуморального иммунного ответа, вызванного иммунизацией экспериментальной вакциной против SARS-CoV-2. В работе было исследовано 37 сывороток крови животных (8 коров, 10 собак, 19 трансгенных мышей линии B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2Prlmn/HEMI Hemizygous for Tg(K18-ACE2)2Prlmn, самки и самцы (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA)), иммунизированных кандидатным вакцинным препаратом против COVID-19 (предоставлены БТК ООО «Фирн-М»), содержащими белок Spike SARS-CoV-2. Для собак и коров анализируемые парные образцы получены от животных до и после иммунизации. В случае трансгенных мышей в эксперименте участвовали две группы животных – контрольная группа и группа вакцинированных животных. Все эксперименты проведены в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 № 755) и «Европейской конвенцией о защите

позвоночных животных. Исследование одобрено на заседании Локального совета по этике ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова (Протокол № 8 от 19.10.2021 г.).

2.2 Методы

2.2.1 Метод культивирования и титрования SARS-CoV-2

В реакции нейтрализации применялся лабораторный штамм SARS-CoV-2 «Dubrovka» (GenBank: MW514307.1). Культивирование коронавируса проводилось на клетках Vero CCL81 (ATCC) при 37°C в CO₂-инкубаторе в питательной среде ДМЕМ с солями Эрла («ПанЭко», Россия) с добавлением 5% эмбриональной сыворотки коров («Gibco» Бразилия), L- глутамина в концентрации 300 мкг/мл («ПанЭко», Россия), гентамицина в концентрации 40 мкг/мл («ПанЭко», Россия) в атмосфере 5% CO₂[219].

За 3-е суток до заражения клетки Vero высевали на культуральные флаконы площадью 75 см² с кратностью 1:5 по площади. Ежедневно инспектировали состояние клеточного монослоя под микроскопом. На 3-и сутки, после достижения 100%-го монослоя, из флакона удаляли культуральную жидкость и добавляли в клетки вирусный материал при MOI равном 0,01-0,0001 ТЦД₅₀ на клетку. Адсорбция вируса проводили в CO₂-инкубаторе в течение 1 часа, затем добавляли поддерживающую среду и инкубировали в CO₂-инкубаторе при 37°C до проявления цитопатического эффекта (ЦПД). Культуральную жидкость осветляли центрифугированием, аликвотировали и хранили при -80°C [219].

Титр вируса SARS-CoV-2 измеряли по конечной точке проявления цитопатического эффекта в чувствительной культуре клеток Vero. За трое суток до начала эксперимента клетки Vero высевали в 96-луночные планшеты, используя кратность посева 1:5 относительно площади. После удаления ростовой среды из лунок вносили последовательные десятикратные разведения вируса в поддерживающей среде и инкубировали планшет в CO₂-инкубаторе в течении 5

дней при 37°C. Результаты титрования оценивали на пятый день после заражения путем визуального анализа состояния клеточного монослоя для выявления характерных признаков цитопатического действия (Рисунок 12). Титр вируса определяли согласно методике [220] и представляли в виде lg ТЦД₅₀/мл.

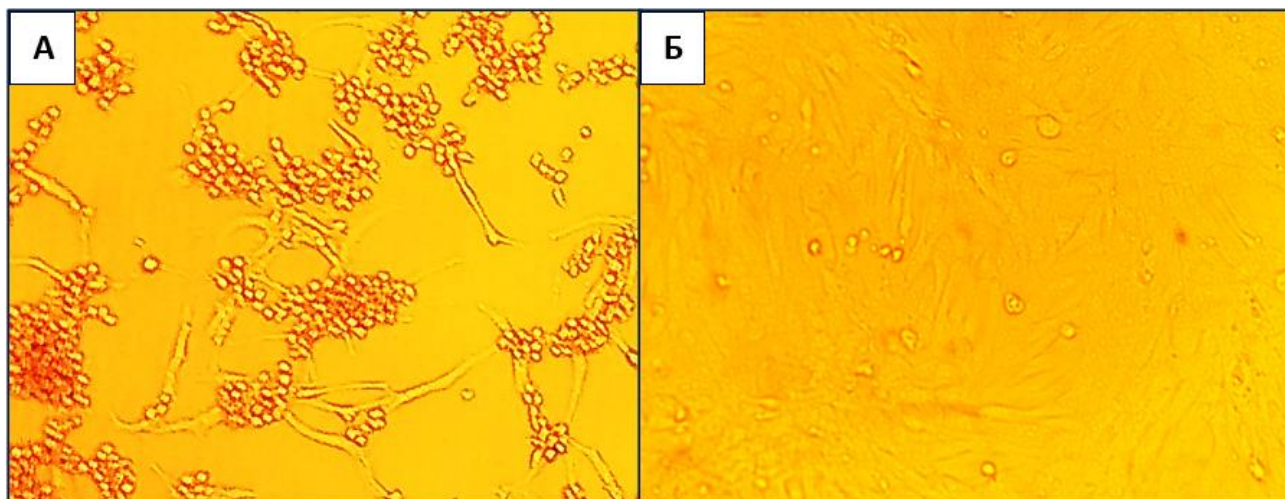


Рисунок 12 – Цитопатогенное действие вируса SARS-CoV-2: А. Культура клеток Vero на 5 сутки после заражения вирусом SARS-CoV-2; Б. Незараженная культура клеток Vero

Требования к безопасности работ. *Все работы с SARS-CoV-2 проводились в условиях, отвечающих требованиям безопасности работ с патогенными биологическими агентами II группы патогенности.*

2.2.2 Методы, использованные для оценки гуморального иммунитета к SARS-CoV-2

Реакция нейтрализации в культуре клеток

В РН исследовались образцы сывороток крови животных, иммунизированных экспериментальным вакцинным препаратом, а также образцы сывороток крови добровольцев, перенесших COVID-19 (серопозитивных в ИФА), и не имевших контакта с возбудителем (серонегативных в ИФА). Образцы сывороток аликвотировали и хранили при температуре -20°C [219]. Перед проведением анализа сыворотки размораживали и прогревали при 56°C (30 мин), после чего готовили ее последовательные двукратные разведения

поддерживающей средой [219]. Разведения сывороток смешивали с вирусным материалом в соотношении 1:1 из расчета, чтобы в каждую лунку планшета попала доза 100 ТЦД₅₀ [219] [219]. Смесь вируса и сыворотки инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 1 часа [219]. Затем смесь вносили в 4 повторах в лунки 96-луночного планшета с клетками, из которых предварительно была удалена среда [219]. Планшеты инкубировали в течение 5 суток при 37°C в атмосфере 5% CO₂ [219]. Схема расположения исследуемых и контрольных образцов в планшете изображена в Таблице 3.

Таблица 3 – Схема расположения тестовых и контрольных образцов в микропланшете для реакции нейтрализации [219]

	Сыворотка 1				Сыворотка 2...n				Контроль			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1:20									КДВ			
1:40												
1:80												
1:160												
1:320									КС-1		КС-2	
1:640									НKK		ЗВК	
1:1280												
1:n...												
Примечание: Сыворотка 1, 2- исследуемые образцы, НKK-незараженная клеточная культура (К-), КДВ- контроль дозы вируса, ЗВК-зараженная вирусом культура (100 ТЦД50/лунку), НKK - незараженная культура клеток, КС - контроль сыворотки.												

Учет титра вируснейтрализующих антител (ВНА) проводили с помощью микроскопа по конечному разведению сыворотки, в котором на 5 сутки культивирования не проявилось ЦПД. В случае, если в лунках с одним разведением сыворотки наблюдалось поражение ЦПД не всех лунок, то титр вируснейтрализующих антител учитывали с учетом процента пораженных лунок. Например, если в одном из 4-х повторов наблюдалось поражение монослоя вирусом, то при учете титра вируснейтрализующих антител делалась поправка на 25% [219]. Титр ВНА рассчитывали по формуле:

$$\text{Титр ВНА} = A + (B - A) * C, \text{ где}$$

А - наибольшее разведение сыворотки, обеспечившую защиту 100% лунок от ЦПД вируса;

В - конечное разведение сыворотки, обеспечившей неполную защиту лунок от действия вируса;

С - доля лунок с выжившими клетками в конечном разведении сыворотки.

С помощью иммуноферментного анализа проводилось исследование гуморального иммунного ответа путем выявления различных антител к SARS- CoV-2. В частности, анализировались IgG-антитела к рецептор-связывающему домену (RBD) спайкового белка вируса и IgG-антитела к нуклеокапсидному (N) белку. Дополнительно осуществлялась оценка силы связывания антител путем расчета индекса авидности. Также методом ИФА определялись антитела, способные препятствовать соединению RBD с рецептором ACE2. Для изучения клеточного звена иммунитета оценивалась концентрация гамма-интерферона в плазме крови пациентов после воздействия специфических антигенов SARS-CoV-2 на Т-лимфоциты в цельной крови.

Инкубация планшет проводилась на шейкере-термостате (ST-3L «SkyLine», Латвия). После всех инкубаций проводилась отмывка планшет на планшетном промывателе (PW-40 «Bio-Rad», Франция). Оптическая плотность измерялась на аппарате Infinite F50 («Tecan», Австрия).

ИФА метод определения IgG к RBD и N-белку SARS-CoV-2

Получение иммуносорбента: рекомбинантный антиген RBD Spike SARS- CoV-2 (HyTest, RF, Cat.No.8COV1) или N-белок (ООО «Хайтест», Россия) SARS- CoV-2 в концентрации 2 мкг/мл в 100 мМ карбонатно-бикарбонатном буфере pH 9,6 вносили по 100 мкл в лунки 96-луночного микропланшета («Corning Costar», США) и выдерживали в течение 18 часов при температуре (4-8)°C. Затем удаляли раствор из лунок планшет, планшеты промывали дистиллированной водой, вносили по 150 мкл блокирующего раствора, представляющего собой 0,02М фосфатный буферный раствор («Диаэм», Россия), содержащий 5% сахарозы («Диаэм», Россия), 0,09% казеината натрия, 0,05% Tween 20 («Servicebio», Китай).

Постановка анализа: вносили образцы сывороток в разведении 1:100 в 0,02М фосфатном буферном растворе pH7,2, содержащем 0,2% бычьего сывороточного альбумина («Диаэм», Россия), 0,05% Tween 20. После инкубирования в течение 30 минут и отмывки вносили соответственно по 100 мкл. моноклональных антител к IgG человека, конъюгированных с пероксидазой хрена (ООО «Сорбент», Россия), в концентрации 125 нг/мл. Повторяли этап инкубирования и добавляли по 100 мкл 33 мМ цитратного буферного раствора pH 4,0 («Диаэм», Россия), содержащего 0,01% перекиси водорода («PanReas Applichem», Германия). и 0,5 мМ 3,3',5,5'-тетраметилбензидина («PanReas Applichem», Германия).

Через 15 мин. реакцию останавливали добавлением 100 мкл 2N серной кислоты («neoFroxx», Германия) измеряли оптическую плотность (ОП) в двухволновом режиме при основной длине волны 450нм и длине волны сравнения 680 нм.

Результаты выражались в виде ИП (индекс позитивности) по формуле:

$$\text{ИП} = \text{ОП}_{\text{образца}} / \text{ГЗ}$$

Вычисляли граничное значение оптической плотности (ГЗ) по формуле:

$$\text{ГЗ} = \text{ОП}_{\text{к-ср}} + 0,2, \text{ где}$$

$\text{ОП}_{\text{к-ср}}$ - среднее значение оптической плотности в лунках с отрицательным контролем.

Результат качественного анализа на определения антител класса G считали положительным при $\text{ИП}_{\text{обр.}} \geq 1,1$, отрицательным при $\text{ИП}_{\text{обр.}} < 0,9$, неопределённым при $0,9 \leq \text{ИП}_{\text{обр.}} < 1,1$.

После появления международного стандартного образца ВОЗ (NIBSC code: 20/136), результаты выражались в качестве количества антител - ВАУ/мл (binding antibodies unit).

По результатам работы был разработан, валидирован наборы реагентов, подготовлены проекты научно-технической документации. По результатам государственных испытаний получены регистрационные удостоверения:

Набор реагентов для качественного иммуноферментного определения антител класса G к коронавирусу SARS-CoV-2 в сыворотке или плазме крови человека «SARS-CoV-2-ИФА-IgG» по ТУ 21.20.23-004-28597318-2020.

Регистрационное удостоверение № РЗН 2020/12585 от 18.11.2020, РУ РЗН 2021/15898 от 30.11.2021 по ТУ 21.20.23-004-28597318-2020.

Определение avidности антител класса G к RBD SARS-CoV-2 ИФА методом

Получение иммуносорбента: см. раздел ИФА метод определения IgG к RBD и N-белку SARS-CoV-2.

Постановка анализа: В две параллельные лунки планшета вносили образец сыворотки или плазмы крови человека в разведении 1:100 в 0,02 М фосфатном буферном растворе pH 7,2, содержащем 0,2% бычьего сывороточного альбумина, 0,05% Twin 20. После инкубирования в течение 30 минут и однократной отмывки в контрольные лунки (ФБ-лунки) - вносят фосфатный буфер, в опытные (ДР-лунки) - денатурирующий раствор (4-8М раствор мочевины). После инкубации в течении 10 минут и отмывки вносили по 100 мкл моноклональных антител к IgG человека, конъюгированных с пероксидазой хрена в концентрации 125 нг/мл и инкубировали 30 минут при 37С и 700 об/мин. По истечению инкубации и отмывки вносили по 100 мкл 33 мМ цитратного буферного раствора pH 4,0, содержащего 0,01% перекиси водорода и 0,5 мМ 3,3',5,5'- тетраметилбензидина.

Через 15 минут реакцию останавливали добавлением 100 мкл 2N серной кислоты, измеряли оптическую плотность в двухволновом режиме при основной длине волны 450нм и длине волны сравнения 680 нм.

Авидность антител в исследуемом образце коррелирует со снижением оптического поглощения в лунке, обработанной денатурирующим раствором, в сравнении с контрольной лункой.

Индекс avidности (ИА) рассчитывается по формуле:

$$\text{ИА} = (\text{ОП}_{\text{ДР-лунка}} / \text{ОП}_{\text{ФБ-лунка}}) \times 100 \%, \text{ где}$$

$\text{ОП}_{\text{ДР-лунка}}$ – $\text{ОП}_{\text{образца}}$, обработанного денатурирующим раствором,

$\text{ОП}_{\text{ФБ-лунка}}$ – $\text{ОП}_{\text{образца}}$, обработанного фосфатным буфером

По результатам работы был разработан, валидирован набор реагентов, подготовлены проекты научно-технической документации. По результатам государственных испытаний получены регистрационные удостоверения:

Набор реагентов для качественного иммуноферментного определения антител класса G к коронавирусу SARS-CoV-2 и индекса их avidности в сыворотке или плазме крови человека «SARS-CoV-2-ИФА-IgG плюс» по ТУ 21.20.23-006-28597318-2020. Регистрационное удостоверение № РЗН 2021/14424 от 27.05.2021 г.

ИФА метод определения антител, блокирующих взаимодействие RBD и ACE2

Получение иммуносорбента: рекомбинантный антиген ACE2 в концентрации 2 мкг/мл в 100 mM карбонатно-бикарбонатном буфере pH 9,6 вносили по 100 мкл в лунки планшет и выдерживали в течение 18 часов при температуре (4-8)°C. Затем удаляли раствор из лунок планшет, планшеты промывали дистиллированной водой, вносили по 150 мкл блокирующего раствора, представляющего собой 0,02M фосфатный буферный раствор, содержащий 5% сахарозы, 0,09% казеината натрия, 0,05% Tween 20.

Постановка анализа: При проведении анализа в лунки чистого планшета вносили по 50 мкл образцов исследуемой сыворотки в разведении 1:10 в 0,02M фосфатном буферном растворе pH 7,2, содержащем 0,2% бычьего сывороточного альбумина, 0,05% Tween 20, и 50 мкл рекомбинантного Spike, конъюгированного с пероксидазой хрена («Vazyme», Китай) в том же буферном растворе в разведении 1:150. После инкубирования в течение 30 минут при 37°C смесь переносили в лунки иммуносорбента и инкубировали еще 30 минут при 37°C. Внесение субстратной буферной смеси, остановку реакции и измерение ОП проводили аналогично описанному для определения антител класса G к RBD SARS-CoV-2.

Для каждого образца рассчитывают коэффициент подавления (КП, %) по формуле:

$$\text{КП} = (\text{ОП}_{\text{ср.К-}} - \text{ОП}_{\text{обр.}}) / (\text{ОП}_{\text{ср. К-}}) * 100\%, \text{ где}$$

ОП_{ср.(К-)} – среднее арифметическое значение ОП для группы неиммунных;

ОП_{обр.} - значение ОП для тестируемого образца.

Образец считается содержащим антитела, блокирующие взаимодействие RBD и ACE2, если КП $\geq$ 30%.

Для более точной интерпретации образцов с высокими показателями КП, был введен количественный параметр – титр-sVNT, который соответствовал последнему разведению исследуемого образца при КП>30%.

ИФА метод определения антител класса G к RBD SARS-CoV-2 в сыворотке крови животных

Получение иммуносорбента: см. раздел ИФА метод определения IgG к RBD и N-белку SARS-CoV-2.

Постановка анализа: при проведении анализа в лунки планшета вносили образцы сывороток крови животных в разных разведениях в 0,02 М фосфатном буферном растворе pH 7,2, содержащем 0,2% бычьего сывороточного альбумина, 0,05% Tween 20. После инкубирования в течение 30 минут при 37°C и отмывки вносили для определения антител в сыворотках крови:

1. мышей, по 100 мкл конъюгата антител к IgG мыши с пероксидазой хрена (ООО «ИМТЕК», Россия) в концентрации 100 нг/мл;
2. собак, по 100 мкл конъюгата белка А с пероксидазой хрена (Sigma Aldrich, Германия) в концентрации 200 нг/мл.

Повторяли этап инкубирования и вносили по 100 мкл. 33 мМ цитратного буферного раствора pH 4,0, содержащего 0,01% перекиси водорода и 0,5 мМ 3,3',5,5'-тетраметилбензидина. Через 15 минут реакцию останавливали добавлением 100 мкл 2N серной кислоты, измеряли оптическую плотность в двухволновом режиме при основной длине волны 450нм и длине волны сравнения 680 нм.

Результаты выражались в виде ИП для сывороток крови мышей и собак:

$$\text{ИП} = \text{ОП}_{\text{образца}} / \text{ОП}_{\text{порог.}}, \text{ где} \\ \text{ОП}_{\text{порог.}} = \text{ОП}_{\text{ср.(К-)}} * 2, \text{ где}$$

ОП_{ср.(К-)}- среднее арифметическое значение регистрируемого сигнала для выборки образцов неиммунизированных животных; образец считали содержащим антитела к RBD Spike SARS-CoV-2 при ИПобр. ≥ 1 .

2.2.3 Методы, использованные для оценки Т-клеточного иммунитета к SARS-CoV-2

Для оценки Т-клеточного иммунитета был разработан тест ИГРА (Interferon Gamma Release Assay), основанный на способности Т-клеток иммунных к SARS-CoV-2 людей продуцировать IFN- γ , который является одним из маркеров Т-клеточного иммунитета, в ответ на стимуляцию пептидным пулом в цельной крови.

Проведение ИГРА-теста

При проведении ИГРА-теста, по 1 мл гепаринизированной крови, полученной от одного и того же пациента вносили в 3 пробирки: 1) содержащую пул пептидов, соответствующих иммунодоминантным Т-клеточным (CD4+, CD8+) эпитопам антигенов SARS-CoV-2 (Peptide 2.0 Inc., США); 2) контрольную, не содержащую никаких стимуляторов; 3) содержащую неспецифический митоген - фитогемагглютинин («ПанЭко», Россия). Образцы помещали в термостат с температурой +37°C на 24 часа. По завершении инкубации пробирки центрифугировали при 2800 об/мин в течение 10 минут для отделения плазмы крови.

Количественное определение γ -интерферона в плазме крови человека после стимуляции цельной крови специфическими антигенами

Получение иммуносорбента: Моноклональные антитела к IFN- γ (ООО «Хайтест», Россия) в 20 мМ фосфатном буфере pH 7,2 вносили по 100 мкл (5 мкг/мл) в лунки планшет и выдерживали в течение 18 часов при температуре +4- 8°C. Затем удаляли раствор из лунок планшет, планшеты промывали дистиллированной водой, вносили по 150 мкл блокирующего раствора,

представляющего собой 0,02М фосфатный буферный раствор, содержащий 5% сахарозы, 0,09% казеината натрия, 0,05% Tween 20.

Постановка анализа: При проведении анализа в лунки планшета (иммуносорбента) вносили по 50 мкл образцов сывороток или плазмы крови, калибровочные образцы, содержащие рекомбинантный IFN- γ известной концентрации, аттестованные относительно стандарта Interferon Gamma (Human, Leukocyte derived, Non WHO Reference Material (NIBSC code: 82/587)), и 50 мкл конъюгата моноклональных антитела к IFN- γ с пероксидазой хрена (3 мкг/мл, ООО «Хайтест», Россия) в 0,02 М фосфатном буферном растворе pH 7,2, содержащем 0,2% бычьего сывороточного альбумина, 0,05% Tween 20, инкубировали 90 минут при температуре $+37\pm 2^\circ\text{C}$. После отмывки вносили по 100 мкл 33мМ цитратного буферного раствора pH 4,0, содержащего 0,01% перекиси водорода и 0,5мМ 3,3',5,5'-тетраметилбензидина. Через 25 минут реакцию останавливали добавлением 100 мкл 2N серной кислоты, измеряли оптическую плотность в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения 680 нм.

Строили график зависимости средних значений ОП разведений контрольных образцов от концентрации калибровочного образца в пг/мл в логарифмических координатах. Диапазон определения находится в интервале от 3,125 до 200 пг/мл. По калибровочному графику определяли содержание IFN- γ в исследуемых образцах, используя значение ОП для каждого образца. Для каждого образца вычисляли разницу $\Delta\text{IFN-}\gamma$ (пг/мл) между концентрацией в плазме крови после антигенной стимуляции и без нее.

Результаты вычислялись по формуле:

$$\Delta\text{IFN-}\gamma = \text{IFN-}\gamma_{\text{образца после стимуляции}} - \text{IFN-}\gamma_{\text{образца до стимуляции}}$$

При $\Delta\text{IFN-}\gamma \geq 4,85$ пг/мл образец считался положительным;

При $\Delta\text{IFN-}\gamma < 4,85$ пг/мл образец считался отрицательным

2.3 Статистические методы анализа

Обработка и анализ данных выполнялись с использованием программных средств Microsoft Excel 2019 (Microsoft, США) и GraphPad ver.10 (GraphPad Software Inc., США). Для оценки корреляции между количественными характеристиками, полученными разными методами, использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена (доверительный интервал оценивали при $p < 0,05$). Для определения статистической значимости различий между двумя группами данных применялся непараметрический критерий U-критерий Манна-Уитни при $p < 0,05$. Оценка чувствительности и специфичности в разработанных в данной работе тестах осуществлялась при помощи ROC-анализа (Receiver Operator Characteristic).

Для оценки индекса авидности, $\Delta IFN-\gamma$ и концентрации антител к RBD SARS-CoV-2 были созданы графические представления в виде комбинированных box/violin-диаграмм. Эти диаграммы позволяют визуализировать распределение числовых данных по группам с использованием квартильного метода. В данной интерпретации данные представлены через межквартильный размах ($Q1-Q3$), при этом медиана отображается линией внутри диаграммы.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Изучение антитело-опосредованного иммунного ответа к SARS-CoV-2

Оценка гуморального иммунитета против SARS-CoV-2 представляет собой ключевой аспект изучения эффективности вакцинации и анализа постинфекционного иммунного ответа. Гуморальный иммунитет, играет ключевую роль в защите организма от вирусной инфекции, обеспечивая нейтрализацию вируса, предотвращение его проникновения в клетки и дальнейшего распространения. Эпидемиологическая, клиническая и социальная важность новой коронавирусной инфекции COVID-19, на начальных стадиях распространения вируса, диктовала необходимость разработки средств диагностики этого опасного заболевания и его возбудителя – и, в первую очередь, средств лабораторной (*in vitro*) диагностики. В рамках проведенного исследования были разработаны методы для количественного и качественного анализа специфических антител класса IgG к различным белкам SARS-CoV-2, что позволило оценить динамику и продолжительность иммунного ответа у обследованных лиц. Полученные данные позволили не только охарактеризовать индивидуальные особенности иммунного статуса, но и выявить факторы, влияющие на формирование долгосрочной защиты от коронавирусной инфекции.

3.1.1 Создание диагностических тест-систем для количественного и качественного анализа антител класса IgG к антигенам SARS-CoV-2

Для определения антител к SARS-CoV-2 широко применяется метод твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Этот метод отличается высокой чувствительностью, экономической эффективностью и возможностью

одновременного анализа большого числа образцов. Альтернативными методами являются иммунохемилюминесцентный анализ (ИХЛА) и экспресс-методы иммунохроматографического анализа (ИХА).

С точки зрения формирования протективного иммунитета особенно важно определять антитела класса G (IgG), так как именно они обеспечивают долгосрочную защиту организма от повторного заражения SARS-CoV-2.

Для выявления антител, специфичных к SARS-CoV-2, был создан тест прямого твердофазного иммуноферментного анализа. Основная идея метода заключается в следующем: на поверхности лунок планшета закреплен рекомбинантный антиген RBD SARS-CoV-2. При добавлении исследуемых проб содержащиеся в них специфические антитела связываются с этим закрепленным антигеном, образуя устойчивые комплексы антиген-антитело. На следующем этапе проводится детекция этих комплексов. Для этого используется конъюгат вторичных антител к IgG человека, меченный ферментом пероксидазой хрена. После удаления несвязавшихся компонентов в лунки добавляют раствор субстратной смеси. Реакцию останавливают путем внесения стоп-реагента, затем измеряют оптическую плотность раствора при длинах волн 450/620–700 нм. Интенсивность полученного сигнала прямо пропорциональна количеству специфических антител в пробах. Условия проведения анализа были оптимизированы для достижения высокой чувствительности и точности тестирования.

В начале пандемии, в виду отсутствия международных стандартов ВОЗ, порог отсекающих положительных образцов от отрицательных оценивали путём сравнения значений индексов позитивности анализируемых сывороток.

Были рассчитаны показатели чувствительности (Se) и специфичности (Sp) разработанного метода по сравнению с коммерческим набором реагентов «SARS- CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ».

Чувствительность и специфичность рассчитывались по формулам и составили:

$$Se = TP / (TP + FN) = 99\% \text{ (ДИ: } 86,28\text{--}100\%, p < 0,05)$$

$Sp = TN / (TN+FP) = 100\%$ (ДИ:92,89-100%, $p<0,05$), где

1) TP – образцы, которые испытуемый тест правильно распознал, как положительные (они оказались положительными как в испытуемом тесте, так и в тесте сравнения);

2) FP – образцы, которые были положительными в испытуемом тесте, но отрицательными в тесте сравнения

3) TN – образцы, которые были отрицательными в обоих тестах;

4) FN - образцы, которые были отрицательными в испытуемом тесте, но положительными в тесте сравнения.

Были определены коэффициенты вариации (CV%) ОП и ИП по итогам постановок 3 реактивных (содержащих IgG к SARS-CoV-2 по итогам тестирования в наборе сравнения «SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ») и 3 неактивных (не содержащих IgG) образцов реального клинического материалов (сывороток крови), каждый из которых был тестирован в 10 повторах. Для всех образцов CV не превысил 8% и для положительных составил 4,5%, 4,2% и 2,3%, а отрицательных – 7,9%, 7,1% и 7,6% (Таблица 4).

Таблица 4 – Воспроизводимость результатов в разработанном тесте

Положительные образцы									
№ повтора	Образец 1			Образец 2			Образец 3		
	ОП	ИП	Результат	ОП	ИП	Результат	ОП	ИП	Результат
1	0,81	2,76	положит	1,99	6,78	положит	1,099	3,74	положит
2	0,796	2,71	положит	1,886	6,43	положит	1,157	3,94	положит
3	0,752	2,56	положит	1,87	6,37	положит	1,133	3,86	положит
4	0,841	2,87	положит	1,838	6,26	положит	1,156	3,94	положит
5	0,8	2,73	положит	1,893	6,45	положит	1,173	4,00	положит
6	0,811	2,76	положит	1,782	6,07	положит	1,116	3,80	положит
7	0,83	2,83	положит	1,774	6,04	положит	1,137	3,87	положит
8	0,762	2,60	положит	1,871	6,37	положит	1,155	3,94	положит
9	0,741	2,52	положит	1,71	5,83	положит	1,099	3,74	положит
10	0,84	2,86	положит	1,814	6,18	положит	1,109	3,78	положит
Среднее значение ОП (ОПср)	0,7983			1,8428			1,1334		
Среднеквадратичное стандартное отклонение ОП, SD(ОП)	0,036			0,078			0,027		
Воспроизводимость ОП (CV, %)	4,50%			4,22%			2,35%		

Продолжение Таблицы 4

Отрицательные образцы									
№ повтора	Образец 4			Образец 5			Образец 6		
	ОП	ИП	Результат	ОП	ИП	Результат	ОП	ИП	Результат
1	0,099	0,34	отрицат	0,1	0,34	отрицат	0,098	0,33	отрицат
2	0,091	0,31	отрицат	0,084	0,29	отрицат	0,106	0,36	отрицат
3	0,089	0,30	отрицат	0,084	0,29	отрицат	0,099	0,34	отрицат
4	0,1	0,34	отрицат	0,087	0,30	отрицат	0,101	0,34	отрицат
5	0,091	0,31	отрицат	0,096	0,33	отрицат	0,111	0,38	отрицат
6	0,088	0,30	отрицат	0,087	0,30	отрицат	0,097	0,33	отрицат
7	0,092	0,31	отрицат	0,088	0,30	отрицат	0,12	0,41	отрицат
8	0,09	0,31	отрицат	0,081	0,28	отрицат	0,096	0,33	отрицат
9	0,11	0,37	отрицат	0,089	0,30	отрицат	0,104	0,35	отрицат
10	0,085	0,29	отрицат	0,08	0,27	отрицат	0,095	0,32	отрицат
Среднее значение ОП (ОПср)	0,0935			0,0876			0,1027		
Среднеквадратичное стандартное отклонение ОП, SD(ОП)	0,007			0,006			0,008		
Воспроизводимость ОП (CV, %)	7,93%			7,16%			7,65%		

Для определения перекрестной реактивности разработанного теста были протестированы 50 образцов сыворотки крови добровольцев, вакцинированных против сезонного гриппа, перенесших ОРВИ за 14–90 дней до начала исследования, беременных женщин, а также сыворотки крови пациентов, у которых были диагностированы другие маркеры инфекций, а именно имевшие положительные результаты на антитела класса G к вирусу кори, антитела класса G к вирусу краснухи, антитела класса G к аденовирусной инфекции, антитела класса G к цитомегаловирусу (ЦМВ), антитела класса G к вирусу простого герпеса 1 и 2 типов, антитела класса G к вирусу Эпштейна-Барр, антитела класса G к вирусу гепатита С, антитела к вирусу гепатита В, антитела к ВИЧ, и не имевшие в анамнезе заболевания или вакцинации против COVID-19. Полученные результаты показали, что разработанный тест не обладает кросс-реактивностью в отношении сывороток, положительных по перечисленным маркерам.

