

СВОЙСТВА АНТИТЕЛ К RBD У ПЕРЕБОЛЕВШИХ COVID-19 И ВАКЦИНИРОВАННЫХ ПРЕПАРАТОМ «СПУТНИК V»

Л. В. Генералова¹, И. В. Григорьев², Д. В. Васина², А. П. Ткачук², И. С. Кружкова², Л. В. Колобухина², О. А. Бургасова^{1,2}, В. А. Гушчин²✉

¹ Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

² Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи, Москва, Россия

Исследование свойств антител, участвующих в нейтрализации вируса, после перенесенного заболевания COVID-19 и применения профилактических препаратов, остается актуальной задачей, от которой зависит выработка стратегий первичной и повторной иммунизации. Измерение уровня антител к антигенам SARS-CoV-2 — один из основных способов оценки иммунитета, однако не дает достаточной информации о количественных и качественных показателях иммунного ответа. Целью работы было исследовать свойства антител IgG к RBD у переболевших COVID-19 и вакцинированных препаратом «Спутник V». На когортах пациентов (18–80 лет; соотношение мужчин и женщин — 47 : 53), переболевших COVID-19, и вакцинированных добровольцев изучена динамика созревания аффинности и изменения нейтрализующей активности IgG к RBD. Нейтрализующая активность сывороток крови у добровольцев через 4–6 месяцев после вакцинации снизилась по сравнению с образцами переболевших пациентов (медианы — 57,4 и 86,4% соответственно). Индекс avidности у вакцинированных добровольцев, напротив, был значительно выше, чем у перенесших COVID-19 (76,7 и 61,4% соответственно). В острую фазу заболевания (14–16 дней от появления симптомов) ранее вакцинированные пациенты имели более высокий индекс avidности, чем первичные пациенты (43,5 и 20,4% соответственно). В долгосрочной перспективе степень созревания аффинности вирусспецифичных IgG после вакцинации может быть выше, чем после естественно перенесенной инфекции. Показано, что вакцинация «Спутником V» приводит к формированию высокоавидных IgG, сохраняющихся по крайней мере 6 месяцев. Продемонстрировано наличие уровней антител, коррелирующих с протективным иммунитетом, на протяжении 4–6 месяцев после вакцинации или перенесенной инфекции.

Ключевые слова: avidность антител, вирус-нейтрализация, SARS-CoV-2, иммунная память, вакцинация, «Спутник V»

Финансирование: исследование проведено при поддержке гранта Министерства здравоохранения РФ, № АААА - А20-120113090054-6, профессору О. А. Бургасовой было выделено финансирование по программе стратегического академического лидерства РУДН.

Вклад авторов: Л. В. Генералова и И. В. Григорьев — планирование исследования, подготовка и проведение экспериментов, интерпретация данных и написание статьи; И. С. Кружкова и Л. В. Колобухина — интерпретация данных, написание статьи; Д. В. Васина, А. П. Ткачук, О. А. Бургасова, В. А. Гушчин — планирование исследования и написание статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Первой московской инфекционной больницы (протокол № 11/А от 16 ноября 2020 г.); всеми участниками исследования было подписано информированное согласие.

✉ **Для корреспонденции:** Владимир Алексеевич Гушчин
ул. Гамалеи, 18, стр. 9, г. Москва, Россия; wowaniada@gmail.com

Статья получена: 23.01.2022 **Статья принята к печати:** 08.02.2022 **Опубликована онлайн:** 16.02.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.005

PROPERTIES OF RBD SPECIFIC IGG FROM COVID-19 PATIENTS AND SPUTNIK V VACCINATED INDIVIDUALS

Generalova LV¹, Grigoriev IV², Vasina DV², Tkachuk AP², Kruzhkova IS², Kolobukhina LV², Burgasova OA^{1,2}, Gushchin VA²✉

¹ Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow, Russia

² Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

SARS-CoV-2 specific antibody response is a generally accepted measure of postinfection and vaccination-induced immunity assessment. The dynamics of avidity maturation and neutralizing activity of virus-specific immunoglobulins G during the SARS-CoV-2-associated coronavirus infection was studied in cohorts of vaccinated volunteers and COVID-19 patients. 4–6 months after vaccination, neutralization activity was low compared to hospitalized patients (medians 57.4% vs 86.4%). On the opposite, the avidity indices in vaccinated volunteers were significantly higher (median 76.7%) than among hospitalized patients (median 61.4%). During the acute phase of the disease (14–16 days PI), post-vaccination patients have also higher avidity indices than primary patients (medians 43.5% vs 20.4%). Our results suggest that in long-term perspective antibody affinity maturation rate is higher after vaccination than after a natural infection. We demonstrated that Sputnik V vaccination leads to formation of high-avidity IgG, which persists for at least 6 months of observation. These results also indicate the presence of protective efficacy markers for at least 4–6 months after the vaccination or a previous illness and gives grounds for the half-year time period chosen for booster immunization with Sputnik V in Russia.

Keywords: antibody avidity, virus neutralization, SARS-CoV-2, immune memory, vaccination, Sputnik-V

Funding: this research was funded by the Ministry of Health of the Russian Federation, Government assignments number № АААА - А20-120113090054-6, Prof. Olga A. Burgasova was also supported by the RUDN University Strategic Academic Leadership Program.

Author contribution: LV Generalova, IV Grigoriev — research planning, experiments preparation and execution, data interpretation and paper draft preparation; IS Kruzhkova, LV Kolobukhina — data interpretation and paper draft preparation; DV Vasina, AP Tkachuk, OA Burgasova, VA Gushchin — research planning, data interpretation and paper draft preparation.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the ethics committee of the First Moscow Infectious Diseases Hospital (protocol № 11/A dated November 16, 2020); informed consent was obtained from all study participants.

