

АНТИТЕЛА К РЕЦЕПТОР–СВЯЗЫВАЮЩЕМУ ДОМЕНУ СПАЙКОВОГО БЕЛКА SARS–COV–2: СВЯЗЬ С ВОЗРАСТОМ, ПНЕВМОНИЕЙ, ДЛИТЕЛЬНОСТЬЮ ПЕРИОДА ПОСЛЕ COVID–19

Е.А. Колосова^{1,2}, О.Н. Шапрова¹, Ю.А. Никулина³, Д.В. Шаньшин^{1,2}, В.С. Несмеянова¹, Ю.А. Меркульева¹, С.В. Беленькая¹, А.А. Исаева¹, Д.Н. Щербачев^{1,2}, С.А. Ельчанинова³, М.А. Никонорова³

¹Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово, Россия

²Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия

³Алтайский государственный медицинский университет, Барнаул, Россия

Antibodies to the receptor-binding domain of the SARS-Cov-2 spike protein: association with age, pneumonia, duration of the period after COVID-19

E.A. Kolosova^{1,2}, O.N. Shaprova¹, Yu.A. Nikulina³, D.V. Shanshin^{1,2}, V.S. Nesmeyanova¹, Yu.A. Merkuleva¹, S.V. Belenkaya¹, A.A. Isaeva¹, D.N. Shcherbakov^{1,2}, S.A. Elchaninova³, M.A. Nikonorova³

¹The State Scientific Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Russia

²Altai State University, Barnaul, Russia

³Altai State Medical University, Barnaul, Russia

Резюме

Несмотря на быстрое накопление фактов о гуморальном иммунном ответе при COVID-19, пока нет доказательных ответов на вопросы о факторах, влияющих на уровень и длительность периода обнаружения антител к SARS-CoV-2 в крови.

Цель: оценить распространенность наличия, клинические и демографические ассоциации антител IgG к RBD спайкового белка SARS-CoV-2 в разные сроки после COVID-19.

Материалы и методы. В одномоментном обсервационном исследовании приняли участие жители Алтайского края России, европеоиды, в возрасте от 20 до 93 лет, переболевшие COVID-19 в период с мая 2020 г. по февраль 2021 г. (n=314). Уровень антител в крови измеряли через 1–14 месяцев от начала клинической манифестации COVID-19 методом иммуноферментного анализа.

Результаты. Антитела IgG к RBD спайкового белка SARS-CoV-2 обнаружены у 86,9% участников исследования. Не выявлено зависимости титра антител от давности COVID-19. Титр антител положительно коррелировал с осложнением пневмонией COVID-19 и объемом поражений легочной ткани. Наличие пневмонии COVID-19 и объем поражений легочной ткани положительно связаны с возрастом. Возраст положительно коррелировал с титром антител независимо от наличия пневмонии COVID-19 в анамнезе.

Заключение. Антитела IgG к RBD спайкового белка SARS-CoV-2 имеются у большей части переболевших COVID-19. Титр этих антител у взрослых зависит от возраста, осложнения пневмонией COVID-19 и может сохраняться до 14 месяцев после появления первых симптомов инфекции.

Ключевые слова: COVID-19, антитела, рецептор-связывающий домен, S-белок, SARS-CoV-2, возраст, пневмония.

Abstract

Despite the rapid accumulation of facts about the humoral immune response in COVID-19, there are still no evidence-based answers to questions about the factors influencing the level and duration of the detection period of antibodies to SARS-CoV-2 in the blood.

Objective: To assess the prevalence, clinical and demographic associations of IgG antibodies to RBD of the SARS-CoV-2 spike protein at different times after COVID-19.

Materials and methods. Residents of the Altai region of Russia, Caucasians aged 20-93 years, who had COVID-19 from May 2020 to February 2021 (n = 314), took part in a one-time observational study. The level of antibodies in the blood was measured by enzyme-linked immunosorbent assay 1-14 months after the onset of the clinical manifestation of COVID-19.

Results. Anti-RBD IgG antibodies of the SARS-CoV-2 spike protein were detected in 86.9% of the study participants. The dependence of the antibody titer on the duration of the period after COVID-19 was not revealed. The antibody titer was positively correlated with the complication of COVID-19 pneumonia and the volume of lung tissue lesions. The presence of pneumonia COVID-19 and the volume of lung tissue lesions are positively associated with age. Age positively correlated with antibody titer regardless of the pneumonia COVID-19 in the anamnesis.

Conclusion. IgG antibodies to RBD of the SARS-CoV-2 spike protein are present in most of the COVID-19 patients. The titer of these antibodies in adults depends on age, complications of pneumonia COVID-19, and probably persists up to 14 months after the first symptoms of infection appear.

Key words: COVID-19, antibodies, receptor-binding domain, S-protein, SARS-CoV-2, age, pneumonia.

Введение

Раскрытие закономерностей формирования и поддержания иммунитета к новой коронавирусной инфекции COVID-19 — в центре внимания исследователей всего мира. Информация о продолжительности и детерминантах гуморального иммунного ответа на новый коронавирус (severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2, SARS-CoV-2) необходима для определения стратегии применения вакцин, препаратов на основе антител и мер санитарно-эпидемиологического контроля COVID-19.

