

Перспективы использования технологической платформы ELISPOT в системе противозидемических мероприятий против новой коронавирусной инфекции COVID-19

Д. А. Потеряев^{1,*}, Р. А. Хамитов¹, Г. А. Ефимов², А. М. Шустер¹

¹Общество с ограниченной ответственностью «Международный биотехнологический центр «ГЕНЕРИУМ», ул. Владимирская, д. 14, пос. Вольгинский, Петушинский район, Владимирская область, 601125, Российская Федерация

²Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный гематологический исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новый Зыковский проезд, д. 4, Москва, 125167, Российская Федерация

Определение наличия Т-клеточного иммунного ответа к вирусу SARS-CoV-2 актуально как для диагностики заболевания у пациентов с наличием симптомов, так и для определения общего количества людей, перенесших данное заболевание, в том числе бессимптомно. Кроме того, данные тесты эффективны для оценки иммунного ответа после проведения вакцинации, а также оценки напряженности специфического иммунитета в группах риска и ранее переболевших. При этом среди методов оценки Т-клеточного иммунного ответа наиболее перспективным является тест ELISPOT на выброс интерферона гамма (IGRA) под действием специфических вирусных антигенов. В обзоре рассмотрены перспективы использования технологической платформы ELISPOT в клинико-лабораторной практике при работе с новой коронавирусной инфекцией COVID-19 с учетом особенностей иммунного ответа при данном заболевании. В качестве источников литературы использовались статьи, опубликованные в реферируемых журналах, препринты статей, размещенные на ресурсах arXiv, кроме того, использовались личные коммуникации авторов с ведущими иммунологами. Показано, что внедрение В- и Т-клеточного ELISPOT-тестов позволяет осуществлять мониторинг иммунологического статуса пациентов и выбор тактики лечения, выявлять наиболее уязвимые группы населения, осуществлять комплексную оценку вакцинных препаратов на этапах разработки, клинических исследований и внедрения в практику. Обсуждаются вопросы сохранения Т-клеточного иммунитета в крови переболевших коронавирусными инфекциями HCoV, SARS, MERS, COVID-19 и преимуществ Т-клеточного ELISPOT-теста перед серологическими тестами для эпидемиологической оценки распространения новой коронавирусной инфекции и в клинических исследованиях вакцин против COVID-19. Биотехнологические компании имеют готовую технологическую платформу, легко адаптируемую под конкретный вид анализа и патогена, для разработки и промышленного производства наборов ELISPOT. Подтверждена необходимость разработки вакцин, стимулирующих как клеточный, так и гуморальный иммунные ответы, поднят вопрос о защитном потенциале перекрестного иммунитета, приобретенного до пандемии COVID-19.

Ключевые слова: ELISPOT; SARS-CoV-2; COVID-19; Т-лимфоциты; В-клетки; антитела; вакцина; иммунитет

Для цитирования: Потеряев ДА, Хамитов РА, Ефимов ГА, Шустер АМ. Перспективы использования технологической платформы ELISPOT в системе противозидемических мероприятий против новой коронавирусной инфекции COVID-19. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2020;20(3):146–158. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-3-146-158>

Контактное лицо: Потеряев Дмитрий Александрович; poteryaev@ibcgenerium.ru

Prospects for Using the ELISPOT Technological Platform as Part of Anti-Epidemic Measures Against the New Coronavirus Infection COVID-19

D. A. Poteryaev^{1,*}, R. A. Khamitov¹, G. A. Efimov², A. M. Shuster¹

¹International Biotechnology Center "GENERIUM", 14 Vladimirskaia St., Volginsky town, Petushinskiy District, Vladimir Oblast 601125, Russian Federation

²National Research Center for Hematology, 4 Novy Zykovskiy proezd, Moscow 125167, Russian Federation

Determination of T-cell immune response to SARS-CoV-2 is important both for diagnosis of the disease in symptomatic patients, and for determination of the total number of people who have had the disease, including its

asymptomatic form. In addition, these assays are efficient for assessing the immune response after vaccination, as well as immunity levels in risk groups and in convalescent patients. The most promising method of T-cell immune response assessment is an ELISPOT-based assay measuring the release of interferon-gamma (IGRA) after stimulation with coronavirus-specific antigens. The present review analyses the prospects for using the ELISPOT technological platform in the clinical laboratory setting when dealing with the new coronavirus infection COVID-19, given specific aspects of the immune response. The review summarises data from articles published in peer-reviewed journals, preprints of articles available at arXiv resources, and information that some leading immunologists shared with the authors during private discussions. It has been shown that the introduction of B- and T-cell ELISPOT assays will make it possible to monitor the immunological status of patients, select a treatment strategy, identify the most vulnerable populations, carry out comprehensive assessment of vaccines during the development, clinical trials and implementation stages. The paper discusses the issues of maintaining T-cell immunity in the blood of people who have had HCoV, SARS, MERS, and COVID-19 coronavirus infections. It also discusses the advantages of the T-cell ELISPOT assay over serological tests as regards epidemiological assessment of the prevalence of the new coronavirus infection, and clinical trials of COVID-19 vaccines. Biotechnology companies have a ready-made technological platform for the development and industrial-scale production of ELISPOT kits, and this platform is easily adaptable to specific types of assays and pathogens. The paper supports the need to develop vaccines that would stimulate both cellular and humoral immune responses, and raises the question of the protective potential of cross-immunity acquired before the COVID-19 pandemic.

Key words: ELISPOT; SARS-CoV-2; COVID-19; T-cells; B-cells; antibodies; vaccine; immunity

For citation: Poteryaev DA, Khamitov RA, Efimov GA, Shuster AM. Prospects for using the ELISPOT technological platform as part of anti-epidemic measures against the new coronavirus infection COVID-19. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение* = *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2020;20(3):146–158. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-3-146-158>

Corresponding author: Dmitry A. Poteryaev; poteryaev@ibcgenerium.ru

Методы оценки Т-клеточного иммунного ответа к COVID-19 широко используются как для диагностики заболевания у пациентов с наличием симптомов, так и для определения общего количества людей, перенесших данное заболевание, в том числе бессимптомно. Кроме того, данные тесты эффективны для оценки иммунного ответа после проведения вакцинации, а также оценки напряженности специфического иммунитета в группах риска и ранее переболевших. При этом среди методов оценки Т-клеточного иммунного ответа наиболее перспективным является IGRA-ELISPOT (Interferon-Gamma Release Assay — Enzyme Linked Spot Analysis, тест на секрецию гамма-интерферона — иммуноферментный анализ пятен), основанный на выбросе интерферона гамма под действием специфических антигенов коронавируса [1].

Имеющиеся данные по SARS-CoV 2002–2003 гг. подтверждают возможность использования ELISPOT для выявления пациентов, перенесших данное заболевание несколько лет назад. Если антитела в сыворотке крови пациентов сохранялись до 16 месяцев, то цитотоксические Т-лимфоциты, специфически реагирующие на N-белок коронавируса, все еще обнаруживались в периферических мононуклеарах переболевших пациентов с SARS или MERS более чем через 10 лет после заражения [2].

Вопрос, наблюдается ли схожая картина при COVID-19, требует дополнительного изучения.

Исследование врожденных и приобретенных иммунных реакций и развитие клеток иммунной защиты у пациентов, которые выздоровели от COVID-19, может стать отправной точкой для разработки профилактических вакцин и иммунотерапии против коронавирусов. Кроме того, есть основание полагать, что необходимо разрабатывать вакцины, которые стимулируют не только гуморальный, но и преимущественно клеточный иммунный ответ.

Цель работы — рассмотреть перспективы использования технологической платформы ELISPOT в клинико-лабораторной практике при работе с новой коронавирусной инфекцией COVID-19 с учетом особенностей иммунного ответа при данном заболевании. Для достижения цели были поставлены следующие задачи: а) провести обзор данных литературы о характере и длительности иммунного ответа на SARS-CoV-2; б) проанализировать наиболее подходящие методики, позволяющие не

только характеризовать иммунный ответ, но и прогнозировать иммунную защищенность к повторным инфекциям или после вакцинации; в) оценить возможности введения наиболее ценных методик в широкую клинико-диагностическую практику.

Обоснование разработки и применения Т-клеточного и В-клеточного ELISPOT при исследованиях вакцин против COVID-19

Высокопроизводительные тесты *in vitro*, позволяющие быстро оценивать иммунологический статус больших когорт людей, являются незаменимыми инструментами для проведения популяционных клинических исследований, включая исследование вакцин.

ELISPOT — чувствительный и надежный инструмент для измерения функционального отклика иммунитета путем оценки наличия антиген-специфических цитокин-секретирующих лимфоцитов, присутствующих в мононуклеарных клетках периферической крови (МКПК, РВМС). В течение последних 15 лет метод ELISPOT был доминирующей платформой и стандартом для анализа клеточно-опосредованного иммунитета (КОИ). Анализы ELISPOT широко используются для определения КОИ после первичной или вторичной вакцинации [3].

Наглядным примером является вакцинация против оспы. Несмотря на то что всеобщая вакцинация с помощью вируса осповакцины была прекращена в мире в 1980-х гг., в начале XXI века в США было принято решение возобновить вакцинацию для отдельных групп населения, профессионально связанных с риском новой встречи с этой инфекцией. Это решение стимулировало разработку высокопроизводительных тестов, предназначенных для оперативной и незатратной оценки иммунного статуса больших популяционных когорт после вакцинации.

Известно, что успешная вакцинация против оспы, как и многих других особо опасных вирусов, к которым может быть отнесен и SARS-CoV-2, требует как гуморального, так и клеточного иммунного ответов. Для оценки гуморального ответа часто используют серологические методы, и прежде всего иммуноферментный анализ (ИФА). Однако золотым стандартом является количественный тест на циркулирующие нейтрализующие антитела, специфичные к вирусу. Несмотря на то

что еще нет единого стандарта на КОИ, при вакцинации против оспы для широкомасштабного определения КОИ применялся именно ELISPOT [4].