✉ **Correspondence should be addressed:** Vladimir A. Gushchin
Gamaleya, 18, str. 9, Moscow, Russia; wowaniada@gmail.com

Received: 23.01.2022 **Accepted:** 08.02.2022 **Published online:** 16.02.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.005

Измерение специфических к SARS-CoV-2 антител является общепризнанным способом оценки иммунитета после вакцинации или перенесенного заболевания. Эффективность антител и их способность предотвращать повторное инфицирование зависят не только от их количества (титра), но и от качественных характеристик антител, включающих нейтрализующую активность и avidность. Эти свойства антител, вырабатываемых после вакцинации «Спутником V» или перенесения COVID-19, в настоящее время охарактеризованы недостаточно. Показано, что avidность (% высокоаффинных антител в крови) к SARS-CoV-2 коррелировала с временем от момента заболевания и с ростом титра вирус-нейтрализации [1]. Благоприятные клинические исходы у пациентов с COVID-19 были ассоциированы с высокой avidностью антител, но не с их количеством [2]. В настоящее время отсутствуют научные публикации о динамике созревания аффинности антител после вакцинации «Спутником V» и перенесенного COVID-19, а также об изменении функциональной активности антител в течение длительного периода наблюдения. Целью исследования было изучить долгосрочную динамику выработки антител у пациентов, перенесших COVID-19 и у вакцинированных «Спутником V» добровольцев, часть из которых после вакцинации перенесла инфекцию, и охарактеризовать особенности формирования продолжительной иммунологической памяти.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Участники исследования

В исследовании приняли участие 41 человек, которые были разделены на три группы (табл. 1). Возраст участников исследования находился в диапазоне 18–80 лет. Группа госпитализированных в стационар была набрана с ноября по декабрь 2020 г. из числа пациентов Первой московской инфекционной больницы (Москва); вакцинированные пациенты, потребовавшие госпитализации (медианное время с момента прохождения полного курса вакцинации до госпитализации составило 56 дней), были набраны там же в период с марта по апрель 2021 г. Здоровые добровольцы, вакцинированные «Спутником V», были отобраны в период с сентября по декабрь 2020 г. У 23 пациентов, госпитализированных в стационар г. Москвы с различной степенью тяжести заболевания, сыворотку крови брали дважды: при поступлении в больницу (острая фаза) и через 4–6 месяцев после выписки; забор крови у девяти вакцинированных пациентов был произведен во время госпитализации, а у девяти здоровых вакцинированных добровольцев — в различные сроки после полной вакцинации. Медиана времени от наступления симптомов до первого забора крови составила 14 дней у невакцинированных пациентов и 10 дней у ранее вакцинированных. У вакцинированных добровольцев отсутствие COVID-19 было подтверждено отсутствием специфических антител к белку нуклеокапсида (Nc) SARS-CoV-2.

Критерии включения для всех пациентов: диагноз COVID-19 был подтвержден методом ОТ-ПЦР на РНК вируса в назофарингеальных мазках либо по результатам КТ легких; тяжесть заболевания госпитализированных пациентов определяли в соответствии со шкалой NEWS [3]. Критерии включения вакцинированных пациентов: госпитализация в стационар участников с подтвержденным диагнозом COVID-19, получивших

вторую дозу вакцины не менее чем за две недели до появления симптомов заболевания. Критерии включения здоровых добровольцев: наличие вакцинации двумя дозами «Спутника V» и отсутствие симптомов COVID-19 в течение двух недель перед взятием образцов. Критерии исключения: отказ от участия в исследовании.

Сбор и хранение образцов крови

Венозную кровь собирали в вакутейнеры с активатором свертывания и разделительным гелем и доставляли в лабораторию при +4 °С. Сыворотку отделяли центрифугированием в течение 10 мин со скоростью 3000 об./мин, аликвотировали и хранили при –30 °С до дальнейшего использования.

Определение IgG к нуклеокапсидному белку (Nc) и рецептор-связывающему домену шиповидного белка (S1 RBD) SARS-CoV-2

Измерение IgG к Nc и RBD проводили с помощью лабораторных тест-систем для иммуноферментного анализа (ИФА), результат выражали в виде индекса позитивности (ИП) в signal/cut-off (S/CO). Для проведения ИФА использовали рекомбинантный фрагмент рецептор-связывающего домена (RBD) S1 шиповидного белка SARS-CoV-2 (RBD №8COV1, Хайтест; Россия), экспрессированный в эукариотических клетках, и рекомбинантный белок нуклеокапсида (Nc), экспрессированный в *Escherichia coli* и очищенный в нашей лаборатории. Для сорбции в 96-луночные ИФА-планшеты (Costar 2592, Corning; США) вносили по 100 мкл раствора 1 мкг/мл рекомбинантного белка в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) и инкубировали ночь при 4 °С. На следующий день планшеты блокировали 2 ч при комнатной температуре буфером с 0,5% казеина S002X (ХЕМА; Россия). Образцы исследуемых сывороток разводили в соотношении 1:100 в ИФА-дилюэнте S011 (ХЕМА; Россия). В качестве положительного контроля использовали сыворотки реконвалесцентов с диагнозом COVID-19, подтвержденным ОТ-ПЦР, а в качестве отрицательного — архивные образцы сывороток, собранные до 2020 г. ИФА-планшеты инкубировали 1 ч при 37 °С и трижды отмывали фосфатным буфером с 0,1% Твин-20. После отмывки в лунки вносили по 100 мкл раствора поликлональных антител к IgG человека, конъюгированных с пероксидазой хрена (ПХ) (Novex A18823; США) и инкубировали 1 час при 37 °С. Затем планшеты отмывали 6 раз и добавляли в лунки по 100 мкл раствора субстрата 3,3', 5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) (R055, ХЕМА; Россия). Через 10 мин останавливали реакцию, внося в лунки по 100 мкл 10% HCl. Оптическую плотность (ОП) измеряли при длине волны 450 нм с помощью Multiscan FC (Thermo Scientific; США).