Предполагается, что одним из основных показателей напряженности иммунитета к COVID-19 может быть уровень антител класса IgG к рецептор-связывающему домену (receptor-binding domain, RBD) S-белка (шиповидного белка, спайкового белка, spike-protein) SARS-CoV-2 [1]. Повышенный интерес к этому показателю обусловлен тем, что RBD играет ключевую роль в развитии инфекции COVID-19. Этот участок S1-субъединицы S-белка опосредует специфическое связывание вириона SARS-CoV-2 с трансмембранным ангиотензин-превращающим ферментом 2 (ACE2) на клетках-мишенях, после которого активируется процесс проникновения вириона в клетку с последующим развитием цитопатического эффекта [1]. Антитела к RBD S-белка SARS-CoV-2 способны блокировать взаимодействие вириона с клетками-мишенями и, таким образом, предотвращать их инфицирование [2]. Эти функциональные особенности определили выбор RBD S-белка в качестве приоритетной мишени для вакцин против COVID-19, а антител к этому эпитопу SARS-CoV-2 — как компонента препаратов для лечения этой инфекции.

Показано, что уровень антител к RBD S-белка SARS-CoV-2, определяемый иммунохимическими методами, в том числе широкодоступным методом иммуноферментного анализа, положительно коррелирует с вируснейтрализующей способностью этих антител [2].

Несмотря на быстрое накопление данных о гуморальном иммунном ответе при COVID-19, пока нет доказательных ответов на вопросы о факторах, влияющих на уровень и длительность периода выявления антител IgG к RBD S-белка SARS-CoV-2 в крови.

Цель исследования — оценить распространенность наличия, клинические и демографические ассоциации антител IgG к RBD спайкового белка SARS-CoV-2 в разные сроки после COVID-19.

Материалы и методы

В одномоментном исследовании приняли участие жители Алтайского края — региона России на юго-востоке Западной Сибири. Критериями

включения в исследование было подтвержденное медицинской документацией наличие новой коронавирусной инфекции COVID-19 в анамнезе. Критериями невключения в исследование были: вакцинация против COVID-19, наличие симптомов острого респираторного инфекционного заболевания и/или положительный результат на РНК SARS-CoV-2 в период от завершения амбулаторного или стационарного лечения COVID-19 до включения в исследование. Критериями выбывания из исследования были: вакцинация, признаки острого респираторного инфекционного заболевания и/или положительный результат на РНК SARS-CoV-2, появившиеся в период после включения в исследование до дня взятия крови для измерения титра антител к SARS-CoV-2 включительно.

Включение в исследование и взятие венозной крови у участников исследования проводили с 11 февраля по 28 июня 2021 г. в разные сроки от даты появления первых клинических симптомов COVID-19. Длительность периода от даты появления первых клинических симптомов коронавирусной инфекции до обследования на антитела IgG к RBD спайкового белка SARS-CoV-2 в среднем составила 189 (21 — 428) дней.

Выборка из жителей Алтайского края, результаты обследования которой использованы для статистического анализа, включала 314 пациентов (252 женщины и 52 мужчины) в возрасте от 20 до 93 лет (медиана 48,5 лет), перенесших COVID-19 в период с мая 2020 г. по февраль 2021 г. По фенотипическим признакам все участники исследования — европеоиды.

Около 93% участников исследования перенесли заболевание с легким и среднетяжелым течением. У части пациентов документировано осложнение пневмонией COVID-19, подтвержденное наличием высоковероятных вирусных изменений легочной ткани по данным компьютерной томографии (табл. 1). У большей части участников исследования в мазках со слизистых оболочек рото-, носоглотки в период болезни была идентифицирована РНК SARS-CoV-2 (см. табл. 1).

Таблица 1

Данные анамнеза по COVID-19 участников исследования (n=314)

Показатель	Количество пациентов, абс. (%)
Выполнено исследование на РНК SARS-CoV-2 материала слизистых оболочек рото-, носоглотки	264 (84,1)
Выявлена РНК SARS-CoV-2	246 (78,3)
<i>Степень тяжести COVID-19:</i>	
Легкое течение	188 (59,9)

Окончание таблицы 1

Показатель	Количество пациентов, абс. (%)
Среднетяжелое течение	105 (33,4)
Тяжелое течение	21 (6,7)
Крайне тяжелое течение	Отсутствовало
Осложнение COVID-19 пневмонией	120 (38,2)
<i>Объем высоковероятных вирусных изменений легочной ткани по данным компьютерной томографии у пациентов с пневмонией:</i>	
Минимальный, до 25%	85 (74,6)
Средний, 25–50%	19 (16,7)
Значительный, 51–75%	10 (8,8)
Субтотальный, более 75%	Отсутствовало

Антитела IgG к RBD спайкового белка SARS-CoV-2 определяли в сыворотке венозной крови методом иммуноферментного анализа. В высокосорбционном 96-луночном планшете сорбировали рекомбинантный RBD по 200 нг/лунку в натрий-фосфатном буфере (НФБ) при 4 °С в течение ночи. После трехкратной промывки на планшетном вошере ELx50 (BioTek, США) промывочным раствором, содержащим 0,5% полисорбат 20 в НФБ, наносили по 150 мкл/лунку блокирующего раствора, содержащего 1% сухое молоко (Sigma-Aldrich, США) в НФБ и инкубировали в течение 1 ч при 37 °С в планшетном термошейкере PST-60HL (Biosan, Латвия) при 200 об/мин. Далее наносили сыворотки в объеме 100 мкл в диапазоне разведения от 1:100 до 1:3200 в блокирующем буферном растворе и инкубировали в течение 1 ч при 37 °С в планшетном термошейкере PST-60HL (Biosan, Латвия) при 200 об/мин. После трехкратной промывки наносили по 100 мкл конъюгата козьих антител против константной области антитела IgG человека, меченого пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich, США), в рабочем разведении 1:20 000 и инкубировали в течение 1 ч при 37 °С в планшетном термошейкере при 200 об/мин. После шестикратной промывки наносили по 50 мкл субстрата на основе тетраметилбензидина и инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл 1 М серной кислоты. Регистрацию сигнала проводили при длине волны 450 нм на планшетном фотометре iMark (BioRad, США).