Тесты ELISPOT могут быть использованы для оценки иммунной памяти (иммунного отклика), для определения количества специфических для вирусных антигенов лимфоцитов, секретирующих цитокины, и для определения Т-хелперного профиля иммунного ответа вакцинированного.

Так, исследователи клиники Майо (США) оптимизировали использование анализов ELISPOT как на интерферон гамма (IFN γ), так и на IL-10 для точной оценки Th1- и Th2-подобного цитокинового профиля людей, ранее вакцинированных вирусом осповакцины, на основе частоты цитокин-секретирующих лимфоцитов после стимуляции *in vitro* вирусом осповакцины. ELISPOT для измерения секреции IFN γ CD8 $^{+}$ Т-клетками, специфичными к вирусу, не требует какого-либо культивирования, предварительной сортировки или выделения Т-клеток. Данный анализ позволяет более точно измерять специфичный для вакцины ответ путем удаления лимфоцитов, которые не являются специфичными для осповакцины, но все же обладают потенциалом секретировать IFN γ в ответ на стимуляцию вирусом осповакцины (например, NK-клетки) [4].

Таким образом, анализы ELISPOT являются быстрым и надежным методом *in vitro* для мониторинга иммунного ответа после вакцинации против оспы.

В-клеточный ELISPOT позволяет исследовать присутствие секретирующих антитела клеток (ASC) в образцах крови или тканей. Традиционный метод контроля В-клеточного ответа, генерируемого после иммунизации или инфекции, заключается в количественном определении титров специфических антител в сыворотке крови с помощью ИФА. Метод ИФА является простым методом измерения титров антител в сыворотке крови, однако ИФА не дает информации о количестве и местонахождении ASC. В-клеточный ELISPOT специально разработан с этой целью и оказался особенно полезным для идентификации и определения количества отдельных ASC в суспензиях клеток. В-клетки памяти, которые имеют большую продолжительность жизни, играют центральную роль в гуморальном иммунном ответе. В естественных условиях В-клетки памяти не размножаются и не продуцируют антитела до тех пор, пока они не активируются повторным воздействием определенного антигена. Основным преимуществом В-клеточного ELISPOT является его способность активировать антиген-специфические В-клетки памяти *ex vivo*, после чего они могут быть обнаружены и подсчитаны визуально. ELISPOT В-клеток является предпочтительным анализом для определения напряженности иммунитета и длительности защиты от определенной инфекции (например, при вакцинации) [5]. Анализ ELISPOT В-клеток полезен в различных областях биомедицинских исследований, включая разработку вакцин, исследования инфекций, в фармакотерапии, а также при изучении аутоиммунных заболеваний и аллергии.

Большинство вакцин, разрешенных для применения у людей, защищают путем индукции выработки специфических антител. Выработка антител обычно определяется в сыворотке или плазме крови с использованием серологических анализов, включая ИФА и функциональные тесты (тесты на агглютинацию, опсонофагоцитарная реакция и активация комплемента, тесты на токсин и нейтрализацию вируса). Однако из-за анатомической компартментализации адаптивной иммунной системы измерение титров антител в сыворотке (или плазме) крови может не предсказать клиническую эффективность или даже местную иммуногенность, особенно для вакцин против инфек-

ций слизистой оболочки, в которых защита часто опосредуется локальным ответом [6].

Как правило, вторичный ответ гуморальной системы иммунитета, индуцируемый большинством инъекционных вакцин, измеряется при максимальном уровне специфических антител, который наблюдается в сыворотке крови через 4–6 недель после иммунизации, и такой ответ может сохраняться довольно долго из-за циркуляции в крови сывороточных иммуноглобулинов в течение довольно длительного времени (от одной до нескольких недель, в зависимости от изотипа иммуноглобулина). В отличие от титров антител в сыворотке крови ответы ASC достигают максимума намного раньше (6–8 сут) и исчезают из крови в течение нескольких суток, что делает их измерение независимым от предшествующих иммунизаций той же вакциной. Измерение ответов ASC представляется более дискриминационным, чем измерение титров сывороточных антител, особенно вторичных или бустерных ответов, поскольку частоты ASC до и после последней иммунизации незначительно изменяются по сравнению с соответствующими ответами вторичных антител сыворотки. Последний тип гуморального ответа может быть измерен только после того, как соответствующий титр антител значительно увеличился по сравнению с титром перед вакцинацией, называемым «серологическим исходным уровнем» [5].

Следовательно, измерение ASC, временно мигрирующих в кровотоки, наиболее доступный лимфоидный компартмент, вероятно, представляет собой мощный и дискриминирующий инструмент для оценки ранней стадии гуморального эффекторного иммунного ответа.

В-клеточный ELISPOT для сопровождения исследований вакцин против COVID-19 также может быть разработан и выпускаться промышленными партиями биотехнологическими компаниями. Такие наборы для исследовательских целей уже используются (рис. 1). В-клеточные наборы ELISPOT позволяют количественно определять специфические для SARS-CoV-2 В-клетки памяти, даже когда уровни антител начинают снижаться. Например, в случае малярии было показано, что уровни антител падают ниже предела обнаружения через 1 год после первичной инфекции, тогда как уровни В-клеток памяти остаются постоянными [7]. Возможность определения гуморального ответа на SARS-CoV-2, даже в отсутствие титров антител, будет иметь большое значение для понимания механизмов формирования долгосрочного иммунитета к COVID-19.

Т-клеточные ответы на SARS-CoV-2 и методы их исследования

До настоящего времени нет достаточной ясности, почему COVID-19 протекает так различно, от бессимптомного до критического, приводящего к смерти пациента. Остается актуальным вопрос, почему даже при близком контакте с больными некоторые люди не заболевают. Безусловно, сопутствующие заболевания во многом объясняют неблагоприятный прогноз в ряде случаев. Однако очевидно, что за легкое и бессимптомное течение, а особенно за резистентность к инфекции, ответственна в первую очередь иммунная система пациента. Может ли такая вариабельность формироваться за счет различий Т-клеточного иммунного ответа, в том числе из-за перенесенных ранее «простудных» инфекций, вызванных другими коронавирусами?

При изучении вирусных инфекций традиционно особое внимание уделяется гуморальному иммунитету — появлению в крови антител (IgM, IgG) к вирусным антигенам. Однако в борьбе с вирусными инфекциями существенную, а во многих

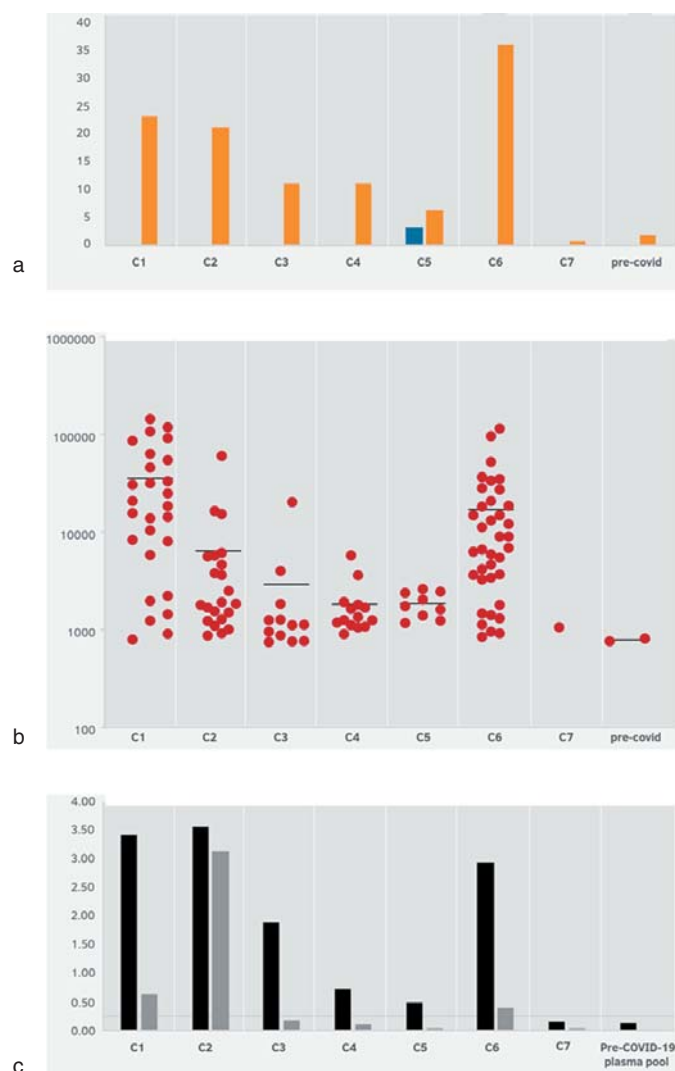


Рис. 1. Определение количества специфичных для RBD спайк-белка В-клеток и титр антител к RBD. Семь пациентов с инфекцией COVID-19, подтвержденной ранее методом ПЦР, сдали кровь после выздоровления от COVID-19 легкой или средней тяжести. Выделенные мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) выздоровевших пациентов были стимулированы R848 и рекомбинантным IL-2. После предварительной стимуляции клетки инкубировали в анти-IgG планшете FluoroSpot (флуоресцентный вариант метода ELISPOT). IgG, специфичные для RBD, были детектированы конъюгатом RBD-550. Частота секретирующих IgG клеток, измеренная как пятнообразующие единицы (SFU), показана на рисунке а, относительная площадь каждого пятна — на рисунке б. IgG, специфичные для RBD, были проанализированы с помощью ИФА. (а) FluoroSpot (SFU) человеческих IgG к RBD, (б) FluoroSpot (RSV) человеческих IgG к RBD, (с) ИФА человеческих IgG к SARS-CoV-2.

По оси абсцисс (рис. а–с): C1–C7 — индивидуальные пациенты; pre-COVID-19 plasma pool — собранный до пандемии COVID-19 пул плазмы; pre-covid — собранные до пандемии COVID-19 образцы МКПК.

По оси ординат: количество «пятен» в лунке FluoroSpot (В-клеточный ELISPOT) (рис. а), относительный размер пятен (рис. б), оптическая плотность в ИФА (рис. с).