ИФА-нейтрализация (конкурентный ИФА)

Выявление IgG, нейтрализующих связывание RBD вируса с рецептором ACE2, проводили с помощью коммерческой тест-системы «SARS-CoV-2-ИФА-анти-RBD» (MT-I-C1-04.192, МедипалТех; Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Для этого образцы исследуемых сывороток смешивали с биотинилированным рекомбинантным человеческим рецептором ACE-2 и вносили смесь в лунки ИФА-планшет, сорбированных рекомбинантным RBD. После инкубации и отмывки в лунки

Таблица 1. Исследуемые когорты. Представлены медианные значения, в скобках указан диапазон

Характеристика	Пациенты (n = 23)	Вакцинированные пациенты (n = 9)	Вакцинированные добровольцы (n = 9)
Медианный возраст, лет (межквартильный диапазон)	59 (54–65)	72 (69–79)	34 (33–39)
Пол, %	52% мужчин, 48% женщин	33% мужчин, 67% женщин	56% мужчин, 44% женщин
Время от начала симптомов до первой точки. Медианное значение (мин-макс)	14 (9–17)	10 (5–19)	NA
Время от начала симптомов до второй точки. Медианное значение (мин-макс)	135 (116–159)	16 (11–24)	NA
Время от первой вакцинации до первой точки исследования, дни. Медианное значение (мин-макс)	NA	62 (30–88)	147 (100–263)
Время от первой вакцинации до второй точки исследования, дни. Медианное значение (мин-макс)	NA	68 (35–95)	261 (161–349)

добавляли ПХ, конъюгированную со стрептавидином. Для визуализации реакции использовали субстратный раствор ТМБ. Оптическая плотность в лунках была обратно пропорциональна концентрации в образце антител, способных блокировать связывание ACE-2 с RBD. Коэффициент ингибирования (КИ) вычисляли по формуле $КИ = (1 - \text{ОПобр}/\text{ОПотр}) \times 100\%$, где ОПобр — ОП исследуемого образца, а ОПотр — ОП отрицательного контроля, не содержащего антител. Нейтрализующую способность антител считали высокой, если образец сыворотки ингибировал связывание RBD с ACE-2 более чем на 30%; промежуточной, если КИ составлял 20–30% и низкой для образцов с КИ менее 20%.

Измерение avidности антител

Aвидность IgG, специфичных к RBD SARS-CoV-2, измеряли с помощью набора «SARS-CoV-2-ИФА-IgG плюс» (MT-И-C1-03.192, МедипалТех, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Для этого образцы положительных сывороток в дубликатах вносили в лунки планшет, сорбированных RBD. После инкубации и отмывки в лунки вносили либо ФСБ (нативные условия), либо раствор мочевины (денатурирующие условия). Далее проводили реакцию как обычный непрямой ИФА. Индекс avidности (ИА), пропорциональный устойчивости антител к денатурации, рассчитывали как соотношение ОП при 450 нм в лунках с денатурирующим агентом (4М мочевины) и в контрольных лунках, содержащих ФСБ. Антитела в образцах с ИА >50% считали высокоавидными, с ИА между 40 и 50% — с переходной avidностью, с ИА <40% — низкоавидными.

Статистический анализ данных

Результаты измерений представлены в виде медианных значений с указанием диапазона минимум-максимум. Сравнение групп проводили с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни, сравнение результатов, полученных для различных временных точек, проводили с помощью рангового критерия Уилкоксона. Статистически значимыми считали значения при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе работы нами были охарактеризованы антитела у трех исследуемых групп. Во всех образцах сывороток определяли наличие IgG к RBD и Nc SARS-CoV-2, а также

уровень avidности и нейтрализующей способности IgG к RBD. Образцы 23 госпитализированных пациентов с подтвержденным диагнозом COVID-19 продемонстрировали сходную динамику изменения уровня антител. Спустя две недели после появления симптомов все образцы были IgG-положительными как для RBD (медианный S/CO — 10,5; мин-макс — 1,1–13,3), так и для Nc (медианный 9,4; мин-макс 3,2–11,7) (рис. 1; табл. 2). Из 23 образцов 22 (95,6%) продемонстрировали высокую нейтрализующую активность в тесте на ингибирование связывания ACE2 с RBD и низкую avidность с медианой 20% (7,5; 37,3%) антител IgG против RBD. Только один образец в этой когорте имел уровень avidности 64,7%, вероятно, из-за предыдущего незарегистрированного контакта с вирусом. Как и ожидалось, эти результаты свидетельствуют о наличии не прошедших процесс созревания аффинитета вирусспецифичных IgG [4]. Для анализа длительности персистенции антител к SARS-CoV-2 у пациентов, перенесших COVID-19, образцы крови были повторно собраны через 4–6 месяцев после выздоровления. Все образцы оставались положительными на анти-RBD- и анти-Nc-IgG (рис. 2; табл. 2). Медианные значения ИП для анти-RBD-IgG снизились с 10,5 до 6,8 S/CO, а для анти-Nc IgG — с 9,4 до 7,4 S/CO. Образцы с низкими уровнями IgG к RBD (S/CO <5) в первой точке были собраны на 10–12-й дни болезни. Таким образом, пик концентрации антител не был достигнут, что может быть связано с вариабельностью инкубационного периода SARS-CoV-2 и индивидуальной динамикой выработки антител. Тем не менее четыре месяца спустя все пациенты, кроме одного, имели схожие уровни анти-RBD IgG (медиана ИП — 6,8, межквартильный диапазон — 6,3–8,9).

Несмотря на выявленное в данной группе 1,5-кратное снижение уровня IgG к RBD, нейтрализующая активность антител при этом оставалась высокой без значимых различий между первой и второй точками. Это позволяет предположить, что количество антител не является единственным фактором, определяющим нейтрализующую активность. С одной стороны, сохранение высокого уровня нейтрализации при снижении концентрации антител может быть обусловлено качественными изменениями антител, в том числе возрастанием их специфичности и аффинности за этот период, с другой стороны — особенностями тест-системы, используемой в исследовании, поскольку полученные значения близки к верхнему пределу количественного измерения данной тест-системы, что не позволяет надежно оценить изменения нейтрализующей активности. В течение того же периода avidность анти-