Результат измерения учитывали при условии, если среднее арифметическое значение оптической плотности (ОП) отрицательного контроля не выше 0,15 ОЕ и положительного контроля не ниже 1,0 ОЕ. Коэффициент позитивности образца (КП) рассчитывали по формуле:

$$\text{КП} = \frac{\text{ОП образца}}{\text{среднее арифметическое ОП отрицательного контроля} + 0,120}.$$

В исследовании использовали рекомбинантный RBD-белок, соответствующий RBD S-белка SARS-CoV-2. Для его получения использовали последовательность, кодирующую фрагмент RBD спайкового белка SARS-CoV-2 (Wuhan-Hu-1, GenBank: MN908947). Оптимизацию кодонного состава ДНК для экспрессии в клетках CHO проводили с помощью инструмента GeneOptimizer (<https://www.thermofisher.com/ru/en/home/life-science/cloning/gene-synthesis/geneart-gene-synthesis/geneoptimizer.html>). Итоговая нуклеотидная последовательность была синтезирована в составе векторной плазмиды рGH (ООО ДНК-синтез, Россия). Интегративный плазмидный вектор рVEAL2-RBD, кодирующий участок 308V – 542N белка S, получали на основе вектора рVEAL2. В N-концевой области RBD содержал сигнальную последовательность тканевого активатора плазминогена – Тра (MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSA). На C-конце белок содержал последовательность 6×His. Культуру-продуцент RBD получали на основе клеточной линии яичников китайского хомячка CHO-K1. Проводили трансфекцию клеток плазмидой рVEAL2-RBD с помощью Lipofectamine 3000 (ThermoFisher, США) согласно инструкции производителя. Для интеграции экспрессионной каскады вектора в геном клеток совместно с целевыми плазмидами добавляли плазмиду рCMV(CAT) T7-SB100, кодирующую транспозазу SB100. Через 3 дня в культуральную среду добавляли селективный антибиотик пурамицин (InvivoGen, США) в конечной концентрации 10 мкг/мл, ген устойчивости к которому входит в состав вектора рVEAL2. Селекцию устойчивых клонов проводили в течение 3 суток, затем поликлональную клеточную культуру рассеивали в 96-луночном планшете из расчета 1 клетка на лунку. Спустя 2 недели анализировали наличие единичных колоний в лунках, отбирали культуральную среду и оценивали продуктивность клонов. Клоны, показавшие наибольшую продуктивность, культивировали на ролирных установках и собирали культуральную среду.

Наличие целевого белка в культуральной среде CHO-K1 определяли с помощью электрофореза в 15% ПААГ в денатурирующих условиях и визуализировали окрашиванием кумасси синим и вестерн-блоттингом с использованием антител к polyHis. Рекомбинантный RBD выделяли из культуральной среды для удаления клеточного дебриса, фильтровали с помощью фильтрационных систем (0,22 мкм). Очистку RBD проводили с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии с использованием сорбента Ni-IMAC сефарозы (GE Healthcare, США). Связывание RBD с колонкой происходило при скорости 1,5 мл/мин. Промывку колонки от несвязавшихся белков про-

водили пятикратным объемом промывочного буфера (40 мМ имидазола, 30 мМ NaH_2PO_4 , 500 мМ NaCl , pH 7,4) при скорости потока 2 мл/мин. RBD элюировали при помощи трехкратного объема элюирующего буфера (500 мМ имидазола, 30 мМ NaH_2PO_4 , 500 мМ NaCl , pH 7,4) при скорости потока 1 мл/мин. Концентрацию проверяли при помощи NanoPhotometer NP80 (Implen, Германия). Содержащие RBD фракции анализировали при помощи электрофореза в денатурирующих условиях в 15% ПААГ, диализовали против натрий-фосфатного буферного раствора и подвергали стерилизующей фильтрации через фильтры 0,22 мкм. Количественный анализ содержания белков проводили методом Лоури [3].

С применением полученного рекомбинантного RBD по изложенной методике иммуноферментного анализа на наличие антител IgG к RBD спайкового белка SARS-CoV-2 были исследованы 120 образцов сыворотки крови от здоровых доноров. Пробы были собраны в Сибирском федеральном округе в октябре – ноябре 2019 г. и транспортированы в Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» (Кольцово, Россия) как описано ранее [4]. Ни в одном из исследованных образцов сывороток не были выявлены антитела IgG к RBD спайкового белка SARS-CoV-2. При проведении иммуноферментного анализа в качестве положительного контроля использовали раствор моноклонального антитела NB6 против RBD спайкового белка SARS-CoV-2, полученного, как изложено M. Schoof et al. (2020) [5], в концентрации 1,0 мкг/мл. Коэффициент вариации (CV) для внутрисерийной и межсерийной воспроизводимости измерений не превышал 9,0% и 13% соответственно, в пределах поглощения от 0,1 до 3,0 ОЕ.

Ранее установлено, что антитела IgG к RBD спайкового белка SARS-CoV-2 в диапазоне титра от 1:400

до 1:3200, измеренного по изложенной авторской методике иммуноферментного анализа, демонстрируют тесную корреляцию с эффективной вируснейтрализующей защитой клеток Vero от развития цитопатического эффекта SARS-CoV-2 [6].

