



Изучение иммуногенности вакцины Гам-КОВИД-Вак

И.А. Кириллов¹, А.П. Пирожков^{2,✉}, В.В. Рубцов², С.Я. Логинова², Н.А. Сайфулина², Т.М. Плеханова², М.А. Тимофеев¹, Д.А. Кутаев², Д.Ю. Логунов³, А.Л. Гинцбург³, С.В. Борисевич²

¹ Управление войск радиационной, химической и биологической защиты Вооруженных Сил Российской Федерации, Фрунзенская наб., д. 22/2, Москва, 119160, Российская Федерация

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, ул. Октябрьская, д. 11, г. Сергиев Посад-6, Московская область, 141306, Российская Федерация

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Гамалеи, д. 18, Москва, 123098, Российская Федерация

✉ Пирожков Алексей Петрович; 48cnii@mil.ru

Резюме

В начале массовой иммунизации личного состава Вооруженных Сил Российской Федерации в ноябре 2020 г. первой в России вакциной Гам-КОВИД-Вак против новой коронавирусной инфекции COVID-19 необходимо было оценить уровень антител у вакцинированных лиц, длительность и напряженность гуморального иммунитета против COVID-19. **Цель работы:** изучение иммуногенной эффективности вакцины Гам-КОВИД-Вак у сотрудников военных лечебных учреждений после вакцинации. **Материалы и методы:** наличие специфических антител в сыворотке крови лиц, иммунизированных вакциной Гам-КОВИД-Вак (477 добровольцев), и переболевших COVID-19 (73 пациента) определяли в реакции нейтрализации, методами иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием наборов реагентов различных производителей и иммуноблоттинга. Статистическую обработку результатов исследования проводили методами вариационной статистики. **Результаты:** установлено, что у 90,7% вакцинированных выявляются вируснейтрализующие антитела в реакции нейтрализации и у 95,4% – в ИФА. Отмечено снижение уровня антител, выявляемых в реакции нейтрализации и ИФА, у вакцинированных старше 50 лет. Концентрация иммуноглобулина класса G к S-белку вируса SARS-CoV-2, определяемая в ИФА у группы лиц, иммунизированных вакциной Гам-КОВИД-Вак, достоверно выше, чем в группе переболевших COVID-19. Наибольший уровень корреляции результатов определения антител в ИФА и реакции нейтрализации получен при использовании экспериментального набора реагентов для количественного выявления вируснейтрализующих антител методом конкурентного ИФА с использованием рекомбинантного человеческого ангиотензинпревращающего фермента (ACE2). Изучение динамики изменений уровня вируснейтрализующих антител показало, что через три месяца после введения второго компонента вакцины отмечается достоверное снижение уровня антител более чем в два раза. **Выводы:** у лиц, иммунизированных вакциной Гам-КОВИД-Вак, формируется эффективный гуморальный иммунитет к возбудителю COVID-19. Снижение среднего геометрического значения титров антител в два раза через три месяца после введения второго компонента вакцины Гам-КОВИД-Вак свидетельствует о необходимости проведения ревакцинации через 6 месяцев после введения второго компонента вакцины.

Ключевые слова: гуморальный иммунитет; вируснейтрализующие антитела; вакцина; Спутник V; Гам-КОВИД-Вак; COVID-19; SARS-CoV-2; ИФА; иммуноглобулин класса G

Для цитирования: Кириллов И.А., Пирожков А.П., Рубцов В.В., Логинова С.Я., Сайфулина Н.А., Плеханова Т.М., Тимофеев М.А., Кутаев Д.А., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л., Борисевич С.В. Изучение иммуногенности вакцины Гам-КОВИД-Вак. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(4):435–445. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-4-435-445>

Immunogenicity evaluation of Gam-COVID-Vac (Sputnik V)

I.A. Kirillov¹, A.P. Pirozhkov^{2,✉}, V.V. Rubtsov², S.Ya. Loginova², N.A. Saifulina², T.M. Plekhanova², M.A. Timofeev¹, D.A. Kutaev², D.Y. Logunov³, A.L. Gintsburg³, S.V. Borisevich²

¹ Directorate of Nuclear, Chemical and Biological Protection Troops of the Armed Forces of the Russian Federation, 22/2 Frunzenskaya Emb., Moscow 119160, Russian Federation