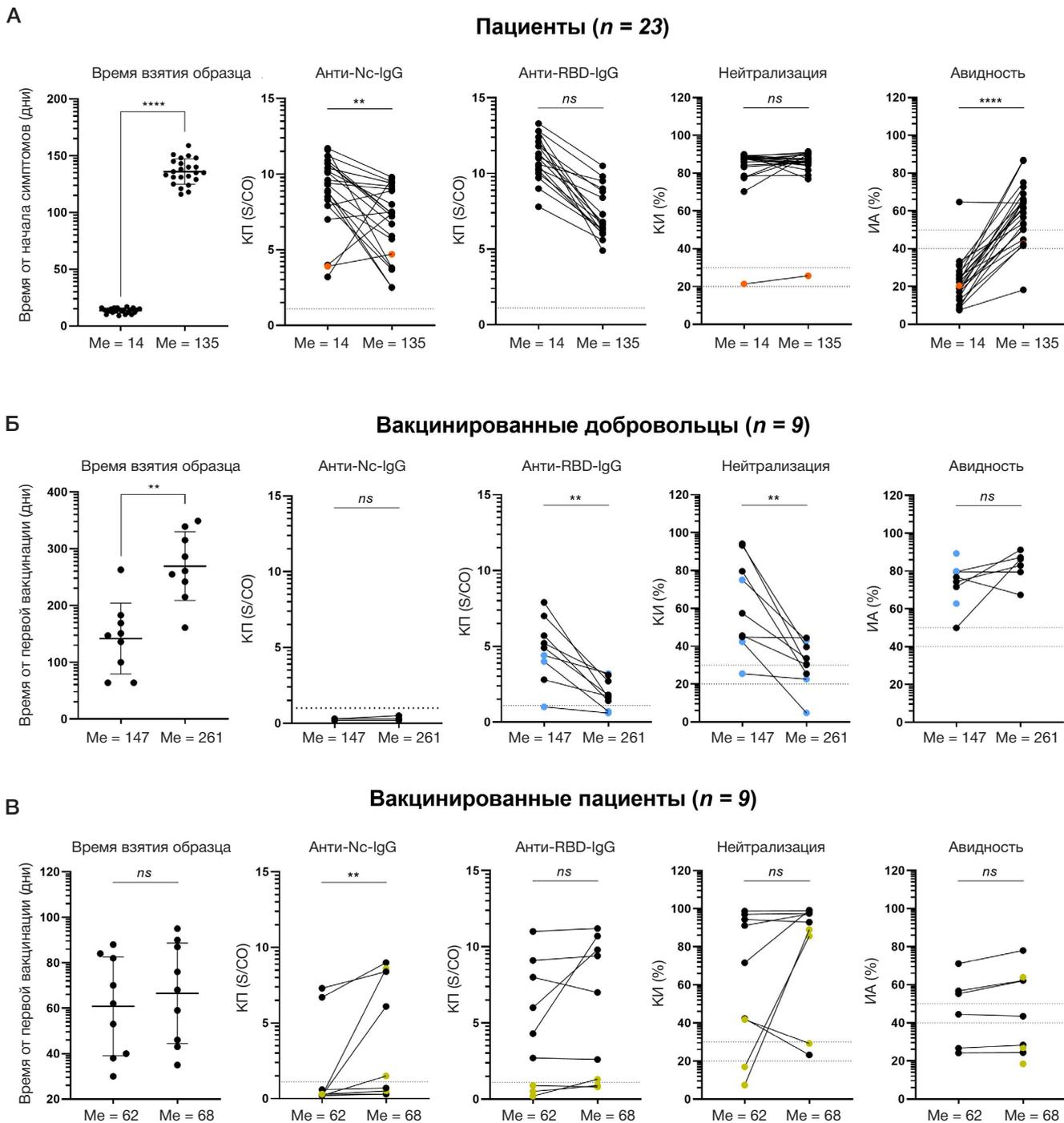


Рис. 1. Иммунный ответ к SARS-CoV-2 в исследуемых группах. (А) Когорта госпитализированных пациентов. (Б) Когорта вакцинированных пациентов. (В) Когорта здоровых добровольцев. Звездочкой отмечены достоверные различия (Т — критерий Уилкоксона). Ме — медианное время забора образцов в группах от начала симптомов или от первой вакцинации указано в подписях к осям графиков

RBD-IgG значительно возросла, достигнув высокого уровня (IA > 50%) у 78% пациентов. Медианное значение avidности во второй точке составило 61,4% (мин-макс — 18,2–86,9%). Оставшиеся шесть пациентов (22%) имели среднюю (40–50%, «зона созревания») или низкую (< 40%) avidность анти-RBD-IgG. Важно отметить, что у пяти пациентов с низкой и средней степенью avidности заболевание проходило со средней степенью тяжести или носило тяжелый характер (рис. 3). У одного пациента (рис. 1А; оранжевые точки) низкие уровни анти-RBD-IgG и нейтрализующей активности сохранялись во всех точках исследования, однако avidность его анти-RBD-IgG увеличилась с 20,4 до 42,7%. К концу периода

госпитализации большинство пациентов обладали высоким уровнем IgG к антигенам SARS-CoV-2, которые были эффективны в предотвращении связывания RBD происходило с человеческим ACE-2. В течение следующих месяцев созревание аффинности анти-RBD IgG и, хотя общая концентрация анти-RBD- и анти-Nc-IgG снижалась, нейтрализующая активность антител оставалась на высоком уровне.

В группе здоровых добровольцев, вакцинированных «Спутником V» (рис. 1Б), восемь из девяти образцов были положительными по анти-RBD-IgG в первой точке исследования (медиана составила 147 дней после первой вакцинации) с ИП, равным 4,9 S/CO (мин-макс —

Таблица 2. Уровни антител и их характеристика у когорт пациентов с различной степенью тяжести заболевания