■ без антигена, ■ антиген RBD (рис. а), ■ разведение плазмы крови 1:100, ■ разведение плазмы крови 1:1000 (рис. с).

Рисунок воспроизведен с модификациями и с разрешения компании Mabtech¹.

Fig. 1. Determination of the number of spike protein RBD-specific B-cells and the anti-RBD antibody titer. Seven individuals, previously PCR-confirmed for COVID-19, donated blood after recovering from mild to moderate COVID-19 disease. Isolated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of the recovered patients were stimulated with R848 and recombinant IL-2. After pre-stimulation, the cells were incubated on an anti-IgG FluoroSpot plate (a fluorescent variation of the ELISPOT assay). RBD-specific IgGs were detected using the RBD-550 conjugate. The number of IgG-secreting cells measured as spot forming units (SFUs) is shown in the top graph a, and the relative area of each spot is shown in the middle graph b. RBD-specific IgGs were analysed using ELISA.

(a) FluoroSpot (SFU) assay of human IgGs specific to RBD, (b) FluoroSpot (RSV) assay of human IgGs specific to RBD, (c) Enzyme immunoassay (EIA) of human IgGs specific to SARS-CoV-2.

X-axis (graphs a–c)—C1–C7 denote individual patients; pre-COVID-19 plasma pool—plasma pooled before the COVID-19 pandemic; pre-covid—PBMCs collected before the COVID-19 pandemic.

Y-axis—number of spots in a FluoroSpot (B-cell ELISPOT) well (graph a), relative areas of the spots (graph b), EIA absorbance (graph c).

■ no antigen, ■ RBD antigen (graph a), ■ blood plasma 100× dilution, ■ blood plasma 1000× dilution (graph c).

The figure is reproduced with modifications and with permission from Mabtech¹.

¹ <https://www.mabtech.com/knowledge-center/applied-research/covid-19>

случаях и главную роль, играет клеточный иммунитет, опосредованный Т-лимфоцитами. Фрагменты белков патогена представляются на своей мембране антиген-презентирующими клетками и распознаются Т-клетками с помощью Т-клеточных рецепторов (TCR) в комплексе с корецепторами (CD4 для Т-хелперов и CD8 для цитотоксических Т-киллеров).

Известно, что для SARS-CoV 2002/03 (атипичной пневмонии) ответы CD4⁺ Т-клеток на белок S коронавируса, как правило, были связаны с положительными исходами [8]. Изучение клеточного иммунного ответа на SARS-CoV-2 в настоящее время находится на начальном этапе.

На основании результатов лабораторных исследований биоматериалов госпитализированных пациентов показано, что специфические Т-клеточные ответы против SARS-CoV важны для распознавания и уничтожения инфицированных клеток, особенно в легких инфицированных людей [9].

В результате исследований 128 случаев коронавирусных инфекций (прежде всего SARS и MERS) установлено [10], что количество и степень активации CD8⁺ Т-клеток в этих случаях были больше, чем ответы CD4⁺ Т-клеток. Однако вопрос о том, достаточно ли ответа Т-клеток памяти для защиты от повторной инфекции, нуждается в дальнейшем изучении. Кроме того, вирус-специфические Т-клетки при тяжелом протекании инфекции SARS/MERS, как правило, имели центральный фенотип памяти со значительно более высокой частотой полифункциональных CD4⁺ Т-клеток, секретирующих цитокины IFN γ , TNF α и IL-2, и CD8⁺ Т-клеток, секретирующих IFN γ , TNF α , а также дегранулированное состояние по сравнению с вирус-специфическими Т-клетками при легких инфекциях. Сильные Т-клеточные ответы связаны с более высоким титром нейтрализующих антител, в то время как у умерших пациентов была диагностирована повышенная секреция цитокинов Th2 в сыворотке крови, например IL-4, IL-5, IL-10 (что увеличивает выработку антител). В отличие от снижения уровня антител в сыворотке крови у пациентов, цитотоксические Т-лимфоциты, специфически реагирующие на коронавирусный антиген (N-белок), все еще обнаруживаются в периферических мононуклеарах выздоровевших пациентов с SARS или MERS более чем через 10 лет после заражения. Этот факт, будучи подтвержденным для COVID-19, указывает на необходимость разработки для текущей пандемии таких вакцин, которые способны вызывать не только гуморальный, но и более стойкий клеточный иммунитет.

В ряде работ указывалось [11, 12], что у большинства пациентов с COVID-19 развивалась лимфопения, а в тяжелых случаях — пневмония с высокими уровнями провоспалительных цитокинов в плазме крови. Это свидетельствует не только о том, что сама иммунная система подвергается атаке в ходе данного заболевания, но и о том, что определенная реакция иммунной системы может усугублять течение болезни. Ранее сообщалось, что у пациентов, инфицированных SARS-CoV или MERS-CoV, обнаруживался гуморальный ответ, то есть выработка специфических антител, но также была отмечена дефектная экспрессия интерферона I и II типа, что свидетельствует о слабых защитных иммунных реакциях [13, 14]. Однако до настоящего времени не проведено достаточного количества исследований по характеристике иммунных реакций, особенно адаптивных, на инфекцию COVID-19. В отдельных публикациях показано, например, что выявляются специфические антитела к нуклеокапсидному белку (NP, N-белку) и S-белку (но не к M-белку), причем IgM достигают пика на 9-е сутки после начала заболевания, а затем на 2-й неделе выявляются IgG, что предполагает участие гуморального иммунитета [15]. Специфический ответ Т-лимфоцитов на SARS-CoV-2 еще недостаточно изучен.

Несмотря на то что большинство выздоровевших пациентов имеют защитный гуморальный иммунитет к SARS-CoV-2, появляются данные о том, что у значительной части выздоравливающих от COVID-19 людей отсутствуют нейтрализующие антитела [16]. По-видимому, иммунитет обеспечивается Т-лимфоцитами. Вполне вероятно, для оценки напряженности иммунитета («иммунного паспорта») пациента потребуется анализировать именно Т-клеточный ответ.

В работе Chen Dong [17] было показано, что антивирусные Т-клетки могут не сохраняться в больших количествах в популяции периферических мононуклеаров у выздоровевших пациентов. При анализе статуса иммунитета всех пациентов в исследованной выборке была установлена значительная корреляция между титрами нейтрализующих антител и количеством NP-специфических Т-клеток (определенное с помощью ELISPOT). Это указывает на то, что развитие нейтрализующих антител может коррелировать с активацией антивирусных Т-клеток. Таким образом, для эффективного клиренса вируса могут потребоваться совместные гуморальные и клеточные иммунные ответы. Именно в этом, одном из первых анализов иммунитета к COVID-19, было показано, что гуморальный и клеточный его компоненты обнаруживаются у значительной части недавно выздоровевших пациентов (но не у всех детектируются оба), и, очевидно, иммунная реакция обеспечивает выздоровление. Однако при последующем, повторном анализе иммунитета у этих же пациентов были обнаружены высокие титры антител IgG наряду с низким уровнем вирус-специфических Т-клеток. Было высказано предположение, что Т-клетки могут перейти в состояние покоя. Последующие работы, например, T. Sekine с соавт. [18], несколько скорректировали это пессимистическое наблюдение.

Hong-Yi Zheng с соавт. показали, что истощение и сниженное функциональное разнообразие Т-клеток в периферической крови могут предсказывать серьезное ухудшение состояния пациентов с COVID-19 [19]. В подобных публикациях [18, 20–22] подчеркивается, что необходим дальнейший анализ защитного иммунитета к данной инфекции для понимания патогенеза COVID-19, особенно в тяжелых случаях. Это также имеет значение при разработке эффективной вакцины для защиты и лечения инфекции COVID-19.

Особенности Т-клеточного ответа на SARS-CoV-2 и его мишени у пациентов с COVID-19 и здоровых людей. К вопросу о разработке оптимальной вакцины

Немецкие ученые проверили встречаемость и характеристики CD4⁺ Т-клеток, реагирующих на S-белок SARS-CoV-2, в крови пациентов с COVID-19 и у здоровых людей, серонегативных по SARS-CoV-2, то есть без антител к данному коронавирусу [20]. Выделенные лимфоциты участников исследования стимулировали пептидами, соответствующими различным фрагментам S-белка. Участки, расположенные ближе к С-концу белка нового коронавируса, имеют больше гомологии с четырьмя коронавирусами, вызывающими обычную простуду у людей (HCoV-229E, -NL63, -OC43, -HKU1), по сравнению с участками из N-конца белка. Однако рецептор-связывающий домен S-белка (RBD), который является мишенью для большинства нейтрализующих вирус антител, располагается ближе к N-концу.

Из 18 пациентов с COVID-19 у 12 были обнаружены Т-клетки, реагирующие на пептиды N-конца S-белка, у 15 (83%) — на пептиды из С-конца. У пациентов, в крови которых реагирующие на данные пептиды Т-клетки не были обнаружены, болезнь, как правило, протекала тяжелее.

У части здоровых доноров (у 24 из 68, то есть 34%) были обнаружены S-реактивные CD4⁺ Т-клетки, к пептидам из N-конца белка — всего у 6 человек (8,8%). Таким образом, Т-клетки здоровых людей, реагирующие на белок нового коронавируса, в основном специфично распознают эпитопы на С-конце, который более сходен с белками «простудных коронавирусов» HCoV-229E, -NL63, -OC43, -HCU1. Часть здоровых участников исследования протестировали на антитела к «простудным коронавирусам» и обнаружили антитела к ним у всех, независимо от наличия S-реактивных Т-клеток.

Однако нельзя ставить знак равенства между Т-клетками здоровых пациентов, реагирующих в тесте *in vitro* на антигены SARS-CoV-2, и таковыми у недавно переболевших COVID-19. Факт специфического распознавания антигенов коронавируса еще не свидетельствует об активной иммунной защите или даже о ее реальном потенциале. S-белок-реактивные CD4⁺ Т-клетки от пациентов с COVID-19 отличались от клеток здоровых доноров еще и тем, что коэкспрессировали более высокие уровни белков CD38 и HLA-DR, что указывает на их недавнюю активацию *in vivo*.