Исследование одобрено этическим комитетом Алтайского государственного медицинского университета. Информированное согласие на участие в исследовании подписано всеми участниками исследования.

Статистический анализ выполнен в программе Statistica 8.0 (Stat. Soft. Inc., США). Проводили оценку межгрупповых различий категориальных переменных по двустороннему точному критерию Фишера, критерию хи-квадрат Пирсона (χ^2), количественных переменных двух независимых групп по U-критерию Манна – Уитни, 3 и более групп независимых групп по H-критерию Краскела-Уоллиса, связей между переменными по коэффициенту корреляции Спирмена (r_s), а также методом множественного регрессионного анализа. Отношение шансов (ОШ) рассчитывали методом логистического регрессионного анализа. Критический уровень значимости $p < 0,05$ принят для всех примененных статистических критериев.

Результаты и обсуждение

Антитела IgG к RBD спайкового белка SARS-CoV-2 выявлены у 273 (86,9%) участников исследования. Наличие выявляемого уровня антител в крови (серопозитивность), коэффициент позитивности и титр антител не коррелировали с увеличением периода давности перенесенного COVID-19, полом и, напротив, положительно коррелировали с тяжестью течения заболевания и его осложнением пневмонией COVID-19 (табл. 2). Коэффициент позитивности и титр антител, в отличие от серопозитивности, положительно связаны с возрастом па-

Таблица 2

Коэффициенты корреляции Спирмена демографических и клинических показателей с серопозитивностью, коэффициентом позитивности и титром антител IgG к RBD S-белка SARS-CoV-2 у пациентов после COVID-19

Показатель	Показатели наличия и уровня антител IgG к RBD S-белка SARS-CoV-2		
	Серопозитивность n = 314	Коэффициент позитивности n = 314	Титр n = 273
Пол	0,050; p = 0,380	0,033; p = 563	0,008; p = 0,892
Возраст	0,063; p = 0,264	0,240; p < 0,001	0,269; p < 0,001
Период от даты появления первых клинических симптомов COVID-19 до обследования	-0,020; p = 0,727	-0,011; p = 0,841	0,095; p = 0,094
Тяжесть течения COVID-19	0,170; p = 0,002	0,235; p < 0,001	0,297; p < 0,001
Наличие признаков вирусной пневмонии по данным компьютерной томографии	0,130; p = 0,021	0,203; p < 0,001	0,256; p < 0,001
Объем высоковероятных вирусных изменений легочной ткани по данным компьютерной томографии	0,143; p = 0,011	0,222; p < 0,001	0,277; p < 0,001

циентов. В то же время с возрастом положительно коррелировали как наличие пневмонии COVID-19, так и объем высоковероятных вирусных изменений легочной ткани по данным компьютерной томографии ($r_s = 0,218$; $p < 0,001$ и $r_s = 0,978$; $p < 0,001$, соответственно).

Отсутствие корреляции длительности периода после COVID-19 с коэффициентом позитивности и титром антител согласуется с результатами анализа групп пациентов, различающихся давностью перенесенного заболевания. Антитела IgG к RBD спайкового белка SARS-CoV-2 обнаружены у большинства пациентов в каждом из выделенных периодов давности COVID-19 (табл. 3). Группы пациентов, сформированные в зависимости от давности появления клинических симптомов COVID-19,

были сопоставимы по соотношению мужчин и женщин ($\chi^2 = 3,2$; $p = 0,358$), возрасту ($H = 3,39$; $p = 0,336$), наличию пневмонии ($\chi^2 = 4,8$; $p = 184$) и соотношению пациентов с разными объемами поражения легких ($\chi^2 = 8,8$; $p = 0,460$). При этом доля серопозитивных пациентов, коэффициент позитивности и титр антител IgG к RBD спайкового белка SARS-CoV-2 в разные сроки после COVID-19 не различались (см. табл. 3).

Величины титра антител у серопозитивных пациентов имели широкое межиндивидуальное варьирование, наименьшее – в первые 3 месяца от даты манифестации заболевания, наибольшее – в сроки 10 – 14 месяцев после COVID-19 (коэффициент вариации 88,4% и 96,6% соответственно).

Таблица 3

Частота выявления, коэффициент позитивности и титр антител IgG к RBD S-белка SARS-CoV-2 в разные сроки после COVID-19

Период от появления клинических симптомов COVID-19 до обследования, месяцы (*)	Количество пациентов	Количество серопозитивных пациентов, абс. (%)	Коэффициент позитивности, у.е.*	Титр антител у серопозитивных пациентов, разведение **	
1 – 3	(1,6±0,8)	26	23 (88,5)	6,0±4,8	800 (200 – 3200)
4 – 6	(4,8±0,7)	118	105 (89,0)	6,0±7,1	800 (200 – 1600)
7 – 9	(7,3±0,9)	126	107 (84,9)	5,6±6,1	800 (400 – 3200)
10 – 14	(10,5±1,5)	44	38 (86,4)	5,1±6,1	800 (400 – 3200)
		$\chi^2 = 0,952$; $p = 0,812$	$H = 1,92$; $p = 0,590$	$\chi^2 = 23,8$; $p = 0,068$	

* – среднее арифметическое и стандартное отклонение; ** – медиана, нижний и верхний квартили.