		Пациенты			
		Всего (n = 23)	Лёгкие (n = 10)	Средней тяжести (n = 6)	Тяжелые (n = 7)
Острая фаза, медиана (межквартильный диапазон)					
1	Анти-RBD-IgG, S/CO	10.5 (7.8–11.8)	10.4 (7.6–11.9)	8.9 (1.5–11.5)	11.3 (10.2–12.8)
	Отрицательные, n (%)	1 (4.3)	0 (0)	1 (20)	0 (0)
	Положительные, n (%)	22 (95.6)	10 (100)	5 (80)	7 (100)
2	Анти-Nc-IgG, S/CO	9.4 (7.9–10.7)	9.9 (8.8–11.3)	7.45 (3.7–8.55)	10.4 (8.8–10.7)
	Отрицательные, n (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Положительные, n (%)	23 (100)	10 (100)	6 (100)	7 (100)
3	Нейтрализация, %	87.7 (83.3–88.7)	87.5 (78.4–88.9)	87.1 (58.1–88.5)	87.8 (87.3–89.0)
	Низкая, n (%)	1 (4.3)	0 (0)	1 (20)	0 (0)
	Высокая, n (%)	22 (95.6)	10 (100)	5 (80)	7 (100)
4	Авидность, %	20.4 (14.6–26.3)	19.5 (15.28–25.7)	22.2 (17.4–25.95)	22.4 (8.7–31.6)
	Низкая, n (%)	22 (95.6)	9 (90)	6 (100)	7 (100)
	Высокая, n (%)	1 (4.3)	1 (10)	0 (0)	0 (0)
4–6 месяцев после выздоровления, медиана (межквартильный диапазон)					
1	Анти-RBD-IgG, S/CO	6.8 (6.1–9.0)	6.5 (6.1–8.7)	6.6 (4.7–9.2)	7.3 (6.8–9.8)
	Отрицательные, n (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Положительные, n (%)	23 (100)	10 (100)	6 (100)	7 (100)
2	Анти-Nc-IgG, S/CO	7.4 (4.7–9.2)	7.3 (3.5–9.3)	6.7 (5.5–9.1)	7.4 (3.8–9.4)
	Отрицательные, n (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Положительные, n (%)	23 (100)	10 (100)	6 (100)	7 (100)
3	Нейтрализация, %	86.4 (84.3–89.5)	86.2 (80.9–88.8)	87.1 (69.7–90.1)	85.8 (85.3–89.5)
	Низкая, n (%)	1 (4.3)	0 (0)	1 (20)	0 (0)
	Высокая, n (%)	22 (95.6)	10 (100)	5 (80)	7 (100)
4	Авидность, %	61.4 (50.0–66.2)	64.7 (52.3–70.0)	55.7 (42.4–62.6)	59.0 (42.2–75.0)
	Низкая, n (%)	6 (26.1)	1 (10)	3 (50)	2 (28.6)
	Высокая, n (%)	17 (73.9)	9 (90)	3 (50)	5 (71.4)

1–7,9). Четыре месяца спустя (медиана — 261 день после первоначальной вакцинации) анти-RBD-IgG-ИП значительно снизился до медианного уровня 1,7 S/CO, хотя у семи из девяти добровольцев оставались положительными по анти-RBD-IgG. У всех вакцинированных добровольцев IgG к Nc у SARS-Cov-2 отсутствовали, что исключает заражение SARS-CoV-2 в данной группе. Нейтрализующая активность антител коррелировала с динамикой изменения общего количества IgG и достоверно снизилась во всех образцах с медианного значения КИ 57,4% в первой точке исследования до медианы 30,6% во второй точке. Авидность антител при этом оставалась высокой, из чего можно заключить, что уже в первой точке исследования (147 дней после вакцинации) созревание аффинитета завершилось у всех вакцинированных. Стоит отметить, что для трех образцов (33%) во второй точке исследования было невозможно оценить авидность из-за низкого уровня анти-RBD-IgG (рис. 1Б; показаны синим).

В группе вакцинированных «Спутником V» пациентов с подтвержденным диагнозом COVID-19 (рис. 1В, табл. 1) медиана времени с момента получения первой дозы вакцины составила 62 дня (30–88), а среднее время забора проб с момента появления симптомов составило 10 дней (5–19). В это время шесть из девяти образцов были положительными на анти-RBD-IgG с медианой 4,3 S/CO

и только два были положительными на анти-Nc-IgG. Все анти-RBD-положительные образцы и один отрицательный образец были положительными в ИФА нейтрализации (медиана — 71,6%, мин-макс — 7,4–98,6%). Большая часть образцов (66,7%) имела антитела с низкой авидностью: медианное значение ИА — 27,6% (мин-макс — 0–71,1%). Повторный забор сыворотки в этой группе осуществляли приблизительно на 16-й день после появления симптомов. Через неделю после первого анализа медиана S/CO анти-RBD-IgG в целом существенно не изменилась (медиана — 7 S/CO, мин-макс — 0,8–11,2), однако семь из девяти пациентов были серопозитивными после инфекции и/или вакцинации. Нейтрализующая активность также существенно не изменилась (медиана — 92,9%, мин-макс — 23,2–99,2%), то же самое наблюдалось и для авидности антител. В двух образцах с низкими уровнями анти-RBD-IgG нейтрализующая активность значительно возросла до 85 и 89%, вероятно, из-за выработки анти-RBD-IgM (рис. 1, желтые точки).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

У переболевших COVID-19 титры вируснейтрализующих антител коррелируют с тяжестью заболевания [5, 6], и такие антитела могут вырабатываться даже при низком уровне