Для оценки влияния потенциально интерферирующих веществ были исследованы образцы сыворотки крови, содержащие и не содержащие антитела к SARS-CoV-2, нагруженные препаратами билирубина, липидов, гемоглобина в

концентрациях, близких к патологическим. В образцы сывороток крови добавляли коммерческие препараты:

- билирубина (до 500 мкМ Bilirubin B 4126-1G, Sigma-Aldrich),
- гемоглобина (до 2 г/л Hemoglobin human H 7379-1G, Sigma-Aldrich),
- триглицеридов (до 10 мМ Triglyceride Mix 17810-1AMP-S, Sigma-Aldrich).

Исследования показали, что указанные концентрации билирубина, гемоглобина и липидов в сыворотке крови влияния на результаты анализа не оказывают (Таблица 5).

Таблица 5 – Оценка влияния веществ-интерферентов в исследуемых образцах

№ образца	Характеристика по потенциально интерферирующим веществам	Результаты определения ИП		Результаты в наборе сравнения "SARS-CoV-2-ИФА-IgG"	
		ИП	Результат	ИП	Результат
1	гемоглобин 1,9 г/л	7,2	положит.	7,4	положит.
2	гемоглобин 2,0 г/л	5,4	положит.	5,6	положит.
3	гемоглобин 2,05 г/л	0,6	отрицат.	0,4	отрицат.
4	билирубин 480 мкМ	10,2	положит.	9,8	положит.
5	билирубин 505 мкМ	6,8	положит.	7,0	положит.
6	билирубин 490 мкМ	0,3	отрицат	0,4	отрицат
7	триглицериды 9,5 мМ	4,8	положит.	5,0	положит.
8	триглицериды 10,1 мМ	4,1	положит.	4,3	положит.
9	триглицериды 10,1 мМ	0,7	отрицат.	0,7	отрицат.

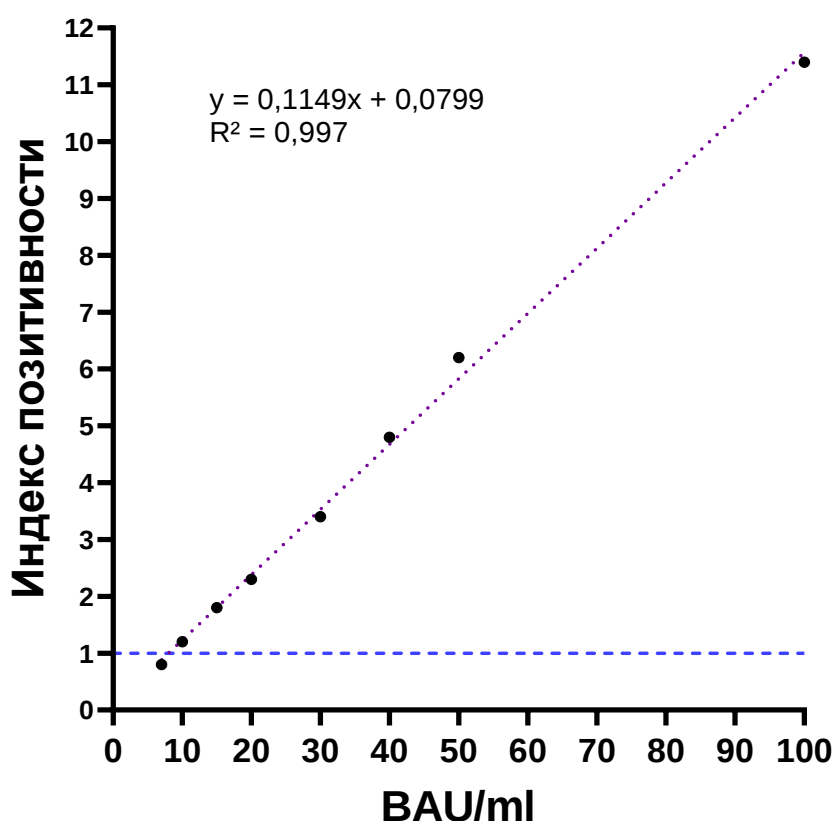
Аналитическая чувствительность разработанной тест системы

После появления международного стандартного образца ВОЗ (NIBSC code: 20/136), стало возможным количественное определение антител в разработанном тесте. Для этого была определена чувствительность метода по международному стандарту ВОЗ. С целью определения предела обнаружения целевого анализата (антител класса G к коронавирусу SARS-CoV-2) исследовали последовательные разведения международного стандарта ВОЗ, номинированного в международных концентрационных единицах антител (binding antibody units, BAU/мл).

На основании полученных данных были построены калибровочные графики зависимости ИП образца от концентрации ВАУ/мл и определена чувствительность, соответствующая **ИП= 1,1**, которая находилась в пределах **8-12 ВАУ/мл**.

На Рисунке 13 представлена зависимость индекса позитивности от концентрации стандарта NIBSC code: 20/136.

Наблюдается выраженная линейность измерений во всем диапазоне концентрации антител – от 0 до 100 ВАУ/мл, коэффициент корреляции с линейным трендом во всех случаях был не менее $R^2=0,99$.



Примечание: Приведена линия тренда, его уравнение (линейное) и коэффициент корреляции, а также граница уровня отсечения (ИП =1,1).

Рисунок 13 – Зависимость индекса позитивности (ось Y) от концентрации стандарта ВОЗ (ВАУ/мл, ось X) (NIBSC code: 20/136) в ИФА

Далее в работе для определения IgG антител к RBD у людей был использован разработанный и зарегистрированный набор («SARS-CoV-2-ИФА-IgG»), в зависимости от времени проведенного исследования результаты представлены в виде ИП или ВАУ/мл.

Оценка возможности определения IgG к RBD SARS-CoV-2 вариантов «Дельта» и «Омикрон» в наборе «SARS-CoV-2-ИФА-IgG»

После появления в популяции людей новых вариантов SARS-CoV-2 «Дельта» и «Омикрон» встал вопрос о способности разработанного теста определять антитела IgG к новым вариантам коронавируса. Для этого в исследование были использованы три группы образцов сывороток крови, характеристика которых представлена в Таблице 6.

Таблица 6 – Сравнительные характеристики исследуемых групп образцов

Группа	Количество образцов	Год	Характеристика группы
I ₆ Контрольная группа	87	2017-2020	Образцы, полученные от добровольцев до начала пандемии
II ₆ "Дельта"	36	июль 2021	Образцы, полученные от добровольцев, переболевших COVID-19 с подтвержденным ПЦР-диагнозом варианта SARS-CoV-2 «Дельта»
III ₆ "Омикрон"	39	январь-февраль 2022	Образцы, полученные от добровольцев, реинфицированных в период наибольшего распространения варианта «Омикрон» и вакцинированных против SARS-CoV-2 в 2021 году. У части образцов был подтвержден диагноз COVID-19 вызванной вариантом «Омикрон».

Образцы групп I₆ и II₆ исследовались параллельно с использованием набора реагентов «SARS-CoV-ИФА-IgG», в котором в качестве иммуносорбента применялся RBD SARS-CoV-2 варианта «Ухань» (GenBank: NC_045512), а также модификации этого набора, где иммуносорбент был заменён на RBD варианта «Дельта» (B.1.617.2, «ProteoGenix», Франция, PX-COV-P061-BUL).

Порог отсекающих положительных образцов от отрицательных в наборах с разными иммуносорбентами оценивался путём сравнения значений индексов позитивности (ИП) анализируемых сывороток, определяемых как отношение:

$ОП_{образца} / ОП_{порог.}$, где

$ОП_{порог.} = ОП_{ср.(Se-)} + 3\sigma$, где

$ОП_{ср.(Se-)}$ - среднее арифметическое значение регистрируемого сигнала для выборки сывороток крови пациентов не содержащих антител к RBD SARS- CoV- 2 (группа I₆); σ - среднеквадратическое отклонение.

Для образцов II₆ группы вычисляли отношение ИП в лунке с RBD варианта «Дельта» к лунке того же образца в иммуносорбенте «Ухань».

На Рисунке 14 представлены данные по отношениям ИП(Дельта)/ИП(Ухань) для исследованных групп. Медианное значение ИП(Дельта)/ИП(Ухань) в группе «Дельта» составило 1,00. По результатам исследования 11 из 36 образцов группы «Дельта» показали более высокий ИП на иммуносорбенте «Дельта». При этом только у трех образцов $\frac{ИП_{Дельта}}{ИП_{Ухань}} > 2$.

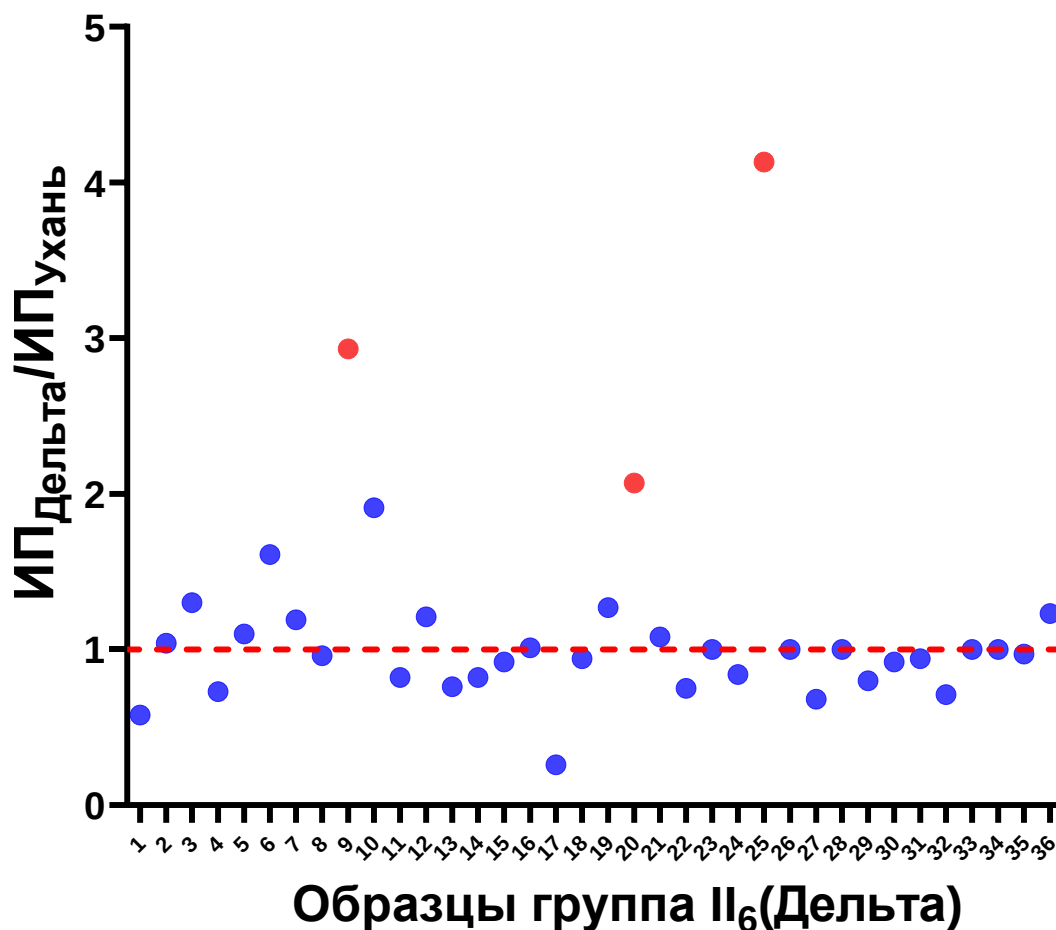


Рисунок 14 – Отношение ИП (Дельта) к ИП (Ухань) (по оси Y) в группах добровольцев с иммунитетом к варианту «Дельта» SARS-CoV-2 (по оси X)

Исследование возможности выявления антител в наборе реагентов «SARS- CoV-2-ИФА-IgG» у добровольцев III₆ группы, переболевших COVID-19 (вариант «Омикрон»), производилось путем сравнения содержания антител в парных образцах сыворотки крови, полученных до и после инфекции. Типичная картина динамики антител, характерная для перенесенной COVID-19, вызванной вариантом «Омикрон», представлена на Рисунке 15 (Пример 1 и 2).

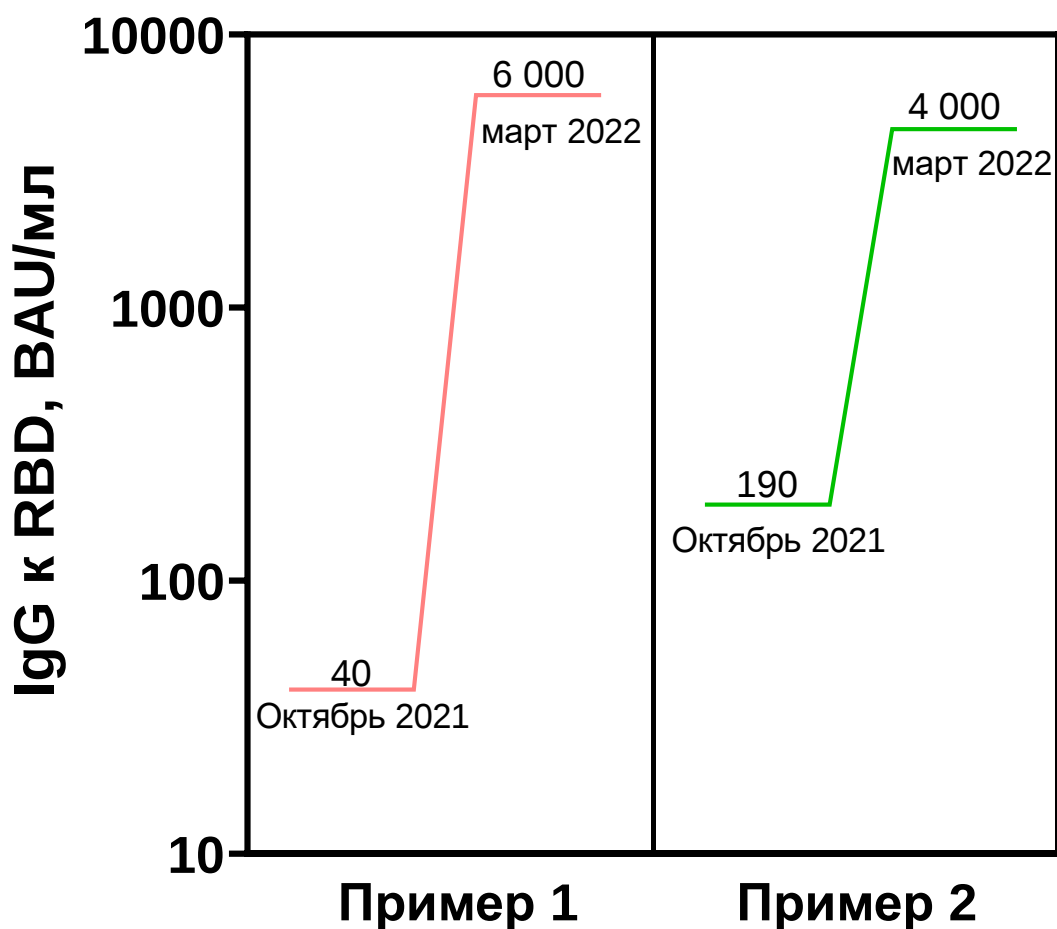


Рисунок 15 – Типичная картина динамики антител в группе III₆ на примере двух добровольцев с подтвержденной COVID-19 вызванной вариантами SARS-CoV-2 «Ухань» и «Омикрон»

В качестве примера взяты образцы двух добровольцев с подтвержденным диагнозом COVID-19 методом ПЦР.

Пример 1- Доброволец был вакцинирован в феврале 2021 г. препаратом «Гам-КОВИД-Вак», в составе которого содержался S-белок штамма «Ухань». В январе-феврале 2022 г. у этого же добровольца после появления симптомов,

характерных для коронавирусной инфекции был взят биоматериал для подтверждения диагноза COVID-19. ПЦР-анализ подтвердил наличие в образце SARS-CoV-2, который в последствии был изолирован и генетически охарактеризован в НИИВС им. И.И. Мечникова как вариант «Омикрон» [GenBank: ON032858.1].

Пример 2 - Доброволец, переболевший в 2020 г инфекцией, вызванной штаммом «Ухань» [GenBank: MW514307.1]. В августе 2021 г. прошел полный курс вакцинации препаратом «Гам-КОВИД-Вак». В январе-феврале 2022 г. был реинфицирован COVID-19 вызванной вариантом «Омикрон».

На примере группы III₆, при помощи набора реагентов «SARS- CoV- ИФА- IgG» было показано, что содержание антител после вакцинации (на основе штамма «Ухань») и перенесённой инфекцией (штамм «Ухань») возросло в 150 и 21 раз, соответственно, для образцов из примера 1 и 2, которые перенесли коронавирусную инфекцию в результате естественного инфицирования вариантом «Омикрон», для всей остальной выборки из группы III₆ были схожие результаты. Полученные данные показали, что набор реагентов «SARS-CoV-ИФА-IgG», в котором в качестве иммуносорбента используется RBD варианта «Ухань» способен определять антитела к варианту «Омикрон».

Таким образом, с учетом поставленных экспериментов, было показано, что наборы реагентов «SARS-CoV-2-ИФА-IgG» пригоден для целей определения IgG к RBD SARS-CoV-2 вариантов «Дельта» и «Омикрон». Однако, оценка наличия антител к SARS-CoV-2 не говорит о протективности гуморального иммунитета, что было показано на примере добровольцев, у которых содержались антитела, сформировавшиеся в результате естественной инфекции и вакцинации, однако наличие этих антител не предотвратило реинфекцию мутировавшими вариантами SARS-CoV-2. Поэтому важно оценивать не только наличие антител, но и изучать их качественные характеристики.

Для оценки качественных характеристик IgG-антител к RBD SARS-CoV-2 был разработан, апробирован и зарегистрирован набор реагентов «SARS-CoV-2-ИФА-IgG плюс». Этот набор предназначен для качественного иммуноферментного

определения антител класса G к коронавирусу SARS-CoV-2, а также для оценки индекса их авидности в сыворотке или плазме крови человека.

3.1.2 Изучение авидности IgG антител к RBD SARS-CoV-2 в группах вакцинированных и переболевших добровольцев

Авидность антител отражает качественный аспект иммунного ответа, индекс авидности представляет собой долю IgG-антител, которые могут оставаться в комплексе с RBD в присутствии денатурирующего агента, в общем пуле специфических IgG.

С целью определения авидности IgG-антител проводилось параллельное тестирование каждого образца человеческой сыворотки или плазмы крови. Исследование выполнялось методом иммуноферментного анализа в двух идентичных лунках планшета, на дне которых был сорбирован рекомбинантный антиген SARS-CoV-2. После образования комплекса антиген-антитело в одну лунку добавляли раствор мочевины (хаотропный агент), а во вторую — фосфатный буфер (Рисунок 16).

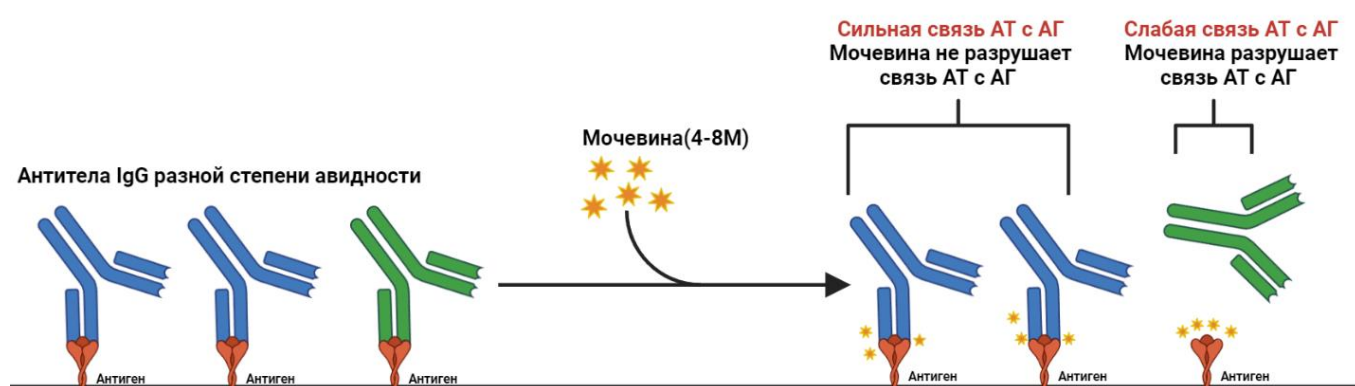
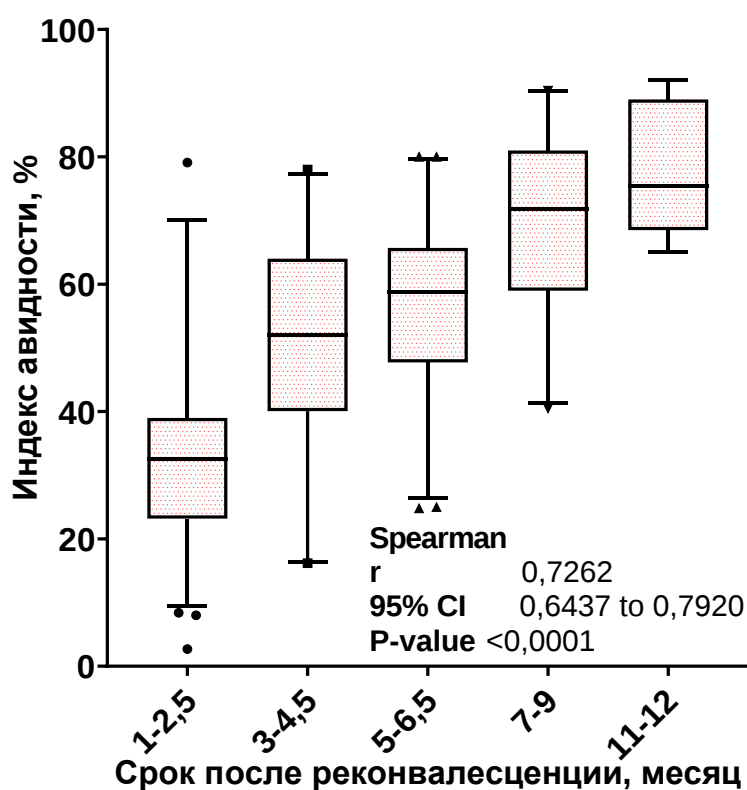


Рисунок 16 – Схема определения индекса авидности IgG-антител к RBD SARS- CoV-2

Затем измеряли оптическую плотность в обеих лунках и рассчитывали разницу между ними. В качестве критерия авидности антител использовался индекс авидности, который определялся на основе полученных данных.

Важно отметить, влияние концентрации денатурирующего раствора на результаты определения индекса avidности антител. Для анализа образцов, полученных на начальных этапах пандемии у добровольцев с разным сроком после перенесенной инфекции, использовался денатурирующий агент, представляющий раствор 4М мочевины, что позволило наблюдать динамику созревания антител со временем.

При исследовании avidности антител с 4М мочевиной на выборке из 170 образцов сывороток крови добровольцев, однократно переболевшие COVID-19 на первом этапе пандемии (2020 год), было показано увеличение индекса avidности (Рисунок 17) в зависимости от срока иммунизации ($r=0,7262$, $p < 0,001$), что согласуется с ранее описанными результатами [138, 141, 221, 222, 223, 224].



Примечание: На данном этапе исследования использовался раствор 4М мочевины

Рисунок 17 – Динамика показателя индекс avidности (ось Y) в зависимости от времени прошедшего после реконвалесценции (ось X)

Исследование зависимости тяжести повторной COVID-19 с авидностью IgG антител к RBD SARS-CoV-2

Повторные случаи заражения SARS-CoV-2, даже среди лиц с наличием специфических антител после перенесенной инфекции или вакцинации, остаются значимой проблемой для понимания механизмов защиты организма от вируса. Одним из ключевых факторов, влияющих на эффективность гуморального иммунного ответа, является авидность антител, которая отражает их способность формировать прочные связи с антигенами вируса. Высокая авидность антител, как правило, свидетельствует о зрелости иммунного ответа и повышенной эффективности нейтрализации вируса. В этой связи представляет научный и клинический интерес анализ взаимосвязи между уровнем авидности антител у пациентов, перенёсших первичное инфицирование, и тяжестью течения повторного заболевания COVID-19. Понимание данной зависимости может способствовать разработке более точных прогностических маркеров риска тяжелого течения повторных эпизодов инфекции, а также оптимизации стратегий вакцинации и терапии.

Так, при исследовании индекса авидности у пациентов показано, что в случае легкого повторного течения COVID-19 медианный показатель "индекса авидности" был выше чем в группе с повторным тяжелым течением инфекции (81,4% против 28,4 %, Рисунок 18Б), различия достоверны ($p < 0,001$).

Эти результаты свидетельствуют о влиянии более зрелого и эффективного иммунного ответа на тяжесть повторного заболевания. Таким образом, индекс авидности может служить важным маркером для оценки риска тяжести течения заболевания, а также эффективности защиты при повторных инфекциях.

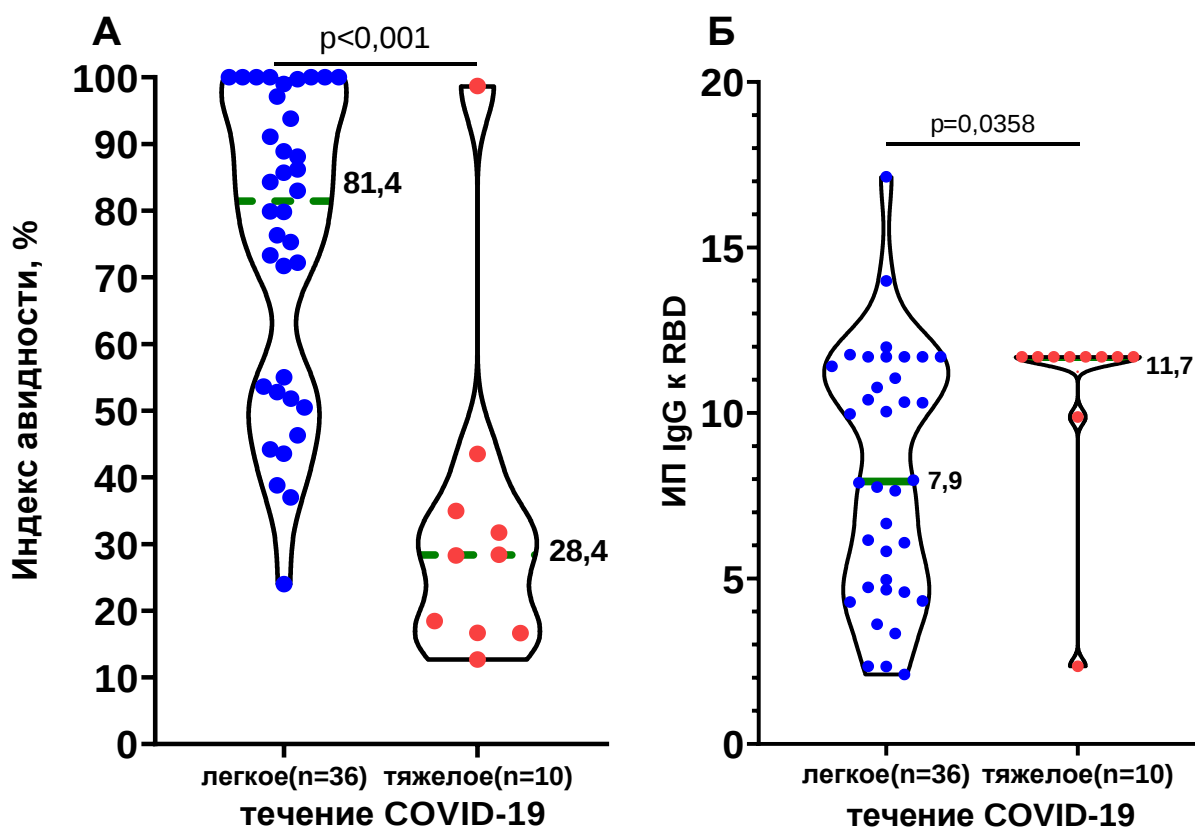


Рисунок 18 – Разница индекса авидности (А) и уровня антител к RBD SARS-CoV-2 (Б) в группах реинфицированных пациентов с легким и тяжелым течением COVID-19

Важно отметить, что при изучении уровня антител IgG к RBD вируса SARS-CoV-2 у пациентов, перенесших реинфекцию, медианный показатель индекса позитивности в группе с тяжелым течением заболевания был достоверно выше, чем в группе с легким течением (Рисунок 18Б).