² 48 Central Scientific Research Institute, 11 Oktyabrskaya St., Sergiev Posad-6, Moscow Region 141306, Russian Federation

³ N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, 18 Gamaleya St., Moscow 123098, Russian Federation

✉ Alexey P. Pirozhkov; 48cnii@mil.ru

Abstract

In November 2020, the Armed Forces of the Russian Federation began mass immunisation of the personnel with Gam-COVID-Vac (Sputnik V), the first Russia vaccine against the new coronavirus infection (COVID-19). Thus, it became necessary to assess post-vaccination antibody levels and the duration and intensity of humoral immunity to COVID-19. **The aim of the study** was to investigate the immunogenicity and efficacy of Gam-COVID-Vac in military medical staff after vaccination. **Materials and methods:** the authors determined the presence of specific antibodies in the serum of individuals immunised with Gam-COVID-Vac (477 volunteers) and COVID-19 convalescents (73 patients), using virus neutralisation (VN), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with reagent kits by several manufacturers, and immunoblotting. The results of the study were evaluated using analysis of variance. **Results:** VN detected virus neutralising antibodies in 90.7% of vaccinated subjects; ELISA, in 95.4%. Both VN and ELISA showed lower antibody levels in the vaccinated over 50 years of age. ELISA demonstrated a significantly higher concentration of anti-SARS-CoV-2 spike IgG in the Gam-COVID-Vac group than in the COVID-19 convalescent group. The correlation between antibody detection results by VN and ELISA was the strongest when the authors used their experimental reagent kit for quantitative detection of virus neutralising antibodies by competitive ELISA with the recombinant human ACE2 receptor. Having analysed the time course of neutralising antibody titres, the authors noted a significant, more than two-fold decrease in geometric means of the titres three months after administration of the second vaccine component. **Conclusions:** the subjects vaccinated with Gam-COVID-Vac gain effective humoral immunity to COVID-19. The decrease in titres indicates the need for revaccination in 6 months.

Key words: humoral immunity; virus neutralising antibodies; vaccine; Sputnik V; Gam-COVID-Vac; COVID-19; SARS-CoV-2; ELISA; immunoglobulin G

For citation: Kirillov I.A., Pirozhkov A.P., Rubtsov V.V., Loginova S.Ya., Saifulina N.A., Plekhanova T.M., Timofeev M.A., Kutaev D.A., Logunov D.Y., Gintsburg A.L., Borisevich S.V. Immunogenicity evaluation of Gam-COVID-Vac (Sputnik V). *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение = Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(4):435–445. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-4-435-445>

Введение

В августе 2020 г. была внедрена в практику отечественного здравоохранения первая вакцина Гам-КОВИД-Вак (Спутник V), разработанная специалистами ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, против новой коронавирусной инфекции COVID-19 на основе аденовирусного вектора со встроенным фрагментом генетического материала, кодирующим шиповидный гликопротеин (spike protein, или S-белок) вируса SARS-CoV-2.

В ходе проведения I–II и III фаз клинических исследований указанной вакцины получены результаты изучения ее иммуногенности [1, 2]. Масовая иммунизация вакциной Гам-КОВИД-Вак в Вооруженных силах Российской Федерации проведена в ноябре 2020 г. Ранее было вакцинировано около 2,5 тыс. военнослужащих, большая часть которых являлась сотрудниками лечебных учреждений Главного военно-медицинского управления. По поручению Министра обороны Российской Федерации в ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России во взаимодействии с Главным военно-медицинским управлением было организовано проведение исследования по количественной оценке гуморального иммунитета у личного состава военных лечебных учреждений, иммунизированного вакциной Гам-КОВИД-Вак, с целью определения уровня антител, длительности и напряженности иммунитета против новой коронавирусной инфекции COVID-19.