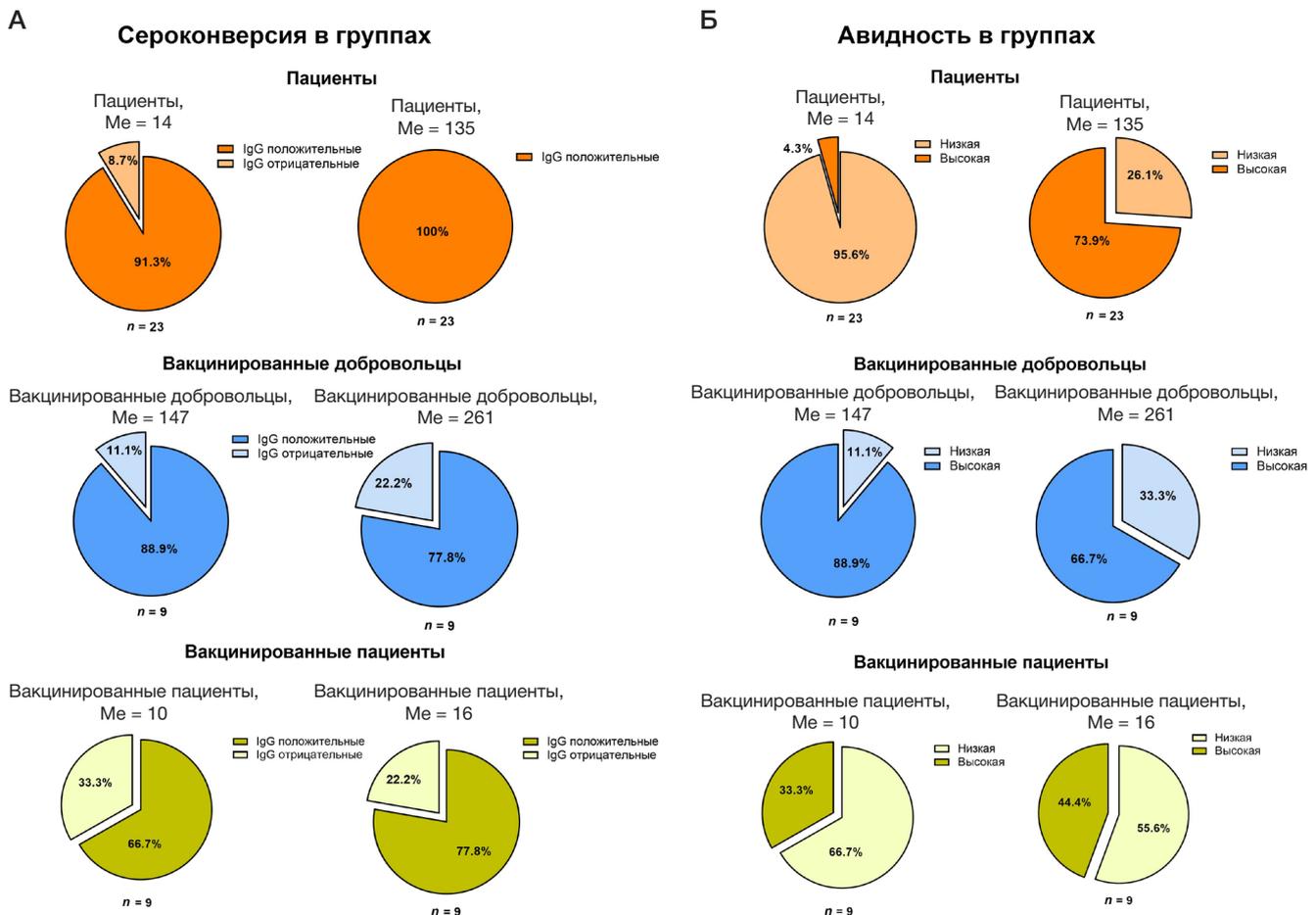


Рис. 2. Конверсия ИП анти-RBD-IgG (А) avidности анти-RBD-IgG (Б) в исследованных группах. Me — медианное время от начала симптомов или от первой вакцинации (дни)

соматической гипермутации [7, 8]. Рецепторсвязывающий домен (RBD) является иммунодоминантным и служит мишенью приблизительно для 90% нейтрализующих антител, обнаруживаемых в крови после перенесенной инфекции. Было показано, что титры анти-RBD-IgG снижаются после выздоровления с периодом полувыведения 49 дней. В то же время avidность антител со временем возрастала за счет проходящего процесса «созревания аффинитета» (соматической гипермутации с последующей селекцией на связывание с антигеном). Количество IgG к S-белку и RBD было выше в сыворотках госпитализированных в стационар пациентов в сравнении с больными, перенесшими COVID-19 в легкой или бессимптомной форме [9]. Известно, что avidность антител возрастает в ходе инфекции и сохраняется высокой после выздоровления [1]. В донорских плазмах реконвалесцентов корреляция высокой нейтрализующей активности с avidностью анти-RBD-IgG была выше, чем с avidностью анти-Nc. Это позволяет предположить, что антитела к RBD являются основными вируснейтрализующими антителами после COVID-19.

В проведенном нами исследовании сравнение образцов от госпитализированных пациентов и вакцинированных добровольцев спустя 4–6 месяцев после заболевания или вакцинации показало, что у вакцинированных добровольцев наблюдается достоверно более низкий уровень анти-RBD-IgG и нейтрализующей активности, но при этом достоверно более высокая avidность анти-RBD-IgG (рис. 4А, В). Все госпитализированные пациенты оставались положительными по анти-RBD-IgG, в то время

как у одного из госпитализированных добровольцев уровень антител опустился ниже порога обнаружения (рис. 4В).

Сравнение образцов, полученных от невакцинированных и полностью вакцинированных «Спутником V» пациентов в острой фазе заболевания, показало, что у вакцинированных пациентов уровни антител к RBD и Nc были достоверно ниже, чем у невакцинированных (рис. 4Б). Тем не менее avidность анти-RBD-IgG в группе вакцинированных пациентов была достоверно выше, из чего можно заключить, что, несмотря на низкие уровни антител, вакцинация «Спутником V» приводила к развитию первичного иммунного ответа и формированию В-клеток памяти, а выработка антител в ходе инфицирования демонстрирует свойства вторичного иммунного ответа. В долгосрочном периоде степень созревания аффинности антител после вакцинации оказывается выше, чем после перенесенной инфекции. Хотя предполагается, что созревание антител повышает их нейтрализующую активность [10], в нашей работе корреляция между этими параметрами не выявлена.

Стоит отметить, что исследование имеет ряд ограничений, которые необходимо учитывать. Во-первых, выборка образцов, используемая для анализа, достаточно небольшая. Во-вторых, включенные группы пациентов имели ограниченный спектр клинических проявлений COVID-19. В частности, в исследовании не участвовали бессимптомные пациенты и пациенты с легким течением, доля которых наибольшая по сравнению с остальными клиническими формами. Кроме того, исследование