Оценка степени созревания антител класса G к RBB SARS-CoV-2 в зависимости от пути и кратности иммунизации

На более поздних этапах пандемии COVID-19 (2022 год), когда значительная часть населения уже перенесла инфекцию и/или была вакцинирована, особую актуальность приобрело изучение характеристик формируемого гуморального иммунного ответа. Одним из ключевых показателей, отражающих протективность и зрелость иммунного ответа, является уровень созревания антител класса G к рецептор-связывающему домену SARS-CoV-2. В этой связи анализ различий в

степени созревания IgG к RBD коронавируса в зависимости от способа и частоты иммунизации приобретает особую научную и практическую значимость.

Как было отмечено ранее, для хорошо изученных инфекций, которые ранее представляли серьезную угрозу для здоровья, одним из ключевых показателей формирования долгосрочного протективного иммунитета является оценка степени созревания антител. Например, анализ авидности IgG-антител, выработанных против вируса краснухи, с использованием обработки хаотропным агентом (например, 8М мочевины), позволяет определить приблизительные сроки инфицирования. Выявление низкоавидных IgG к вирусу краснухи (индекс авидности <40%) свидетельствует о первичной инфекции, перенесенной в течение предшествующих трех месяцев [122].

В случае SARS-CoV-2 использование 4М мочевины на начальных этапах пандемии (2020–2021 гг.) оказалось наиболее эффективным для оценки динамики нарастания ИА антител во времени. Для образцов, полученных в более поздний период пандемии, применяли 8М мочевины, чтобы оценить степень созревания антительного ответа.

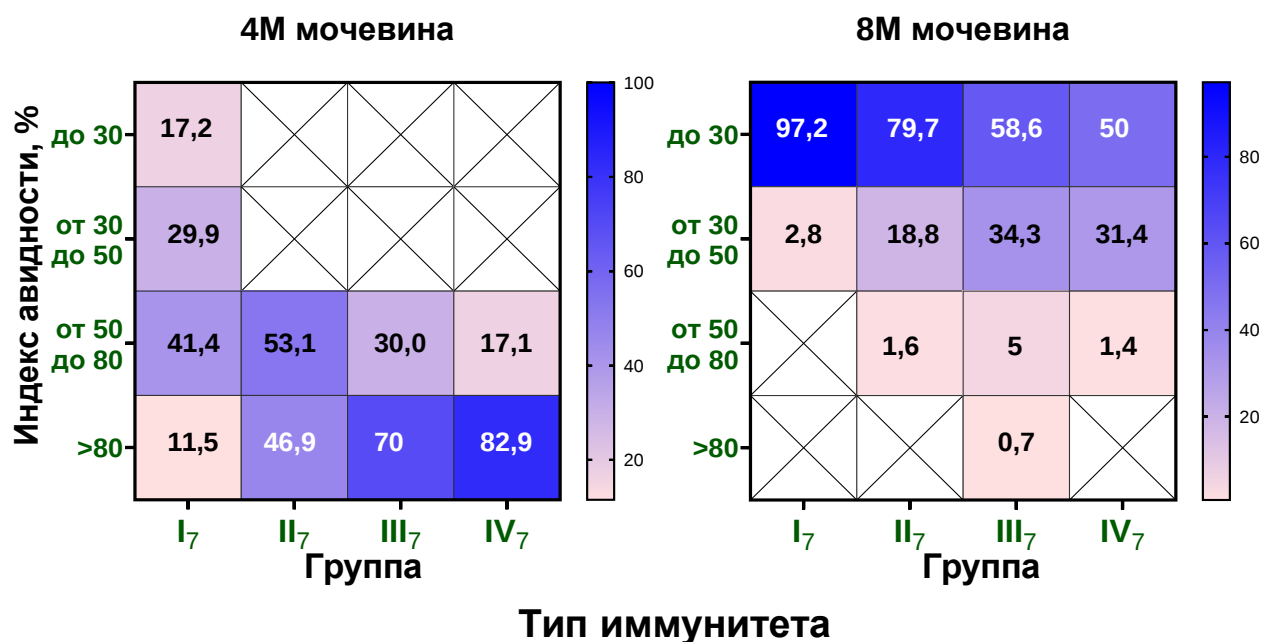
На данном этапе исследования были сформированы группы образцов сывороток крови добровольцев, собранных в период с 2020 по 2022 год. В исследование были включены добровольцы, перенесшие COVID-19 и/или прошедшие вакцинацию. Характеристика исследованных образцов представлена в Таблице 7.

Таблица 7 – Характеристики образцов сыворотки крови добровольцев

	<i>Пациенты</i>	<i>Формирование иммунитета</i>	<i>Тип иммунитета</i>	<i>Характеристика групп</i>
<i>Группа №</i>	Количество	Год	COVID-19 и/или вакцинация («Спутник V»)	Группа
<i>I₇</i>	36	2020	Инфекция COVID-19 (штамм «Ухань»**)	Добровольцы, однократно переболевшие COVID-19 в период с марта по сентябрь 2020 года
<i>II₇</i>	64	2021	Вакцинация «Спутник V» (на основе штамма «Ухань»)	Добровольцы с отсутствием COVID-19 в анамнезе, прошедшие полный курс вакцинации препаратом "Спутник V"*
<i>III₇</i>	140	2021	Гибридный иммунитет (вариант «Дельта»)	Добровольцы, перенесшие COVID-19 и прошедшие полный курс вакцинации препаратом "Спутник V"
<i>IV₇</i>	58	2022	Гибридный иммунитет (вариант «Омикрон»)	Добровольцы, перенесшие COVID-19 и ревакцинированные препаратом "Спутник V"
<i>Примечание:</i> *Отнесение добровольцев к группе "Вакцинированные" проводилось на основании проверки отсутствия антител к N-белку вируса SARS-CoV-2, что свидетельствует об отсутствии инфекции COVID-19 в анамнезе. ** Циркулирующий на момент проведения анализа штамм SARS-CoV-2				

Результаты оценки влияния 4М и 8М мочевины на определение показателя ИА антител в образцах сыворотки крови добровольцев, полученных на разных этапах пандемии представлены на Рисунке 19.

На основании представленных на Рисунке 19 результатов было показано увеличение ИА в зависимости от типа иммунитета и кратности иммунизации. При этом использование мягкого денатурирующего агента — 4М мочевины — позволяет наблюдать динамику изменения индекса avidности, тогда как применение 8М мочевины отражает степень созревания антител.



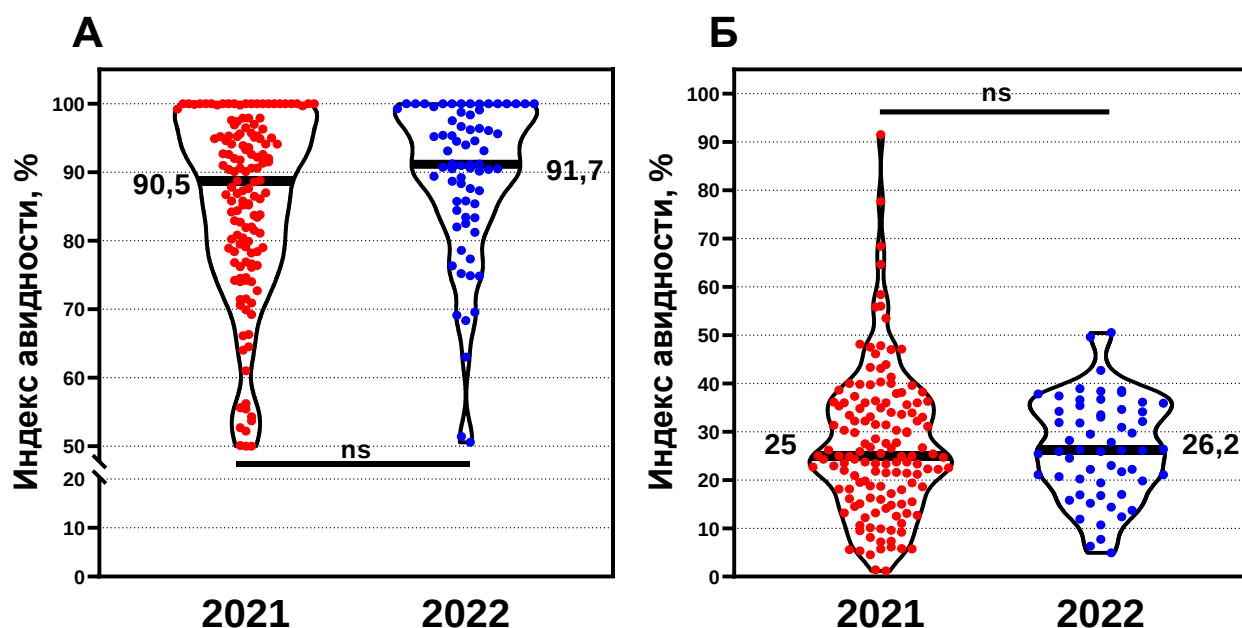
Примечание: Данные представлены в виде тепловых диаграмм, чем выше % количества добровольцев, тем насыщеннее градиент цвета

Рисунок 19 – Оценка индекса авидности антител, в присутствии денатурирующего раствора разной концентрации, в образцах сывороток крови добровольцев, с разным типом иммунитета полученных на разных этапах пандемии (2020-2022гг.)

Из данных ИА антител, полученных при использовании 4М мочевины, видно, что количество образцов с ИА>80% демонстрирует нарастание, и составляет в группах I₇–IV₇, соответственно, 11,5%, 46,9%, 70% и 82,9%. В группе II₇, III₇ и IV₇ добровольцев с ИА менее 50% обнаружено не было.

Однако при изучении этих же образцов в присутствии 8М мочевины (Рисунок 19) было показано, что практически во всех исследуемых образцах ИА не превышал 50%, что указывает на незавершенность созревания антител в большинстве случаев. Количество образцов с ИА $\geq$ 50% составило всего 8,8%.

Детальное сравнение групп добровольцев с гибридным иммунитетом (группа III₇ и IV₇) которые различались по году формирования иммунитета, количеству полученных вакцинных доз, показало следующие результаты. При использовании 4М мочевины медианное значение ИА для образцов, собранных в 2022 году, составило 91,7% и не отличалось от медианного значения ИА за 2021 год, которое равнялось 90,5% (Рисунок 20А).



Примечание:

ns - нет достоверной разницы между подгруппами пациентов "2021" и "2022" с гибридным иммунитетом (непараметрический критерий Манна-Уитни)

Рисунок 20 – Оценка индекса авидности при использовании 4М (А) и 8М (Б) мочевины в группах добровольцев с гибридным иммунитетом (группа III₇ и IV₇), различающихся годом формирования иммунитета и количеству полученных вакцинных доз

Однако при сравнении медианных значений ИА для образцов 2021 и 2022 годов с использованием 8М мочевины, оба значения оказались значительно ниже и составили 25% и 26% соответственно (Рисунок 20Б) и не различался между собой.

Таким образом, данные результаты указывают, что в случае с SARS-CoV-2 процесс созревания антител остается не завершенным, независимо от времени прошедшего после инфицирования или вакцинации, а также от их кратности, что в последствии может приводить к реинфекции. Это соотносится с высказанными другими авторами [119, 135] мнениями о том, что в случае SARS-CoV-2 IgG- антитела значительно реже проходят полный цикл созревания.

3.1.3 Создание, валидация и апробация суррогатного вируснейтрализующего теста для определения нейтрализующих антител, специфически блокирующих взаимодействие между RBD и ACE2

Эталонным методом для определения вируснейтрализующих антител является классическая реакция нейтрализации вируса (Рисунок 21А) в чувствительной к нему культуре клеток. Однако проведение данного анализа требует соблюдения специальных условий биобезопасности из-за работы с живым SARS-CoV-2. Кроме того, метод является трудоемким и занимает 2–4 дня.

Альтернативой классической вирусологической реакции нейтрализации (РН) является метод, основанный на использовании псевдовирусов, где на поверхности генно-модифицированного вируса экспрессируется S-белок SARS-CoV-2. Однако, поскольку этот метод (pVNT) по-прежнему требует применения живых вирусов и клеточных культур, он остается сложным для масштабирования [225, 226]. Другой альтернативой РН является суррогатный вируснейтрализующий тест (sVNT) — серологический иммуноферментный анализ, направленный на выявление антител, блокирующих взаимодействие RBD и ACE2 (Рисунок 21Б) [207, 208, 227, 228].

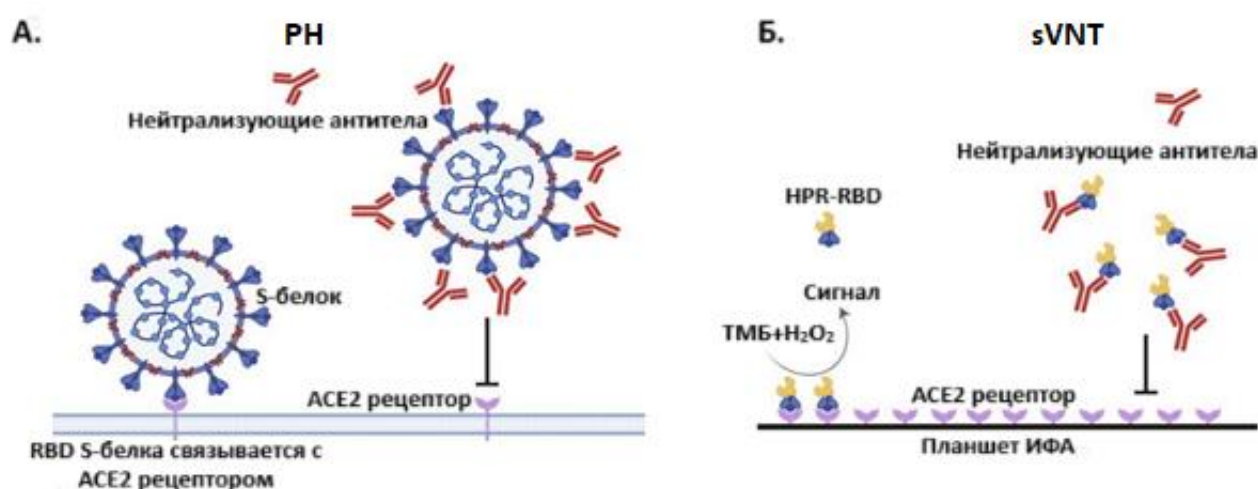


Рисунок 21 – Методы определения антител, блокирующих взаимодействие вируса SARS-CoV-2 с рецептором клеток хозяина. **А.** Механизм реакции нейтрализации вируса в культуре клеток; **Б.** Механизм суррогатного вируснейтрализующего теста

Оптимизация и оценка диагностических характеристик метода sVNT для выявления антител, блокирующих взаимодействие RBD и ACE2, проводились на 374 образцах сывороток крови, собранных от добровольцев с известным анамнезом в 2017–2020 годах, а также на 97 образцах, полученных в 2021 году от пациентов, перенесших COVID-19 или вакцинированных препаратом «Гам-КОВИД-Вак». Все образцы были проанализированы на наличие антител к RBD шипового белка SARS-CoV-2. В качестве критерия наличия антител, блокирующих взаимодействие RBD SARS-CoV-2 и ACE2 в сыворотке или плазме крови, использовали коэффициент подавления (КП%), рассчитываемый по формуле:

$$\text{КП} = (\text{ОП}_{\text{ср.}(K-)} - \text{ОП}_{\text{обр.}}) / (\text{ОП}_{\text{ср.}(K-)} - \text{ОП}_{\text{обр.}}) * 100, \text{ где}$$

$\text{ОП}_{\text{ср.}(K-)}$ – среднее арифметическое значение ОП для выборки образцов сывороток крови человека, не содержащих антител к SARS-CoV-2;

$\text{ОП}_{\text{обр.}}$ – значение ОП для тестируемого образца.

КП прямо пропорционален концентрации антител, блокирующих образование комплекса между RBD и ACE2: чем больше КП для образца, тем больше в нем соответствующих антител. Оценка порогового значения КП, позволяющая дифференцировать образцы, содержащие антитела, блокирующие взаимодействие RBD и ACE2, от не содержащих определялась двумя методами.

В первом методе граничное значение определялось как $\text{КП}_{\text{порог.}}$, рассчитываемое для $\text{ОП} = \text{ОП}_{\text{Котр.}} - 3\sigma$, где σ – среднеквадратическое отклонение.

В соответствии с полученными результатами, образцы с $\text{КП} \geq 30\%$ рассматривались как содержащие антитела, блокирующие взаимодействие RBD и ACE2 [209].

Были рассчитаны показатели чувствительности (Se) и специфичности (Sp) разработанного sVNT метода по отношению к коммерческому тесту («SARS-CoV-2-ИФА-IgG плюс», «МедипалТех») [229, 230].

Чувствительность и специфичность рассчитывались по формулам и составили: $\text{Se} = \text{TP} / (\text{TP} + \text{FN}) = 96\% (\text{ДИ} \pm 3,35\%, p < 0,05)$;

$$\text{Sp} = \text{TN} / (\text{TN} + \text{FP}) = 100\% (\text{ДИ} \pm 0,65\%, p < 0,05), \text{ где}$$

- TP – образцы, определенные как содержащие антитела, блокирующие взаимодействие RBD и ACE2, и к RBD Spike SARS-CoV-2;
- FP – образцы, определенные как содержащие антитела, блокирующие взаимодействие RBD и ACE2, в разрабатываемом тесте, но не содержащие антител к RBD Spike SARS-CoV-2;
- TN – образцы, определенные как не содержащие антитела, блокирующие взаимодействие RBD и ACE2, и к RBD Spike SARS-CoV-2;
- FN – образцы, определенные как не содержащие антитела, блокирующие взаимодействие RBD и ACE2, но содержащие антитела к RBD Spike SARS-CoV-2 [208]

Пороговое значение и диагностические характеристики теста были определены с использованием ROC-анализа. Результаты ROC-анализа для выборки образцов, собранных в 2017–2021 годах, а также для двух отдельных выборок, полученных на разных этапах пандемии, представлены на Рисунке 22 (А, Б, В) и в Таблице 8.

Таблица 8 – Пороговые значения и диагностические характеристики sVNT-теста

Метод	Год, Тип иммунитета	КП _{порог} , %	Чувствительность, %	Специфичность, %
Уилсона (Wilson)	2020-2021(n= 340), инфекция + вакцинация «Гам- КОВИД-Вак»	30	96 (ДИ $\pm 3,35\%$, $p < 0,05$)	100 (ДИ $\pm 0,65\%$, $p < 0,05$)
ROC (Рис. 24А)	2020-2021(n= 340), инфекция + вакцинация «Гам- КОВИД-Вак»	31,45	98,53 (ДИ:96,60-99,37%)	100 (ДИ:97,15-100,0%)
ROC (рис. 24Б)	2020(n= 243), инфекция	31,45	99.59 (ДИ:97,71-98,0%)	100 (ДИ 97,15-100%)
ROC (рис. 24В)	2021 (n= 97), инфекция + вакцинация «Гам- КОВИД-Вак»	31,65	95,88 (ДИ:89,87-98,38%)	100 (ДИ: 97,15-100%)

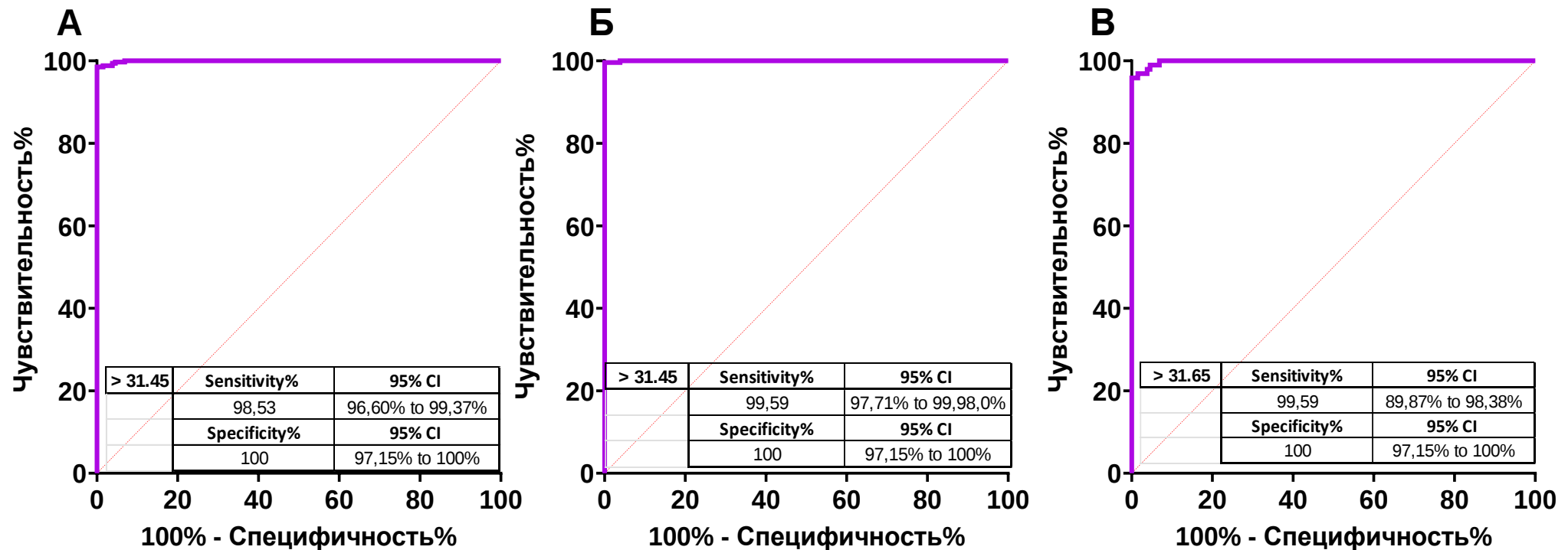


Рисунок 22 – Кривые ROC результатов sVNT: **А**- для положительных образцов (гибридный иммунитет) полученных в 2020-2021 г.; **Б** - для положительных образцов(постинфекционный иммунитет) полученных в 2020 г.; **В** - для положительных образцов (гибридный иммунитет) полученных в 2021 г.; Образцы полученные с 2017 по 2019 гг. использовали в качестве отрицательных, т.е. не содержащие антител к SARS-CoV-2

Коэффициент вариации (CV%), рассчитанный для 30 образцов, как содержащих, так и не содержащих антитела, блокирующие взаимодействие RBD и ACE2, составил 5,5–17,1%.

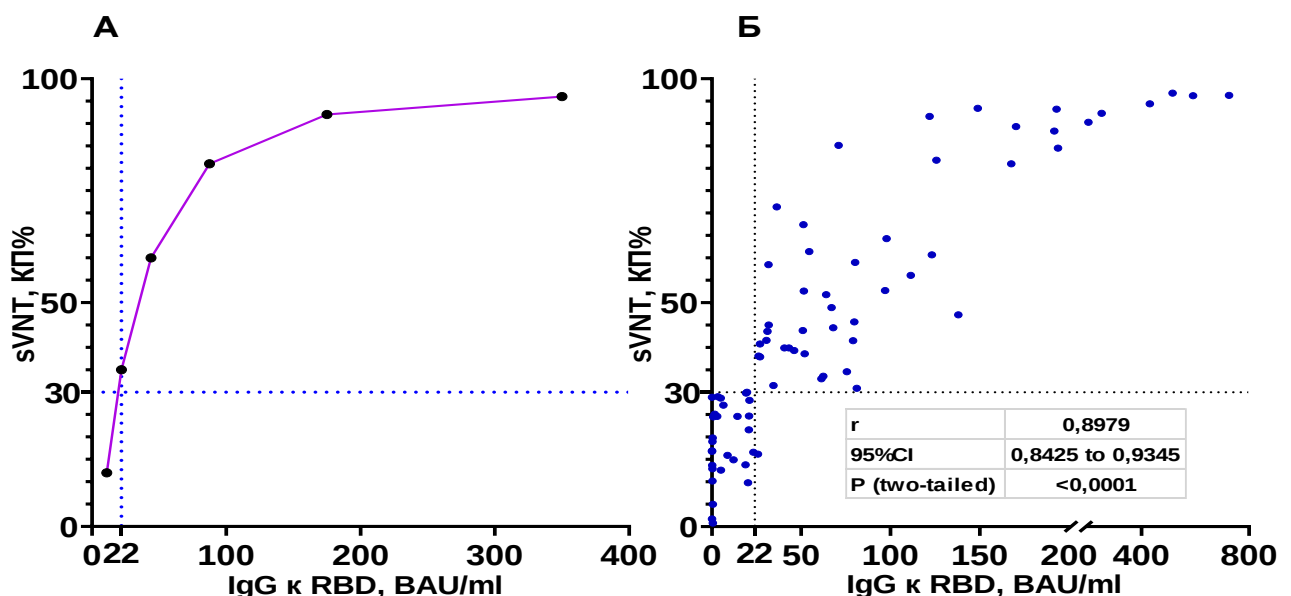
Аналитическая чувствительность sVNT

Аналитическая чувствительность sVNT была оценена с использованием международного стандартного образца (NIBSC code: 20/136). Была определена концентрация антител к SARS-CoV-2, блокирующих взаимодействие RBD и ACE2,

соответствующая коэффициенту подавления 30%. На основании трех независимых экспериментов диапазон чувствительности составил 20–22 ВАУ/мл (Рисунок 23А)

Аналитическая чувствительность, оцененная с использованием стандартного образца ВОЗ, согласуется с экспериментальными данными, полученными при анализе образцов сывороток крови с помощью наборов двух производителей (Рисунок 23Б). Все образцы с концентрацией IgG-антител к RBD SARS-CoV-2 менее 22 ВАУ/мл, определенные с помощью наборов «SARS-CoV-2-ИФА-IgG» («МедипалТех», Россия) и «SARS-CoV-2 IgG II Quant Reagent Kit» («Abbott», Ирландия), были классифицированы как не содержащие антител, блокирующих взаимодействие RBD и ACE2, в методе sVNT. Напротив, все образцы с концентрацией IgG-антител к RBD SARS-CoV-2 более 22 ВАУ/мл были идентифицированы как содержащие такие антитела в методе sVNT.

Коэффициент корреляции Спирмена 0,8979 (ДИ 95%:0,8425-0,9345, $p < 0,001$) свидетельствует о выраженной, статистически значимой корреляции между КП% sVNT и количеством антител, выявленных в наборах сравнения (Рисунок 23Б).



Примечание: На каждом графике приведена граница уровня отсеечения (КП = 30, ось Y) и граница чувствительности (ВАУ/мл = 22 ось X).

Рисунок 23 – Результаты sVNT-теста: А. Кривая титрования стандарта ВОЗ в sVNT; Б. Результаты зависимости КП от количества антител, полученных в наборах сравнения

Сопоставление данных, полученных в разработанном методе с титром нейтрализующих антител, полученном в классической реакции нейтрализации вируса

Так как sVNT рассматривается в данной работе как альтернатива реакции нейтрализации, на следующем этапе исследования было проведено сопоставление результатов, полученных двумя методами. Для этого 118 образца, полученных от добровольцев с постинфекционным иммунитетом и охарактеризованных по наличию антител к RBD Spike SARS-CoV-2, были исследованы в РН на культуре клеток для определения титров ВНА и в sVNT для определения антител, блокирующих взаимодействие между RBD и ACE2. Доля пациентов, у которых были обнаружены антитела к RBD SARS-CoV-2, но отсутствовали ВНА составила 9,3%.

Было проведено сопоставление полученных значений КП с полученными в РН титрами ВНА, результаты которого представлены на Рисунке 24.

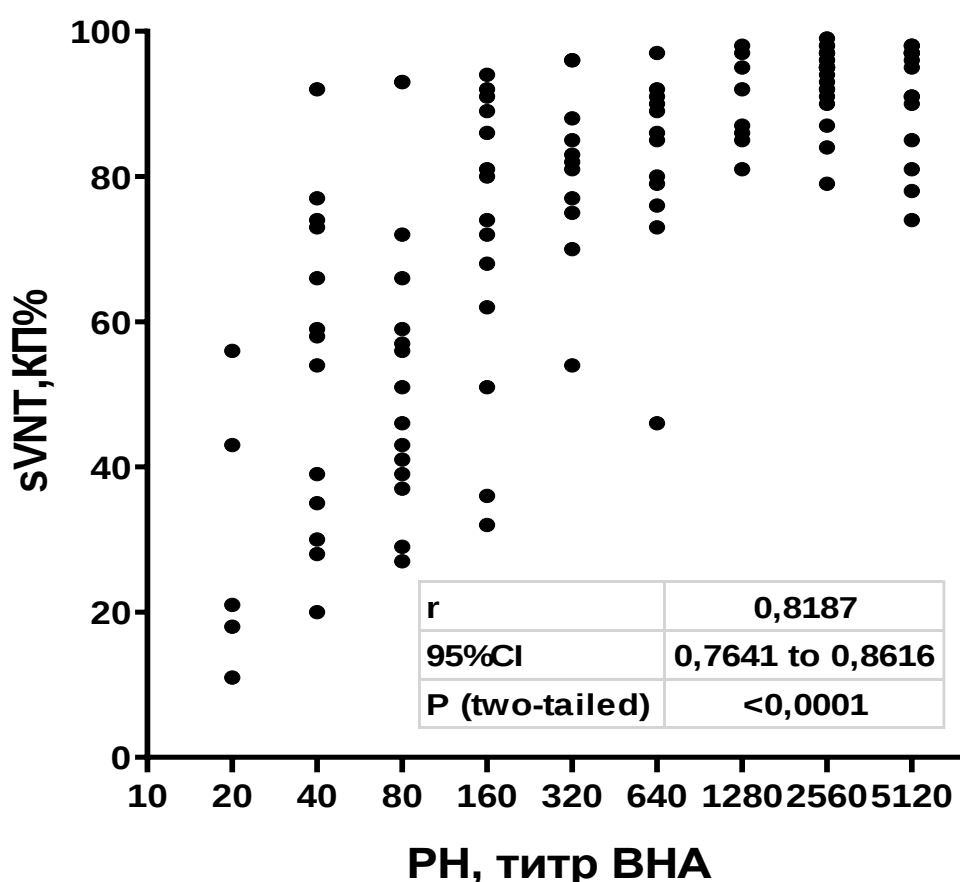


Рисунок 24 – Зависимость коэффициента подавления КП% (ось Y) от титра ВНА (NT50, ось X) в группе добровольцев с постинфекционным иммунитетом

Коэффициент корреляции Спирмена для этих данных составил 0,8187(95%ДИ: 0,7641-0,8616, $p < 0,001$), и, таким образом, полученные данные говорят о выраженной, статистически значимой корреляции КП% sVNT с титрами ВНА, определенными в вирусологической РН. Медианное значение титров вируснейтрализующих антител, полученное в РН, для данной выборки составило 1:320. Медианное значение КП, определенное в sVNT-тесте, составило 59%.