Известно, что эффективность вакцинации против вирусных инфекций главным образом определяется наличием вируснейтрализующих антител (ВНА), которые выявляются в реакции нейтрализации [3]. Однако постановка реакции нейтрализации является длительной и трудоемкой процедурой, которая проводится с использованием живого вируса SARS-CoV-2 в условиях лабораторий, предназначенных для работы с возбудителями II группы патогенности. Поэтому для массовой оценки гуморального иммунитета у лиц, иммунизированных вакциной Гам-КОВИД-Вак, используют общепринятый и доступный в обычной лаборатории метод определения/выявления иммуноглобулинов класса G (IgG) к рецептор-связывающему домену (receptor-binding domain, RBD) S-белка или полноразмерному S-белку вируса SARS-CoV-2 с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) [4, 5]. Однако коэффициент корреляции между уровнем антител в реакции нейтрализации и уровнем IgG, выявляемых в ИФА с помощью различных наборов реагентов, может значительно отличаться в зависимости от варианта анализа и используемых рекомбинантных антигенов. Поэтому для полу-

чения достоверных результатов оценки гуморального иммунитета у вакцинированных лиц необходимо было экспериментально обосновать выбор оптимального варианта проведения ИФА и соответствующего набора реагентов.

Цель работы – изучение иммуногенной эффективности вакцины Гам-КОВИД-Вак у сотрудников военных лечебных учреждений после вакцинации.

Материалы и методы

Пациенты и добровольцы. Исследование проводили с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности. Взятие крови у пациентов и добровольцев для исследований проводили после получения информированного согласия на включение результатов их обследования в данное исследование, которое было одобрено на заседании биоэтической комиссии ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России, протокол заседания № 6(924) от 04.05.2022.

В исследование были включены пробы крови, полученные от 477 добровольцев (группа иммунизированных вакциной Гам-КОВИД-Вак) из числа медицинского персонала в возрасте от 23 до 72 лет, из них 267 (55,9%) мужчин и 210 (44,0%) женщин, и 93 пациентов с подтвержденным диагнозом COVID-19 (группа пациентов, переболевших COVID-19 (реконвалесцентом)) в возрасте от 26 до 63 лет, из них 49 (52,6%) мужчин и 44 (47,3%) женщины. Средний возраст в группе добровольцев составил 40,2 года, в группе пациентов – 37,5. Критериями включения в исследование служили возраст добровольца или пациента старше 18 лет, отсутствие в анамнезе сведений о перенесенном ранее COVID-19 и наличие информированного согласия. Определение наличия антител в сыворотках крови добровольцев к вирусу SARS-CoV-2 перед проведением вакцинации не проводили.

Реакция нейтрализации. Определение уровня вируснейтрализующих антител к вирусу SARS-CoV-2 проводили в реакции нейтрализации *in vitro* классическим методом. Для постановки реакции нейтрализации готовили ряд последовательных разведений испытуемых сывороток крови в среде 199 (НПП «ПанЭко», Россия) в одинаковых объемах. Ко всем разведениям сыворотки добавляли вирус SARS-CoV-2 в дозе 50 БОЕ. Смесь вируса и сыворотки крови выдерживали при температуре 37 °C в течение 60 мин. Далее проводили заражение однослойной культуры клеток Vero B (постоянная культура клеток почки африканской зеленой марышки, полученная из Института вирусологии Д.И. Ивановского). В качестве контроля

использовали нормальную сыворотку крови человека и образцы испытуемых сывороток в разведении 1:2 в среде 199. Инфицированный монослой клеток термостатировали в течение 60 мин при 37 °С, удаляли инокулят и на монослой наносили питательное агаровое покрытие, под которым монослой инкубировали в течение 2 сут, после чего окрашивали витальным красителем (нейтральный красный) и через сутки учитывали результаты по методу, предложенному Н.Н. Гинцбургом с соавт. [6].

Вирусы. В работе использовали вирус SARS-CoV-2, исходного варианта В.1 (вариант В), соответствующий референсной последовательности NC_045512.2 (Wuhan seafood market pneumonia virus isolate Wuhan-Hu-1, complete genome), а также варианты «альфа» В.1.1.7 (британский), «бета» В.1.351 (южно-африканский), «гамма» Р.1 (бразильский) и «дельта» В.1.617 (индийский), хранившиеся в Специализированной коллекции ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России. Определение биологической активности вариантов SARS-CoV-2 проводили на флаконах с однослойной монослойной культурой клеток Vero В методом негативных колоний под агаровым покрытием [7].