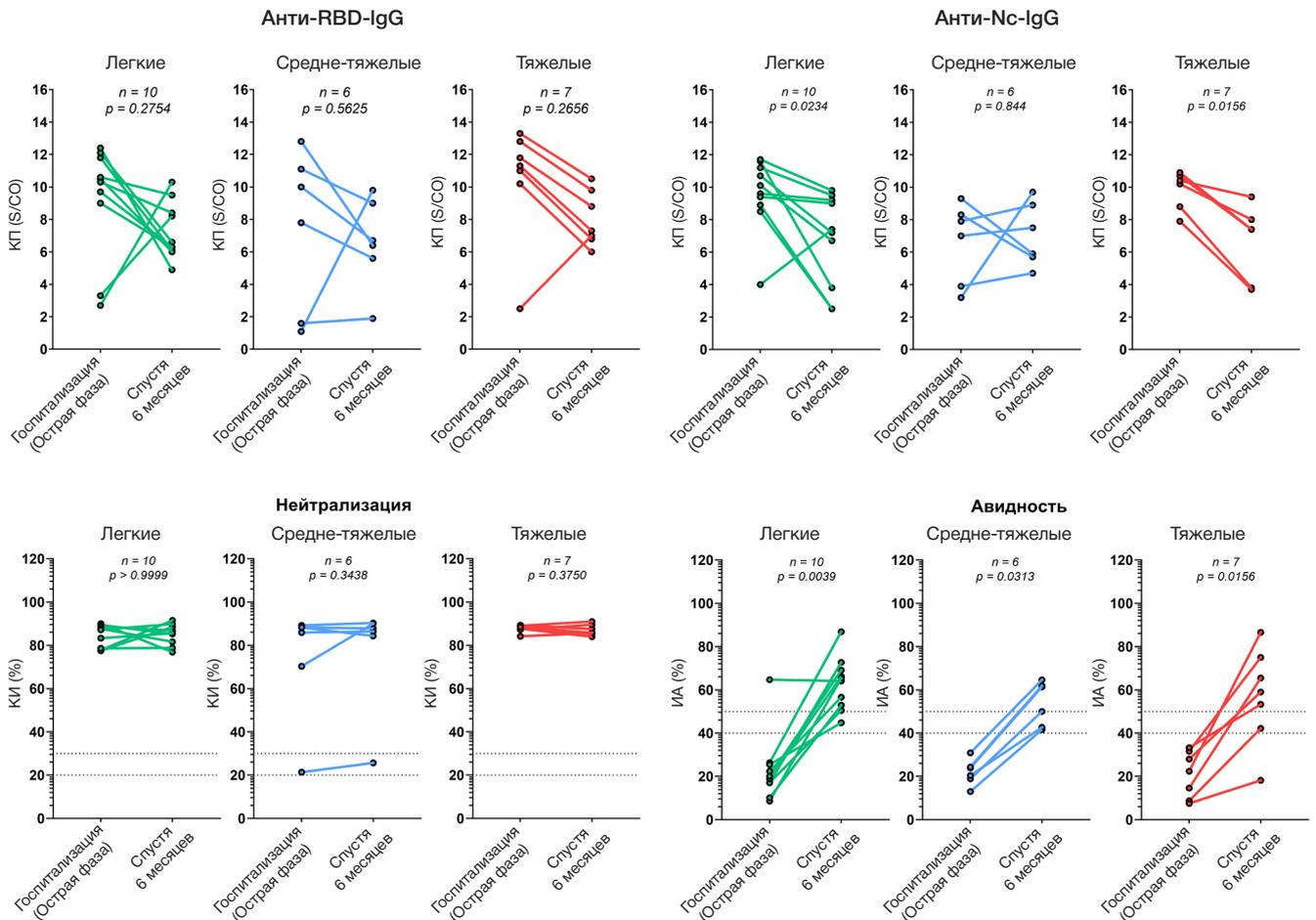


Рис. 3. Сравнение антительного ответа у пациентов с различной тяжестью заболевания

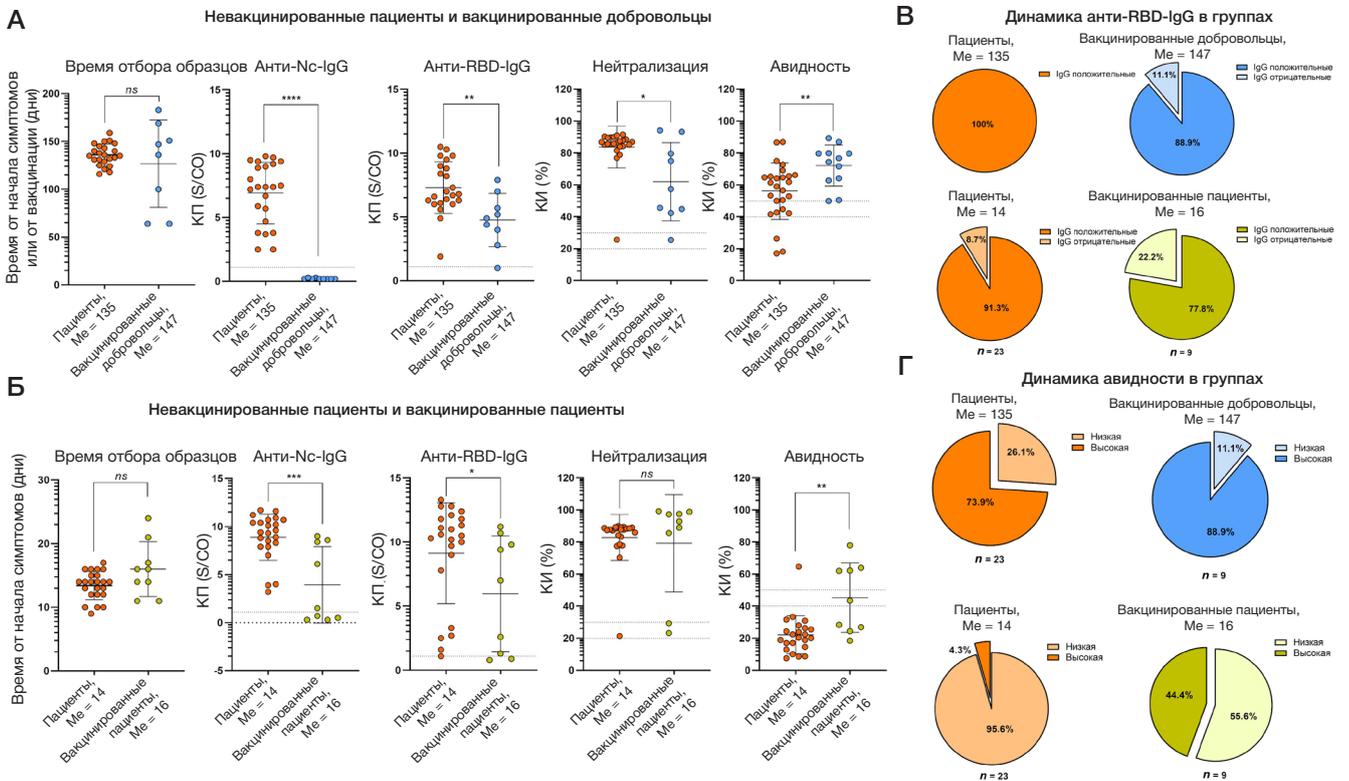


Рис. 4. Сравнение иммунного ответа в различных группах. (А) Сравнение невакцинированных пациентов и здоровых вакцинированных добровольцев через 4–6 месяцев после инфицирования/вакцинации. (Б) Сравнение вакцинированных и невакцинированных пациентов в острой фазе инфекционного процесса (2–3 недели от начала симптомов). (В) Сравнение сероконверсии по анти-RBD-IgG в исследованных группах. (Г) Сравнение динамики изменения avidности анти-RBD-IgG в исследованных группах. Звездочкой отмечены достоверные различия (U-критерий Манна-Уитни)

лимитировано лишь двумя временными точками, в которых были проведены наблюдения, что не позволяет оценить, когда именно наступает пик ответа по исследуемым нами параметрам.