Таблица 4

Сравнительная характеристика демографических характеристик, частоты серопозитивности и уровня антител IgG к RBD S-белка SARS-CoV-2 в группах пациентов, переболевших COVID-19 с осложнением и без осложнения пневмонией COVID-19

Показатель	Переболевшие COVID-19		Значимость различий, p
	без осложнения пневмонией n = 194	с осложнением пневмонией n = 120	
Возраст, годы	45,5±15,0	51,5±13,3	<0,001
Женщины:мужчины, n (соотношение)	93:27 (3,4)	159:35 (4,5)	0,206
Период от даты появления первых клинических симптомов COVID-19 до обследования, дни	196,3±73,0	190,4±85,3	0,799
Количество серопозитивных пациентов, абс. (%)	162 (83,5)	111 (92,5)	0,015
Коэффициент позитивности, у.е.	4,9±6,0	7,1±7,3	<0,001
Титр антител, медиана (верхний и нижний квартили)	400 (200-1600)	800 (400-3200)	0,009
<i>Коэффициенты корреляции (r_s):</i>			
Возраста и доли серопозитивных пациентов	0,021; p = 0,768	0,110; p = 0,233	0,447
Возраста и коэффициента позитивности	0,206; p = 0,004	0,170; p = 0,034	0,751
Возраста и титра антител	0,208; p = 0,004	0,242; p = 0,008	0,774

Для сравнительной оценки связей титра антител IgG к RBD спайкового белка SARS-CoV-2 с двумя выявленными коррелятами — возрастом и пневмонией, был проведен множественный регрессионный анализ. По результатам анализа установлено, что с высокой вероятностью возраст является фактором, независимым от осложнения заболевания пневмонией: коэффициент детерминации R^2 для возраста как предиктора титра антител с поправкой на наличие пневмонии COVID-19 составляет 0,105 ($p < 0,001$). Обнаружены признаки линейной связи возраста и титра антител ($F = 29,6$; $p < 0,001$).

С результатами множественного регрессионного анализа согласуется наличие положительных связей возраста с коэффициентом позитивности и титром антител как у пациентов с пневмонией COVID-19, так и у пациентов, не имевших этого осложнения инфекции (см. табл. 4). При этом, судя по величинам коэффициентов корреляции, сила этих связей не зависит от наличия осложнения заболевания пневмонией.

Поскольку группы пациентов с наличием/отсутствием пневмонии COVID-19 в анамнезе различались по возрасту, проведено сравнение частоты серопозитивности и значений титра антител IgG к RBD спайкового белка SARS-CoV-2 в подгруппах пациентов COVID-19, сформированных по возрастным диапазонам, определенных Всемирной организацией здравоохранения. В этих подгруппах выявлены различия по титру антител (рис.).

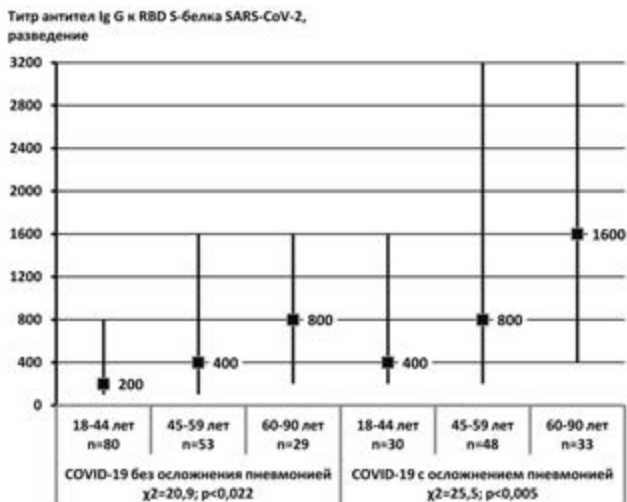


Рис. Титр антител IgG к RBD S-белка SARS-CoV-2 (медиана, нижний и верхний квартили) у пациентов разных возрастных групп, перенесших COVID-19 с осложнением и без осложнения пневмонией COVID-19

Как показал логистический регрессионный анализ, с повышенной вероятностью формирования гуморального иммунитета к COVID-19 с титром антител IgG к RBD S-белка выше 800 и более

ассоциирован возраст старше 50 лет у переболевших без осложнения пневмонией COVID-19 (ОШ среднее значение 2,20; 95% доверительный интервал 1,20–4,04; $p = 0,011$), возраст старше 60 лет при осложнении инфекции вирусной пневмонией (ОШ среднее значение 2,63; 95% доверительный интервал 1,01–6,81; $p = 0,044$).

В исследовании у переболевших COVID-19 оценен уровень антител IgG к RBD S-белка SARS-CoV-2, который рассматривается как наиболее значимый в клиническом и эпидемиологическом аспекте компонент гуморального иммунного ответа на COVID-19, поскольку RBD белка шипа играет ключевую роль в проникновении вирионов SARS-CoV-2 в клетку [1, 2]. Способность IgG к RBD S-белка SARS-CoV-2 блокировать этот процесс, следовательно, и инфицирование положительно коррелирует с уровнем антител, выявляемых методом иммуноферментного анализа [2, 6].

Оценка в одномоментном исследовании титра антител IgG к RBD спайкового белка SARS-CoV-2 позволяет полагать, что эти антитела продуцируются у большей части переболевших COVID-19 и могут обнаруживаться в крови на протяжении 12–14 месяцев после инфекции.

Наличие среди переболевших COVID-19 серонегативных по антителам IgG к RBD спайкового белка SARS-CoV-2 согласуется с данными других наблюдений [7] и, возможно, обусловлено тем, что инфицирование SARS-CoV-2 может подавлять активацию гуморального иммунитета через торможение экспрессии МНС-II на В-клетках [8].