Исследование J. Braun с соавт. [20] является первым прямым исследованием Т-клеточных ответов на SARS-CoV-2. Была показана потенциальная возможность кросс-реактивного клеточного иммунитета к новой коронавирусной инфекции, то есть иммунного ответа у тех, кто ранее переболел сезонными коронавирусами. Авторы предполагают, что такой иммунитет может быть у сравнительно большой доли населения, поскольку считается, что коронавирусные респираторные инфекции широко распространены, по крайней мере, в регионах с умеренным климатом, где инфекции HCoV имеют зимнюю сезонность. Эпидемиологические наблюдения свидетельствуют о том, что взрослый человек заражается одним из четырех известных «простудных» HCoV в среднем каждые 2–3 года [23]. При такой расчетной частоте заболевания титр защитных антител может существенно снизиться, но клеточный иммунитет с высокой вероятностью останется [2, 24].

Не исключено, что эта кросс-реактивность вносит вклад в более легкое протекание COVID-19 у детей и молодежи, поскольку большее число социальных контактов, посещение детских учреждений и учебных заведений увеличивает шанс переболеть «коронавирусной простудой».

Как долго сохраняются гуморальный и клеточный иммунитет к COVID-19, в настоящее время неизвестно. Нейтрализующие антитела к SARS-CoV ассоциируются с выздоровлением, и они обнаруживаются даже через 12 месяцев после заболевания. Однако персистирование нейтрализующих антител к новому коронавирусу SARS-CoV-2 в настоящее время остается неизвестным. Титр антител против «простудных» HCoV может снижаться в течение нескольких месяцев после заражения, хотя повторное заражение HCoV сопровождается низким уровнем вирусемии и коротким периодом выделения вируса, легкими симптомами, что указывает на наличие остаточного иммунитета [24]. В этом контексте клеточный иммунитет еще не изучен. Как и в какой степени специфический гуморальный или клеточный иммунитет к COVID-19 обеспечивает долговременную защиту от повторного заражения, неизвестно, но поиск ответа на этот вопрос станет одной из важнейших задач исследований в ближайшие месяцы.

В работе A. Grifoni с соавт. [25] эпитопы Т-клеточного иммунного ответа на SARS-CoV-2 и его особенности были исследованы более подробно. Авторами отмечен факт наличия Т-клеточного ответа у существенной части (40–60% всего исследованного пула) не инфицированных новым коронавирусом здоровых людей.

Для определения доминантных Т-клеточных эпитопов использовались «мегапулы» синтетических пептидов, которые были созданы с применением биоинформатических методов, чтобы с большей вероятностью соответствовать Т-клеточным эпитопам белков SARS-CoV-2. Была проведена функциональная валидация предсказанных эпитопов с использованием МКПК выздоравливающих пациентов COVID-19. Важно, что МКПК группы здоровых доноров были собраны и законсервированы в 2015–2018 гг., что исключает попадание образцов пациентов с ложноотрицательными тестами на SARS-CoV-2. Было обнаружено, что иммунодоминирующий паттерн существенно отличается от таковых у предыдущих тяжелых коронавирусных инфекций, SARS и MERS. В частности, белки М, спайк (S) и N распознавались Т-клетками у всех пациентов, включенных в исследование. Существенная часть Т-клеточных ответов была также направлена на эпитопы белков nsp3, nsp4, ORF3a, ORF7a, nsp12 и ORF8. Эти данные свидетельствуют в пользу того, что если вакцина будет состоять только из S-белка, она, конечно, вызовет CD4⁺ Т-клеточный ответ, специфичный к SARS-CoV-2, но включение дополнительных структурных антигенов, таких как белки М и N, приблизит ответ на вакцинацию к естественному Т-хелперному ответу, наблюдающемуся у пациентов с незначительной или умеренной тяжестью протекания болезни COVID-19.

Что касается ответов CD8⁺ Т-клеток на SARS-CoV-2, распределение иммунодоминантных мишеней, продемонстрированное в работе A. Grifoni с соавт. [25], отличалось от данных литературы по другим коронавирусам. S-белок был мишенью для ответов CD8⁺ Т-клеток, но не доминантной. М-белок распознавался точно так же, и значительная реактивность была отмечена для других антигенов, в основном nsp6, ORF3a и N, которые в среднем составляли почти 50% от общего ответа CD8⁺ Т-клеток.

Таким образом, эти данные указывают на то, что вакцины-кандидаты против COVID-19, в которых использован в качестве антигена только S-белок, будут вызывать относительно узкий диапазон ответов CD8⁺ Т-клеток по сравнению с естественным ответом CD8⁺ Т-клеток, наблюдаемым при легком и умеренном заболевании COVID-19. Оптимальная с точки зрения ответа Т-киллеров вакцина может быть получена при использовании дополнительных эпитопов класса I, таких как полученные из М, nsp6, ORF3a и/или N белков.

Существуют опасения относительно увеличения тяжести заболевания вследствие вакцинации, если вакцина будет вызывать так называемый эффект антителозависимого усиления проникновения вируса в клетку (ADE) или развития ответов по типу Th2 [26]. Эти опасения можно считать частично снятыми, поскольку A. Grifoni с соавт. [25] наблюдали преобладающие ответы типа Th1 у выздоравливающих пациентов COVID-19, с небольшим уровнем или отсутствием цитокинов, характерных для Th2.

Таким образом, накапливаются данные о том, что некоторые здоровые не болевшие COVID-19 доноры имеют Т-клетки, специфичные к антигенам SARS-CoV-2, к S-белку в частности. Результаты, полученные коллективом российских ученых, включая одного из авторов настоящего обзора [21], в целом подтверждают это с оговоркой, что в данной работе авторы наблюдали значительное увеличение количества реагирующих на S-белок Т-клеток у отобранных во время пандемии COVID-19 здоровых доноров в сочетании с полным отсутствием специфических антител к SARS-CoV-2 в этой группе. Это свидетельствует о том, что некоторые доноры могли иметь контакт с SARS-CoV-2 до забора крови. Из-за перекрестной реактив-

ности, вызванной другими коронавирусами, Т-клетки могли защитить таких условно здоровых доноров от развития полномасштабной инфекции. Это иллюстрируется случаем пациента p1477 (рис. 2), который проживал совместно с пациентом с COVID-19, но вирус у p1477 не выявлялся в нескольких последовательных тестах ПЦР; p1477 не имел никаких типичных или гриппоподобных симптомов COVID-19 и у него не обнаруживались антитела к любому из антигенов SARS-CoV-2. Авторы процитированной работы также считают, что эта гипотеза тем не менее должна быть подтверждена на большей когорте доноров. На момент написания данной работы опубликована статья F. Gallais с соавт. [27], в которой описаны Т-клеточные ответы на SARS-CoV-2, детектированные ELISPOT, у членов семей больных COVID-19. Примечательно, что у части исследуемых был обнаружен выраженный Т-клеточный ответ, но не только без сероконверсии, но и с отрицательным тестом ПЦР на РНК вируса. Данный факт свидетельствует не только о том, что эпидемиологические данные, полагающиеся только на присутствие антител к SARS-CoV-2, приводят к недооценке распространения инфекции, но и о том, что часть пациентов может эффективно справиться с инфекцией на начальной стадии без их выработки.

Вопрос кросс-реактивности иммунитета

В работе А. S. Shomuradova с соавт. [21] использовался метод ELISPOT, детектирующий секрецию IFN γ при стимуляции антигеном в качестве критерия для определения антигенспецифических клеток. Существуют и другие способы оценки реактивности Т-клеток, особенно CD4 $^+$ Т-клеток. Таким образом, есть опасность, что детекция именно IFN γ в тесте ELISPOT (IGRA) может потенциально пропустить некоторые реагирующие Т-клетки, секретирующие другие цитокины. Но анализ результатов предыдущих исследований показал, что CD4 $^+$ Т-клетки реагируют на стимуляцию антигенами SARS-CoV-2 ответом Th1-типа [28]. В другом исследовании IFN γ также

был преобладающим цитокином, продуцируемым Т-клетками памяти после стимуляции пептидами белков SARS-CoV-2 [29].

Как уже отмечалось, описанный в первой подобной работе J. Braun с соавт. [20] Т-клеточный иммунный ответ у здоровых доноров сфокусирован преимущественно на эпитопах в С-концевой части S-белка SARS-CoV-2, что может объясняться более высокой гомологией этого региона с «простудными коронавирусами». В исследовании А. S. Shomuradova с соавт. [21] только один эпитоп (YLQ) был получен из N-концевой части S-белка, авторы практически не наблюдали Т-клеточного ответа на этот эпитоп у здоровых доноров.

Что касается значения кросс-реактивных Т-клеток, иммунологические исследования пандемий гриппа могут быть поучительными и дать обнадеживающие аналогии. В контексте пандемии гриппа H1N1 2009 г. ранее приобретенный Т-клеточный иммунитет существовал во взрослой популяции и был сосредоточен на более консервативных внутренних вирусных белках гриппа [30]. Было обнаружено, что наличие кросс-реактивных Т-клеток коррелирует с менее тяжелым течением заболевания [31, 32]. Частая встречаемость кросс-реактивных ответов Т-клеток памяти, возможно, была одним из факторов, способствующих меньшей степени тяжести пандемии гриппа H1N1 [33]. Кросс-реактивный иммунитет к штаммам вируса гриппа был смоделирован как критический фактор, влияющий на восприимчивость к новым, потенциально пандемическим, штаммам вируса гриппа [34]. Учитывая серьезность продолжающейся пандемии COVID-19, будет логичным предположить, что любая степень перекрестного защитного иммунитета к коронавирусу среди населения может иметь существенное влияние на общее течение пандемии и эпидемиологическую динамику в течение многих следующих лет [35].