В процессе анализа данных дополнительно (для sVNT) использовался уточненный параметр, характеризующий содержание антител – sVNT-титр, который соответствовал последнему разведению исследуемого образца при КП>30%. Так, в группе добровольцев с гибридным иммунитетом, sVNT-титр определялся по кривым титрования образцов, анализируемых в ряде последовательных разведений. Пример таких кривых титрования представлен на Рисунке 25А.

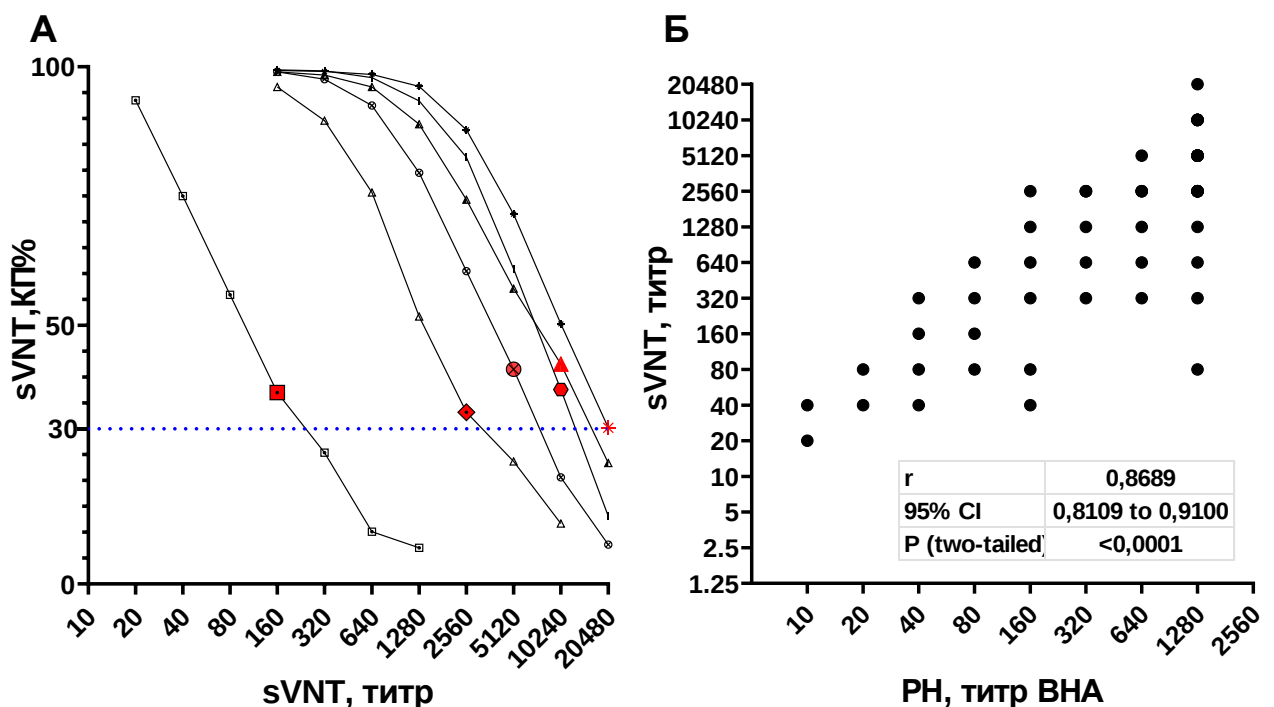


Рисунок 25 – Определение sVNT-титр и его корреляция с результатами РН в группе добровольцев с гибридным иммунитетом: **А** - кривые титрования образцов; **Б** – зависимость титра sVNT (ось Y) от титра ВНА в РН (ось X)

При сравнении титров ВНА РН с титрами sVNT (Рисунок 25Б), установлена корреляция высокой степени, коэффициент Спирмена составил 0,8689 (ДИ 95%:0,8109 -0,9100, $p < 0,0001$). Для данной выборки добровольцев с гибридным иммунитетом ($n = 110$) медианные значения параметров sVNT-титров, измеренных с помощью суррогатного вируснейтрализующего теста (sVNT), составили 1:640. Медианные значения титров вируснейтрализующих антител (ВНА), определенных методом реакции нейтрализации, составили 1:320.

Отдельно стоит отметить, что у 8,3% участников исследования были обнаружены антитела к RBD SARS-CoV-2, однако, согласно данным sVNT-теста отсутствовали вируснейтрализующие антитела. Аналогичный показатель, полученный методом РН, составил 7,3%.

3.1.4 Сопоставление результатов трех ИФА-тестов с титрами вируснейтрализующих антител к SARS-CoV-2 у вакцинированных добровольцев

Титр вируснейтрализующих антител (ВНА) является ключевым серологическим параметром, напрямую связанным с эффективностью гуморального иммунитета против SARS-CoV-2. Как отмечалось ранее, титр ВНА обычно определяется с помощью реакции нейтрализации (РН), которая выявляет максимальное разведение сыворотки, при котором антитела все еще способны предотвращать репликацию живого вируса в культуре чувствительных клеток. Хотя РН обеспечивает точные и воспроизводимые результаты, ее применение требует строгих мер биологической безопасности, что делает невозможным использование данного метода в обычных клинических лабораториях. Исследование Tang M. и коллег [231] продемонстрировало корреляцию между титром нейтрализующих антител к SARS-CoV-2 и результатами коммерческих тестов: Roche (для IgM/IgG к нуклеокапсидному антигену), Abbott (для IgG к нуклеокапсидному антигену) и Euroimmun (для IgG к субъединице S1 белка-S),

составившую 0,29, 0,47 и 0,46 соответственно. Чувствительность этих тестов для правильного выявления сывороток с титром ВНА $\geq 1:32$ достигла 100, 96 и 91%, соответственно. Однако специфичность оказалась низкой: только 56, 69 и 81% положительных результатов соответствовали образцам с титром ВНА $\geq 1:32$ [231].

После внедрения международных единиц измерения (BAU/мл) многие исследователи стремились установить взаимосвязь между титром вируснейтрализующих антител и уровнем IgG к антигенам шиповидного белка или рецептор-связывающему домену. Например, Cristiano A. и коллеги [232] продемонстрировали, что у пациентов, перенесших бессимптомное течение COVID-19, медианная концентрация общих антител к S1-домену составила 281 BAU/мл, при этом средний титр ВНА достигал 1:80. В двух других группах — вакцинированных участников и пациентов с симптоматическим течением COVID-19 — средний титр ВНА составил 1:160, а концентрация антител варьировала в диапазоне 769–983 BAU/мл.

Одним из перспективных параметров для оценки вируснейтрализующих антител является авидность IgG-антител, которая играет важную роль в нейтрализации вируса. ВНА связываются с рецептор-связывающим доменом таким образом, что блокируют его взаимодействие с рецептором ACE2 на поверхности клеток человека. Однако комплекс RBD–ACE2 характеризуется высокой константой термодинамического связывания [233]. Следовательно, нейтрализующие антитела должны обладать сродством к RBD, превышающим сродство белка ACE2, чтобы эффективно конкурировать за связывание с вирусным антигеном. На основании этого ряд исследователей [119, 141] заключили, что только IgG с высокой авидностью вносят значительный вклад в нейтрализацию вируса. Действительно, на мышинной модели была установлена прямая корреляция между индексом авидности IgG к RBD и титром ВНА с коэффициентом корреляции 0,75 [234]. Дополнительным подтверждением важности авидности IgG для нейтрализующей способности антител является тот факт, что у пациентов с тяжелой формой COVID-19, при реинфекции, индекс авидности был значительно ниже, чем у пациентов с легкой формой заболевания [235].

На данном этапе исследования была задача сравнить три класса иммунохимических методов (количественное определение IgG в ВАУ/мл, определение количества антител после обработки хоатропным агентом и анализ sVNT) с РН. Для этого было отобрано 104 образца сыворотки крови добровольцев, вакцинированных препаратом «Спутник V» с известным титром ВНА, полученным в классической РН. Все образцы были исследованы с помощью ИФА на три количественных маркера гуморального иммунитета к SARS-CoV-2: IgG к RBD (в ВАУ/мл), индекс авидности IgG к RBD и титра в sVNT-тесте. До и после вакцинации, вплоть до даты сбора образцов, участники не сообщали о случаях COVID-19. У всех добровольцев были выявлены IgG-антитела к RBD SARS-CoV-2, однако у 5,7% отсутствовали ВНА.

Корреляция титра ВНА(РН) с количеством IgG к RBD SARS-CoV-2. При изучении корреляция между титром ВНА полученном в РН и количеством IgG к RBD полученном в наборе «SARS-CoV-2-ИФА-IgG» («МедипалТех», Россия) (Рисунке 26А), коэффициент корреляции, рассчитанный с использованием критерия Спирмена (r), составил 0,8627, что говорит о сильной и статистически значимой связи между титром ВНА(РН) и количеством IgG к RBD в исследуемой группе вакцинированных пациентов (95% ДИ: 0,8015 - 0,9059, $P < 0,0001$).

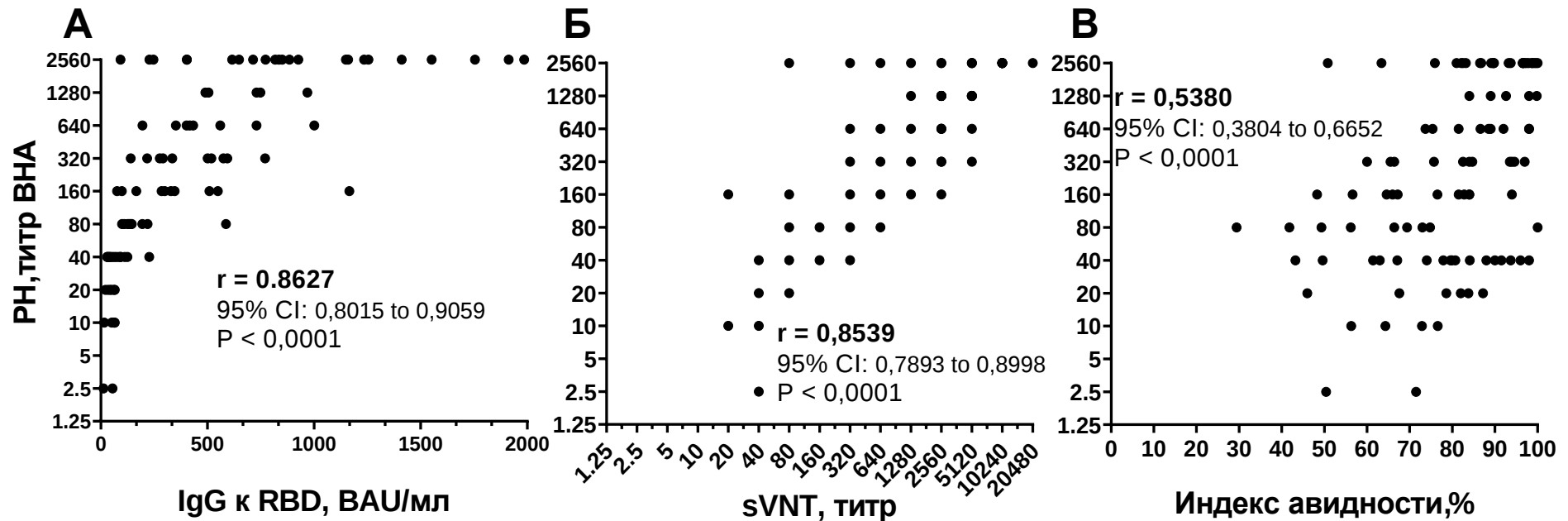


Рисунок 26 – Сравнительный анализ между ВНА (ось Y, логарифмическая) к SARS-CoV-2, полученными в PH, с: **А.** количеством IgG антител (ось X), **Б.** sVNT-титром (ось X, логарифмическая) и **В.** индексом avidности (ось X)

Корреляция титра ВНА(PH) с титром-sVNT. Как было описано, в разработанном sVNT-тесте, показатель «sVNT-титр» определялся как последнее разведение сыворотки, способное подавлять образование комплекса между ACE2 и RBD *in vitro* с коэффициентом подавления (КП) $\geq 30\%$. С этой точки зрения sVNT-тест является тестом, наиболее похожим на классическую PH. Так, sVNT-титр показал сильную ($r = 0.8539$, 95% ДИ: 0.7893-0.8998, $p < 0.0001$; Рисунок 26Б) статистически значимую связь с титром ВНА, полученным в PH.

При этом доля участников исследования, у которых были обнаружены IgG-антитела к RBD SARS-CoV-2, но отсутствовали ВНА, составила 6,7% для sVNT-теста и 5,7% для РН.

Корреляция титра ВНА(РН) с индексом авидности. При анализе корреляции индекс авидности IgG-антител к RBD SARS-CoV-2 показал слабую, но статистически значимую связь с титром ВНА ($r = 0,5380$, 95% ДИ: 0,3804–0,6652, $p < 0,0001$) (Рисунок 26В). Этот результат был предсказуем, поскольку индекс авидности не отражает количество или концентрацию антител (в отличие от титра ВНА или ВАУ/мл). Вместо этого он характеризует долю IgG-антител, способных оставаться связанными с RBD в присутствии денатурирующего агента, среди общего пула специфических IgG.

Тем не менее, возможно определить концентрацию IgG-антител, которые остаются связанными с RBD даже в условиях воздействия денатурирующего агента и составляют часть общего пула специфических IgG. Предполагается, что эти антитела играют ключевую роль в нейтрализации вируса. В этой связи особое значение приобретает установление корреляции между уровнем таких антител, титром ВНА и результатами sVNT теста.

Корреляция содержания IgG-антител, выявленных после обработки мягким денатурирующим агентом (4М мочеви́на) с титрами ВНА в РН и титрами sVNT. В связи с низкой корреляцией ИА с титрами ВНА, был определен показатель – уровень IgG_{4М} к RBD, который выражался в виде остаточного количества антител (ВАУ/мл) выявленных в присутствии мягкого денатурирующего агента (4М мочеви́на). Для оценки валидности данного показателя был проведен корреляционный анализ с двумя другими показателями – титром антител, полученным в sVNT-тесте и титром ВНА, определенным в РН.

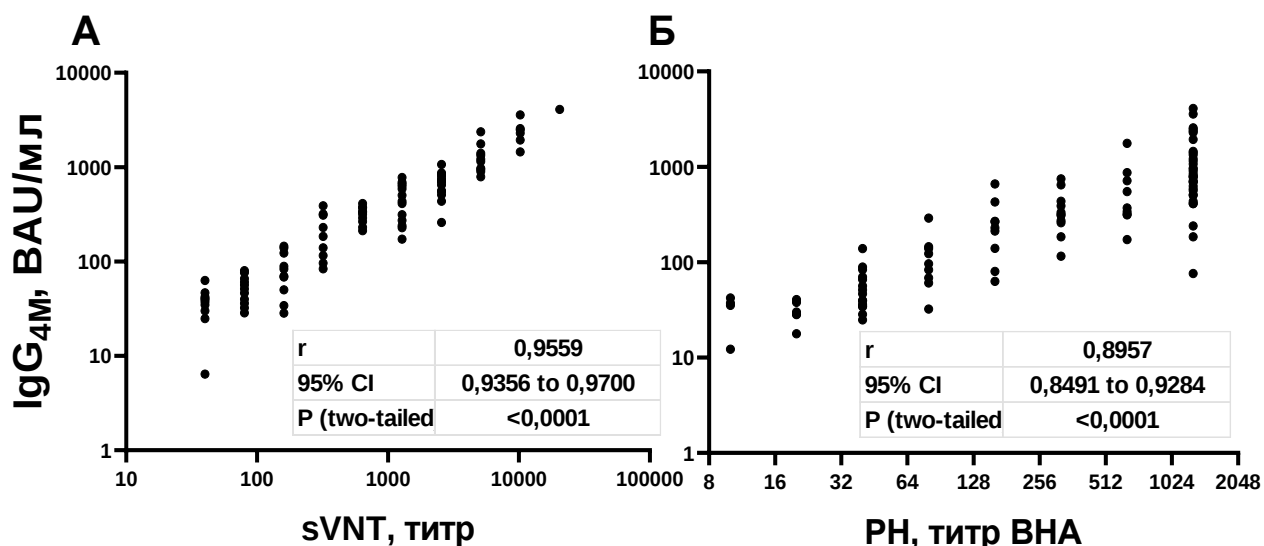


Рисунок 27 – Корреляции между результатами уровня IgG_{4M} (ось Y) с (А) sVNT-титром (ось X) и (Б) титром ВНА, полученным в РН (ось X) в исследуемых образцах

На Рисунке 27А, Б представлены результаты корреляции между титром антител, блокирующих взаимодействие RBD и ACE2 в тесте sVNT, титром вируснейтрализующих антител, предотвращающим заражение клеток в реакции нейтрализации, и уровнем IgG_{4M} к RBD (в BAU/мл). Коэффициенты корреляции, рассчитанные с использованием критерия Спирмена (r), составили 0,9559 и 0,8957 соответственно, что указывает на сильную и статистически значимую связь между остаточным уровнем антител IgG_{4M} (BAU/мл) и титрами sVNT, а также титрами ВНА(РН) в исследуемой группе пациентов (95%ДИ: 0,9356–0,9700 и 0,8491–0,9284; p<0,0001).

Таким образом, как описано выше, пороговое значение коэффициента подавления (КП%) для дифференциации образцов, содержащих антитела, блокирующие взаимодействие RBD и ACE2, от образцов без таких антител, было оценено двумя статистическими методами (Таблица 8). Дополнительно методом ROC-анализа были отдельно изучены образцы с постинфекционным и гибридным иммунитетом. Во всех случаях полученные пороговые значения КП оказались близкими (31,45–31,65%) и сопровождалась высокими диагностическими характеристиками.

При сравнении данных, полученных с использованием разработанного sVNT-теста, с результатами классической вирусологической реакции нейтрализации (РН), была выявлена статистически значимая корреляция (коэффициент корреляции Спирмена 0,8187; 95%ДИ: 0,7641–0,8616, $p < 0,0001$), что согласуется с данными других исследователей [207, 227, 228]. Разработанный sVNT-тест для определения антител, блокирующих взаимодействие RBD и ACE2, был апробирован на образцах доноров как с гибридным, так и с постинфекционным иммунитетом.

Следует отметить, что используемые наборы реагентов для определения количества антител к RBD SARS-CoV-2 («SARS-CoV-2-ИФА-IgG» («МедипалТех», Россия) и «SARS-CoV-2 IgG II Quant Reagent Kit» («Abbott», Ирландия)) имеют более высокую чувствительность, 10 BAU/ml и 7 BAU/ml, соответственно. Проанализированные в работе образцы, содержащие антитела к SARS-CoV-2 в количестве, ниже предела чувствительности sVNT (22 BAU/мл) имели КП <30%. Чувствительность классической вирусологической реакции нейтрализации в культуре клеток, определенная путем титрования международного стандартного образца NIBSC 20/136, составила 25 IU/мл (разведение стандартного образца 1:40). Сопоставление результатов, полученных для чувствительности двух методов, позволяет утверждать, что разработанный метод является адекватной альтернативой классической вирусологической реакции нейтрализации.

3.1.5 Оценка корреляции суррогатного вируснейтрализующего теста с реакцией нейтрализации на стадии доклинических испытаний вакцинного препарата против SARS-CoV-2

На данном этапе работы была поставлена задача оценить возможность применения суррогатного вируснейтрализующего теста для оценки

вируснейтрализующих антител у различных видов животных, иммунизированных кандидатным вакцинным препаратом.

На образцах сывороток крови людей было показано, что суррогатный вируснейтрализующий тест обладает свойством, которое позволяет определять антитела всех классов, обладающих способностью предотвращать образование комплекса RBD-ACE2. Следует отметить, что sVNT-тест зарекомендовал себя как высокоэффективный метод диагностики и мониторинга ВНА, во многом благодаря его экономичности, высокой пропускной способности, простоте использования, точности и скорости получения результатов.

В рамках настоящего раздела исследования было проведено сравнительное изучение результатов, полученных при помощи классического метода РН, метода sVNT и классического ИФА (в котором использовался антивидовой конъюгат) в отношении сывороток крови животных (трансгенных мышей, коров и собак) на этапе доклинических испытаний экспериментального вакцинного препарата против COVID-19, в составе которого содержался белок Spike SARS-CoV-2.

В случае собак и коров от каждого животного был получен материал сыворотки крови, до и после иммунизации (Таблица 9).

Таблица 9 – Определение антител методами ИФА, sVNT и РН в сыворотке крови собак и коров

Собаки						
№	до имм.	после имм.	до имм.	после имм.	до имм.	после имм.
	IgG к RBD, ИП	IgG к RBD, ИП	КП, %	КП, %	ВНА, титр	ВНА, титр
1	1,1	27,1	0,0	98,9	<10	640,0
2	1,9	3,3	8,6	76,4	<10	20,0
3	0,3	30,8	6,9	97,6	<10	1280,0
4	1,1	5,2	4,0	78,4	<10	20,0
5	0,7	12,5	0,0	86,7	<10	40,0
6	0,6	10,0	9,5	88,8	<10	40,0
7	0,3	7,2	0,0	84,9	<10	40,0
8	0,5	24,2	3,1	84,5	<10	20,0
9	0,4	13,3	0,0	91,8	<10	20,0
10	0,3	7,2	4,1	68,0	<10	10,0

Продолжение Таблицы 9

Коровы						
1	-	-	2,3	72,8	<10	15
2	-	-	3,1	89,7	<10	60
3	-	-	3,8	94,1	<10	80
4	-	-	0,9	66	<10	15
5	-	-	0,0	43,8	<10	0
6	-	-	2,6	73,6	<10	60
7	-	-	2,1	70,9	<10	30
8	-	-	0,0	30,4	<10	20
<i>Примечание: ИП – индекс позитивности; КП – коэффициент подавления; ВНА– вируснейтрализующие антитела; для сывороток коров определение IgG к RBD не проводилось.</i>						

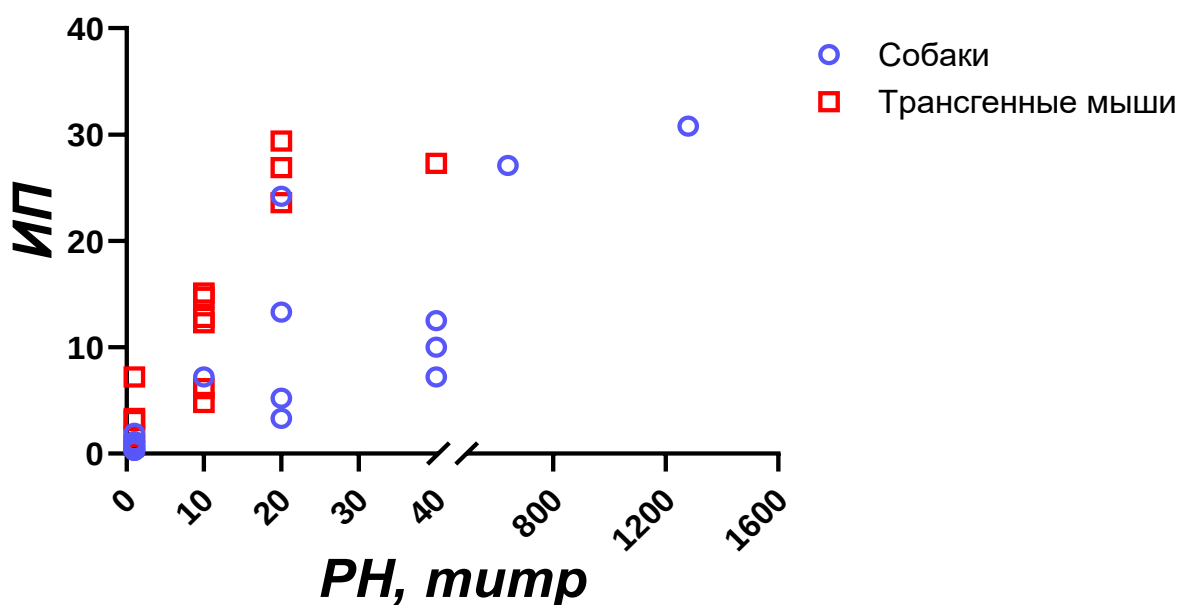
В случае с трансгенными мышами было сформировано две группы животных – в первую группу (контрольная группа) вошли животные, которым вводилось плацебо, во вторую группу (опытная группа) животные, иммунизированные вакцинным препаратом (Таблица 10).

Таблица 10 – Определение антител в сыворотке крови трансгенных мышей K18-hACE2 методами ИФА, sVNT и РН

Группы	№ животного	IgG к RBD, ИП	ВНА, титр	КП, %
контроль	1-4	0,52-0,75	<10	2,7-8,1
опыт	5	12,3	10	43,9
	6	14,7	10	66,7
	7	6,1	10	67,7
	8	23,6	20	81,4
	9	27,3	40	93,3
	10	3,1	<10	72,1
	11	15,1	10	72,9
	12	29,4	20	62,9
	13	12,8	10	48,5
	14	7,2	<10	24,3
	15	3,3	<10	20,3
	16	0,8	<10	15
	17	26,9	20	78,2
	18	1,6	<10	0
	19	4,8	10	44,5
<i>Примечание: ИП – индекс позитивности; КП – коэффициент подавления; ВНА– вируснейтрализующие антитела;</i>				

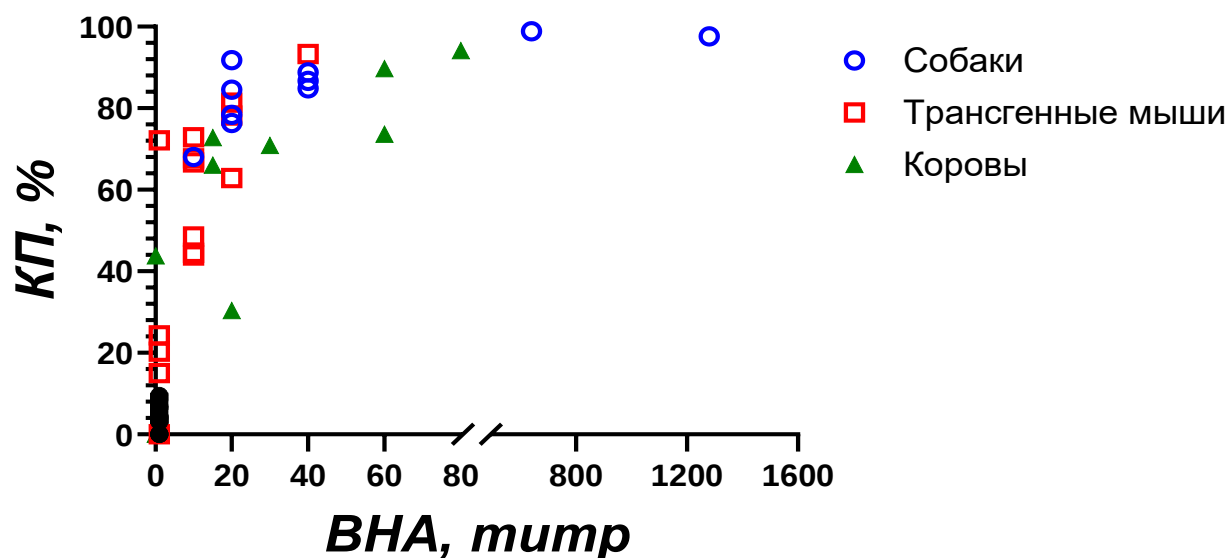
В образцах сывороток крови мышей и собак также были определены антитела IgG к RBD SARS-CoV-2 (Таблица 9 и 10) в ИФА с использованием антивидовых конъюгатов. Результаты количества антител (ИП) (Рисунок 28; Таблица 9 и 10) так же были проанализированы для установления корреляционной связи с ВНА(РН) (Рисунок 29; Таблица 9 и 10).

Анализ данных, представленных в Рисунках 28 и 29, а также в Таблице 11, выявил статистически достоверную взаимосвязь между показателями КП и ИП, определенными иммуноферментными методами, и титрами ВНА, полученными в ходе вирусологической РН в исследуемых группах.



Примечание: Коэффициент корреляции между измеряемыми параметрами представлен в таблице 5

Рисунок 28 – График корреляция между концентрацией IgG к RBD (выраженном в ИП, ось X) и титром ВНА, полученным в РН (ось Y) в исследуемых сыворотках собак и трансгенных мышей K18-hACE2



Примечание: Коэффициент корреляции между измеряемыми параметрами представлен в таблице 5

Рисунок 29 – График корреляции между результатами sVNT (выражены в КП, %, ось X) и титром ВНА, полученным в РН (ось Y) исследуемых сывороток собак, трансгенных мышей K18-hACE2 и коров

В Таблице 11 представлены результаты статистического анализа корреляций между параметрами, изображенными на Рисунках 28 и 29.

Так, при изучении связи результатов, полученных в sVNT методе и ИФА с результатами полученными в РН, была показана высокая степень корреляции, диапазон коэффициента корреляции Спирмена составил 0,8085-0,9207 ($p < 0,0001$) и 0,8854-0,8955 ($p < 0,0001$), соответственно.