Сопоставление заключения о возможности выявления антител IgG к RBD спайкового белка SARS-CoV-2 на протяжении 12–14 месяцев после инфекции с данными других исследований затруднено из-за неоднородности этих исследований. Как показал недавно проведенный мета-анализ и систематический обзор 150 публикаций [7], результаты большинства исследований полностью или преимущественно основаны на данных госпитализированных пациентов и имеют множество методологических различий, включая состав участников, длительность наблюдения, методы измерения антител. В очень небольшом числе наблюдений участвовали пациенты с легкой или бессимптомной инфекцией COVID-19. В целом, хотя динамика антител в острой фазе инфекции достаточно хорошо описана, более долгосрочные закономерности гораздо менее очевидны и не позволяют сделать однозначного заключения [7]. В нескольких исследованиях показано, что у большинства пациентов антитела IgG к SARS-CoV-2, включая антитела к RBD, обнаруживаются в течение не менее года после заражения [9–13].

Выявленная частота серопозитивности и возможность обнаружения IgG к RBD спайкового

белка SARS-CoV-2 в период от 1 до 14 месяцев после появления симптомов COVID-19 согласуются с данными о наличии RBD-специфических В-клеток памяти более чем у 95% пациентов, переболевших COVID-19 [14]. Показано, что количество этих клеток остается относительно стабильным в оцененном периоде до 12 месяцев после заражения [15], а уровень антиген-связывающих антител IgG к RBD спайкового белка SARS-CoV-2, которые экспрессируют эти клетки, тесно коррелирует с вируснейтрализующей способностью антител [11,15]. Предполагается, что одной из причин сохранения признаков гуморального иммунного ответа на SARS-CoV-2 на протяжении около года после COVID-19 может быть длительное присутствие антигенов SARS-CoV-2 с поддержанием иммунореактивности к ним, в частности, в кишечнике [11].

Следует подчеркнуть, что длительность сохранения защиты от повторного заражения SARS-CoV-2 требует дополнительного изучения с учетом неполного отражения вируснейтрализующей способности антител иммунохимическими тестами на специфические антитела и остающегося открытым вопроса об эффективности защитных свойств антител к продолжающим появляться в результате мутаций новых генетических линий SARS-CoV-2. Показано, что мутации SARS-CoV-2, особенно мутации в областях, кодирующих спайковый белок, RBD спайкового белка, могут приводить к снижению эффективности распознавания вируса антителами, продукция которых ранее индуцирована вирусом другого клайда [17,16].

Полагаем, что на титр антител IgG к RBD спайкового белка SARS-CoV-2 влияют возраст и объем вирусного поражения легких, в значительной степени определяющий тяжесть течения COVID-19. Эти влияния, скорее всего, взаимосвязаны. Как следует из полученных данных, чем больше возраст (в диапазоне от 20 до 93 лет) и чем обширнее поражение легких в период болезни, тем более вероятно выявление более высокого титра антител IgG к RBD спайкового белка SARS-CoV-2 в среднем и долгосрочном периоде после инфекции. С другой стороны, возраст положительно связан с более тяжелым течением COVID-19, его осложнением пневмонией и объемом поражения легких.

Отметим, что практически одновременно с получением нами данных о связи возраста, тяжести COVID-19 с титром антител IgG к RBD спайкового белка SARS-CoV-2, появилось несколько публикаций, свидетельствующих о положительной корреляции возраста и тяжести инфекции с уровнем и вируснейтрализующей способностью антител к спайковому белку [19–24]. С учетом результатов множественного регрессионного анализа и сравнения групп участников исследования с наличием и отсутствием осложнения COVID-19 пневмонией, мож-

но полагать, что весьма вероятно независимое от вирусного поражения легких влияние возраста на титр антител IgG к RBD спайкового белка SARS-CoV-2.

Механизмы такого влияния в настоящее время могут быть обозначены лишь гипотетически. Возможно, предсуществующие В-клетки памяти к другим коронавирусам HCoV способны вносить вклад в адаптивный иммунитет против инфекции SARS-CoV-2. Отдельные исследования указывают на такую возможность [25, 26], хотя, в целом, эффективность перекрестного иммунитета к разным коронавирусам изучена недостаточно.

При обсуждении причинно-следственных взаимоотношений между уровнем антител и тяжестью COVID-19 нельзя игнорировать возможность антителозависимого усиления – опосредованного антителами связывания вируса с Fc-рецептором на иммунокомпетентных клетках и, как следствие, усиления воспалительных реакций с развитием более тяжелого течения инфекции [27]. Однако полученные нами данные не позволяют доказательно утверждать, что индивидуумы, имевшие относительно высокий титр антител IgG к RBD спайкового белка в период после болезни, имели повышенный уровень этих антител, так же, как и антител к другим эпитомам SARS-CoV-2, во время острого периода инфекции, когда и возможно развитие антителозависимого усиления инфекции.

Отметим некоторые ограничения экстраполяции на популяцию полученных данных о длительности сохранения и уровне антител IgG к RBD спайкового белка SARS-CoV-2 после COVID-19. Эти ограничения связаны с методологией одномоментного наблюдения на фоне широкого межличностного варьирования уровня антител. Это варьирование не помешало выявить представленные факты с общепринятым порогом достоверности, однако указывает на рациональность подтверждения этих фактов в проспективных и лучше когортных наблюдениях напряженности постинфекционного иммунитета против COVID-19. В настоящее время мы продолжаем динамическое наблюдение за уровнем антител IgG к RBD спайкового белка SARS-CoV-2 в контингенте переболевших COVID-19 жителей Алтайского края.