Все эти результаты дают решающее обоснование для начала глобальных проспективных исследований для оценки вклада ранее существовавшего кросс-реактивного иммунитета к COVID-19, учитывая потенциальные региональные различия,

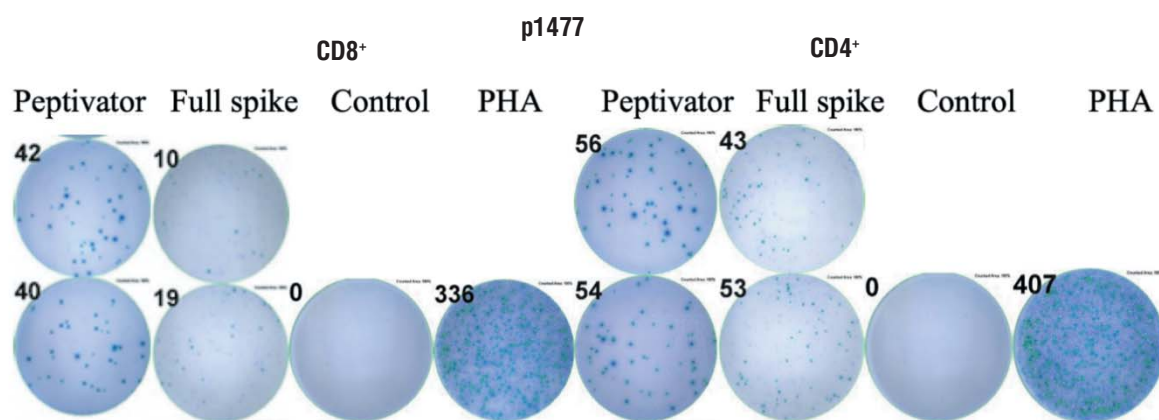


Рис. 2. Пример IFN γ ELISPOT анализа Т-клеток, выделенных из крови условно здорового донора, близко контактировавшего с больным COVID-19. Выделенные CD4 $^+$ или CD8 $^+$ Т-клетки были активированы различными вариантами антигенов SARS-CoV-2. Цифры рядом с фотографиями лунок обозначают количество Т-клеточных пятен (spots). Peptivator — пул синтетических пептидов, покрывающих большую часть последовательности спайк-белка (S-белка) SARS-CoV-2 (Miltenyi Biotech, Германия), Full spike — полноразмерный рекомбинантный S-белок, Control — контроль без активации антигенами, PHA — положительный контроль активации всех функционально активных Т-клеток с помощью фитогемагглютинаина (Г. А. Ефимов, неопубликованные данные).

Fig. 2. An example of IFN γ ELISPOT assay of T-cells isolated from the blood of a presumably healthy donor who had had close contact with a COVID-19 patient. Isolated CD4 $^+$ or CD8 $^+$ T-cells were activated by different versions of SARS-CoV-2 antigens. The numbers beside the wells' photos show the number of T-cell spots. Peptivator—a pool of synthetic peptides covering most of the SARS-CoV-2 spike protein (S-protein) sequence (Miltenyi Biotech, Germany), Full spike—recombinant full-length S-protein, Control—control without antigen stimulation, PHA—positive activation control of all functionally active T-cells with phytohemagglutinin (G. Efimov, unpublished results).

в клинические исходы инфекции COVID-19. Наряду с введенными в настоящее время новыми серологическими тестами данные, полученные в результате таких исследований, могут дать критическую информацию для обоснованной оценки риска, мониторинга пациентов, адаптации методов эпидемического сдерживания и, что не менее важно, разработки вакцин.

Вопросы защитного иммунитета после перенесенной инфекции COVID-19. Роль Т-клеточного анализа и уровня IgG

SARS-CoV-2 способен вызывать тяжелый острый респираторный синдром, при котором иммунная система является частью процесса клинической эволюции, от первых симптомов ОРВИ до тяжелого поражения легких, вызванного воспалительным ответом, таким как цитокиновый шторм и активация макрофагов и нейтрофилов [36, 37]. В ряде исследований уже представлена информация об иммунном ответе во время этой инфекции, который включает выработку антител и активацию Т-лимфоцитов, но эти данные в основном ограничены исследованиями госпитализированных пациентов, то есть с подтверждением наличия вируса и выраженными симптомами. Было показано, что у выздоровевших госпитализированных пациентов титр антител увеличивается после первой недели с момента появления симптомов, что дает возможность предположить положительную корреляцию гуморального ответа с тяжестью заболевания [38, 39]. При этом наблюдается также активация Т-клеток и увеличение доли Т-клеток с центральным фенотипом памяти после 14 суток госпитализации [28, 40].

Если мы полагаем, что защиту от инфекции обеспечивает иммунитет, возникают вопросы, кто нуждается и не нуждается в изоляции или мониторинге на основании выявленного иммунного статуса. Негоспитализированное или неизолированное население считается вирусным хозяином, поскольку способствует распространению вируса. Другой проблемой текущей пандемии являются бессимптомные случаи, особенно у медицинских работников в больнице, что способствует распространению инфекции. Очевидной мерой противодействия распространению вируса является социальное дистанцирование и массовое тестирование. Массовое тестирование в настоящий момент в основном сфокусировано на обнаружении антител и РНК вируса с помощью ПЦР. Увеличивается количество описанных случаев отсутствия существенных титров защитных IgG при подтвержденной молекулярными методами (ПЦР) инфекции. Кроме того, нередки случаи обнаружения низких титров или полного отсутствия нейтрализующих антител даже у госпитализированных пациентов [38, 39]. Что же является защитным иммунитетом в случае SARS-CoV-2 и какое время требуется для ограничения социальных контактов или карантинных мер?

Как уже показано в ряде исследований, включая процитированные в данной статье, Т-клетки могут быть ключом к решению этой дилеммы. Несмотря на опубликованные данные о том, что вирус может вызывать лимфопению и вызывать задержку активации Т-клеток в первые сутки инфекционного процесса, после примерно двух недель от первых симптомов в периферической крови начинают появляться специфичные для SARS-CoV-2 Т-клетки с фенотипами иммунной памяти (это центральная память для CD4⁺ и эффекторная память для CD8⁺ лимфоцитов) [28].

Чаще всего эффективность вакцин оценивалась по гуморальному ответу, но уже есть некоторые вакцины, предназна-

ченные в основном для активации Т-клеток, что обеспечивает надежный ответ Т-клеток памяти, но исследования таких вакцин все еще находятся на доклинической стадии. Опубликованы результаты наблюдений изменения статуса противовирусного иммунитета в ходе вакцинации против гепатитов А и В, когда титры антител не имели отношения к защитному статусу, поскольку именно Т-клетки памяти могли активироваться и защищать людей от инфекции [41, 42]. Если верна недавно высказанная гипотеза о том, что новый коронавирус способен снижать активность В-клеток, тесты на активацию Т-клеток и вакцины, направленные на стимуляцию Т-клеток памяти, приобретают особое значение [43]. Этот вопрос должен быть дополнительно изучен.

Возможно, ответ на вопрос о достаточности иммунной защиты заключается в анализе клеточного ответа, в поиске максимально подходящего лабораторного анализа, стоимость которого сравнима с тестами на нейтрализующие антитела или даже ниже. Как только мы сможем оценить достаточную субпопуляцию, которая не продуцирует антитела класса IgG, но имеет активируемые Т-клетки после заболевания или вакцинации (или даже вследствие кросс-реактивного иммунитета), этого будет достаточно, чтобы гарантировать защитный иммунитет. Анализ Т-клеток имеют высокую специфичность и чувствительность. Существует много методов анализа Т-клеточного иммунитета, например оценка пролиферации с использованием вирусных частиц в качестве стимуляторов и др. [44], но, пожалуй, наиболее приемлемым по соотношению затрат и получаемой информации является, по нашему мнению, метод ELISPOT. Т-клеточный ELISPOT может помочь в оценке иммунитета населения (госпитализированного, изолированного или неизолированного), и этот анализ будет возможен в странах, имеющих специализированные иммунологические лаборатории, включая Россию. Кроме того, такого рода клеточные анализы предоставят информацию, которая будет полезна для разработки вакцины для предотвращения и мониторинга этого вирусного заболевания. Данное мнение разделяют не только авторы настоящего обзора, но и члены международного консорциума, посвященного иммунологии COVID-19, возглавляемого М. Маойрером² (персональное сообщение), и находит свое отражение в научной периодике [43].

Адаптацией технологии ELISPOT под нужды исследования иммунитета и борьбы с COVID-19 уже занимаются несколько зарубежных и отечественных биотехнологических компаний. Примеры анализа приведены на рисунках 1–3.

Показано, что количество специфичных для SARS-CoV-2 Т-клеток может и не коррелировать с титрами антител (рис. 2). Пациент С7, не имевший специфических антител к SARS-CoV-2 по результатам ИФА, но с присутствием сильного Т-клеточного ответа, также не имел обнаруживаемых В-клеток памяти на RBD S-белка SARS-CoV-2 (рис. 2, 3). Таким образом, подтверждается результат в образцах сыворотки крови пациента С7 в параллельно проведенном ИФА: у индивидуума не было В-клеток, секретирующих RBD-специфический IgG. Организм пациента С7 с подтвержденным COVID-19 (методом ПЦР, клинической картиной заболевания) противостоял инфекции, несмотря на то что его иммунная система не мобилизовала никаких RBD-специфических IgG-секретирующих В-клеток. Очевидно, что иммунитет этого человека к коронавирусу достиг защитного статуса, используя другую составляющую, а именно Т-клеточный иммунитет, что и подтверждается соответствующим тестом ELISPOT.