Таблица 11 – Коэффициенты корреляции между изучаемыми параметрами, рассчитанные с использованием критерия Спирмена

	Титр ВНА v. КП, собаки	Титр ВНА, v. КП, мыши	Титр ВНА v. КП, коровы	Титр ВНА v. ИП, собаки	Титр ВНА v. ИП, мыши
Коэф. корреляции (Spearman r)	0,9151	0,8085	0,9207	0,8854	0,8955
95% доверительный интервал	0,7890 - 0,9672	0,5499 - 0,9257	0,7662 - 0,9746	0,7215 - 0,9553	0,7373 - 0,9606
P (two-tailed)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

В ходе исследования, направленного на оценку иммуногенности вакцинного препарата, оба метода — иммуноферментный анализ для определения IgG к RBD

и суррогатный вируснейтрализующий тест для выявления антител, блокирующих взаимодействие RBD и ACE2 — зарекомендовали себя как адекватные и безопасные альтернативы реакции нейтрализации. Однако sVNT имеет важное преимущество: он универсален и не требует использования специфических конъюгатов для анализа сывороток крови животных разных видов. Это делает sVNT надежным инструментом для доклинических исследований вакцин против SARS-CoV-2 на различных животных моделях.

Данные, полученные для образцов крови трансгенных мышей, собак и коров, показали высокую согласованность с результатами, полученными для человеческих сывороток. Анализ выявил значительную корреляцию между sVNT-подобными конкурентными тестами, предназначенными для выявления антител, блокирующих взаимодействие RBD и ACE2, и результатами определения вируснейтрализующих антител в классической реакции нейтрализации

Таким образом, был создан тест, позволяющий быстро, безопасно и с высокой точностью выявлять антитела, блокирующие взаимодействие RBD и ACE2. Ключевым преимуществом данного подхода является его универсальность, которая исключает необходимость применения антивидовых конъюгатов для анализа сывороток крови различных видов животных в ходе доклинических испытаний вакцин против SARS-CoV-2. В частности, при оценке иммуногенности кандидатной вакцины на трех видах животных была выявлена значительная корреляция между титрами, полученными в реакции нейтрализации, и результатами sVNT [208].

Таким образом, разработанный тест может быть применен в клинической диагностике для мониторинга уровней антител у вакцинированных пациентов и реконвалесцентов, включая подбор донорской плазмы. Кроме того, данный метод пригоден для оценки эффективности вакцин-кандидатов на этапах доклинических и клинических испытаний, а также для разработки лекарственных средств, таких как моноклональные антитела с соответствующим механизмом действия [236].

Материалы раздела 3.1. опубликованы в [208,209,210,235]

3.2 Изучение клеточно-опосредованного иммунного ответа к SARS-CoV-2

Оценка клеточно-опосредованного иммунного ответа против SARS-CoV-2 представляет собой важный аспект изучения эффективности вакцинации и анализа постинфекционного иммунитета. В отличие от гуморального иммунитета, который обеспечивает нейтрализацию вируса за счет антител, клеточный иммунитет играет ключевую роль в уничтожении инфицированных клеток, предотвращении прогрессирования заболевания и формировании долгосрочной защиты.

На начальных этапах пандемии COVID-19 основное внимание уделялось разработке средств диагностики, направленных на выявление антител. Однако исследования показали, что клеточно-опосредованный иммунитет, включающий активацию CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов, является критически важным компонентом защиты, особенно в случаях с дефектами гуморального ответа или при мутациях вируса, снижающих эффективность антител. Клеточный иммунитет демонстрирует длительную персистенцию, что подтверждается исследованиями как SARS-CoV-2, так и родственных коронавирусов. Например, Т-клеточные реакции у переболевших SARS-CoV-1 сохранялись до 17 лет после инфекции [144]. Аналогично, у перенесших COVID-19 Т-клеточный ответ обнаруживался у 94% пациентов через месяц и у 80% — через 8 месяцев после заболевания, тогда как уровень антител значительно снижался уже через полгода [237].

Таким образом, клеточный иммунный ответ играет ключевую роль в защите организма от SARS-CoV-2, особенно учитывая изменчивость вируса и постепенное снижение уровня антител. Однако, в отличие от тестов для определения антител, которые широко доступны, изучение Т-клеточного иммунитета к SARS-CoV-2 сталкивается с рядом трудностей. Это обусловлено тем, что специфичные к данному патогену Т-клетки составляют лишь небольшую часть (часто менее 1–3%) от общего числа лимфоцитов в крови. Для их анализа требуются сложные методы, которые, кроме того, предполагают поддержание жизнеспособности Т-клеток на протяжении всего исследования.

Таким образом, задачей данного этапа работы являлась разработка теста для оценки уровня активности клеточного иммунитета у лиц, вакцинированных препаратом «Гам-Ковид-Вак», а также у переболевших COVID-19. Предложенный тест направлен на преодоление существующих ограничений: он не требует использования сложного оборудования или поддержания жизнеспособности клеток, что значительно упрощает его внедрение в лабораторную практику.

3.2.1 Разработка, валидация и апробация системы определения Т-клеточного иммунного ответа к SARS-CoV-2

Разрабатываемый тест был основан на способности Т-клеток (иммунных к SARS-CoV-2 людей) продуцировать IFN- γ , который является одним из ключевых маркеров Т-клеточного иммунитета, в ответ на стимуляцию антигенами SARS-CoV-2 в цельной крови.

Принцип теста заключается в следующем (Рисунок 30). У пациентов производится забор крови в три пробирки:

1. Контрольная пробирка, не содержащая стимуляторов, для оценки базового уровня IFN- γ .
2. Пробирка, содержащая неспецифический митоген (фитогемагглютинин), который выступает в качестве положительного контроля для проверки способности лимфоцитов продуцировать IFN- γ .
3. Пробирка, содержащая пул пептидов [216], соответствующих иммунодоминантным Т-клеточным (CD4+, CD8+) эпитопам антигенов SARS-CoV-2. Если пациент ранее был инфицирован вирусом или вакцинирован, сенсibilизированные лимфоциты начинают продуцировать IFN- γ в ответ на стимуляцию.

После 24-часовой стимуляции цельной крови при температуре 37°C плазма отбирается для дальнейшего определения уровня IFN- γ методом иммуноферментного анализа.

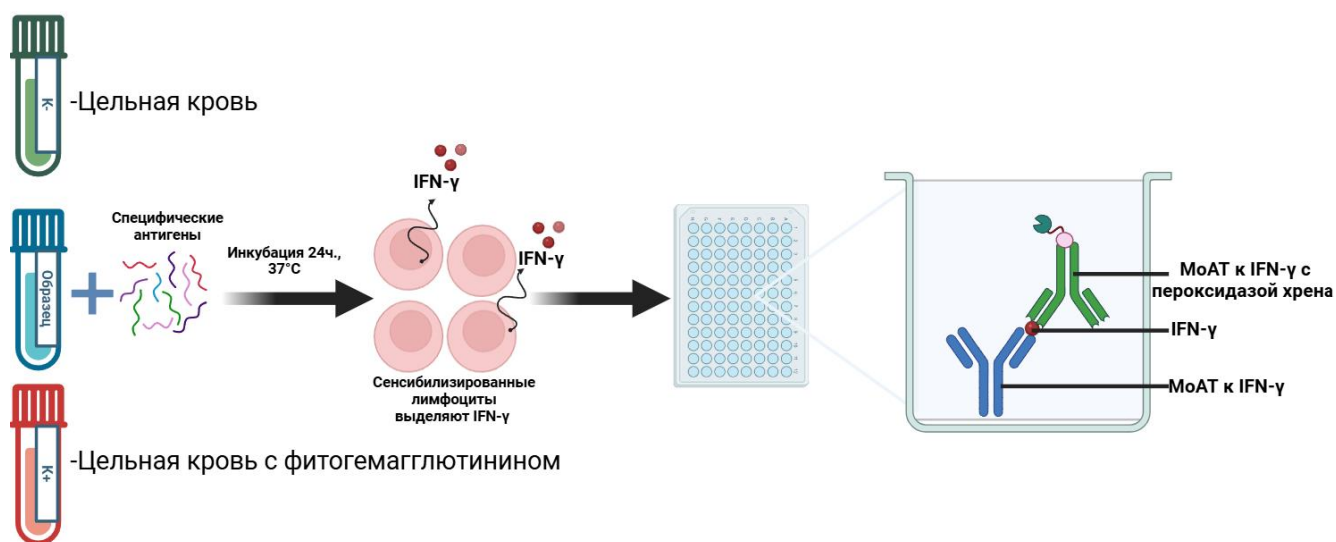


Рисунок 30 – Схема постановки метода определения Т-клеточного иммунного ответа к SARS-CoV-2

На первых этапах разработки тест-системы были использованы полноразмерные рекомбинантные белки SARS-CoV-2. При работе с полноразмерными белками было обнаружено, что S-белок демонстрирует низкую чувствительность, а N-белок вызывает перекрестные реакции. В частности, при стимуляции Т-клеток пациентов, которые не были инфицированы SARS-CoV-2, наблюдался неспецифический Т-клеточный иммунный ответ.

На следующем этапе исследования, в связи с полученными результатами, были использованы синтетические олигопептиды, соответствующие последовательностям иммунодоминантных Т-клеточных эпитопов белков SARS-CoV-2. Эти пептиды ранее были изучены и продемонстрировали высокие диагностические характеристики [216]: чувствительность составила 96,4%, а специфичность — 93,5%. Важно отметить, что в разработанном тесте применялись пептиды, не вызывающие перекрестных реакций.

Опытным путем были подобраны режимы стимуляции, обеспечивающие наилучшие результаты при использовании данного метода:

1. Объем крови для стимуляции: 1 мл.

2. *Способ проведения стимуляции:* стимуляция выполняется непосредственно в вакуумных пробирках для забора крови, на стенки которых заранее нанесены и высушены антигенные стимуляторы.

3. *Условия инкубации:* кровь инкубируют со стимуляторами в течение 24 часов при температуре +37 °С.

Чувствительность определяли по международному препарату IFN- γ , Recombinant Human Interferon- γ (PHC4031, «Thermo Fisher Scientific»). Результаты представлены на Рисунке 31

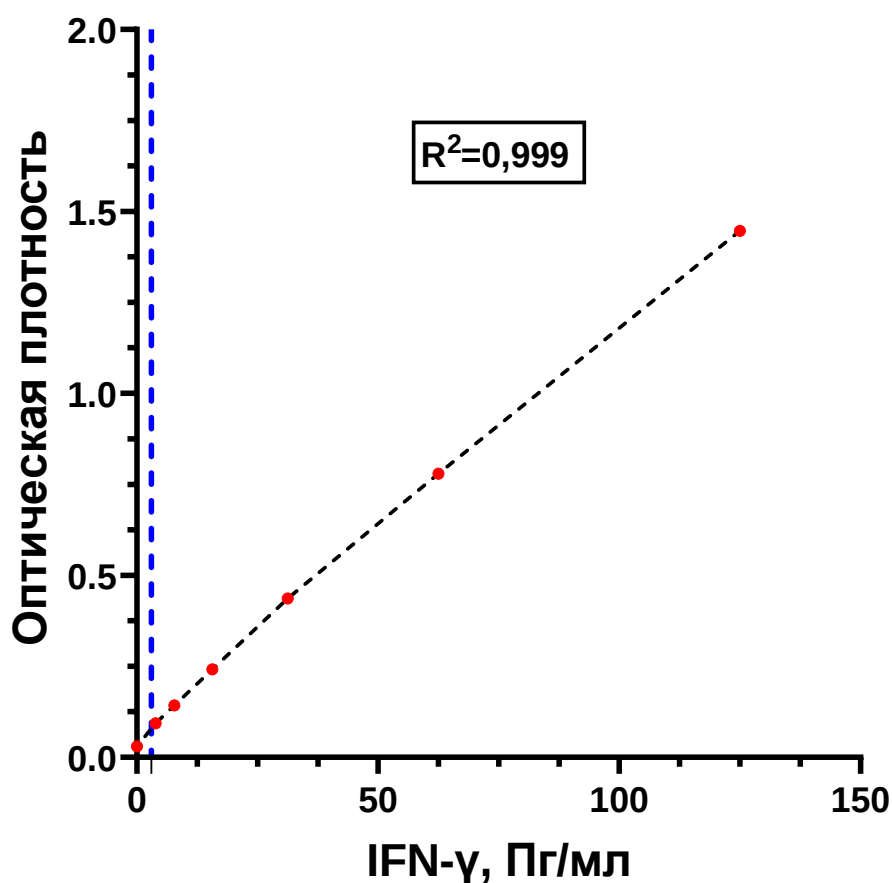


Рисунок 31– Калибровочный график международного стандартного образца IFN- γ

Для определения предела обнаружения (ПО), рассчитывали:

$ПО = ОП_{ср.0} + 3S$, где S – стандартное отклонение;

Концентрация соответствующая этому значению ОП, определенная по графику зависимости концентрация от оптической плотности, является пределом обнаружения и составила – 3 пг/мл

Оценка диагностических характеристик ИГРА-теста

Для оценки такого уровня IFN- γ продуцируемого в ответа на антигенную стимуляцию лимфоцитов крови, который мог быть ассоциирован с наличием или отсутствием предшествующей иммунизации пациента против SARS-CoV-2 были исследованы образцы 80-ти участников с известным медицинским анамнезом (наличие или отсутствие вакцинации, заболевание COVID-19), собранные в период 2021 года, когда еще сохранялась неиммунная прослойка населения. Всего для 16 участников данной группы предполагался «неиммунный» статус (они заявили об отсутствии вакцинации или перенесенного заболевания), а для 64 – «иммунный» (были предоставлены документы, подтверждающие вакцинацию препаратом «Спутник V» или перенесённый COVID-19). Для всех них определяли антитела класса G к RBD SARS-CoV-2, а также изменение уровня IFN- γ в плазме крови после стимуляции лимфоцитов (Δ IFN- γ).

Результаты определения антител класса G к RBD SARS-CoV-2 и изменение уровня IFN- γ в плазме крови после стимуляции по сравнению с исходным уровнем (в отрицательном контрольном образце крови без стимуляции) представлены на Рисунке 32 А и Б, соответственно. Следует отметить, что на момент анализа первой группы 80 участников (2021 год) в РФ еще не был доступен международный стандарт IgG к Spike SARS-CoV-2 (NIBSC code: 20/136, Dated 17/12/2020), поэтому результаты определения IgG на Рисунок 32А представлены в единицах индекса позитивности (ИП).

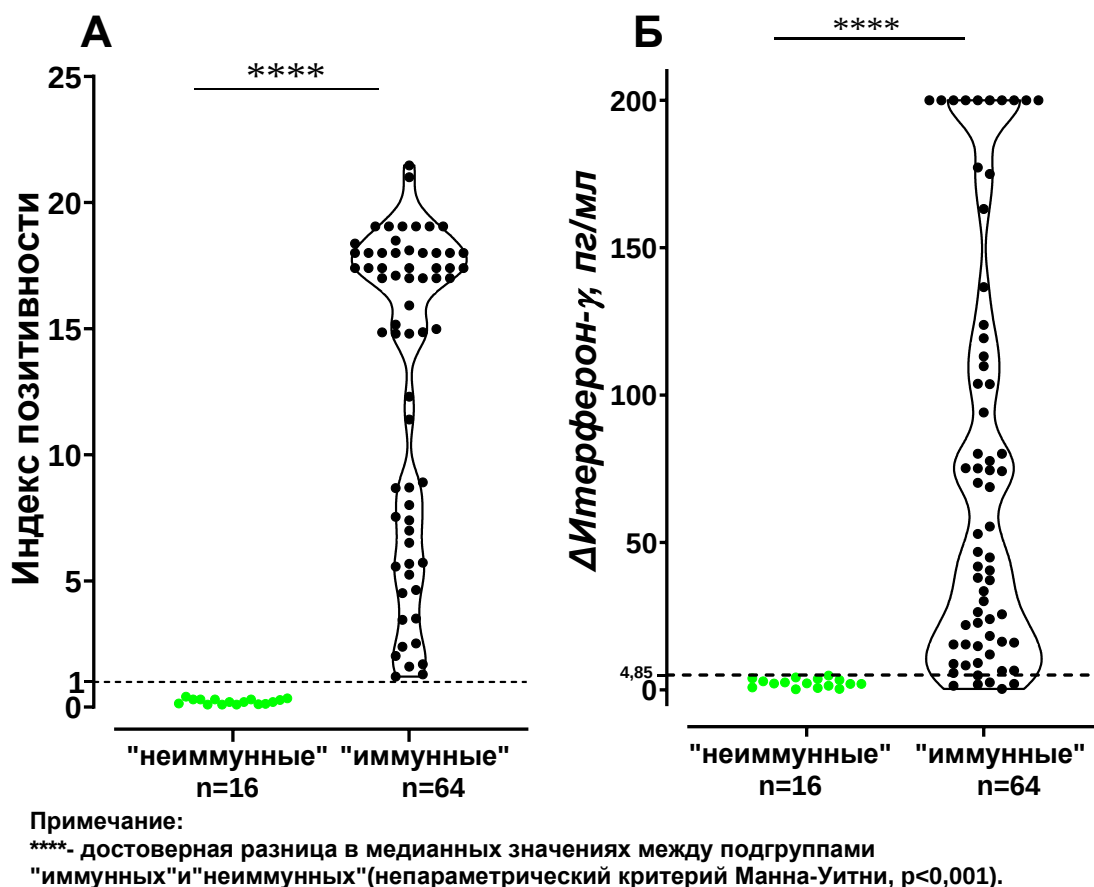


Рисунок 32 – Оценка адаптивного иммунного ответа к SARS-CoV-2: **А.** Уровень антител IgG (в относительных единицах ИП) в сыворотке крови пациентов с наличием (n=64, черные точки) или отсутствием (n=16, зеленые точки) иммунизации в анамнезе; **Б.** Превышение уровня IFN- γ над базовым (в пг/мл, шкала по оси Y) у тех же пациентов

На основании полученных данных для выборки пациентов, «иммунных» и «неиммунных» в отношении SARS-CoV-2, была построена кривая ROC зависимости (Рисунок 33). Пороговое значение, определяющее достоверно значимое превышение уровня IFN- γ после стимуляции над исходным уровнем, определяли как Δ IFN- γ , для которого сумма чувствительности и специфичности (то есть процентной согласованности выраженности интерферонового ответа (IFN- γ) к иммунному статусу в анамнезе) была максимальной. Эта величина составила 4,85 пг/мл. Иными словами, в исследовании люди, демонстрирующие в разработанном ИГРА-тесте интерфероновый ответ на уровне 4,85 пг/мл и более, с вероятностью 92,2 % (ДИ 95 %: 83-96,6 %), попадали в когорту «иммунных»; люди с интерфероновым ответом менее 4,85 пг/мл в 100% случаев (ДИ 95 %: 80,6-100 %)

попадали в когорту «неиммунных». В дальнейших исследованиях первых классифицировали как «имеющих клеточный иммунный ответ к SARS-CoV-2», вторых, соответственно – как не имеющих такового.

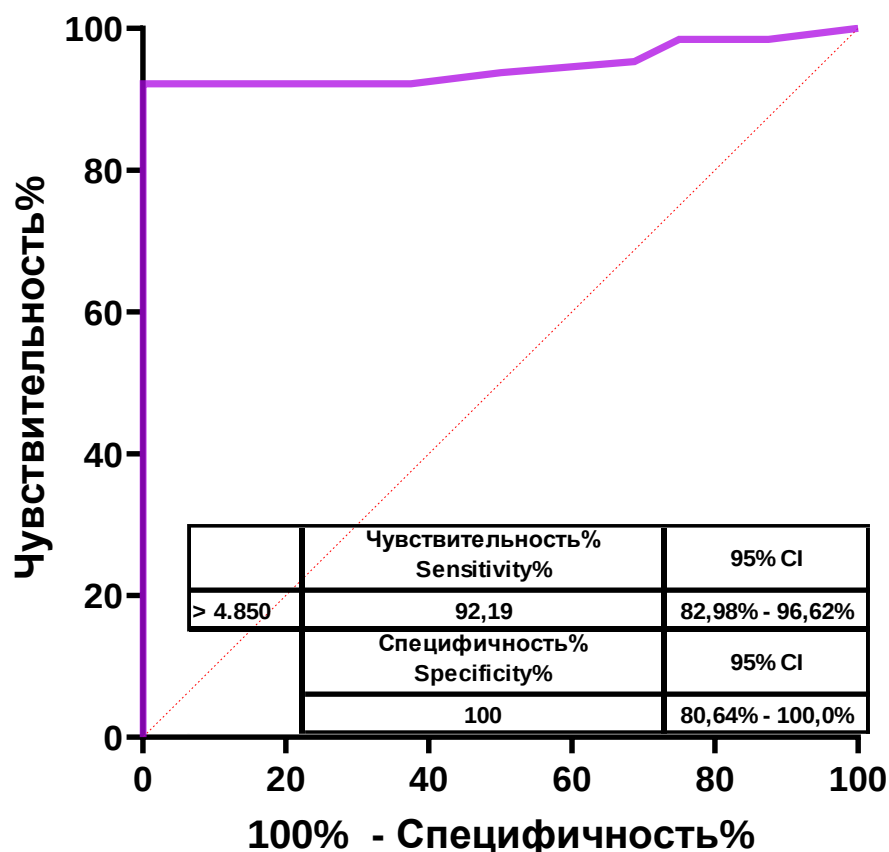


Рисунок 33 – Кривая ROC результатов ИГРА-теста для «иммунных» в сравнении с «неиммунными» донорами

Следует отметить, что пороговое значение, определяющее достоверно значимое превышение уровня IFN- γ после стимуляции над исходным уровнем, было проведено на ограниченной выборке, включающей всего шестнадцать «неиммунных» образцов. Здесь, однако, дальнейшие исследования столкнулось с объективными сложностями. За время оптимизации метода определения Т-клеточного иммунитета, в связи с широкими программами вакцинации населения и вспышкой заболеваемости вариантом «Омикрон» SARS-CoV-2 в декабре-феврале 2022 г., доля людей с наивным иммунным статусом в отношении SARS-CoV-2 резко сократилась.

В результате был разработан ИГРА-тест для оценки Т-клеточного иммунитета к SARS-CoV-2. Задачей следующего этапа исследования было изучение Т-клеточного иммунитета к SARS-CoV-2 у людей с постинфекционным и поствакцинальным иммунитетом.

3.2.2 Оценка Т-клеточного иммунного ответа при помощи ИГРА-теста на выборке добровольцев с гибридным иммунитетом

На втором этапе работы было проведено исследование выборки из 258 добровольцев, образцы цельной крови которых были получены в сентябре – октябре 2022 года. Характеристика выборки пациентов представлена в Таблице 12.

Таблица 12 – Общая характеристики пациентов, исследованных на наличие Т-клеточного иммунитета к SARS-CoV-2

<i>Характеристика</i>	<i>Фактор</i>	<i>Общее</i>	<i>Вакцинация «Спутник V»</i>	<i>COVID-19 в анамнезе</i>
<i>Доноры</i>	Количество	258	258 (100%)	198 (76,7%)
<i>Возраст</i>	Медиана возраста Диапазон (мин.-макс)	43 19-73	43 19-73	43 19-73
<i>Пол</i>	Муж. Жен.	70 (27,1%) 188 (72,9%)	70 (27,1%) 188 (72,9%)	48 (24,2%) 150 (75,8%)

Характеристика выборки образцов SARS-CoV-2 проводилась на основании следующих критериев:

1. Анкетирования (болел/не болел; количество вакцинаций). По итогам анкетирования 258 пациентов либо болели и/или были вакцинированы;
2. Определения антител к RBD SARS-CoV-2 для подтверждения данных, указанных пациентами при анкетировании;
3. Определение Т-клеточного ответа в ИГРА-тесте.

Для всех пациентов были определены концентрация антител класса IgG к RBD SARS-CoV-2 и продукция IFN- γ после стимуляции лимфоцитов пептидным

пулом. Результаты исследования представлены на Рисунке 34А (IgG-антитела к RBD) и Рисунке 34Б (продукция IFN- γ).

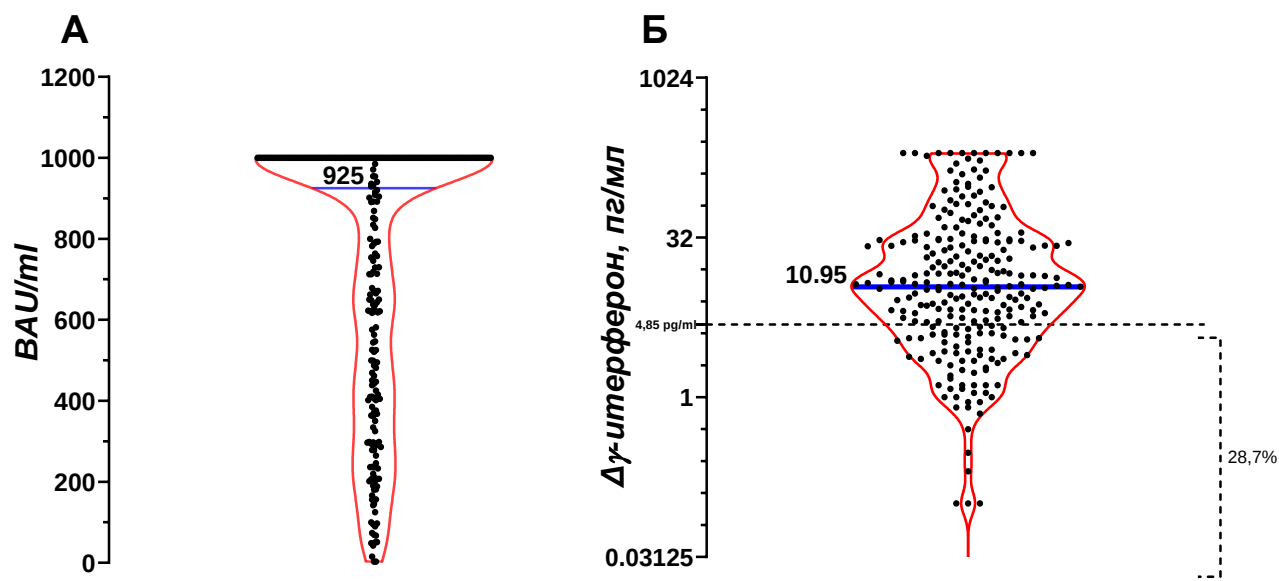


Рисунок 34 – Оценка адаптивного иммунного ответа к SARS-CoV-2: **А.** Уровень антител IgG в сыворотке крови (BAU/мл); **Б.** Превышение уровня IFN- γ над базовым уровнем (4,85 пг/мл) в ИГРА-тесте

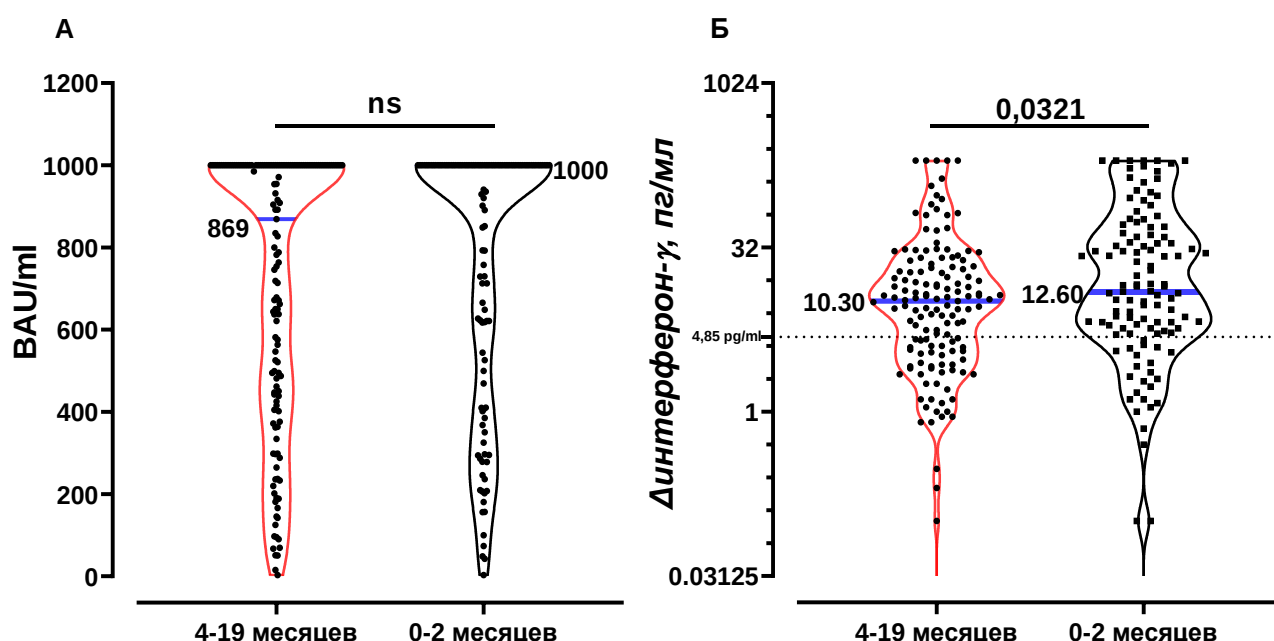
Во всех исследуемых образцах были обнаружены антитела класса G (IgG) к рецептор-связывающему домену SARS-CoV-2. Согласно результатам ИГРА-теста, у 28,7% пациентов (сформированным в результате вакцинации и/или перенесенного заболевания) или поствакцинальным иммунитетом не было выявлено значимого повышения уровня IFN- γ после стимуляции (более 4,85 пг/мл).

Статистический анализ не выявил значимой корреляции между концентрацией антител и уровнем стимулированного IFN- γ во всей группе (Таблица 13).

Таблица 13 – Оценка корреляции между уровнем антител класса G к RBD SARS-CoV-2 и амплитудой превышения уровня IFN- γ над базовым, критерий Спирмена

	BAU/ml vs. Δ IFN- γ
Коэффициент корреляции (Spearman r)	-0,03021
95% доверительный интервал	-0,2957 to 0,2396
P (two-tailed)	0,8235

Сравнение уровней антител IgG и концентрации стимулированного гамма интерферона (Δ IFN- γ) в группах, различающихся по времени, прошедшему с момента последней вакцинации, представлено на Рисунке 35А,Б. В зависимости от времени, прошедшего после последней вакцинации, все пациенты были разделены на две группы: первая группа включала образцы пациентов, прошедших ревакцинацию за 1–2 месяца до взятия крови, вторая — пациентов, вакцинированных за 4 и более.