Проведенный в работе анализ указывает на малую вероятность связи титра антител IgG к RBD спайкового белка SARS-CoV-2 с биологическим полом. В обследованной выборке переболевших COVID-19 соотношение женщин и мужчин составляет 4,8, что не соответствует таковому в населении Алтайского края (1,2 по данным Федеральной службы государственной статистики <https://www.gks.ru>), возможно, и в контингенте переболевших COVID-19 в период с мая 2020 г. по февраль 2021 г., данные по половому составу которого нами не найдены в открытом доступе. Это опре-

деляет ограничения экстраполяции полученных данных на популяцию в части предположения об отсутствии зависимости уровня антител IgG к RBD спайкового белка SARS-CoV-2 от пола переболевших COVID-19. По данным систематического обзора публикаций [7], результаты сравнительного анализа уровня антител к RBD спайкового белка SARS-CoV-2 у мужчин и женщин противоречивы.

В представленном исследовании не оценивалось влияние лечения на уровень антител IgG к RBD спайкового белка SARS-CoV-2. Проведение такой оценки было затруднено тем, что подходы к лечению, применяемые лекарственные препараты, во-первых, значительно различались в зависимости от тяжести течения COVID-19, а во-вторых, изменялись даже в отношении пациентов со сходным течением инфекции в соответствии с изменениями в рекомендациях Министерства здравоохранения России. Очевидно, вопрос о влиянии лечения на фенотип адаптивного иммунного ответа на SARS-CoV-2 требует специального исследования.

Заключение

Антитела IgG к RBD спайкового белка SARS-CoV-2 имеются у большей части переболевших COVID-19. Титр этих антител у взрослых зависит от возраста, осложнения COVID-19 пневмонией и может сохраняться до 14 месяцев после появления первых симптомов инфекции.

Источники финансирования

Работа выполнена при поддержке государственного задания (№ FZMW-2020-0007) и Стипендии президента Российской Федерации (СП-5107.2021.4).

Конфликт интересов:

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

- Lotfi R, Kalmarzi RN, Roghani S.A. A review on the immune responses against novel emerging coronavirus (SARS-CoV-2). *Immunol Res.* 2021;69:213–224. <https://doi.org/10.1007/s12026-021-09198-0>
- Byrnes JR, Zhou XX, Lui I, et al. Competitive SARS-CoV-2 serology reveals most antibodies targeting the spike receptor-binding domain compete for ACE2 binding. *mSphere.* 2020 Sep 16;5(5):e00802-20. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00802-20>
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265–275.
- Ilyicheva T, Durymanov A, Susloparov I, et al. Fatal Cases of Seasonal Influenza in Russia in 2015-2016. *PLoS One.* 2016 Oct 24;11(10):e0165332. <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0165332>
- Schoof M, Faust B, Saunders RA, Sangwan S, et al. An ultrapotent synthetic nanobody neutralizes SARS-CoV-2 by stabilizing inactive Spike. *Science.* 2020;370(6523):1473–1479. <http://dx.doi.org/10.1126/science.abe3255>
- Kazachinskaia E, Chepurnov A, Shcherbakov D, et al. IgG Study of Blood Sera of Patients with COVID-19. *Pathogens.* 2021; 10(11):1421. <https://doi.org/10.3390/pathogens10111421>
- Post N, Eddy D, Huntley C, et al. Antibody response to SARS-CoV-2 infection in humans: A systematic review. *PLoS One.* 2020 Dec 31;15(12):e0244126. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244126>
- Wilk AJ, Rustagi A, Zhao NQ, et al. A single-cell atlas of the peripheral immune response in patients with severe COVID-19. *Nat Med.* 2020;26:1070–6. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0944-y>
- Gallais F, Gantner P, Bruel T, et al. Anti-SARS-CoV-2 Antibodies persist for up to 13 months and reduce risk of reinfection. *medRxiv.* 2021 05.07.21256823. <https://doi.org/10.1101/2021.05.07.21256823>
- Yoo JH. What we do know and do not yet know about COVID-19 vaccines as of the beginning of the year 2021. *J Korean Med Sci.* 2021;36:e54. <https://doi.org/10.3346/jkms.2021.36.e54>
- Yao L, Wang GL, Shen Y, et al. Persistence of antibody and cellular immune responses in COVID-19 patients over nine months after infection. *J Infect Dis.* 2021;jiab255. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiab255>
- Gaebler C, Wang Z, Lorenzi JCC, et al. Evolution of antibody immunity to SARS-CoV-2. *Nature.* 2021;591:639-644. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03207-w>
- Xiang T, Liang B, Fang Y, et al. Declining levels of neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 in convalescent COVID-19 patients one year post symptom onset. *Front Immunol.* 2021 Jun 16;12:708523. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.708523>
- Pravost J, Gasser R, Beaudoin-Bussi res G, et al. Cross-sectional evaluation of humoral responses against SARS-CoV-2 spike. *Cell Rep Med.* 2020 Oct 20;1(7):100126. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2020.100126>
- Wang Z, Muecksch F, Schaefer-Babajew D, et al. Naturally enhanced neutralizing breadth against SARS-CoV-2 one year after infection. *Nature.* 2021 Jul;595(7867):426-431. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03696-9>
- Dan JM, Mateus J, Kato Y, et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science.* 2021;371:eabf4063. <https://doi.org/10.1126/science.abf4063>
- Zhou D, Dejnirattisai W, Supasa P, et al. Evidence of escape of SARS-CoV-2 variant B.1.351 from natural and vaccine-induced sera. *Cell.* 2021;S0092–8674:00226–9. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.02.037>
- Quast I, Tarlinton D. B cell memory: understanding COVID-19. *Immunity.* 2021;54:205–10. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.01.014>
- Terpos E, Stellas D, Rosati M, et al. SARS-CoV-2 antibody kinetics eight months from COVID-19 onset: Persistence of spike antibodies but loss of neutralizing antibodies in 24% of convalescent plasma donors. *Eur J Intern Med.* 2021 Jul;89:87-96. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2021.05.010>
- Guthmiller JJ, Stovicek O, Wang J, et al. SARS-CoV-2 Infection severity is linked to superior humoral immunity against the spike. *mBio.* 2021 Jan;12(1):e02940-20. <https://dx.doi.org/10.1128/mBio.02940-20>
- Legros V, Denolly S, Vogrig M, et al. A longitudinal study of SARS-CoV-2-infected patients reveals a high correlation between neutralizing antibodies and COVID-19 severity. *Cell Mol Immunol.* 2021 Feb;18(2):318-327. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00588-2>
- Atyeo C, Fischinger S, Zohar T, et al. Distinct early serological signatures track with SARS-CoV-2 survival. *Immunity.* 2020 Sep;53:524–532.e4. <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.immuni.2020.07.020>