ВЫВОДЫ

Проведенное исследование позволяет оценить основные характеристики антительного ответа. Так, у переболевших мы наблюдали ожидаемую картину, где после острой фазы заболевания, достигнутый уровень антител к RBD неизбежно снижается, но по меньшей мере в течение полугодия вируснейтрализующая активность сохраняется, что, вероятно, достигается повышением качества антител и ростом avidности. Нами показано, что вакцинация «Спутником V» также приводит к формированию высокоавидных антител, которые сохраняются на протяжении по меньшей мере 6 месяцев наблюдения. Это свидетельствует о наличии

маркеров защитной эффективности по крайней мере в течение 4–6 месяцев после вакцинации или ранее перенесенного заболевания и адекватности срока, выбранного для повторной иммунизации «Спутником V» на территории России. Наше исследование не позволяет оценить, для каких групп защитная эффективность может составлять меньший срок, чем 6 месяцев, однако исследование группы вакцинированных заболевших показывает наличие низкой avidности у вакцинированных заболевших и это резко контрастирует с группой здоровых вакцинированных, которые на заболели в течение полугодия наблюдения. Мы предполагаем, что низкая avidность анти-RBD-IgG, спустя два месяца после вакцинации, может служить не только прогностическим фактором тяжести заболевания, но и одним из потенциальных маркеров для ранней ревакцинации. Дальнейшие исследования на больших группах позволят подтвердить или опровергнуть данную гипотезу.

Литература

1. Benner SE, Patel EU, Laeyendecker O, et al. SARS-CoV-2 antibody avidity responses in COVID-19 patients and convalescent plasma donors. *J Infect Dis.* 2020; 222: 1974–84.
2. Tang J, Grubbs G, Lee Y, et al. Impact of convalescent plasma therapy on SARS-CoV-2 antibody profile in COVID-19 patients. *Clin Infect Dis.* 2021; ciab317.
3. Baker KF, Hanrath AT, Schim van der Loeff I, et al. National Early Warning Score 2 (NEWS2) to identify inpatient COVID-19 deterioration: a retrospective analysis. *Clin Med (Lond).* 2021; 21 (2): 84–89.
4. Paul KS Chan, Pak-Leong Lim, Esther YM Liu, et al. Antibody Avidity Maturation during Severe Acute Respiratory Syndrome-Associated Coronavirus Infection. *J Infect Dis.* 2005; 192 (1): 166–9.
5. Wang C, Li W, Drabek D, et al. A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection. *Nat Commun.* 2020; 11 (1): 2251.
6. Long Q, Liu B, Deng H, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat Med.* 2020; 26 (6): 845–8.
7. Kreer C, Zehner M, Weber T, et al. Longitudinal isolation of potent near-germline SARS-CoV-2-neutralizing antibodies from COVID-19 patients. *Cell.* 2020; 182 (4): 843–54.
8. Chi X, Yan R, Zhang J, et al. A neutralizing human antibody binds to the N-terminal domain of the spike protein of SARS-CoV-2. *Science.* 2020; 369 (6504): 650–5.
9. Piccoli L, Park Y, Tortorici M, et al. Mapping neutralizing and immunodominant sites on the SARS-CoV-2 Spike Receptor-Binding Domain by structure-guided high-resolution serology. *Cell.* 2020; 183 (4): 1024–42.
10. Gaebler C, Wang Z, Lorenzi JCC, et al. Evolution of antibody immunity to SARS-CoV-2. *Nature.* 2021; 591, 639–44.

References

1. Benner SE, Patel EU, Laeyendecker O, et al. SARS-CoV-2 antibody avidity responses in COVID-19 patients and convalescent plasma donors. *J Infect Dis.* 2020; 222: 1974–84.
2. Tang J, Grubbs G, Lee Y, et al. Impact of convalescent plasma therapy on SARS-CoV-2 antibody profile in COVID-19 patients. *Clin Infect Dis.* 2021; ciab317.
3. Baker KF, Hanrath AT, Schim van der Loeff I, et al. National Early Warning Score 2 (NEWS2) to identify inpatient COVID-19 deterioration: a retrospective analysis. *Clin Med (Lond).* 2021; 21 (2): 84–89.
4. Paul KS Chan, Pak-Leong Lim, Esther YM Liu, et al. Antibody Avidity Maturation during Severe Acute Respiratory Syndrome-Associated Coronavirus Infection. *J Infect Dis.* 2005; 192 (1): 166–9.
5. Wang C, Li W, Drabek D, et al. A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection. *Nat Commun.* 2020; 11 (1): 2251.
6. Long Q, Liu B, Deng H, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat Med.* 2020; 26 (6): 845–8.
7. Kreer C, Zehner M, Weber T, et al. Longitudinal isolation of potent near-germline SARS-CoV-2-neutralizing antibodies from COVID-19 patients. *Cell.* 2020; 182 (4): 843–54.
8. Chi X, Yan R, Zhang J, et al. A neutralizing human antibody binds to the N-terminal domain of the spike protein of SARS-CoV-2. *Science.* 2020; 369 (6504): 650–5.
9. Piccoli L, Park Y, Tortorici M, et al. Mapping neutralizing and immunodominant sites on the SARS-CoV-2 Spike Receptor-Binding Domain by structure-guided high-resolution serology. *Cell.* 2020; 183 (4): 1024–42.
10. Gaebler C, Wang Z, Lorenzi JCC, et al. Evolution of antibody immunity to SARS-CoV-2. *Nature.* 2021; 591, 639–44.