Иммуноферментный анализ. ИФА проводили с использованием наборов реагентов для иммуноферментного выявления IgG к SARS-CoV-2:

- набор реагентов для иммуноферментного количественного определения IgG к SARS-CoV-2 в сыворотке (плазме) крови «SARS-CoV-2-IgG количественный-ИФА-БЕСТ» производства АО «Вектор-Бест», Россия (ПУ № РЗН 2021/14458);
- набор реагентов для иммуноферментного выявления IgG к рецептор-связывающему домену поверхностного гликопротеина S (spike) коронавируса SARS-CoV-2 «SARS-COV-2-RBD-ИФА-Гамалеи» производства ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (ПУ № РЗН 2020/10393);
- экспериментальный набор реагентов «SARS-CoV-2-ВНА-ИФА-РХБЗ», изготовленный в ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России, для количественного выявления ВНА методом конкурентного ИФА с использованием рекомбинантного человеческого ангиотензинпревращающего фермента 2 (рецептор ангиотензина 2, ACE2) [8].

Количественное определение ВНА с помощью конкурентного ИФА проводили с использованием рекомбинантного внеклеточного до-

мена человеческого рецептора ангиотензина ACE2 (ООО «Хайтест», Россия), иммобилизованного на поверхности лунок полистиролового планшета. Изучаемые образцы сывороток крови и калибровочные пробы с известной концентрацией ВНА в международных единицах IU (относительно Международного стандарта ВОЗ – WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin NIBSC code: 20/136¹) предварительно разводили в 10 раз на отдельном планшете с помощью рабочего раствора рекомбинантного S-белка вируса SARS-CoV-2 (ООО «Хайтест», Россия), конъюгированного с пероксидазой хрена. Планшет помещали в термощейкер и инкубировали в течение 30 мин при температуре 37 °С с интенсивностью перемешивания 300 об/мин. Затем полученные разведения сыворотки крови с конъюгатом S-белка вируса SARS-CoV-2 переносили в лунки планшета с иммобилизованным рецептором ACE2. Планшет помещали в термощейкер и инкубировали в течение 30 мин при температуре 37 °С с интенсивностью перемешивания 300 об/мин. После промывки в лунки планшета вносили раствор тетраметилбензидина, через 25 мин реакцию останавливали внесением раствора серной кислоты и проводили учет результатов на спектрофотометре при длине волны 450 нм.

Электрофорез и иммуноблоттинг. Электрофорез рекомбинантного RBD S-белка коронавируса SARS-CoV-2 и последующий иммуноблоттинг с использованием образцов сыворотки крови группы пациентов, переболевших COVID-19, и группы лиц, иммунизированных вакциной Гам-КОВИД-Вак, проводили в соответствии со стандартной методикой [9, 10].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием методик, описанных в руководствах И.П. Ашмарина, А.А. Воробьева [11] и В.С. Генеса [12]. Для характеристики полученных вариационных рядов были использованы: среднее геометрическое значение, среднее квадратическое отклонение, доверительный интервал, коэффициент корреляции. Достоверность различий коэффициента корреляции определяли по методике В.Ю. Урбаха [13].

Результаты и обсуждение

На первом этапе работы было проведено исследование специфичности антител к S-белку вируса SARS-CoV-2, содержащихся в исследованных образцах сывороток, методом иммуноблоттинга. Для этого был проведен

¹ WHO International Standard. First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin (human). NIBSC code: 20/136. <https://www.nibsc.org/documents/ifu/20-136.pdf>

электрофорез рекомбинантного RBD S-белка коронавируса SARS-CoV-2 и последующий иммуноблоттинг с использованием исследуемых образцов сыворотки. Проводили сравнительный анализ образцов сывороток крови группы пациентов, переболевших COVID-19, и группы лиц, иммунизированных вакциной Гам-КОВИД-Вак. Для исследований были использованы объединенные образцы сывороток крови исследуемых групп, в которых содержание IgG к S-белку вируса SARS-CoV-2 было одинаковым (титр в ИФА 1:12800). В результате исследования было установлено, что при одинаковом уровне IgG к S-белку вируса SARS-CoV-2 в группах сравнения более выраженное взаимодействие антител с рекомбинантным RBD S-белка вируса SARS-CoV-2 наблюдается в группе вакцинированных лиц (рис. 1).