² <https://www.fchampalimaud.org/covid19>

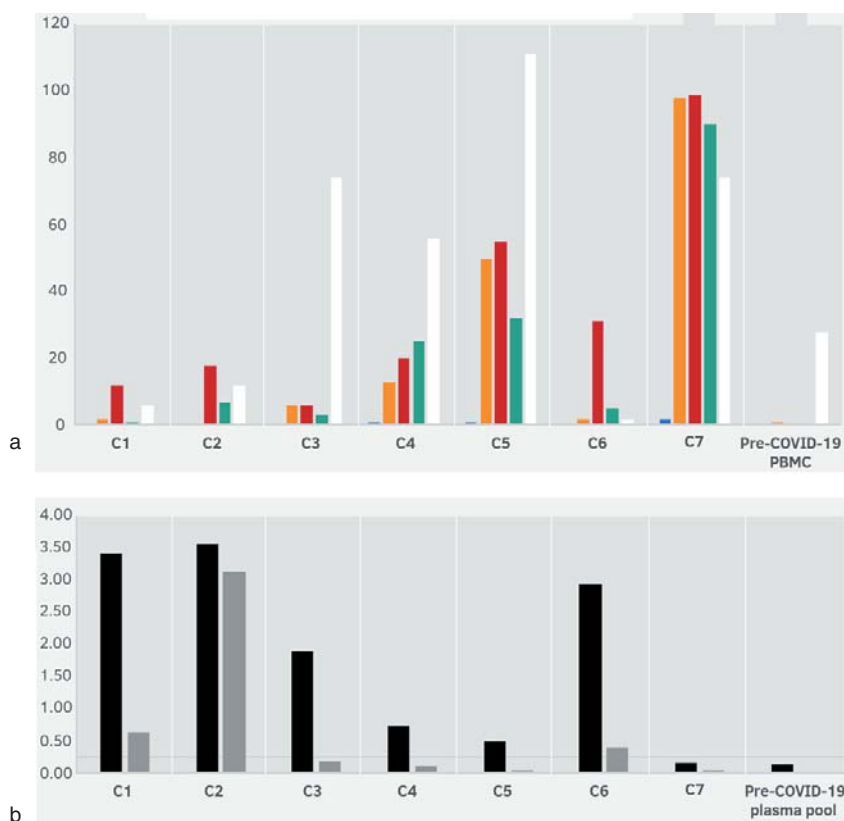


Рис. 3. Определение количества специфичных для SARS-CoV-2 Т-клеток и соответствующих титров антител. Семь пациентов с инфекцией COVID-19, подтвержденной ранее ПЦР, сдали кровь после выздоровления от COVID-19 легкой или средней тяжести. Выделенные мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) выздоровевших пациентов были стимулированы пептидным пулом SARS-CoV-2 (15-членные пептиды с перекрытием в 11 аминокислот, покрывающие последовательность нуклеокапсида или домены S1 и S2 спайк-белка). Т-клеточный ответ анализировали с помощью флуоресцентного варианта метода ELISPOT — FluoroSpot. Дополнительно иммуноглобулины класса G (IgG), специфичные для RBD домена спайк-белка SARS-CoV-2, были определены с помощью ИФА.

(a) FluoroSpot человеческого $INF\gamma/IL-2$, (b) ИФА человеческого IgG к SARS-CoV-2. По оси абсцисс (рис. а–b): C1–C7 — индивидуальные пациенты; pre-COVID-19 plasma pool — собранный до пандемии COVID-19 пул плазмы; pre-COVID-19 PBMC — собранные до пандемии COVID-19 образцы МКПК.

По оси ординат: количество «пятен» в лунке ELISPOT (рис. а), оптическая плотность в тесте ИФА (рис. б).

■ отрицательный контроль, без стимуляции МКПК антигенами, ■ стимуляция МКПК пептидными антигенами SARS-CoV-2 нуклеокапсидного белка, ■ стимуляция МКПК пептидными антигенами SARS-CoV-2 S1 части спайк-белка, ■ стимуляция МКПК пептидными антигенами SARS-CoV-2 S2 части спайк-белка, □ контроль выброса $INF\gamma$ всеми функционально активными Т-клетками, с помощью фитагемагглютинаина (рис. а), ■ разведение плазмы крови 1:100, ■ разведение плазмы крови 1:1000 (рис. б).

Рисунок воспроизведен с модификациями и с разрешения компании Мабтек³.

Fig. 3. Determination of the number of SARS-CoV-2-specific T-cells and corresponding antibody titers. Seven individuals, previously PCR-confirmed for COVID-19, donated blood after recovering from moderate COVID-19 disease. Isolated PBMCs were stimulated with a SARS-CoV-2 peptide pool (15-mer peptides with an overlap of 11 amino acids, covering the nucleocapsid protein or S1 and S2 domains of the spike protein). The T-cell response was analysed using a FluoroSpot assay, the fluorescent variation of the ELISPOT assay. Additionally, IgGs specific to RBD of the SARS-CoV-2 spike protein S2 domain were analysed using ELISA.

(a) FluoroSpot assay of human $INF\gamma/IL-2$, (b) EIA of human IgGs specific to SARS-CoV-2.

X-axis (graphs a–b)—C1–C7 denote individual patients; pre-COVID-19 plasma pool—plasma pooled before the COVID-19 pandemic; pre-COVID-19 PBMC—PBMCs collected before the COVID-19 pandemic.

Y-axis—number of spots in an ELISPOT well (graph a), EIA absorbance (graph b).

■ negative control, PBMCs without antigen stimulation, ■ PBMC stimulation with peptide antigens of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein, ■ PBMC stimulation with peptide antigens of SARS-CoV-2 spike protein S1 domain, ■ PBMC stimulation with peptide antigens of SARS-CoV-2 spike protein S2 domain, □ control of $INF\gamma$ release by all functionally active T-cells using phytohemagglutinin (graph a), ■ blood plasma 100× dilution, ■ blood plasma 1000× dilution (graph b).

The figure is reproduced with modifications and with permission from Mabtech³.

Анализ В-клеток памяти и Т-клеток (рис. 1–3) может быть очень информативным при разработке вакцин: титры антител могут быть не единственным определяющим фактором для

оценки успеха иммунизации. Аффинность Т-клеток и антител также может быть очень важна для понимания механизмов иммунного ответа при исследовании вакцины-кандидата.

³ <https://www.mabtech.com/knowledge-center/applied-research/covid-19>

Задачи, решаемые разработкой и внедрением тестов на основе ELISPOT в системе противоэпидемических мероприятий при COVID-19, и реализуемость такой разработки для скрининга больших групп населения

Диагностические наборы ELISPOT для количественного определения как специфических для SARS-CoV-2 Т-клеток, так и для секретирующих антитела против вирусных антигенов

В-клеток могут быть использованы для решения ряда задач при изучении SARS-CoV-2 и контроля над заболеваемостью COVID-19 (рис. 4).

Для разработки и серийного выпуска наборов ELISPOT необходимо решить следующие задачи:

- экспериментальный и биоинформатический поиск оптимальных пептидных и/или белковых антигенов, их производство и контроль качества;

Эпидемиологические цели: прогноз и контроль над распространением инфекции и распределение ограниченных медицинских ресурсов (вакцин), снятие ограничений для защищенных людей
Epidemiological goals: forecasting of and control over the spread of infection, distribution of limited medical resources (vaccines), lifting restrictions for protected people

- Выявление бессимптомно инфицированных (включая серонегативных) SARS-CoV-2 пациентов
Identification of asymptomatic (including seronegative) SARS-CoV-2 patients
- Выявление потенциально защищенных от инфекции пациентов
Identification of potentially immune patients
- Определение биомаркеров иммунной защиты от COVID-19
Determination of biomarkers of immune response to COVID-19
- Прогнозирование последствий повторного контакта с SARS-CoV-2 (особенно для медицинского персонала). Типирование MHC в группе потенциально хорошо защищенных от COVID-19
Prediction of the consequences of repeated contact with SARS-CoV-2 (especially for medical personnel). MHC typing in the population potentially immune to COVID-19
- Возможно более раннее по сравнению с детекцией анти-SARS-CoV-2 антител выявление COVID-положительных пациентов (есть примеры из итальянской популяции)
Identification of COVID-positive patients at an earlier stage than detection of anti-SARS-CoV-2 antibodies, if possible (there have been such cases in the Italian population)
- Выявление длительности анти-SARS-CoV-2 иммунного ответа
Determination of the duration of anti-SARS-CoV-2 immune response

Терапевтические цели
Therapeutic goals

- Разработка альтернативного Т-клеточного ELISPOT, который может прогнозировать тяжелое течение болезни, например разработку IL-17 вместо IFN γ
Development of an alternative T-cell ELISPOT assay that could predict severe progression of the disease, e.g. based on determination of IL-17 release instead of IFN γ
- Сравнение антительных и Т-клеточных ответов иммунной системы пациентов в активной стадии болезни. Например, развитие тяжелого течения болезни коррелирует с высокой продукцией TGF β и IL-10, вызывающее преобладание класса IgA над IgG
Comparison of antibody-mediated and T-cell immune responses of patients during the active phase of the disease. For instance, severe progression of the diseases correlates with high TGF β and IL-10 production leading to higher levels of IgA as compared to IgG
- Диагностическая поддержка при высокотехнологичной и затратной терапии (биомедицинские клеточные продукты, антитела к интерлейкинам и т. п.)
Diagnostic support for high-technology and costly therapy (biomedical cell products, antibodies to interleukins, etc.)
- Определение «горячих эпитопов» распознавания:
 - разные эпитопы могут быть ассоциированы с разными типами экспозиции вирусом: массивная однократная, медленная хроническая;
 - эпитопы у индивидуумов с тяжелым или умеренным/бессимптомным течением болезни;
 - соотношение экспонированных и зараженных, ассоциация эпитопов с отсутствием симптомов и минимальными симптомами*Determination of major recognition epitopes:
- different epitopes may be associated with different types of virus exposure: single mass exposure, slow chronic exposure;
- epitopes in individuals with severe or moderate/asymptomatic disease;
- ratio of exposed and infected individuals, correlation between epitopes and asymptomatic disease or minimal symptoms*
- Исследования корреляции Т-клеточного ответа и вирусной нагрузки для выбора тактики терапии
Analysis of correlation between a T-cell response and viral load with a view of treatment strategy selection

Разработка, исследование вакцин и лекарственных средств
Development, research of vaccines and medicines

- Идентификация эпитопов SARS-CoV-2, характерных для разных этнических групп
Identification of SARS-CoV-2 epitopes specific to different ethnic groups
- Информированный выбор мишеней для создания вакцин, которые в настоящее время не задействованы в текущих разрабатываемых вакцинах
Informed choice of vaccine targets which are not currently used in the vaccines under development
- Предварительная селекция эпитопов на основании перекрытия с эпитопами SARS-CoV-1, MERS и 4 наиболее распространенных бета-коронавирусов («простудные коронавирусы»)
Preselection of epitopes based on overlaps with epitopes of SARS-CoV-1, MERS, and 4 most common beta-coronaviruses (that cause common cold infections)
- Прямая идентификация эпитопов SARS-CoV-2 с помощью В-клеточного ELISPOT и косвенная с помощью Т-клеточного, поскольку сильные антительные и Т-клеточные эпитопы часто перекрываются (и возможность информирования интернациональных центров о потенциальных эпитопах для нейтрализующих антител)
Direct identification of SARS-CoV-2 epitopes using B-cell ELISPOT assay and indirect identification using T-cell ELISPOT assay, since strong antibody epitopes and T-cell epitopes often overlap (and the possibility of informing international centres about potential epitopes for neutralising antibodies)
- Картирование эпитопов в разных когортах. В случае нахождения «горячих» эпитопов — сиквенс индивидуальных Т- и В-клеточных рецепторов (биотехнологические компании ищут «сильные» клоны В-клеток для терапевтических антительных кандидатов)
Mapping of epitopes in different cohorts. Sequencing of individual T- and B-cell receptors, if major epitopes are observed (biotechnology companies are looking for strong B-cell clones for therapeutic antibody candidates)

Рис. 4. Задачи, решаемые с помощью технологической платформы ELISPOT, и цели, которые могут быть достигнуты с ее помощью для изучения SARS-CoV-2 и контроля над заболеваемостью COVID-19.