Примечание:

ns - нет достоверной разницы (непараметрический критерий Манна-Уитни)

Рисунок 35 – Оценка адаптивного иммунного ответа к SARS-CoV-2 в зависимости от времени, прошедшего после последней вакцинации до взятия крови: **А.** Уровень антител IgG и их медианное значение; **Б.** Превышение уровня IFN- γ над базовым уровнем и их медианное значение (по оси Y шкала логарифмическая)

Медианные значения обоих параметров незначительно выше у добровольцев, прошедшей ревакцинацию за 1-2 месяца до проведения исследования, при этом достоверная разницы между двумя выборками была выявлена только при оценке Δ IFN- γ , пг/мл (критерий Манна-Уитни, $p=0,0321$).

Материалы раздела 3.2 опубликованы в [217]

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В период пандемии COVID-19, вызванной SARS-CoV-2, особую актуальность приобрели исследования механизмов формирования и оценки иммунного ответа на эту инфекцию, так как они способствуют разработке эффективных подходов к диагностике, профилактике и лечению. Даже после завершения пандемии понимание особенностей как гуморального, так и клеточного иммунитета к SARS-CoV-2 сохраняет свою значимость для совершенствования этих подходов.

Иммунный ответ на SARS-CoV-2 представляет собой сложный многоуровневый процесс, включающий различные компоненты адаптивного иммунитета. С одной стороны, это выработка специфических антител, способных нейтрализовать вирус, а с другой — активация Т-клеточного иммунитета, играющего ключевую роль в уничтожении инфицированных клеток и обеспечении долгосрочной защиты. Значительный интерес представляет изучение не только количественных характеристик гуморального иммунного ответа, но и его качественных параметров, таких как авидность антител и их нейтрализующая способность.

В представленной работе проведена разработка и валидация тестов для оценки адаптивного иммунного ответа к SARS-CoV-2. Разработанные тесты включали иммуноферментный анализ для оценки уровня антител и их функциональной активности, а также методы анализа Т-клеточного ответа. Эти тесты были использованы для оценки постинфекционного и поствакцинального иммунитета на разных этапах пандемии. Полученные данные могут быть использованы для совершенствования стратегий вакцинации, мониторинга популяционного иммунитета и прогнозирования рисков повторных инфекций.

Одним из направлений работы стала разработка и оптимизация тестов для определения специфических антител класса IgG и их авидности к SARS-CoV-2. Были созданы и успешно зарегистрированы наборы реагентов для качественного

иммуноферментного анализа, демонстрирующие высокие диагностические характеристики. Аналитическая чувствительность разработанной тест-системы, определённая по международному стандарту ВОЗ, находится в пределах 8–12 ВАУ/мл. В ходе исследований на образцах сывороток крови добровольцев, перенёсших COVID-19, вызванную вариантами «Дельта» и «Омикрон», было показано, что разработанная тест-система способна эффективно выявлять антитела, сформировавшиеся в ответ на инфицирование указанными вариантами SARS-CoV-2.

Особое внимание уделялось не только количественной оценке антител, но и их качественным характеристикам — авидности и нейтрализующей способности. Анализ полученных данных выявил особенности гуморального иммунного ответа против SARS-CoV-2. Исследование образцов сывороток крови добровольцев, перенесших COVID-19 однократно на первом этапе пандемии (2020 год), показало увеличение индекса авидности, что свидетельствует о формировании более зрелого гуморального иммунитета, зависящего от времени, прошедшего после реконвалесценции.

Установлено, что индекс авидности может служить важным маркером для оценки риска тяжелого течения заболевания и эффективности защиты при повторных инфекциях. В частности, у пациентов, перенесших повторный COVID-19 в легкой форме индекс авидности был выше, чем у реинфицированных пациентов с тяжелым течением инфекции. Таким образом, в случае с COVID-19 можно предположить, что формирование более зрелого и эффективного гуморального иммунитета коррелирует с более легким течением повторного заболевания. При изучении уровня антител IgG к RBD SARS-CoV-2 были выявлены различия между группами пациентов с разной тяжестью повторного заболевания. У пациентов, перенесших повторную COVID-19 в тяжелой форме, медианное значение индекса позитивности составило 11,7, что достоверно выше, чем в группе добровольцев с легкой формой заболевания (ИП = 7,9; критерий Манна–Уитни, $p = 0,0358$).

Полученные данные подчеркивают важность оценки не только количественных характеристик антител, но и их качественных свойств, таких как авидность, для прогнозирования формирования протективного гуморального иммунного ответа. Важнейшим показателем, отражающим протективность и зрелость гуморального иммунного ответа, является степень созревания антител класса G к рецептор-связывающему домену SARS-CoV-2.

При оценке степени созревания антител класса G к RBD SARS-CoV-2 в зависимости от пути и кратности иммунизации на более поздних этапах пандемии COVID-19 (в 2022 году), когда значительная часть населения уже перенесла инфекцию и/или была вакцинирована, было показано, что индекс авидности в большинстве случаев не превышал 50%. Количество образцов, в которых этот показатель был выше, составило всего 8,8%. Это свидетельствует о незавершенности процесса созревания антител к SARS-CoV-2, несмотря на время, прошедшее после инфицирования или вакцинации, а также на количество полученных доз вакцины. Полученные данные согласуются с предположением о том, что IgG- антитела к SARS-CoV-2 реже проходят полный цикл созревания по сравнению с другими инфекциями. Такая особенность может приводить к реинфекции.

Золотым стандартом для выявления вируснейтрализующих антител считается тест на нейтрализацию вируса в клеточных культурах. Проведение этого анализа требует специальной лаборатории с высоким уровнем биобезопасности из-за работы с вирулентным SARS-CoV-2. Метод характеризуется значительной сложностью и длительностью — выполнение анализа может занять от 48 до 96 часов. В качестве альтернативы традиционному методу предлагается использование псевдовиральной системы (pVNT), которая основана на генетически модифицированных частицах, экспрессирующих S-белок коронавируса. Тем не менее, даже при использовании этой технологии остаются требования к работе с живыми клетками и вирусами, что создает препятствия для масштабного применения.

В настоящем исследовании был разработан суррогатный вируснейтрализующий тест (sVNT) как альтернатива классической реакции нейтрализации. Этот тест предназначен для специфического выявления антител, блокирующих взаимодействие рецептор связывающего домена и рецептора ACE2. В процессе валидации sVNT продемонстрировал высокие диагностические показатели. Сравнительный анализ результатов sVNT и традиционной реакции нейтрализации выявил статистически значимую корреляцию между методами. Тест был успешно протестирован на образцах доноров с поствакцинальным, постинфекционным и гибридным иммунитетом, что подтвердило его применимость для оценки уровня антител, препятствующих взаимодействию RBD и ACE2.

На следующем этапе исследования при помощи разработанного sVNT-теста была изучена иммуногенность кандидатной вакцины против SARS-CoV-2 на стадии доклинических испытаний. Тест sVNT продемонстрировал высокую эффективность для оценки иммуногенности вакцин у различных видов животных, включая собак, коров и трансгенных мышей. Полученные данные подтвердили высокую корреляцию между результатами sVNT и реакции нейтрализации, при этом коэффициенты корреляции находились в диапазоне от 0,8085 до 0,9207 ($p < 0,0001$). Это делает данный тест надежным инструментом для исследовательских целей. Одним из ключевых преимуществ sVNT является универсальность: метод не требует специфических конъюгатов для выявления антител в сыворотках крови разных видов животных. Результаты, полученные для образцов крови трансгенных мышей, собак и коров, хорошо согласуются с данными, полученными для человеческих сывороток. По итогам исследования предложенный sVNT может быть применен в клинической диагностике для мониторинга титров антител у вакцинированных пациентов и реконвалесцентов, а также для подбора донорской плазмы. Метод также применим для оценки эффективности вакцин-кандидатов на доклинических и клинических этапах, а также при разработке лекарственных средств, таких как моноклональные антитела с соответствующим механизмом действия. Важно отметить, что принцип sVNT,

основанный на блокировании взаимодействия антигена патогена с клеточным рецептором, может быть адаптирован для изучения гуморального иммунитета не только к данному патогену, но и к другим вирусам.

Следует отметить, что, хотя гуморальный иммунитет играет важную роль в борьбе с коронавирусом, постоянные мутации в генах, кодирующих поверхностные белки SARS-CoV-2, позволяют вирусу ускользать от гуморального ответа. В связи с этим особое значение приобретает изучение клеточного иммунитета, на который вариабельность вируса оказывает меньшее влияние.

Для оценки формирования клеточного иммунитета к SARS-CoV-2 был разработан тест, основанный на измерении уровня гамма-интерферона, продуцируемого Т-клетками цельной крови в ответ на их стимуляцию специфическими пептидами антигенов SARS-CoV-2. Таким образом, предложенный тест позволяет оценить напряженность Т-клеточного иммунитета к SARS-CoV-2 с высокими диагностическими характеристиками: специфичность – 100% (95% ДИ: 80,6-100%); чувствительность – 92,19% (95% ДИ: 83-96,6%).

На основе установленного порогового значения $\Delta IFN-\gamma$ среди пациентов, вакцинированных «Спутник V» (75,2% которых получили 3–4 дозы), было выявлено 71,3% пациентов с достоверным повышением уровня $IFN-\gamma$ после стимуляции по сравнению с исходным уровнем, что указывает на наличие Т-клеточного ответа. Это позволяет предположить формирование специфического Т-клеточного иммунитета. В подгруппе с гибридным иммунитетом (комбинация перенесенного COVID-19 и вакцинации) доля таких пациентов составила 73,7%, что согласуется с литературными данными о сохранении Т-клеток, продуцирующих $IFN-\gamma$, у двух третей пациентов спустя год после инфекции [238]. У доноров с поствакцинальным иммунитетом этот показатель был ниже — 63,3%. Статистически значимой разницы между группами не выявлено (критерий Манна–Уитни, $p = 0,0782$). Во всех исследуемых образцах были обнаружены антитела класса G к RBD SARS-CoV-2, что свидетельствует о наличии гуморального иммунитета у всех участников выборки. Однако примерно у трети пациентов отсутствовал клеточный иммунитет. Статистический анализ не выявил корреляции

между уровнем антител и уровнем стимулированного IFN- γ . Было показано, что ревакцинация в течение последних 1–2 месяцев усиливает амплитуду интерферонового ответа. Тем не менее, влияние этого показателя на протективность остается недостаточно изученным и рассматривается лишь в ограниченном числе публикаций [239].

Следует отметить, что поиск корреляций между параметрами иммунитета и определение протективного уровня существенно затруднен из-за высокой гетерогенности популяционного иммунитета. На формирование иммунного ответа влияют такие факторы, как тип вакцины, количество введенных доз, временные рамки вакцинации и варианты SARS-CoV-2, циркулирующие в популяции. Дополнительную сложность создает феномен длительных последствий перенесенной инфекции, известный как long COVID. Это состояние сопровождается продолжительными нарушениями функций различных систем организма, включая иммунную систему, что усложняет интерпретацию данных о защите и стабильности иммунного ответа. Наличие long COVID подчеркивает важность углубленного изучения не только краткосрочных, но и долгосрочных эффектов взаимодействия вируса с организмом человека

Кроме того, разработка тестов для оценки иммунного ответа на SARS-CoV-2 открывает перспективы для адаптации и оптимизации этих методов в отношении других вирусов. Многие принципы диагностики, включая выявление антител, анализ цитокинового профиля и оценку активности Т-клеток, могут быть применены для исследования иммунного ответа на другие патогены. Такая универсальность позволяет создавать унифицированные платформы для мониторинга популяционного иммунитета, что особенно важно в условиях пандемий и растущей угрозы появления новых инфекций.

Таким образом, основными задачами в борьбе с инфекциями являются создание новых и совершенствование существующих вакцинных препаратов, которые будут индуцировать протективный иммунный ответ против актуальных вариантов SARS-CoV-2, а также разработка лекарственных средств, направленных на борьбу с вирусом. Немаловажной задачей также является создание адекватных

методик контроля качества вакцинных препаратов и методов оценки как гуморального, так и клеточного иммунитета у людей с постинфекционным, поствакцинальным и гибридным иммунитетом. Оптимизация существующих тестов для других вирусов также может способствовать снижению затрат на разработку диагностических инструментов и ускорению их внедрения в клиническую практику.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны и апробированы наборы реагентов для определения IgG антител к RBD SARS-CoV-2 и их авидности. Чувствительность составила - 99% (ДИ: 86,28-100%, $p < 0,05$) специфичность - 100% (ДИ: 92,89-100%, $p < 0,05$).

2. Установлено, что только у 8,8% вакцинированных и перенесших COVID-19 добровольцев наблюдалось образование аффинно-зрелых IgG-антител к RBD SARS-CoV-2.

3. Показано, что у лиц, перенесших COVID-19 в 2020 году (в период наибольшего распространения варианта «Ухань» SARS-CoV-2), а затем реинфицированных в 2021 году (в период циркуляции варианта «Дельта»), ИА $< 50\%$ (мягкий денатурирующий агент - 4М мочевины) служит маркером для оценки риска тяжелого течения заболевания при повторных инфекциях.

4. Разработана тест система - суррогатный вируснейтрализующий тест - для определения антител, блокирующих взаимодействие RBD SARS-CoV-2 с ACE2 рецептором. Тест показал высокую чувствительность 96% (ДИ $\pm 3,35\%$, $p < 0,05$) и специфичность 100% (ДИ $\pm 0,65\%$, $p < 0,05$).

5. Была установлена высокая степень корреляции между показателем коэффициента подавления и sVNT-титра с титрами ВНА для добровольцев с постинфекционным ($r = 0,8187$, $p < 0,0001$), поствакцинальным ($r = 0,8539$, $p < 0,0001$) и гибридным ($r = 0,8689$, $p < 0,001$) иммунитетом, а также для животных: собак ($r = 0,9151$, $p < 0,0001$), трансгенных мышей ($r = 0,8085$, $p < 0,0001$) и коров ($r = 0,9207$, $p < 0,0001$). В группах добровольцев с постинфекционным, поствакцинальным и гибридным иммунитетами у 9,3%, 5,7% и 7,3%, соответственно, отсутствовали вируснейтрализующие антитела.

6. Разработан и апробирован тест для определения Т-клеточного иммунитета к SARS-CoV-2, основанный на измерении IFN- γ , продуцируемого Т-клетками цельной крови в ответ на их стимуляцию специфическими пептидами антигенов

коронавируса, с чувствительностью 92,2% (ДИ 95%: 83-96,6%) и специфичностью 100% (ДИ 95%: 80,6-100%).

7. Посредством измерения IFN- γ , продуцируемого Т-клетками цельной крови в ответ на их стимуляцию специфическими пептидами антигенов SARS-CoV-2, выявлено, что у 71,3% добровольцев наблюдалась специфическая Т-клеточная реакция.

8. Показано, что в группах добровольцев с гибридным иммунитетом против SARS-CoV-2 корреляции между уровнем антител и уровнем стимулированного IFN- γ не наблюдалось. При сравнении амплитуды превышение уровня IFN- γ над базовым уровнем у групп выборки, отличающихся временем последней вакцинации, медианные значения параметра были выше для части выборки, прошедшей ревакцинацию за 1-2 месяца ($p = 0,0321$).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При изучении напряженности гуморального иммунитета, формируемого в результате перенесенной COVID-19 и/или иммунизации кандидатными вакцинными препаратами, методология теста для оценки индекса авидности антител класса G к RBD SARS-CoV-2, может быть использована для определения количества антител, обладающих наибольшей степенью авидности, которые имеют высокую степень корреляции с титрами вируснейтрализующих антител. Кроме того, данный тест может быть использован в клинической практике как прогностический фактор для оценки риска тяжести течения COVID-19 при реинфекциях.

2. Разработанный в данной работе sVNT-тест, который позволяет выявлять антитела, блокирующие взаимодействие между RBD SARS-CoV-2 и ACE2, в сыворотке/плазме крови людей и различных видов животных, показал высокую степень корреляции с титрами вируснейтрализующих антител, полученными в классической реакции нейтрализации вируса. В связи с этим, данный тест может быть использован в процессе доклинических и клинических испытаний кандидатных вакцинных препаратов, для оценки формирования протективных антител, как аналог классической реакции нейтрализации.

3. Методом, основанным на измерении IFN- γ , продуцируемого Т-клетками цельной крови в ответ на их стимуляцию специфическими антигенами SARS-CoV-2, может быть проведена как оценка формирования клеточно-опосредованного иммунитета к кандидатным вакцинным препаратам против коронавируса, так и для оценки уровня популяционного клеточного иммунитета.

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

ACE2	– ангиотензинпревращающий фермент 2 (Angiotensin-converting enzyme 2)
ADE	– эффект антитело-зависимой активации (antibody-dependent enhancement)
BAU/мл	– единицы связывающих антител (Binding Antibody Units/мл)
COVID-19	– новая коронавирусная инфекция человека, вызванная SARS- CoV-2 (Coronavirus disease 2019,)
CV	– коэффициент вариации (coefficient of variation)
ELISpot	– иммуноферментный клеточный анализ (Enzyme linked immuno spot)
IFN- γ	– интерферон гамма (interferon gamma)
IgA	– иммуноглобулин A (immunoglobulin A)
IgG	– иммуноглобулин G (immunoglobulin G)
IgM	– иммуноглобулин M (immunoglobulin M)
NC	– нуклеокапсидный белок (nucleocapsid protein)
NIBSC	– Национальный институт биологических стандартов и контроля (National Institute for Biological Standards and Control)
RBD	– рецептор-связывающий домен (Receptor-binding domain)
SARS-CoV-2	– второй коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2)
Spike, S- белок	– поверхностный белок вируса SARS-CoV-2
sVNT	– суррогатный вируснейтрализующий тест (surrogate virus neutralization test)
ВНА	– вируснейтрализующие антитела
ВОЗ	– Всемирная организация здравоохранения
ГОСТ	– государственный стандарт
ДИ, CI	– доверительный интервал

ДР	– денатурирующий раствор
ИА	– индекс авидности
ИГРА-тест	– анализ, основанный на высвобождении гамма-интерферона (interferon gamma release assay)
ИП	– индекс позитивности
ИФА	– иммуноферментный анализ
ИХА	– иммунохроматографический анализ
ИХЛА	– иммунохемилюминисцентный анализ
КП	– коэффициент подавления
М	– моль/литр
МЕ	– международная единица
ОП	– оптическая плотность
ТУ	– технические условия
ФБ	– фосфатный буфер

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape / W. T. Harvey, A. M. Carabelli, B. Jackson [et al.] // *Nature Reviews Microbiology*. – 2021. – Vol. 19. – № 7. – P. 409-424. – DOI 10.1038/s41579-021-00573-0.
2. Sette, A. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19 / A. Sette, S. Crotty // *Cell*. – 2021. – Vol. 184. – № 4. – P. 861-880. – DOI 10.1016/J.CELL.2021.01.007.
3. Differential Kinetics of Immune Responses Elicited by Covid-19 Vaccines / A. Y. Collier, J. Yu, K. McMahan [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2021. – Vol. 385. – № 21. – P. 2010-2012. – DOI 10.1056/NEJMC2115596/SUPPL_FILE/NEJMC2115596_DISCLOSURES.PDF.
4. Omicron escapes the majority of existing SARS-CoV-2 neutralizing antibodies / Y. Cao, J. Wang, F. Jian [et al.] // *Nature*. – 2022. – Vol. 602. – № 7898. – P. 657-663. – DOI 10.1038/S41586-021-04385-3.
5. Proal, A. D. Long COVID or Post-acute Sequelae of COVID-19 (PASC): An Overview of Biological Factors That May Contribute to Persistent Symptoms / A. D. Proal, M. B. VanElzakker // *Frontiers in microbiology*. – 2021. – Vol. 12. – DOI 10.3389/FMICB.2021.698169.
6. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin / P. Zhou, X. L. Yang, X. G. Wang [et al.] // *Nature* 2020 579:7798. – 2020. – Vol. 579. – № 7798. – P. 270-273. – DOI 10.1038/s41586-020-2012-7.
7. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2 / J. Shang, G. Ye, K. Shi [et al.] // *Nature* 2020 581:7807. – 2020. – Vol. 581. – № 7807. – P. 221-224. – DOI 10.1038/s41586-020-2179-y.
8. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention / M. Z. Tay, C. M. Poh, L. Rénia [et al.] // *Nature Reviews Immunology* 2020 20:6. – 2020. – Vol. 20. – № 6. – P. 363-374. – DOI 10.1038/s41577-020-0311-8.
9. Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1 / N. van Doremalen, T. Bushmaker, D. H. Morris [et al.] // *The New England journal of medicine*. – 2020. – Vol. 382. – № 16. – P. 1564-1567. – DOI 10.1056/NEJMC2004973.
10. The airborne lifetime of small speech droplets and their potential importance in SARS-CoV-2 transmission / V. Stadnytskyi, C. E. Bax, A. Bax, P. Anfinrud // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2020. – Vol. 117. – № 22. – P. 11875-11877. – DOI 10.1073/pnas.2006874117.

11. WHO. Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020 // ВОЗ: официальный сайт [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020> (дата обращения: 10.10.2023). – Текст: электронный.
12. WHO. Statement on the fifteenth meeting of the IHR (2005) Emergency Committee on the COVID-19 pandemic. // ВОЗ: официальный сайт [Электронный ресурс]. – URL: [https://www.who.int/news/item/05-05-2023-statement-on-the-fifteenth-meeting-of-the-international-health-regulations-\(2005\)-emergency-committee-regarding-the-coronavirus-disease-\(covid-19\)-pandemic](https://www.who.int/news/item/05-05-2023-statement-on-the-fifteenth-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-emergency-committee-regarding-the-coronavirus-disease-(covid-19)-pandemic) (дата обращения: 10.12.2023). – Текст: электронный.
13. Complete Mapping of Mutations to the SARS-CoV-2 Spike Receptor-Binding Domain that Escape Antibody Recognition / A. J. Greaney, T. N. Starr, P. Gilchuk [et al.] // *Cell host & microbe*. – 2021. – Vol. 29. – № 1. – P. 44-57.e9. – DOI 10.1016/J.CHOM.2020.11.007.
14. WHO.COVID-19 cases | WHO COVID-19 dashboard // ВОЗ: официальный сайт [Электронный ресурс]. – URL: <https://data.who.int/dashboards/covid19/cases> (дата обращения: 1.02.2025). – Текст: электронный.
15. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China / F. Wu, S. Zhao, B. Yu [et al.] // *Nature*. – 2020. – Vol. 579. – № 7798. – P. 265-269. – DOI 10.1038/S41586-020-2008-3.
16. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2 / A. E. Gorbalenya, S. C. Baker, R. S. Baric [et al.] // *Nature microbiology*. – 2020. – Vol. 5. – № 4. – P. 536-544. – DOI 10.1038/S41564-020-0695-Z.
17. The molecular virology of coronaviruses / E. Hartenian, D. Nandakumar, A. Lari [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2020. – Vol. 295. – № 37. – P. 12910-12934. – DOI 10.1074/jbc.REV120.013930
18. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells / C. B. Jackson, M. Farzan, B. Chen, H. Choe // *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2021 23:1. – 2021. – Vol. 23. – № 1. – P. 3-20. – DOI 10.1038/s41580-021-00418-x.
19. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein / A. C. Walls, Y. J. Park, M. A. Tortorici [et al.] // *Cell*. – 2020. – Vol. 181. – № 2. – P. 281-292.e6. – DOI 10.1016/J.CELL.2020.02.058.
20. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis / I. Hamming, W. Timens, M. L. C.

Bulthuis [et al.] // The Journal of pathology. – 2004. – Vol. 203. – № 2. – P. 631-637. – DOI 10.1002/PATH.1570.

21. Role of Structural and Non-Structural Proteins and Therapeutic Targets of SARS-CoV-2 for COVID-19 / R. Yadav, J. K. Chaudhary, N. Jain [et al.] // Cells 2021, Vol. 10, Page 821. – 2021. – Vol. 10. – № 4. – P. 821. – DOI 10.3390/CELLS10040821.

22. Brémaud, E. Deciphering the Assembly of Enveloped Viruses Using Model Lipid Membranes / E. Brémaud, C. Favard, D. Muriaux // Membranes 2022, Vol. 12, Page 441. – 2022. – Vol. 12. – № 5. – P. 441-441. – DOI 10.3390/MEMBRANES12050441.

23. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor / M. Hoffmann, H. Kleine-Weber, S. Schroeder [et al.] // Cell. – 2020. – Vol. 181. – № 2. – P. 271-280.e8. – DOI 10.1016/J.CELL.2020.02.052.

24. Evidence that TMPRSS2 activates the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein for membrane fusion and reduces viral control by the humoral immune response / I. Glowacka, S. Bertram, M. A. Müller [et al.] // Journal of virology. – 2011. – Vol. 85. – № 9. – P. 4122-4134. – DOI 10.1128/JVI.02232-10.

25. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2 / P. V'kovski, A. Kratzel, S. Steiner [et al.] // Nature Reviews Microbiology 2020 19:3. – 2020. – Vol. 19. – № 3. – P. 155-170. – DOI 10.1038/s41579-020-00468-6.

26. A unifying structural and functional model of the coronavirus replication organelle: Tracking down RNA synthesis / E. J. Snijder, R. W. A. L. Limpens, A. H. de Wilde [et al.] // PLOS Biology. – 2020. – Vol. 18. – № 6. – P. e3000715-e3000715. – DOI 10.1371/JOURNAL.PBIO.3000715.

27. A molecular pore spans the double membrane of the coronavirus replication organelle / G. Wolff, R. W. A. L. Limpens, J. C. Zevenhoven-Dobbe [et al.] // Science (New York, N.Y.). – 2020. – Vol. 369. – № 6509. – P. 1395-1398. – DOI 10.1126/SCIENCE.ABD3629.

28. Fehr, A. R. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis / A. R. Fehr, S. Perlman // Methods in molecular biology (Clifton, N.J.). – 2015. – Vol. 1282. – P. 1-23. – DOI 10.1007/978-1-4939-2438-7_1.

29. Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein / S. Belouzard, J. K. Millet, B. N. Licitra, G. R. Whittaker // Viruses. – 2012. – Vol. 4. – № 6. – P. 1011-1033. – DOI 10.3390/V4061011.

30. Temporal signal and the phylodynamic threshold of SARS-CoV-2 / S. Duchene, L. Featherstone, M. Haritopoulou-Sinanidou [et al.] // Virus Evolution. – 2020. – Vol. 6. – № 2. – DOI 10.1093/VE/VEAA061.

31. Koyama, T. Variant analysis of SARS-cov-2 genomes / T. Koyama, D. Platt, L. Parida // Bulletin of the World Health Organization. – 2020. – Vol. 98. – № 7. – P. 495-504. – DOI 10.2471/BLT.20.253591.
32. Antibody resistance of SARS-CoV-2 variants B.1.351 and B.1.1.7 / P. Wang, M. S. Nair, L. Liu [et al.] // Nature. – 2021. – Vol. 593. – № 7857. – P. 130-135. – DOI 10.1038/S41586-021-03398-2.
33. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2 / J. Shang, Y. Wan, C. Luo [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2020. – Vol. 117. – № 21. – DOI 10.1073/PNAS.2003138117.
34. SARS-CoV-2-associated lymphopenia: possible mechanisms and the role of CD147 / S. Shouman, N. El-Kholy, A. E. Hussien [et al.] // Cell communication and signaling : CCS. – 2024. – Vol. 22. – № 1. – DOI 10.1186/S12964-024-01718-3.
35. The diverse role of heparan sulfate and other GAGs in SARS-CoV-2 infections and therapeutics / F. Eilts, S. Bauer, K. Fraser [et al.] // Carbohydrate polymers. – 2023. – Vol. 299. – DOI 10.1016/J.CARBPOL.2022.120167.
36. Gudowska-Sawczuk, M. The Role of Neuropilin-1 (NRP-1) in SARS-CoV-2 Infection: Review / M. Gudowska-Sawczuk, B. Mroczko // Journal of clinical medicine. – 2021. – Vol. 10. – № 13. – DOI 10.3390/JCM10132772.
37. Mutational spectrum of SARS-CoV-2 during the global pandemic / K. Yi, S. Y. Kim, T. Bleazard [et al.] // Experimental & Molecular Medicine 2021 53:8. – 2021. – Vol. 53. – № 8. – P. 1229-1237. – DOI 10.1038/s12276-021-00658-z.
38. Emergence of genomic diversity and recurrent mutations in SARS-CoV-2 / L. van Dorp, M. Acman, D. Richard [et al.] // Infection, Genetics and Evolution. – 2020. – Vol. 83. – P. 104351. – DOI 10.1016/J.MEEGID.2020.104351.
39. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019 / N. Zhu, D. Zhang, W. Wang [et al.] // The New England journal of medicine. – 2020. – Vol. 382. – № 8. – P. 727-733. – DOI 10.1056/NEJMOA2001017.
40. Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England / N. G. Davies, S. Abbott, R. C. Barnard [et al.] // Science (New York, N.Y.). – 2021. – Vol. 372. – № 6538. – DOI 10.1126/SCIENCE.ABG3055.
41. Risk of mortality in patients infected with SARS-CoV-2 variant of concern 202012/1: matched cohort study / R. Challen, E. Brooks-Pollock, J. M. Read [et al.] // BMJ (Clinical research ed.). – 2021. – Vol. 372. – DOI 10.1136/BMJ.N579.
42. Transmission of SARS-CoV-2 Lineage B.1.1.7 in England: Insights from linking epidemiological and genetic data / E. Volz, S. Mishra, M. Chand [et al.] // medRxiv. – 2021. – DOI 10.1101/2020.12.30.20249034.