23. Guthmiller JJ, Stovicek O, Wang J, et al. SARS-CoV-2 infection severity is linked to superior humoral immunity against the spike. *mBio*. 2021 Jan-Feb;12(1):e02940-20. <https://dx.doi.org/10.1128/mBio.02940-20>

24. Robbiani DF, Gaebler C, Muecksch F, et al. Convergent antibody responses to SARS-CoV-2 in convalescent individuals. *Nature*. 2020 Jun;584:437–442. <https://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2456-9>

25. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Krüger N, et al. The novel coronavirus 2019 (2019-nCoV) uses the SARS-coronavirus receptor ACE2 and the cellular protease TM-

PRSS2 for entry into target cells. *bioRxiv*. 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.01.31.929042>

26. Ortega, N., Ribes, M., Vidal, M. et al. Seven-month kinetics of SARS-CoV-2 antibodies and role of pre-existing antibodies to human coronaviruses. *Nat Commun* 2021;12: 4740. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24979-9>

27. Guthmiller JJ, Stovicek O, Wang J, et al. SARS-CoV-2 infection severity is linked to superior humoral immunity against the spike. *mBio*. 2021 Jan;12(1): e02940-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.02940-20>

Авторский коллектив:

Колосова Евгения Ангреевна — младший научный сотрудник лаборатории иммунохимии отдела биоинженерии Центра вирусологии и биотехнологии «Вектор»; младший научный сотрудник Российско-Американского противоракового центра Алтайского государственного университета; тел.: 8(3852)29-81-42, e-mail: kurchanovaea@gmail.com

Шапрова Ольга Николаевна — младший научный сотрудник лаборатории иммунохимии отдела биоинженерии Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор»; тел.: 8(383)36-34-700, e-mail: ngelya209@gmail.com

Никулина Юлия Александровна — аспирант кафедры инфекционных болезней Алтайского государственного медицинского университета; тел: +7-906-967-68-94, e-mail: Julia_didenko91@gmail.com

Шаньшин Даниил Васильевич — младший научный сотрудник лаборатории иммунохимии отдела биоинженерии Центра вирусологии и биотехнологии «Вектор»; младший научный сотрудник Российско-Американского противоракового центра Алтайского государственного университета; тел.: 8(3852)29-81-42, e-mail: Dan6091154224@gmail.com

Несмеянова Валентина Сергеевна — стажер-исследователь лаборатории иммунохимии отдела биоинженерии Центра вирусологии и биотехнологии «Вектор»; тел.: 8(383)363-47-00, e-mail: nesmeyanova_vs@vector.nsc.ru

Меркульева Юлия Александровна — младший научный сотрудник лаборатории иммунохимии отдела биоинженерии Центра вирусологии и биотехнологии «Вектор»; тел.: 8(383)36-32-007, e-mail: j.a.merkulyeva@gmail.com

Беленькая Светлана Валерьевна — младший научный сотрудник лаборатории иммунохимии отдела биоинженерии Центра вирусологии и биотехнологии «Вектор»; тел.: 8(383)363-47-00, e-mail: belenkaya.sveta@gmail.com

Исаева Анастасия Александровна — младший научный сотрудник лаборатории иммунохимии отдела биоинженерии Центра вирусологии и биотехнологии «Вектор»; тел.: 8(383)363-20-07, e-mail: anastasya_iseeva_1993@mail.ru

Щербakov Дмитрий Николаевич — ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией иммунохимии отдела биоинженерии Центра вирусологии и биотехнологии «Вектор»; ведущий научный сотрудник Российско-Американского противоракового центра, Алтайский государственный университет, к.б.н.; тел.: 8(3852)29-81-42, dnshcherbakov@gmail.com

Ельчанинова Светлана Александровна — профессор кафедры биохимии и клинической лабораторной диагностики Алтайского государственного медицинского университета, д.б.н., профессор; тел.: 8(3852)56-69-19, e-mail: saelch@mail.ru

Никонорова Марина Анатольевна — профессор кафедры инфекционных болезней Алтайского государственного медицинского университета, д.м.н.; тел: +7-903-910-31-99, e-mail: ma.nikulina@mail.ru