Fig. 4. Tasks that the ELISPOT technology platform helps to achieve, and goals that it could help to achieve in the areas of SARS-CoV-2 research and COVID-19 incidence control.

- производство и химическая конъюгация различных моноклональных антител;

- разработка технологии сорбции на иммунологических планшетах антител и антигенов, учитывая требования к сроку годности и стабильности серий наборов. Настройка автоматизированной линии по подготовке и консервации планшетов;

- подбор условий постановки анализа ELISPOT с варьированием принципиальных компонентов и их концентраций;

- валидация анализа, клинико-лабораторные испытания и определение параметров чувствительности, специфичности анализа и межсерийных вариаций;

- промышленный выпуск и контроль качества серий наборов.

В настоящее время некоторые биотехнологические компании наладили выпуск исследовательских наборов Т- и В-клеточных ELISPOT для SARS-CoV-2⁴.

В Российской Федерации технология ELISPOT достаточно хорошо знакома ряду диагностических лабораторий и нашла применение в диагностике туберкулезной инфекции. В АО «Генериум» локализовано производство ELISPOT набора T-SPOT.TB® (компания Oxford Immunotech) для диагностики туберкулеза⁵.

В ряде достаточно оснащенных клинико-диагностических лабораторий метод IGRA-ELISPOT выполняется рутинно (ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, ФГБНУ «ЦНИИТ», ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ», ФГБУ «НМИЦ ФПИ» Минздрава России, частные сети в регионах «Инвитро», «Ситилаб», клинико-диагностические лаборатории компаний ООО «Экзактэ Лабс», «ФармЛайн», иммунобиологическая лаборатория АБТ и др.). Освоение метода ELISPOT на COVID-19 не требует переобучения сотрудников или закупки нового оборудования.

Выводы

1. Характер приобретенного иммунитета у пациентов, перенесших COVID-19, особенно в бессимптомной и легкой форме, факторы, указывающие на кросс-реактивность иммунитета, а также описанные случаи отсутствия инфекции у людей, близко контактировавших с заболевшими, позволяют сделать вывод, что Т-клеточный иммунитет играет важнейшую роль в борьбе с вирусом SARS-CoV-2.

2. Наиболее подходящим методом, наряду с тестом на нейтрализующие вирус антитела, позволяющим не только характеризовать иммунный ответ, но и прогнозировать иммунную защищенность к повторным инфекциям или после вакцинации, является IGRA-ELISPOT.

3. Внедрение В- и Т-клеточных ELISPOT-тестов в клинико-лабораторную диагностику позволит качественно усилить следующие направления борьбы с пандемией COVID-19:

- мониторинг иммунологического статуса пациента и выбора тактики лечения;

- определение эффективности защиты гуморального и клеточного иммунитета в случае повторной инфекции переболевших пациентов;

- определение наиболее уязвимых групп населения при повторной инфекции или повторной пандемии COVID-19 и близкородственными штаммами SARS-CoV-2;

- комплексная оценка вакцин в клинических исследованиях и при массовом применении для прогнозирования их эпидемиологической эффективности;

- определение наиболее иммуногенных эпитопов антигенов SARS-CoV-2 при разработке вакцин.

4. Биотехнологические компании имеют готовую технологическую платформу, легко адаптируемую под конкретный вид анализа и патогена, для разработки и промышленного производства наборов ELISPOT.

Вклад авторов. Д. А. Потеряев — анализ данных литературы, написание текста статьи; Р. А. Хамитов — критическое обсуждение, утверждение окончательной версии статьи для публикации; Г. А. Ефимов — предоставление наблюдений и неопубликованных данных, критическое обсуждение текста статьи; А. М. Шустер — разработка концепции, критическое обсуждение текста статьи, утверждение окончательной версии статьи для публикации.

Authors' contributions. Dmitry A. Poteryaev—analysed the literature and wrote the paper; Ravil A. Khamitov—reviewed the paper, approved the final version of the paper for publication; Grigory A. Efimov—shared observations and unpublished data, reviewed the paper; Aleksandr M. Shuster—developed the concept of the study, reviewed the paper, approved the final version of the paper for publication.

Благодарности. Авторы благодарны Markus Maeurer (Fundação Champalimaud, Португалия) и Chiara Agrati (Istituto Nazionale Malattie Infettive Lazzaro Spallanzani, Италия) за обсуждение методов исследования иммунитета к SARS-CoV-2.

Acknowledgements. The authors are grateful to Markus Maeurer (Fundação Champalimaud, Portugal) and Chiara Agrati (Istituto Nazionale Malattie Infettive Lazzaro Spallanzani, Italy) for discussions of methods used in SARS-CoV-2 immunity studies.

Конфликт интересов. Р. А. Хамитов является членом редакционной коллегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение».

Conflict of interest. Ravil A. Khamitov is a member of the Editorial Board of the *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

Литература/References

1. Folegatti PM, Ewer KJ, Aley PK, Angus B, Becker S, Belij-Rammerstorfer S, et al. Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomised controlled trial. *Lancet*. 2020;396(10249):467–78. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31604-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31604-4)
2. Oi-Wing Ng, Adeline Chia, Anthony T Tan, Ramesh S Jadi, Hoe Nam Leong, Antonio Bertoletti, Yee-Joo Tan. Memory T cell responses targeting the SARS coronavirus persist up to 11 years post-infection. *Vaccine*. 2016;34(17):2008–14. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.02.063>
3. Lehmann PV, Zhang W. Unique strengths of ELISPOT for T cell diagnostics. In: Kalyuzhny A, ed. *Handbook of ELISPOT. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. Vol. 792. Totowa, NJ: Humana Press; 2012. P. 3–23. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-325-7_1
4. Umlauf BJ, Pinsky NA, Ovsyannikova IG, Poland GA. Detection of vaccinia virus-specific IFN γ and IL-10 secretion from human PBMCs and CD8⁺ T cells by ELISPOT. In: Kalyuzhny A, ed. *Handbook of ELISPOT. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. Vol. 792. Totowa, NJ: Humana Press; 2012. P. 199–218. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-325-7_16
5. Saletti G, Çuburu N, Yang JS, Dey A, Czerkinsky C. Enzyme-linked immunosorbent assays for direct *ex vivo* measurement of vaccine-induced human humoral immune responses in blood. *Nat Protoc*. 2013;8(6):1073–87. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.058>
6. Kozłowski PA, Cu-Uvin S, Neutra MR, Flanagan TP. Comparison of the oral, rectal, and vaginal immunization routes for induction of

⁴ SARS-CoV-2 FluoroSpot and ELISpot kits. <https://www.mabtech.com/news#2989>

T-SPOT® Discovery™ SARS-CoV-2 kit. https://go.oxfordimmunotec.com/t-spot_discovery_SARS_CoV-2