43. Emergence and rapid spread of a new severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 (SARS-CoV-2) lineage with multiple spike mutations in South Africa / H. Tegally, E. Wilkinson, M. Giovanetti [et al.]. – 2020. – DOI 10.1101/2020.12.21.20248640:
44. Escape of SARS-CoV-2 501Y.V2 from neutralization by convalescent plasma / S. Cele, I. Gazy, L. Jackson [et al.]. – 2021. – DOI 10.1101/2021.01.26.21250224.
45. Genomics and epidemiology of the P.1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil / N. R. Faria, T. A. Mellan, C. Whittaker [et al.] // Science (New York, N.Y.). – 2021. – Vol. 372. – № 6544. – DOI 10.1126/SCIENCE.ABH2644.
46. Increased transmissibility and global spread of SARSCoV- 2 variants of concern as at June 2021 / F. Campbell, B. Archer, H. Laurenson-Schafer [et al.] // Eurosurveillance. – 2021. – Vol. 26. – № 24. – P. 1-6. – DOI 10.2807/1560-7917.ES.2021.26.24.2100509/CITE/REFWORKS.
47. The N501Y spike substitution enhances SARS-CoV-2 transmission / S. Weaver, Y. Liu, J. Liu [et al.]. – 2021. – DOI 10.21203/RS.3.RS-311070/V1.
48. Reduced sensitivity of SARS-CoV-2 variant Delta to antibody neutralization / D. Planas, D. Veyer, A. Baidaliuk [et al.] // Nature 2021 596:7871. – 2021. – Vol. 596. – № 7871. – P. 276-280. – DOI 10.1038/s41586-021-03777-9.
49. SARS-CoV-2 Delta VOC in Scotland: demographics, risk of hospital admission, and vaccine effectiveness / A. Sheikh, J. McMenamin, B. Taylor, C. Robertson // The Lancet. – 2021. – Vol. 397. – № 10293. – P. 2461-2462. – DOI 10.1016/S0140-6736(21)01358-1.
50. SARS-CoV-2 Omicron variant causes mild pathology in the upper and lower respiratory tract of hamsters / F. Armando, G. Beythien, F. K. Kaiser [et al.] // Nature communications. – 2022. – Vol. 13. – № 1. – DOI 10.1038/S41467-022-31200-Y.
51. Evolution of the SARS-CoV-2 omicron variants BA.1 to BA.5: Implications for immune escape and transmission / L. B. Shrestha, C. Foster, W. Rawlinson [et al.] // Reviews in medical virology. – 2022. – Vol. 32. – № 5. – DOI 10.1002/RMV.2381.
52. Karim, S. S. A. Omicron SARS-CoV-2 variant: a new chapter in the COVID-19 pandemic / S. S. A. Karim, Q. A. Karim // The Lancet. – 2021. – Vol. 398. – № 10317. – P. 2126-2128. – DOI 10.1016/S0140-6736(21)02758-6.
53. Receptor Binding for the Entry Mechanisms of SARS-CoV-2: Insights from the Original Strain and Emerging Variants / M. Mahdi, I. W. Kiarie, J. A. Mótyán [et al.] // Viruses 2025, Vol. 17, Page 691. – 2025. – Vol. 17. – № 5. – P. 691. – DOI 10.3390/V17050691.

54. Murphy, K. W. Janeway's: Immunobiology / K. Murphy, C. Weaver. – New York Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC., 2017. – P. 1-277. – ISBN 9780815345053 – Текст : непосредственный
55. Abbas, A. K. . Cellular and molecular immunology / A. K. . Abbas, A. H. Lichtman, S. Pillai. – Elsevier Health Sciences, 2015. – P. 117-164. – ISBN 0323286453 – Текст : непосредственный
56. T cell immunity is key to the pandemic endgame: How to measure and monitor it / M. Schwarz, S. Mzoughi, D. Lozano-Ojalvo [et al.] // Current Research in Immunology. – 2022. – Vol. 3. – P. 215-221. – DOI 10.1016/J.CRIMMU.2022.08.004.
57. Immunology of COVID-19: Current State of the Science / N. Vabret, G. J. Britton, C. Gruber [et al.] // Immunity. – 2020. – Vol. 52. – № 6. – P. 910-941. – DOI 10.1016/J.IMMUNI.2020.05.002.
58. Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19 / D. Blanco-Melo, B. E. Nilsson-Payant, W. C. Liu [et al.] // Cell. – 2020. – Vol. 181. – № 5. – P. 1036-1045.e9. – DOI 10.1016/J.CELL.2020.04.026.
59. Systems biological assessment of immunity to mild versus severe COVID-19 infection in humans / P. S. Arunachalam, F. Wimmers, C. K. P. Mok [et al.] // Science (New York, N.Y.). – 2020. – Vol. 369. – № 6508. – P. 1210-1220. – DOI 10.1126/SCIENCE.ABC6261.
60. Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19 / P. Bastard, L. B. Rosen, Q. Zhang [et al.] // Science (New York, N.Y.). – 2020. – Vol. 370. – № 6515. – DOI 10.1126/SCIENCE.ABD4585.
61. Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19 / M. Liao, Y. Liu, J. Yuan [et al.] // Nature medicine. – 2020. – Vol. 26. – № 6. – P. 842-844. – DOI 10.1038/S41591-020-0901-9.
62. Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity / C. R. Moderbacher, S. I. Ramirez, J. M. Dan [et al.] // Cell. – 2020. – Vol. 183. – № 4. – P. 996-1012.e19. – DOI 10.1016/J.CELL.2020.09.038.
63. Acute SARS-CoV-2 Infection Impairs Dendritic Cell and T Cell Responses / R. Zhou, K. K. W. To, Y. C. Wong [et al.] // Immunity. – 2020. – Vol. 53. – № 4. – P. 864-877.e5. – DOI 10.1016/J.IMMUNI.2020.07.026.
64. Robust T Cell Immunity in Convalescent Individuals with Asymptomatic or Mild COVID-19 / T. Sekine, A. Perez-Potti, O. Rivera-Ballesteros [et al.] // Cell. – 2020. – Vol. 183. – № 1. – P. 158-168.e14. – DOI 10.1016/J.CELL.2020.08.017.

65. Convergent antibody responses to SARS-CoV-2 in convalescent individuals / D. F. Robbani, C. Gaebler, F. Muecksch [et al.] // *Nature*. – 2020. – Vol. 584. – № 7821. – P. 437-442. – DOI 10.1038/S41586-020-2456-9.
66. Neutrophil extracellular traps infiltrate the lung airway, interstitial, and vascular compartments in severe COVID-19 / C. Radermecker, N. Detrembleur, J. Guiot [et al.] // *The Journal of experimental medicine*. – 2020. – Vol. 217. – № 12. – DOI 10.1084/JEM.20201012.
67. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection / J. M. Dan, J. Mateus, Y. Kato [et al.]. – Text : electronic // *Science* (New York, N.Y.). – 2021. – Vol. 371. – № 6529. – DOI 10.1126/SCIENCE.ABF4063.
68. IgA-Ab response to spike glycoprotein of SARS-CoV-2 in patients with COVID-19: A longitudinal study / A. Padoan, L. Sciacovelli, D. Basso [et al.] // *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. – 2020. – Vol. 507. – P. 164-166. – DOI 10.1016/J.CCA.2020.04.026.
69. Profiling Early Humoral Response to Diagnose Novel Coronavirus Disease (COVID-19) / L. Guo, L. Ren, S. Yang [et al.] // *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. – 2020. – Vol. 71. – № 15. – P. 778-785. – DOI 10.1093/CID/CIAA310.
70. Persistence of serum and saliva antibody responses to SARS-CoV-2 spike antigens in COVID-19 patients / B. Isho, K. T. Abe, M. Zuo [et al.] // *Science immunology*. – 2020. – Vol. 5. – № 52. – DOI 10.1126/SCIIMMUNOL.ABE5511.
71. Longitudinal observation and decline of neutralizing antibody responses in the three months following SARS-CoV-2 infection in humans / J. Seow, C. Graham, B. Merrick [et al.] // *Nature microbiology*. – 2020. – Vol. 5. – № 12. – P. 1598-1607. – DOI 10.1038/S41564-020-00813-8.
72. Stavnezer, J. Mechanism and regulation of class switch recombination / J. Stavnezer, J. E. J. Guikema, C. E. Schrader // *Annual review of immunology*. – 2008. – Vol. 26. – P. 261-292. – DOI 10.1146/ANNUREV.IMMUNOL.26.021607.090248.
73. Antibody Responses to SARS-CoV-2 in Patients With Novel Coronavirus Disease 2019 / J. Zhao, Q. Yuan, H. Wang [et al.] // *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. – 2020. – Vol. 71. – № 16. – P. 2027-2034. – DOI 10.1093/CID/CIAA344.
74. Meyer, B. Serological assays for emerging coronaviruses: challenges and pitfalls / B. Meyer, C. Drosten, M. A. Müller // *Virus research*. – 2014. – Vol. 194. – P. 175-183. – DOI 10.1016/J.VIRUSRES.2014.03.018.
75. Chronological evolution of IgM, IgA, IgG and neutralisation antibodies after infection with SARS-associated coronavirus / P. R. Hsueh, L. M. Huang, P. J. Chen [et

al.] // *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. – 2004. – Vol. 10. – № 12. – P. 1062-1066. – DOI 10.1111/J.1469-0691.2004.01009.X.

76. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study / K. K. W. To, O. T. Y. Tsang, W. S. Leung [et al.] // *The Lancet. Infectious diseases*. – 2020. – Vol. 20. – № 5. – P. 565-574. – DOI 10.1016/S1473-3099(20)30196-1.

77. Kinetics of SARS-CoV-2 specific IgM and IgG responses in COVID-19 patients / B. Sun, Y. Feng, X. Mo [et al.] // *Emerging microbes & infections*. – 2020. – Vol. 9. – № 1. – P. 940-948. – DOI 10.1080/22221751.2020.1762515.

78. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19 / Q. X. Long, B. Z. Liu, H. J. Deng [et al.] // *Nature medicine*. – 2020. – Vol. 26. – № 6. – P. 845-848. – DOI 10.1038/S41591-020-0897-1.

79. Antibody Detection and Dynamic Characteristics in Patients With Coronavirus Disease 2019 / F. Xiang, X. Wang, X. He [et al.] // *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. – 2020. – Vol. 71. – № 8. – P. 1930-1934. – DOI 10.1093/CID/CIAA461.

80. Robust neutralizing antibodies to SARS-CoV-2 infection persist for months / A. Wajnberg, F. Amanat, A. Firpo [et al.] // *Science (New York, N.Y.)*. – 2020. – Vol. 370. – № 6521. – P. 1227-1230. – DOI 10.1126/SCIENCE.ABD7728.

81. Compromised Humoral Functional Evolution Tracks with SARS-CoV-2 Mortality / T. Zohar, C. Loos, S. Fischinger [et al.] // *Cell*. – 2020. – Vol. 183. – № 6. – P. 1508-1519.e12. – DOI 10.1016/j.cell.2020.10.052.

82. Evaluation of commercial and automated SARS-CoV-2 IgG and IgA ELISAs using coronavirus disease (COVID-19) patient samples / A. J. Jääskeläinen, E. Kekäläinen, H. Kallio-Kokko [et al.] // *Eurosurveillance*. – 2020. – Vol. 25. – № 18. – P. 2000603-2000603. – DOI 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.18.2000603.

83. Quick COVID-19 Healers Sustain Anti-SARS-CoV-2 Antibody Production / Y. Chen, A. Zuiani, S. Fischinger [et al.] // *Cell*. – 2020. – Vol. 183. – № 6. – P. 1496-1507.e16. – DOI 10.1016/J.CELL.2020.10.051.

84. Cross-Sectional Evaluation of Humoral Responses against SARS-CoV-2 Spike / J. Prévost, R. Gasser, G. Beaudoin-Bussièrès [et al.] // *Cell reports. Medicine*. – 2020. – Vol. 1. – № 7. – DOI 10.1016/J.XCRM.2020.100126.

85. Detection, prevalence, and duration of humoral responses to SARS-CoV-2 under conditions of limited population exposure / T. J. Ripperger, J. L. Uhrlaub, M. Watanabe

[et al.] // medRxiv: the preprint server for health sciences. – 2020. – DOI 10.1101/2020.08.14.20174490.

86. Mucosal versus systemic antibody responses to SARS-CoV-2 antigens in COVID-19 patients / B. Isho, K. T. Abe, M. Zuo [et al.] // medRxiv. – 2020. – P. 2020.08.01.20166553-2020.08.01.20166553. – DOI 10.1101/2020.08.01.20166553.

87. Persistence and decay of human antibody responses to the receptor binding domain of SARS-CoV-2 spike protein in COVID-19 patients / A. S. Iyer, F. K. Jones, A. Nodoushani [et al.] // Science immunology. – 2020. – Vol. 5. – № 52. – DOI 10.1126/SCIIMMUNOL.ABE0367.

88. Humoral Immune Response to SARS-CoV-2 in Iceland / D. F. Gudbjartsson, G. L. Norddahl, P. Melsted [et al.] // The New England journal of medicine. – 2020. – Vol. 383. – № 18. – P. 1724-1734. – DOI 10.1056/NEJMOA2026116.

89. Palm, A. K. E. Remembrance of Things Past: Long-Term B Cell Memory After Infection and Vaccination / A. K. E. Palm, C. Henry // Frontiers in immunology. – 2019. – Vol. 10. – P. 1787-1787. – DOI 10.3389/FIMMU.2019.01787.

90. A systematic review of antibody mediated immunity to coronaviruses: kinetics, correlates of protection, and association with severity / A. T. Huang, B. Garcia-Carreras, M. D. T. Hitchings [et al.] // Nature communications. – 2020. – Vol. 11. – № 1. – DOI 10.1038/S41467-020-18450-4.

91. COVID-19 diagnostics in context / R. Weissleder, H. Lee, J. Ko, M. J. Pittet // Science translational medicine. – 2020. – Vol. 12. – № 546. – DOI 10.1126/SCITRANSLMED.ABC1931.

92. SARS-CoV-2 neutralizing antibody structures inform therapeutic strategies / C. O. Barnes, C. A. Jette, M. E. Abernathy [et al.] // Nature. – 2020. – Vol. 588. – № 7839. – P. 682-687. – DOI 10.1038/S41586-020-2852-1.

93. Potently neutralizing and protective human antibodies against SARS-CoV-2 / S. J. Zost, P. Gilchuk, J. B. Case [et al.] // Nature. – 2020. – Vol. 584. – № 7821. – P. 443-449. – DOI 10.1038/S41586-020-2548-6.

94. Mapping Neutralizing and Immunodominant Sites on the SARS-CoV-2 Spike Receptor-Binding Domain by Structure-Guided High-Resolution Serology / L. Piccoli, Y. J. Park, M. A. Tortorici [et al.] // Cell. – 2020. – Vol. 183. – № 4. – P. 1024-1042.e21. – DOI 10.1016/J.CELL.2020.09.037.

95. Isolation of potent SARS-CoV-2 neutralizing antibodies and protection from disease in a small animal model / T. F. Rogers, F. Zhao, D. Huang [et al.] // Science (New York, N.Y.). – 2020. – Vol. 369. – № 6506. – P. 956-963. – DOI 10.1126/SCIENCE.ABC7520.

96. Extremely potent human monoclonal antibodies from COVID-19 convalescent patients / E. Andreano, E. Nicastri, I. Paciello [et al.] // *Cell*. – 2021. – Vol. 184. – № 7. – P. 1821-1835.e16. – DOI 10.1016/J.CELL.2021.02.035.
97. Krammer, F. SARS-CoV-2 vaccines in development / F. Krammer // *Nature* 2020 586:7830. – 2020. – Vol. 586. – № 7830. – P. 516-527. – DOI 10.1038/s41586-020-2798-3.
98. Ahmed, S. F. Preliminary Identification of Potential Vaccine Targets for the COVID-19 Coronavirus (SARS-CoV-2) Based on SARS-CoV Immunological Studies / S. F. Ahmed, A. A. Quadeer, M. R. McKay // *Viruses*. – 2020. – Vol. 12. – № 3. – DOI 10.3390/V12030254.
99. Immunological characterizations of the nucleocapsid protein based SARS vaccine candidates / S. J. Liu, C. H. Leng, S. P. Lien [et al.] // *Vaccine*. – 2006. – Vol. 24. – № 16. – P. 3100-3108. – DOI 10.1016/J.VACCINE.2006.01.058.
100. Viral epitope profiling of COVID-19 patients reveals cross-reactivity and correlates of severity / E. Shrock, E. Fujimura, T. Kula [et al.] // *Science (New York, N.Y.)*. – 2020. – Vol. 370. – № 6520. – DOI 10.1126/SCIENCE.ABD4250.
101. Heterogeneous antibodies against SARS-CoV-2 spike receptor binding domain and nucleocapsid with implications for COVID-19 immunity / K. M. McAndrews, D. P. Dowlatshahi, J. Dai [et al.] // *JCI insight*. – 2020. – Vol. 5. – № 18. – DOI 10.1172/JCI.INSIGHT.142386.
102. Vaccine efficacy in senescent mice challenged with recombinant SARS-CoV bearing epidemic and zoonotic spike variants / D. Deming, T. Sheahan, M. Heise [et al.] // *PLoS medicine*. – 2006. – Vol. 3. – № 12. – P. 2359-2375. – DOI 10.1371/JOURNAL.PMED.0030525.
103. Primary exposure to SARS-CoV-2 protects against reinfection in rhesus macaques / W. Deng, L. Bao, J. Liu [et al.] // *Science (New York, N.Y.)*. – 2020. – Vol. 369. – № 6505. – P. 818-823. – DOI 10.1126/SCIENCE.ABC5343.
104. SARS-CoV-2 infection protects against rechallenge in rhesus macaques / A. Chandrashekar, J. Liu, A. J. Martino [et al.] // *Science (New York, N.Y.)*. – 2020. – Vol. 369. – № 6505. – P. 812-817. – DOI 10.1126/SCIENCE.ABC4776.
105. Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections / Q. X. Long, X. J. Tang, Q. L. Shi [et al.] // *Nature medicine*. – 2020. – Vol. 26. – № 8. – P. 1200-1204. – DOI 10.1038/S41591-020-0965-6.
106. SARS-CoV-2 infection induces sustained humoral immune responses in convalescent patients following symptomatic COVID-19 / J. Wu, B. Liang, C. Chen [et al.] // *Nature communications*. – 2021. – Vol. 12. – № 1. – DOI 10.1038/S41467-021-22034-1.

107. Orthogonal SARS-CoV-2 Serological Assays Enable Surveillance of Low-Prevalence Communities and Reveal Durable Humoral Immunity / T. J. Ripberger, J. L. Uhrlaub, M. Watanabe [et al.] // *Immunity*. – 2020. – Vol. 53. – № 5. – P. 925-933.e4. – DOI 10.1016/J.IMMUNI.2020.10.004.
108. Оценка формирования и напряженности адаптивного иммунитета у переболевших COVID-19 / Иванова И.А., Филиппенко А.В., Труфанова А.А. [и др.] // *Инфекция и иммунитет*. – 2023. – Vol. 13. – № 2. – P. 319-328. – DOI 10.15789/2220-7619-AOF-2107.
109. Evolution of antibody immunity to SARS-CoV-2 / C. Gaebler, Z. Wang, J. C. C. Lorenzi [et al.] // *Nature*. – 2021. – Vol. 591. – № 7851. – P. 639-644. – DOI 10.1038/S41586-021-03207-W.
110. Slifka, M. K. Long-lived plasma cells: a mechanism for maintaining persistent antibody production / M. K. Slifka, R. Ahmed // *Current opinion in immunology*. – 1998. – Vol. 10. – № 3. – P. 252-258. – DOI 10.1016/S0952-7915(98)80162-3.
111. The generation of antibody-secreting plasma cells / S. L. Nutt, P. D. Hodgkin, D. M. Tarlinton, L. M. Corcoran // *Nature reviews. Immunology*. – 2015. – Vol. 15. – № 3. – P. 160-171. – DOI 10.1038/NRI3795.
112. The half-lives of IgG subclasses and specific antibodies in patients with primary immunodeficiency who are receiving intravenously administered immunoglobulin. / S. Mankarious, M. Lee, S. Fischer [et al.] // *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. – 1988. – Vol. 112. – № 5. – P. 634-640.
113. COVID-19-neutralizing antibodies predict disease severity and survival / W. F. Garcia-Beltran, E. C. Lam, M. G. Astudillo [et al.] // *Cell*. – 2020. – Vol. 184. – № 2. – P. 476-476. – DOI 10.1016/J.CELL.2020.12.015.
114. COVID-19 survival associates with the immunoglobulin response to the SARS-CoV-2 spike receptor binding domain / M. Secchi, E. Bazzigaluppi, C. Brigatti [et al.] // *The Journal of clinical investigation*. – 2020. – Vol. 130. – № 12. – P. 6366-6378. – DOI 10.1172/JCI142804.
115. Extrafollicular B cell responses correlate with neutralizing antibodies and morbidity in COVID-19 / M. C. Woodruff, R. P. Ramonell, D. C. Nguyen [et al.] // *Nature immunology*. – 2020. – Vol. 21. – № 12. – P. 1506-1516. – DOI 10.1038/S41590-020-00814-Z.
116. Siracusano, G. Humoral Immune Responses in COVID-19 Patients: A Window on the State of the Art / G. Siracusano, C. Pastori, L. Lopalco // *Frontiers in immunology*. – 2020. – Vol. 11. – DOI 10.3389/FIMMU.2020.01049.

117. Antibody Profiles in Mild and Severe Cases of COVID-19 / Z. L. Liu, Y. Liu, L. G. Wan [et al.] // *Clinical chemistry*. – 2020. – Vol. 66. – № 8. – P. 1102-1104. – DOI 10.1093/CLINCHEM/HVAA137.
118. SARS-CoV-2 neutralizing antibody responses are more robust in patients with severe disease / P. Wang, L. Liu, M. S. Nair [et al.] // *Emerging microbes & infections*. – 2020. – Vol. 9. – № 1. – P. 2091-2093. – DOI 10.1080/22221751.2020.1823890.
119. Bauer, G. The potential significance of high avidity immunoglobulin G (IgG) for protective immunity towards SARS-CoV-2 / G. Bauer // *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. – 2021. – Vol. 106. – P. 61-64. – DOI 10.1016/J.IJID.2021.01.061.
120. Bauer, G. The variability of the serological response to SARS-corona virus-2: Potential resolution of ambiguity through determination of avidity (functional affinity) / G. Bauer // *Journal of medical virology*. – 2021. – Vol. 93. – № 1. – P. 311-322. – DOI 10.1002/JMV.26262.
121. The challenge of avidity determination in SARS-CoV-2 serology / G. Bauer, F. Struck, P. Schreiner [et al.] // *Journal of medical virology*. – 2021. – Vol. 93. – № 5. – P. 3092-3104. – DOI 10.1002/JMV.26863.
122. Бабаченко И. В. Клинические рекомендации (протокол лечения) оказания медицинской помощи детям больным краснухой / И. В. Бабаченко, О. М. Ибрагимова; ФГБУ НИИДИ ФМБА РОССИИ, Общественная организация «Евроазиатское общество по инфекционным болезням», Общественная организация «Ассоциация врачей инфекционистов Санкт-Петербурга и Ленинградской области» (АВИСПО) – URL: <https://library.mededtech.ru/rest/documents/ba8dd601-7b01-40b6-806c-21bf63436a55> (дата обращения 01.12.2023).
124. Иванова Г.П. Федеральные клинические рекомендации (протоколы) по диагностике и лечению вирусных энцефалитов у детей [Электронный ресурс]: утверждены на заседании профильной комиссии в рамках Всероссийского ежегодного конгресса "Инфекционные болезни у детей: диагностика, лечение и профилактика" 8–9 октября 2013 года / подгот.: Г. П. Иванова, Н. В. Скрипченко; – (Национальные клинические рекомендации) – URL: <https://library.ngmu.ru/search/view?mfn=105785&irbisBase=MAIN> (дата обращения 01.12.2023).
125. Toxoplasma gondii-specific IgG avidity testing in pregnant women / C. Garnaud, H. Fricker-Hidalgo, B. Evengård [et al.] // *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. – 2020. – Vol. 26. – № 9. – P. 1155-1160. – DOI 10.1016/J.CMI.2020.04.014.

126. Precision and accuracy of a procedure for detecting recent human immunodeficiency virus infections by calculating the antibody avidity index by an automated immunoassay-based method / B. Suligoi, C. Galli, M. Massi [et al.] // *Journal of clinical microbiology*. – 2002. – Vol. 40. – № 11. – P. 4015-4020. – DOI 10.1128/JCM.40.11.4015-4020.2002.
127. M, D. P. Serological diagnosis of Epstein-Barr virus infection: Problems and solutions / D. P. M, C. P // *World journal of virology*. – 2012. – Vol. 1. – № 1. – P. 31-31. – DOI 10.5501/WJV.V1.I1.31.
128. Junker, A. K. Varicella-zoster virus antibody avidity and IgG-subclass patterns in children with recurrent chickenpox / A. K. Junker, P. Tilley // *Journal of medical virology*. – 1994. – Vol. 43. – № 2. – P. 119-124. – DOI 10.1002/JMV.1890430204.
129. Maternal immunoglobulin G avidity as a diagnostic tool to identify pregnant women at risk of congenital cytomegalovirus infection / M. Kaneko, M. Ohhashi, T. Minematsu [et al.] // *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy*. – 2017. – Vol. 23. – № 3. – P. 173-176. – DOI 10.1016/J.JIAC.2016.12.001.
130. Waning antibody levels and avidity: implications for MMR vaccine-induced protection / M. Kontio, S. Jokinen, M. Paunio [et al.] // *The Journal of infectious diseases*. – 2012. – Vol. 206. – № 10. – P. 1542-1548. – DOI 10.1093/INFDIS/JIS568.
131. Correlation between dengue-specific neutralizing antibodies and serum avidity in primary and secondary dengue virus 3 natural infections in humans / A. Puschnik, L. Lau, E. A. Cromwell [et al.] // *PLoS neglected tropical diseases*. – 2013. – Vol. 7. – № 6. – DOI 10.1371/JOURNAL.PNTD.0002274.
132. Lack of antibody affinity maturation due to poor Toll-like receptor stimulation leads to enhanced respiratory syncytial virus disease / M. F. Delgado, S. Coviello, A. C. Monsalvo [et al.] // *Nature medicine*. – 2009. – Vol. 15. – № 1. – P. 34-41. – DOI 10.1038/NM.1894.
133. GM-CSF DNA: an adjuvant for higher avidity IgG, rectal IgA, and increased protection against the acute phase of a SHIV-89.6P challenge by a DNA/MVA immunodeficiency virus vaccine / L. Lai, D. Vödrös, P. A. Kozlowski [et al.] // *Virology*. – 2007. – Vol. 369. – № 1. – P. 153-167. – DOI 10.1016/J.VIROL.2007.07.017.
134. Antibodies with high avidity to the gp120 envelope protein in protection from simian immunodeficiency virus SIV(mac251) acquisition in an immunization regimen that mimics the RV-144 Thai trial / P. Pegu, M. Vaccari, S. Gordon [et al.] // *Journal of virology*. – 2013. – Vol. 87. – № 3. – P. 1708-1719. – DOI 10.1128/JVI.02544-12.
135. Vaccination versus infection with SARS-CoV-2: Establishment of a high avidity IgG response versus incomplete avidity maturation / F. Struck, P. Schreiner, E. Staschik

[et al.] // Journal of medical virology. – 2021. – Vol. 93. – № 12. – P. 6765-6777. – DOI 10.1002/JMV.27270.

136. Kinetics of Nucleo- and Spike Protein-Specific Immunoglobulin G and of Virus-Neutralizing Antibodies after SARS-CoV-2 Infection / A. Strömer, R. Rose, O. Grobe [et al.] // Microorganisms. – 2020. – Vol. 8. – № 10. – P. 1-12. – DOI 10.3390/MICROORGANISMS8101572.

137. Diagnostic accuracy of six commercial SARS-CoV-2 IgG/total antibody assays and identification of SARS-CoV-2 neutralizing antibodies in convalescent sera / A. Strömer, O. Grobe, R. Rose [et al.] // MedRxiv: the preprint – 2020 – DOI 10.1101/2020.06.15.20131672

138. Sex, age, and hospitalization drive antibody responses in a COVID-19 convalescent plasma donor population / S. L. Klein, A. Pekosz, H. S. Park [et al.] // The Journal of clinical investigation. – 2020. – Vol. 130. – № 11. – P. 6141-6150. – DOI 10.1172/JCI142004.

139. High-Accuracy multiplexed SARS-CoV-2 antibody assay with avidity and saliva capability on a nano-plasmonic platform / T. Liu, J. Hsiung, S. Zhao [et al.] // bioRxiv. – 2020. – DOI 10.1101/2020.06.16.155580.

140. Serological assessment of COVID-19 patients in Brazil: levels, avidity, and subclasses of IgG against RBD / A. D. Moura, H. H. M. Da Costa, V. A. Correa C. Prudencio. – 2021. – DOI 10.21203/rs.3.rs-131195/v1.

141. SARS-CoV-2 Antibody Avidity Responses in COVID-19 Patients and Convalescent Plasma Donors / S. E. Benner, E. U. Patel, O. Laeyendecker [et al.] // The Journal of infectious diseases. – 2020. – Vol. 222. – № 12. – P. 1974-1984. – DOI 10.1093/INFDIS/JIAA581.

142. Incomplete IgG avidity maturation after seasonal coronavirus infections / F. Struck, P. Schreiner, E. Staschik [et al.] // Journal of Medical Virology. – 2022. – Vol. 94. – № 1. – P. 186-196. – DOI 10.1002/JMV.27291.

143. Sallusto, F. Heterogeneity of Human CD4(+) T Cells Against Microbes / F. Sallusto // Annual review of immunology. – 2016. – Vol. 34. – P. 317-334. – DOI 10.1146/ANNUREV-IMMUNOL-032414-112056.

144. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls / N. L. Bert, A. T. Tan, K. Kunasegaran [et al.] // Nature 2020 584:7821. – 2020. – Vol. 584. – № 7821. – P. 457-462. – DOI 10.1038/s41586-020-2550-z.

145. Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals / A. Grifoni, D. Weiskopf, S. I. Ramirez

[et al.] // Cell. – 2020. – Vol. 181. – № 7. – P. 1489-1501.e15. – DOI 10.1016/J.CELL.2020.05.015.

146. Broad and strong memory CD4⁺ and CD8⁺ T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19 / Y. Peng, A. J. Mentzer, G. Liu [et al.] // Nature immunology. – 2020. – Vol. 21. – № 11. – P. 1336-1345. – DOI 10.1038/S41590-020-0782-6.

147. Impact of SARS-CoV-2 variants on the total CD4⁺ and CD8⁺ T cell reactivity in infected or vaccinated individuals / A. Tarke, J. Sidney, N. Methot [et al.] // Cell Reports Medicine. – 2021. – Vol. 2. – № 7. – P. 100355. – DOI 10.1016/J.XCRM.2021.100355/ATTACHMENT/0799D196-562E-4F28-9EFB-A5436C825113/MMC2.PDF.

148. Detection of SARS-CoV-2-Specific Humoral and Cellular Immunity in COVID-19 Convalescent Individuals / L. Ni, F. Ye, M. L. Cheng [et al.] // Immunity. – 2020. – Vol. 52. – № 6. – P. 971-977.e3. – DOI 10.1016/J.IMMUNI.2020.04.023.

149. Imbalance of Regulatory and Cytotoxic SARS-CoV-2-Reactive CD4⁺ T Cells in COVID-19 / B. J. Meckiff, C. Ramírez-Suástegui, V. Fajardo [et al.] // Cell. – 2020. – Vol. 183. – № 5. – P. 1340-1353.e16. – DOI 10.1016/J.CELL.2020.10.001.

150. Comprehensive analysis of T cell immunodominance and immunoprevalence of SARS-CoV-2 epitopes in COVID-19 cases / A. Tarke, J. Sidney, C. K. Kidd [et al.] // Cell reports. Medicine. – 2021. – Vol. 2. – № 2. – DOI 10.1016/J.XCRM.2021.100204.

151. SARS-CoV-2 epitope-specific CD4⁺ memory T cell responses across COVID-19 disease severity and antibody durability / R. W. Nelson, Y. Chen, O. L. Venezia [et al.] // Science immunology. – 2022. – Vol. 7. – № 73. – DOI 10.1126/SCIIMMUNOL.ABL9464.

152. Signature of long-lived memory CD8⁺ T cells in acute SARS-CoV-2 infection / S. Adamo, J. Michler, Y. Zurbuchen [et al.] // Nature. – 2022. – Vol. 602. – № 7895. – P. 148-155. – DOI 10.1038/S41586-021-04280-X.

153. mRNA vaccines induce durable immune memory to SARS-CoV-2 and variants of concern / R. R. Goel, M. M. Painter, S. A. Apostolidis [et al.] // Science (New York, N.Y.). – 2021. – Vol. 374. – № 6572. – DOI 10.1126/SCIENCE.ABM0829.

154. BNT162b2 vaccination induces durable SARS-CoV-2-specific T cells with a stem cell memory phenotype / G. Guerrero, M. Picozza, S. D'Orso [et al.] // Science immunology. – 2021. – Vol. 6. – № 66. – DOI 10.1126/SCIIMMUNOL.ABL5344.

155. Single-cell profiling of T and B cell repertoires following SARS-CoV-2 mRNA vaccine / S. Sureshchandra, S. A. Lewis, B. M. Doratt [et al.] // JCI insight. – 2021. – Vol. 6. – № 24. – DOI 10.1172/JCI.INSIGHT.153201.

156. SARS-CoV-2 mRNA vaccination elicits a robust and persistent T follicular helper cell response in humans / P. A. Mudd, A. A. Minervina, M. V. Pogorelyy [et al.] // *Cell*. – 2022. – Vol. 185. – № 4. – P. 603-613.e15. – DOI 10.1016/J.CELL.2021.12.026.
157. Expansion of cytotoxic tissue-resident CD8⁺ T cells and CCR6⁺CD161⁺ CD4⁺ T cells in the nasal mucosa following mRNA COVID-19 vaccination / A. Ssemaganda, H. M. Nguyen, F. Nuhu [et al.] // *Nature communications*. – 2022. – Vol. 13. – № 1. – DOI 10.1038/S41467-022-30913-4.
158. Robust induction of B cell and T cell responses by a third dose of inactivated SARS-CoV-2 vaccine / Y. Liu, Q. Zeng, C. Deng [et al.] // *Cell discovery*. – 2022. – Vol. 8. – № 1. – DOI 10.1038/S41421-022-00373-7.
159. SARS-CoV-2 infection and vaccination trigger long-lived B and CD4⁺ T lymphocytes with implications for booster strategies / A. Mazzoni, A. Vanni, M. Spinicci [et al.] // *The Journal of clinical investigation*. – 2022. – Vol. 132. – № 6. – DOI 10.1172/JCI157990.
160. SARS-CoV-2-reactive T cells in healthy donors and patients with COVID-19 / J. Braun, L. Loyal, M. Frentsch [et al.] // *Nature*. – 2020. – Vol. 587. – № 7833. – P. 270-274. – DOI 10.1038/S41586-020-2598-9.
161. Early induction of functional SARS-CoV-2-specific T cells associates with rapid viral clearance and mild disease in COVID-19 patients / A. T. Tan, M. Linster, C. W. Tan [et al.] // *Cell reports*. – 2021. – Vol. 34. – № 6. – DOI 10.1016/J.CELREP.2021.108728.
162. Longitudinal analysis shows durable and broad immune memory after SARS-CoV-2 infection with persisting antibody responses and memory B and T cells / K. W. Cohen, S. L. Linderman, Z. Moodie [et al.] // *Cell reports. Medicine*. – 2021. – Vol. 2. – № 7. – DOI 10.1016/J.XCRM.2021.100354.
163. SARS-CoV-2-specific T cell memory is sustained in COVID-19 convalescent patients for 10 months with successful development of stem cell-like memory T cells / J. H. Jung, M. S. Rha, M. Sa [et al.] // *Nature communications*. – 2021. – Vol. 12. – № 1. – DOI 10.1038/S41467-021-24377-1.
164. CD8⁺ T cells contribute to survival in patients with COVID-19 and hematologic cancer / E. M. Bange, N. A. Han, P. Wileyto [et al.] // *Nature medicine*. – 2021. – Vol. 27. – № 7. – P. 1280-1289. – DOI 10.1038/S41591-021-01386-7.
165. Case Study: Prolonged Infectious SARS-CoV-2 Shedding from an Asymptomatic Immunocompromised Individual with Cancer / V. A. Avanzato, M. J. Matson, S. N. Seifert [et al.] // *Cell*. – 2020. – Vol. 183. – № 7. – P. 1901-1912.e9. – DOI 10.1016/J.CELL.2020.10.049.
166. Three patients with X-linked agammaglobulinemia hospitalized for COVID-19 improved with convalescent plasma / H. Jin, J. C. Reed, S. T. H. Liu [et al.] // *The journal*

of allergy and clinical immunology. In practice. – 2020. – Vol. 8. – № 10. – P. 3594-3596.e3. – DOI 10.1016/J.JAIP.2020.08.059.

167. Rapid recovery of a SARS-CoV-2-infected X-linked agammaglobulinemia patient after infusion of COVID-19 convalescent plasma / E. Mira, O. A. Yarce, C. Ortega [et al.] // The journal of allergy and clinical immunology. In practice. – 2020. – Vol. 8. – № 8. – P. 2793-2795. – DOI 10.1016/J.JAIP.2020.06.046.

168. Loss of Bcl-6-Expressing T Follicular Helper Cells and Germinal Centers in COVID-19 / N. Kaneko, H. H. Kuo, J. Boucau [et al.] // Cell. – 2020. – Vol. 183. – № 1. – P. 143-157.e13. – DOI 10.1016/J.CELL.2020.08.025.

169. Humoral and circulating follicular helper T cell responses in recovered patients with COVID-19 / J. A. Juno, H. X. Tan, W. S. Lee [et al.] // Nature medicine. – 2020. – Vol. 26. – № 9. – P. 1428-1434. – DOI 10.1038/S41591-020-0995-0.

170. Peripheral CD4+ T cell subsets and antibody response in COVID-19 convalescent individuals / F. Gong, Y. Dai, T. Zheng [et al.] // The Journal of clinical investigation. – 2020. – Vol. 130. – № 12. – P. 6588-6599. – DOI 10.1172/JCI141054.

171. Spike-specific circulating T follicular helper cell and cross-neutralizing antibody responses in COVID-19-convalescent individuals / J. Zhang, Q. Wu, Z. Liu [et al.] // Nature microbiology. – 2021. – Vol. 6. – № 1. – P. 51-58. – DOI 10.1038/S41564-020-00824-5.

172. CD8 T cells contribute to vaccine protection against SARS-CoV-2 in macaques / J. Liu, J. Yu, K. McMahan [et al.] // Science immunology. – 2022. – Vol. 7. – № 77. – DOI 10.1126/SCIIMMUNOL.ABQ7647.

173. Correlates of protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques / K. McMahan, J. Yu, N. B. Mercado [et al.] // Nature. – 2021. – Vol. 590. – № 7847. – P. 630-634. – DOI 10.1038/S41586-020-03041-6.

174. Neutralizing-antibody-independent SARS-CoV-2 control correlated with intranasal-vaccine-induced CD8+ T cell responses / H. Ishii, T. Nomura, H. Yamamoto [et al.] // Cell Reports. Medicine. – 2022. – Vol. 3. – № 2. – P. 100520. – DOI 10.1016/j.xcrm.2022.100520.

175. Cruz-Tapias, P. Major histocompatibility complex: Antigen processing and presentation / P. Cruz-Tapias, J. Castiblanco, J.-M. Anaya. – 2013.

176. HLA class I molecules consistently present internal influenza epitopes / A. Wahl, F. Schafer, W. Bardet [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2009. – Vol. 106. – № 2. – P. 540-545. – DOI 10.1073/PNAS.0811271106/SUPPL_FILE/0811271106SI.PDF.

177. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease (5th edition): NCBI Bookshelf / Janeway CA Jr, Travers P, Walport M [et al.] – New York: Garland Science; 2001. T cell-mediated cytotoxicity. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27101/> – Текст : непосредственный
178. Human leukocyte antigen class II quantification by targeted mass spectrometry in dendritic-like cell lines and monocyte-derived dendritic cells / A. Casasola-LaMacchia, M. S. Ritorto, R. J. Seward [et al.] // Scientific Reports 2021 11:1. – 2021. – Vol. 11. – № 1. – P. 1-11. – DOI 10.1038/s41598-020-77024-y.
179. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease (5th edition): NCBI Bookshelf / Janeway CA Jr, Travers P, Walport M [et al.] – New York: Garland Science; 2001. B-cell activation by armed helper T cells. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27142/> – Текст : непосредственный
180. HLA alleles, disease severity, and age associate with T-cell responses following infection with SARS-CoV-2 / T. A. Olafsdottir, K. Bjarnadottir, G. L. Norddahl [et al.] // Communications Biology 2022 5:1. – 2022. – Vol. 5. – № 1. – P. 1-14. – DOI 10.1038/s42003-022-03893-w.
181. A common allele of HLA is associated with asymptomatic SARS-CoV-2 infection / D. G. Augusto, L. D. Murdolo, D. S. M. Chatzileontiadou [et al.] // Nature 2023 620:7972. – 2023. – Vol. 620. – № 7972. – P. 128-136. – DOI 10.1038/s41586-023-06331-x.
182. Human Leukocyte Antigen Susceptibility Map for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 / A. Nguyen, J. K. David, S. K. Maden [et al.] // Journal of Virology. – 2020. – Vol. 94. – № 13. – DOI 10.1128/JVI.00510-20/SUPPL_FILE/JVI.00510-20-SD003.XLS.
183. Coronavirus Resistance Database (CoV-RDB): SARS-CoV-2 susceptibility to monoclonal antibodies, convalescent plasma, and plasma from vaccinated persons / P. L. Tzou, K. Tao, S. L. Kosakovsky Pond, R. W. Shafer // PloS one. – 2022. – Vol. 17. – № 3. – DOI 10.1371/JOURNAL.PONE.0261045.
184. Breakthrough SARS-CoV-2 infections during periods of delta and omicron predominance, South Africa / A. Goga, L. G. Bekker, N. Garrett [et al.] // Lancet (London, England). – 2022. – Vol. 400. – № 10348. – P. 269-271. – DOI 10.1016/S0140-6736(22)01190-4.
185. SARS-CoV-2 vaccination induces immunological T cell memory able to cross-recognize variants from Alpha to Omicron / A. Tarke, C. H. Coelho, Z. Zhang [et al.] // Cell. – 2022. – Vol. 185. – № 5. – P. 847-859.e11. – DOI 10.1016/J.CELL.2022.01.015.

186. Divergent SARS-CoV-2 Omicron-reactive T and B cell responses in COVID-19 vaccine recipients / C. H. GeurtsvanKessel, D. Geers, K. S. Schmitz [et al.] // *Science immunology*. – 2022. – Vol. 7. – № 69. – DOI 10.1126/SCIIMMUNOL.ABO2202.
187. T cell responses to SARS-CoV-2 spike cross-recognize Omicron / R. Keeton, M. B. Tincho, A. Ngomti [et al.] // *Nature*. – 2022. – Vol. 603. – № 7901. – P. 488-492. – DOI 10.1038/S41586-022-04460-3.
188. Identification of conserved SARS-CoV-2 spike epitopes that expand public cTfh clonotypes in mild COVID-19 patients / X. Lu, Y. Hosono, M. Nagae [et al.] // *The Journal of experimental medicine*. – 2021. – Vol. 218. – № 12. – DOI 10.1084/JEM.20211327.
189. T cell epitopes in SARS-CoV-2 proteins are substantially conserved in the Omicron variant / S. J. Choi, D. U. Kim, J. Y. Noh [et al.] // *Cellular & molecular immunology*. – 2022. – Vol. 19. – № 3. – P. 447-448. – DOI 10.1038/S41423-022-00838-5.
190. An Overview of Vaccines against SARS-CoV-2 in the COVID-19 Pandemic Era / A. Pascual-Iglesias, J. Canton, A. M. Ortega-Prieto [et al.] // *Pathogens*. – 2021. – Vol. 10. – № 8. – P. 1030-1030. – DOI 10.3390/PATHOGENS10081030.
191. Изучение иммуногенности вакцины Гам-КОВИД-Вак / Кириллов И. А., Пирожков А. П., Рубцов В. В. [и др.] // *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. – 2022. – Vol. 22. – № 4. – P. 435-445. – DOI 10.30895/2221-996X-2022-22-4-435-445.
192. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia / D. Y. Logunov, I. V. Dolzhikova, O. V. Zubkova [et al.] // *Lancet (London, England)*. – 2020. – Vol. 396. – № 10255. – P. 887-897. – DOI 10.1016/S0140-6736(20)31866-3.
193. Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia / D. Y. Logunov, I. V. Dolzhikova, D. V. Shcheblyakov [et al.] // *Lancet (London, England)*. – 2021. – Vol. 397. – № 10275. – P. 671-681. – DOI 10.1016/S0140-6736(21)00234-8.
194. Iversen, P. L. Inactivated COVID-19 vaccines to make a global impact / P. L. Iversen, S. Bavari // *The Lancet Infectious Diseases*. – 2021. – Vol. 21. – № 6. – P. 746-748. – DOI 10.1016/S1473-3099(21)00020-7.
195. Efficacy and Safety of NVX-CoV2373 in Adults in the United States and Mexico / L. M. Dunkle, K. L. Kotloff, C. L. Gay [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2022. – Vol. 386. – № 6. – P. 531-543. – DOI 10.1056/NEJMOA2116185/SUPPL_FILE/NEJMOA2116185_DATA-SHARING.PDF.

196. Rapid evaluation of COVID-19 vaccine effectiveness against symptomatic infection with SARS-CoV-2 variants by analysis of genetic distance / L. Cao, J. Lou, S. Y. Chan [et al.] // *Nature Medicine* 2022 28:8. – 2022. – Vol. 28. – № 8. – P. 1715-1722. – DOI 10.1038/s41591-022-01877-1.
197. Comparing COVID-19 vaccines for their characteristics, efficacy and effectiveness against SARS-CoV-2 and variants of concern: a narrative review / T. Fiolet, Y. Kherabi, C. J. MacDonald [et al.] // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2021. – Vol. 28. – № 2. – P. 202-202. – DOI 10.1016/J.CMI.2021.10.005.
198. Review of COVID-19 testing and diagnostic methods / O. Filchakova, D. Dossym, A. Ilyas [et al.] // *Talanta*. – 2022. – Vol. 244. – P. 123409. – DOI 10.1016/J.TALANTA.2022.123409.
199. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2–Specific Antibody Responses in Coronavirus Disease Patients - Volume 26, Number 7—July 2020 - *Emerging Infectious Diseases journal - CDC* / N. M. A. Okba, M. A. Müller, W. Li [et al.] // *Emerging Infectious Diseases*. – 2020. – Vol. 26. – № 7. – P. 1478-1488. – DOI 10.3201/EID2607.200841.
200. A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans / F. Amanat, D. Stadlbauer, S. Strohmeier [et al.] // *Nature Medicine* 2020 26:7. – 2020. – Vol. 26. – № 7. – P. 1033-1036. – DOI 10.1038/s41591-020-0913-5.
201. Diagnostic accuracy of serological tests for covid-19: systematic review and meta-analysis / M. L. Bastos, G. Tavaziva, S. K. Abidi [et al.] // *BMJ*. – 2020. – Vol. 370. – P. 2516. – DOI 10.1136/BMJ.M2516.
202. Evaluation of SARS-CoV-2 serology assays reveals a range of test performance / J. D. Whitman, J. Hiatt, C. T. Mowery [et al.] // *Nature Biotechnology* 2020 38:10. – 2020. – Vol. 38. – № 10. – P. 1174-1183. – DOI 10.1038/s41587-020-0659-0.
203. Оптимизация и валидация количественного метода оценки реактивности Т-клеток памяти человека к антигенам вируса SARS-CoV-2 с использованием проточной цитометрии / Стрижакова О.М., Першин А.С., Казаров А.А., [и др.] // *Инфекция и иммунитет*. – 2023. – Vol. 13. – № 4. – P. 642-652. – DOI 10.15789/2220-7619-OAV-2084.
204. Hwai, H. B-Cell ELISpot Assay to Quantify Antigen-Specific Antibody-Secreting Cells in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells / H. Hwai, Y. Y. Chen, S. J. Tzeng // *Methods in Molecular Biology*. – 2018. – Vol. 1808. – P. 133-141. – DOI 10.1007/978-1-4939-8567-8_11.
205. SARS-CoV-2 Neutralization Assays Used in Clinical Trials: A Narrative Review / Y. Sun, W. Huang, H. Xiang, J. Nie // *Vaccines* 2024, Vol. 12, Page 554. – 2024. – Vol. 12. – № 5. – P. 554-554. – DOI 10.3390/VACCINES12050554.

206. Mechanism and significance of cell type-dependent neutralization of flaviviruses / S. Mukherjee, K. A. Dowd, C. J. Manhart [et al.] // *Journal of virology*. – 2014. – Vol. 88. – № 13. – P. 7210-7220. – DOI 10.1128/JVI.03690-13.
207. A SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test based on antibody-mediated blockage of ACE2-spike protein-protein interaction / C. W. Tan, W. N. Chia, X. Qin [et al.] // *Nature biotechnology*. – 2020. – Vol. 38. – № 9. – P. 1073-1078. – DOI 10.1038/S41587-020-0631-Z.
208. Псевдонейтрализующий тест для доклинических исследований вакцин против SARS-CoV-2 / Черепович Б.С., Кудряшова А.М., Карташова Н.П. [и др.] // *Медицинская иммунология*. – 2023. – Vol. 26. – № 3. – P. 569-576. – DOI 10.15789/1563-0625-PTF-2905.
209. Разработка и оценка диагностических характеристик иммуноферментного метода определения антител, блокирующих взаимодействие RBD SARSCoV-2 и ACE2 / Черепович Б.С., Кудряшова А.М., Мануйлов В.А. [и др.] // *Клиническая лабораторная диагностика*. – 2025. – Vol. 70. – № 2. – P. 119-125. – DOI 10.51620/0869-2084-2025-70-2-119-125.
210. Simple ELISA Methods to Estimate Neutralizing Antibody Titers to SARS-CoV-2: IgG Quantification, the Avidity Index, and the Surrogate Virus Neutralization Test / V. Manuylov, I. Dolzhikova, B. Cherepovich [et al.] // *Archives of Microbiology & Immunology*. – 2022. – Vol. 06. – № 04. – DOI 10.26502/AMI.93650088.
211. Clinical Validation of a Novel T-Cell Receptor Sequencing Assay for Identification of Recent or Prior Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection / S. C. Dalai, J. N. Dines, T. M. Snyder [et al.] // *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. – 2022. – Vol. 75. – № 12. – P. 2079-2087. – DOI 10.1093/CID/CIAC353.
212. Перспективы использования технологической платформы ELISPOT в системе противоэпидемических мероприятий против новой коронавирусной инфекции COVID-19 / Потеряев Д. А., Хамитов Р. А., Ефимов Г. А. [и др.] // *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. – 2020. – Vol. 20. – № 3. – P. 146-158. – DOI 10.30895/2221-996X-2020-20-3-146-158.
213. Cox, J. H. Measurement of cytokine release at the single cell level using the ELISPOT assay / J. H. Cox, G. Ferrari, S. Janetzki // *Methods (San Diego, Calif.)*. – 2006. – Vol. 38. – № 4. – P. 274-282. – DOI 10.1016/J.YMETH.2005.11.006.
214. Isolation and preservation of peripheral blood mononuclear cells for analysis of islet antigen-reactive T cell responses: position statement of the T-Cell Workshop Committee of the Immunology of Diabetes Society / R. Mallone, S. I. Mannering, B. M.

Brooks-Worrell [et al.] // *Clinical and experimental immunology*. – 2011. – Vol. 163. – № 1. – P. 33-49. – DOI 10.1111/J.1365-2249.2010.04272.X.

215. Interferon-gamma release assays outcomes in healthy subjects following BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccination / E. Kurteva, G. Vasilev, K. Tumangelova-Yuzeir [et al.] // *Rheumatology International*. – 2022. – Vol. 42. – № 3. – P. 449-456. – DOI 10.1007/S00296-022-05091-7/FIGURES/3.

216. Immunogenic epitope panel for accurate detection of non-cross-reactive T cell response to SARS-CoV-2 / A. Titov, R. Shaykhutdinova, O. V. Shcherbakova [et al.] // *JCI insight*. – 2022. – Vol. 7. – № 9. – DOI 10.1172/JCI.INSIGHT.157699.

217. Определение Т-клеточного иммунного ответа к коронавирусу SARS-CoV-2, основанного на индукции выработки γ -интерферона специфическими Т-лимфоцитами периферической крови при их стимуляции вирусным антигеном / Черепович Б.С., Кудряшова А.М., Панкратьева Л. Л. [и др.] // *Медицинская иммунология*. – 2024. – Vol. 27. – № 1. – P. 45-56. – DOI 10.15789/1563-0625-DOT-3007.

218. A Cytokine-Independent Approach To Identify Antigen-Specific Human Germinal Center T Follicular Helper Cells and Rare Antigen-Specific CD4⁺ T Cells in Blood / J. M. Dan, C. S. Lindestam Arlehamn, D. Weiskopf [et al.] // *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950). – 2016. – Vol. 197. – № 3. – P. 983-993. – DOI 10.4049/JIMMUNOL.1600318.

219. Адаптация МТТ-теста для определения нейтрализующих антител к вирусу SARS-CoV-2 / Грачёва А.В., Корчевая Е.Р., Кудряшова А.М. [и др.] // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. – 2021. – Vol. 98. – № 3. – P. 253-265. – DOI 10.36233/0372-9311-136.

220. Ramakrishnan, M. A. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. / M. A. Ramakrishnan // *World journal of virology*. – 2016. – Vol. 5. – № 2. – P. 85-6. – DOI 10.5501/wjv.v5.i2.85.

221. Use of antibody avidity assays for diagnosis of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection / K. H. Chan, K. Sonnenberg, M. Niedrig [et al.] // *Clinical and vaccine immunology: CVI*. – 2007. – Vol. 14. – № 11. – P. 1433-1436. – DOI 10.1128/CVI.00056-07.

222. Antibody avidity maturation during severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus infection / P. K. S. Chan, P. L. Lim, E. Y. M. Liu [et al.] // *Journal of Infectious Diseases*. – 2005. – Vol. 192. – № 1. – P. 166-169. – DOI 10.1086/430615/2/192-1-166-FIG002.GIF.

223. Quantification of antibody avidities and accurate detection of SARS-CoV-2 antibodies in serum and saliva on plasmonic substrates / T. Liu, J. Hsiung, S. Zhao [et al.]

// Nature biomedical engineering. – 2020. – Vol. 4. – № 12. – P. 1188-1196. – DOI 10.1038/S41551-020-00642-4.

224. Kinetics of the SARS-CoV-2 Antibody Avidity Response Following Infection and Vaccination / L. Garcia, T. Woudenberg, J. Rosado [et al.] // Viruses. – 2022. – Vol. 14. – № 7. – DOI 10.3390/V14071491.

225. Establishment and validation of a pseudovirus neutralization assay for SARS-CoV-2 / J. Nie, Q. Li, J. Wu [et al.] // Emerging Microbes & Infections. – 2020. – Vol. 9. – № 1. – P. 680-686. – DOI 10.1080/22221751.2020.1743767.

226. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor / M. Hoffmann, H. Kleine-Weber, S. Schroeder [et al.] // Cell. – 2020. – Vol. 181. – № 2. – P. 271-280.e8. – DOI 10.1016/j.cell.2020.02.052.

227. Validation and clinical evaluation of a SARS-CoV-2 surrogate virus neutralisation test (sVNT) / B. Meyer, J. Reimerink, G. Torriani [et al.] // Emerging Microbes & Infections. – 2020. – Vol. 9. – № 1. – P. 2394-2403. – DOI 10.1080/22221751.2020.1835448.

228. Evaluation of a surrogate virus neutralization test for high-throughput serosurveillance of SARS-CoV-2 / J. Mariën, J. Michiels, L. Heyndrickx [et al.] // Journal of Virological Methods. – 2021. – Vol. 297. – P. 114228. – DOI 10.1016/j.jviromet.2021.114228.

229. Флетчер, Р. Клиническая эпидемиология. Основы доказательной медицины: учебник / Р.Флетчер, С.Флетчер, Э.Вагнер. – Москва : Издательство "Медиасфера", 1998. – 346 с. ISBN 95-89084-011-8 (русск.). – Текст : непосредственный

230. Гланц, С. Медико-биологическая статистика: учебник / С. Гланц ; – Москва : Издательский дом "Практика", 1999. – 459 с. ISBN 5-89816-009-4 (русск.). – Текст : непосредственный

231. Association between SARS-CoV-2 Neutralizing Antibodies and Commercial Serological Assays / M. S. Tang, J. B. Case, C. E. Franks [et al.] // Clinical chemistry. – 2020. – Vol. 66. – № 12. – P. 1538-1547. – DOI 10.1093/CLINCHEM/HVAA211.

232. Serological anti-SARS-CoV-2 neutralizing antibodies association to live virus neutralizing test titers in COVID-19 paucisymptomatic/symptomatic patients and vaccinated subjects / A. Cristiano, M. Nuccetelli, M. Pieri [et al.] // International immunopharmacology. – 2021. – Vol. 101. – № Pt B. – DOI 10.1016/J.INTIMP.2021.108215.

233. Khatri, I. Blocking of the High-Affinity Interaction-Synapse Between SARS-CoV-2 Spike and Human ACE2 Proteins Likely Requires Multiple High-Affinity Antibodies: An Immune Perspective / I. Khatri, F. J. T. Staal, J. J. M. van Dongen // Frontiers in immunology. – 2020. – Vol. 11. – DOI 10.3389/FIMMU.2020.570018.

234. Gaspar, E. B. Avidity assay to test functionality of anti-SARS-Cov-2 antibodies / E. B. Gaspar, E. D. Gaspari // *Vaccine*. – 2021. – Vol. 39. – № 10. – P. 1473-1475. – DOI 10.1016/J.VACCINE.2021.02.003.
235. Avidity of IgG to SARS-CoV-2 RBD as a Prognostic Factor for the Severity of COVID-19 Reinfection / V. Manuylov, O. Burgasova, O. Borisova [et al.] // *Viruses*. – 2022. – Vol. 14. – № 3. – DOI 10.3390/V14030617.
236. Dalbavancin binds ACE2 to block its interaction with SARS-CoV-2 spike protein and is effective in inhibiting SARS-CoV-2 infection in animal models / G. Wang, M.-L. Yang, Z.-L. Duan [et al.] // *Cell Research*. – 2021. – Vol. 31. – № 1. – P. 17-24. – DOI 10.1038/s41422-020-00450-0.
237. SARS-CoV-2 Epitopes Are Recognized by a Public and Diverse Repertoire of Human T Cell Receptors / A. S. Shomuradova, M. S. Vagida, S. A. Sheetikov [et al.] // *Immunity*. – 2020. – Vol. 53. – № 6. – P. 1245-1257.e5. – DOI 10.1016/j.immuni.2020.11.004.
238. One Year after Mild COVID-19: The Majority of Patients Maintain Specific Immunity, But One in Four Still Suffer from Long-Term Symptoms / A. Rank, A. Tzortzini, E. Kling [et al.] // *Journal of Clinical Medicine*. – 2021. – Vol. 10. – № 15. – P. 3305. – DOI 10.3390/jcm10153305.
239. Magnitude of venous or capillary blood-derived SARS-CoV-2-specific T cell response determines COVID-19 immunity / M. J. Scurr, G. Lippiatt, L. Capitani [et al.] // *Nature Communications* 2022 13:1. – 2022. – Vol. 13. – № 1. – P. 1-9. – DOI 10.1038/s41467-022-32985-8.