⁵ http://www.generium.ru/about/press_center/company_news/press-release

- antibodies in rectal and genital tract secretions of women. *Infect Immun*. 1997;65(4):1387–94.
7. Sundling C, Rönnerberg C, Yman V, Asghar M, Jahnmatz P, Lakshminanth T, et al. B cell profiling in malaria reveals expansion and remodelling of CD11c⁺ B cell subsets. *JCI Insight*. 2019;4(9):e126492. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.126492>
 8. Yue-Dan Wang, Wan-Yee Fion Sin, Guo-Bing Xu, Huang-Hao Yang, Tin-yau Wong, Xue-Wen Pang, et al. T-cell epitopes in severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus spike protein elicit a specific T-cell immune response in patients who recover from SARS. *J Virol*. 2004;78(11):5612–8. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.11.5612-5618.2004>
 9. Jiang Gu, Encong Gong, Bo Zhang, Jie Zheng, Zifen Gao, Yanfeng Zhong, et al. Multiple organ infection and the pathogenesis of SARS. *J Exp Med*. 2005;202(3):415–24. <https://doi.org/10.1084/jem.20050828>
 10. Rokni M, Ghasemi V, Tavakoli Z. Immune responses and pathogenesis of SARS-CoV-2 during an outbreak in Iran: comparison with SARS and MERS. *Rev Med Virol*. 2020;30(3):e2107. <https://doi.org/10.1002/rmv.2107>
 11. Dawei Wang, Yimei Yin, Chang Hu, Xing Liu, Xingguo Zhang, Shuliang Zhou, et al. Clinical course and outcome of 107 patients infected with the novel coronavirus, SARS-CoV-2, discharged from two hospitals in Wuhan, China. *Crit Care*. 2020;24(1):188. <https://doi.org/10.1186/s13054-020-02895-6>
 12. Li Tan, Qi Wang, Duanyang Zhang, Jinya Ding, Qianchuan Huang, Yi-Quan Tang, et al. Lymphopenia predicts disease severity of COVID-19: a descriptive and predictive study. *Signal Transduct Target Ther*. 2020;5(1):33. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0148-4>
 13. Pak-Yin Lui, Lok-Yin Roy Wong, Cheuk-Lai Fung, Kam-Leung Siu, Man-Lung Yeung, Kit-San Yuen, et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus M protein suppresses type I interferon expression through the inhibition of TBK1-dependent phosphorylation of IRF3. *Emerg Microbes Infect*. 2016;5(4):e39. <https://doi.org/10.1038/emi.2016.33>
 14. Park A, Iwasaki A. Type I and type III interferons — induction, signaling, evasion, and application to combat COVID-19. *Cell Host Microbe*. 2020;27(6):870–8. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.05.008>
 15. Woo PCY, Lau SKP, Wong BHL, Kwok-hung Chan, Chung-ming Chu, Hoi-wah Tsoi, et al. Longitudinal profile of immunoglobulin G (IgG), IgM, and IgA antibodies against the severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus nucleocapsid protein in patients with pneumonia due to the SARS coronavirus. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2004;11(4):665–8. <https://doi.org/10.1128/CDLI.11.4.665-668.2004>
 16. Fan Wu, Aojie Wang, Mei Liu, Qimin Wang, Jun Chen, Shuai Xia, et al. Neutralizing antibody responses to SARS-CoV-2 in a COVID-19 recovered patient cohort and their implications. *medRxiv*. 2020.03.30.20047365. <https://doi.org/10.1101/2020.03.30.20047365>
 17. Chen Dong, Ling Ni, Fang Ye, Meng-Li Chen, Yu Feng, Yong-Qiang Deng, et al. Characterization of anti-viral immunity in recovered individuals infected by SARS-CoV-2. *medRxiv*. 2020.03.17.20036640. <https://doi.org/10.1101/2020.03.17.20036640>
 18. Sekine T, Perez-Potti A, Rivera-Ballesteros O, Strålin K, Gorin J-B, Olsson A, et al. Robust T cell immunity in convalescent individuals with asymptomatic or mild COVID-19. *Cell*. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.017>
 19. Hong-Yi Zheng, Mi Zhang, Cui-Xian Yang, Nian Zhang, Xi-Cheng Wang, Xin-Ping Yang, et al. Elevated exhaustion levels and reduced functional diversity of T cells in peripheral blood may predict severe progression in COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol*. 2020;17(5):541–3. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0401-3>
 20. Braun J, Loyal L, Frentsch M, Wendisch D, Georg P, Kurth F, et al. Presence of SARS-CoV-2 reactive T cells in COVID-19 patients and healthy donors. *medRxiv*. 2020.04.17.20061440. <https://doi.org/10.1101/2020.04.17.20061440>
 21. Shomuradova AS, Vagida MS, Sheetikov SA, Zornikova KV, Kiryukhin D, Titov A, et al. SARS-CoV-2 epitopes are recognized by a public and diverse repertoire of human T-cell receptors. *medRxiv*. 2020.05.20.20107813. <https://doi.org/10.1101/2020.05.20.20107813>
 22. Pia L. SARS-CoV-2-reactive T cells in patients and healthy donors. *Nat Rev Immunol*. 2020;20(6):353. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0333-2>
 23. Gaunt ER, Hardie A, Claas EC, Simmonds P, Templeton KE. Epidemiology and clinical presentations of the four human coronaviruses 229E, HKU1, NL63, and OC43 detected over 3 years using a novel multiplex real-time PCR method. *J Clin Microbiol*. 2010;48(8):2940–7. <https://doi.org/10.1128/JCM.00636-10>
 24. Callow KA, Parry HF, Sergeant M, Tyrrell DA. The time course of the immune response to experimental coronavirus infection of man. *Epidemiol Infect*. 1990;105(2):435–46. <https://doi.org/10.1017/s0950268800048019>
 25. Grifoni A, Weiskopf D, Ramirez SI, Mateus J, Dan JM, Moderbacher CR, et al. Targets of T cell responses to SARS-CoV-2 coronavirus in humans with COVID-19 disease and unexposed individuals. *Cell*. 2020;181(7):1489–501.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.015>
 26. Peeples L. News feature: avoiding pitfalls in the pursuit of a COVID-19 vaccine. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2020;117(15):8218–21. <https://doi.org/10.1073/pnas.2005456117>
 27. Gallais F, Velay A, Wendling M-J, Nazon C, Partisani M, Sibilia J, et al. Intrafamilial exposure to SARS-CoV-2 induces cellular immune response without seroconversion. *medRxiv*. 2020.06.21.20132449. <https://doi.org/10.1101/2020.06.21.20132449>
 28. Weiskopf D, Schmitz KS, Raadsen MP, Grifoni A, Okba NMA, Endeman H, et al. Phenotype and kinetics of SARS-CoV-2-specific T cells in COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome. *Sci Immunol*. 2020;5(48):eabd2071. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abd2071>
 29. Yan-Ying Fan, Zi-Tong Huang, Li Li, Man-Hui Wu, Tao Yu, Richard A Koup, et al. Characterization of SARS-CoV-specific memory T cells from recovered individuals 4 years after infection. *Arch Virol*. 2009;154(7):1093–9. <https://doi.org/10.1007/s00705-009-0409-6>
 30. Greenbaum JA, Kotturi MF, Kim Y, Oseroff C, Vaughan K, Salimi N, et al. Pre-existing immunity against swine-origin H1N1 influenza viruses in the general human population. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(48):20365–70. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911580106>
 31. Sridhar S, Begom S, Bermingham A, Hoschler K, Adamson W, Carman W, et al. Cellular immune correlates of protection against symptomatic pandemic influenza. *Nat Med*. 2013;19(10):1305–12. <https://doi.org/10.1038/nm.3350>
 32. Wilkinson TM, Li CKF, Chui CSC, Huang AKY, Perkins M, Lieber JC, et al. Preexisting influenza-specific CD4⁺ T cells correlate with disease protection against influenza challenge in humans. *Nat Med*. 2012;18(2):274–80. <https://doi.org/10.1038/nm.2612>
 33. Hancock K, Veguilla V, Xiuhua Lu, Zhong W, Butler EN, Hong Sun, et al. Cross-reactive antibody responses to the 2009 pandemic H1N1 influenza virus. *N Engl J Med*. 2009;361(20):1945–52. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0906453>
 34. Gostic KM, Ambrose M, Worobey M, Lloyd-Smith JO. Potent protection against H5N1 and H7N9 influenza via childhood hemagglutinin imprinting. *Science*. 2016;354(6313):722–6. <https://doi.org/10.1126/science.aag1322>
 35. Kissler SM, Tedijanto C, Goldstein E, Grad YH, Lipsitch M. Projecting the transmission dynamics of SARS-CoV-2 through the postpandemic period. *Science*. 2020;368(6493):860–8. <https://doi.org/10.1126/science.abb5793>
 36. Chuan Qin, Luoqi Zhou, Ziwei Hu, Shuoqi Zhang, Sheng Yang, Yu Tao, et al. Dysregulation of immune response in patients with Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. *Clin Infect Dis*. 2020;71(15):762–8. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa248>
 37. Yufang Shi, Ying Wang, Changshun Shao, Jianan Huang, Jianhe Gan, Xiaoping Huang, et al. COVID-19 infection: the perspectives on immune responses. *Cell Death Differ*. 2020;27(5):1451–4. <https://doi.org/10.1038/s41418-020-0530-3>
 38. Huang AT, Garcia-Carreras B, Hitchings MDT, Yang B, Katzelnick LC, Rattigan SM, et al. A systematic review of antibody mediated immunity to coronaviruses: antibody kinetics, correlates of protection, and association of antibody responses with severity of disease. *medRxiv*. 2020.04.14.20065771. <https://doi.org/10.1101/2020.04.14.20065771>

39. Fan Wu, Aojie Wang, Mei Liu, Qimin Wang, Jun Chen, Shuai Xia, et al. Neutralizing antibody responses to SARS-CoV-2 in a COVID-19 recovered patient cohort and their implications. *medRxiv*. 2020.03.30.20047365.
<https://doi.org/10.1101/2020.03.30.20047365>
40. Thevarajan I, Thi H O Nguyen, Koutsakos M, Druce J, Caly L, van de Sandt CE, et al. Breadth of concomitant immune responses prior to patient recovery: a case report of non-severe COVID-19. *Nat Med*. 2020;26(4):453–5.
<https://doi.org/10.1038/s41591-020-0819-2>
41. Bauer T, Jilg W. Hepatitis B surface antigen-specific T and B cell memory in individuals who had lost protective antibodies after hepatitis B vaccination. *Vaccine*. 2006;24(5):572–7.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.08.058>
42. Melgaco JG, Morgado LN, Santiago MA, de Oliveira JM, Lewis-Ximenez LL, Hasselmann B, et al. A single dose of inactivated hepatitis A vaccine promotes HAV-specific memory cellular response similar to that induced by a natural infection. *Vaccine*. 2015;33(32):3813–20.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.06.099>
43. Melgaco JG, Azamor T, Ano Bom APD. Protective immunity after COVID-19 has been questioned: what can we do without SARS-CoV-2-IgG detection? *Cell Immunol*. 2020;353:104114.
<https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2020.104114>
44. Pizzolla A, Wakim LM. Memory T cell dynamics in the lung during influenza virus infection. *J Immunol*. 2019;202(2):374–81.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800979>

Об авторах / Authors

Потеряев Дмитрий Александрович, канд. биол. наук. *Dmitry A. Poteryaev*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-2695-8869>

Хамитов Равиль Авгатович, д-р мед. наук, проф. *Ravil A. Khamitov*, Dr. Sci. (Med.), Professor. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-1314-894X>

Ефимов Григорий Александрович, канд. биол. наук. *Grigory A. Efimov*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-7129-6062>

Шустер Александр Михайлович, канд. биол. наук. *Aleksandr M. Shuster*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-6980-7190>

Статья поступила 30.06.2020

После доработки 17.08.2020

Принята к печати 28.08.2020

Received 30 June 2020

Revised 17 August 2020

Accepted 28 August 2020