Для изучения концентрации IgG к S-белку вируса SARS-CoV-2 в сыворотках крови участников исследования из групп лиц, иммунизированных вакциной Гам-КОВИД-Вак и переболевших COVID-19, были проведены исследования с помощью набора реагентов «SARS-CoV-2-IgG количественный-ИФА-БЕСТ». Исследовали образцы

сывороток крови, полученные от 93 пациентов, переболевших в первую волну пандемии, вызванную уханьским вариантом вируса SARS-CoV-2, на 18–30 сут от начала заболевания, которые имели подтвержденный диагноз и прошли стационарное лечение, а также от 93 добровольцев из числа медицинского персонала, иммунизированных вакциной Гам-КОВИД-Вак, через 21–40 сут после введения второго компонента вакцины. Результаты сравнения двух групп представлены на рисунке 2.

В группе лиц, иммунизированных вакциной Гам-КОВИД-Вак (рис. 2), уровень IgG к S-белку вируса SARS-CoV-2, выявляемый в ИФА, достоверно выше ($p < 0,05$), чем в группе переболевших инфекцией COVID-19, вызванной исходным вариантом B.1 вируса SARS-CoV-2. Учитывая, что образцы сыворотки крови в группе переболевших COVID-19 были получены от лиц, прошедших стационарное лечение и, следовательно, имевших выраженную клиническую картину, и так как в выборку исследования не были включены образцы сыворотки крови от пациентов с легким течением и с инapparантными формами

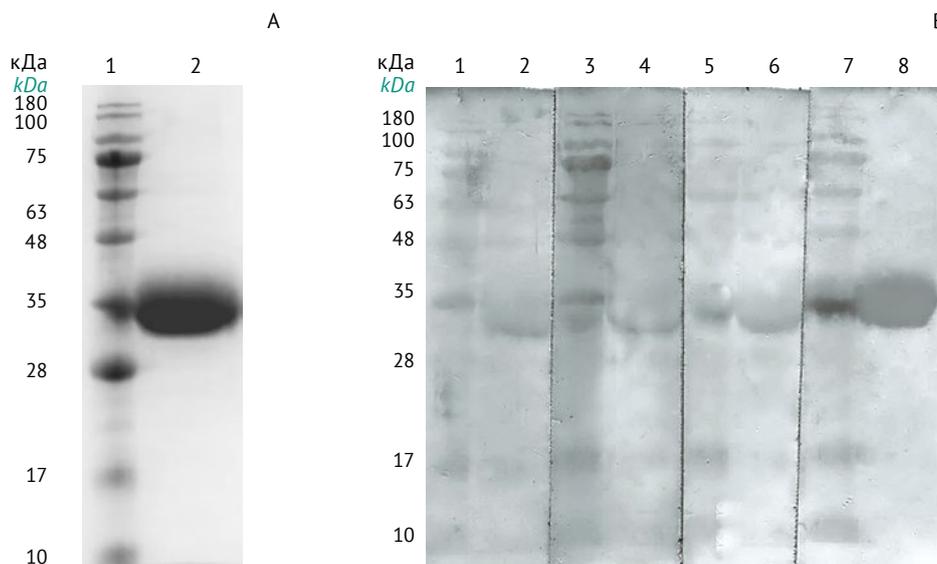


Рис. 1. Электрофореграмма рекомбинантного RBD S-белка коронавируса SARS-CoV-2 (A) и иммуноблоттинг с образцами сыворотки крови группы реконвалесцентов и группы лиц, иммунизированных вакциной Гам-КОВИД-Вак (B). Дорожки на электрофореграмме (A): 1 – стандарт молекулярной массы белков (Абсам, США, кат. № ab116027); 2 – рекомбинантный RBD S-белка коронавируса SARS-CoV-2. Данные иммуноблоттинга (B): дорожки 1, 3, 5, 7 – стандарт молекулярной массы белков (Абсам, США, кат. № ab116027); дорожка 2 – объединенный образец сывороток крови группы реконвалесцентов; дорожки 4 и 6 – моноклональные антитела к RBD S-белка SARS-CoV-2 (положительный контроль); дорожка 8 – объединенный образец сывороток крови группы лиц, иммунизированных вакциной Гам-КОВИД-Вак.

Fig. 1. Electropherogram of the recombinant SARS-CoV-2 RBD (A) and immunoblot with serum samples of the convalescent group and the Gam-COVID-Vac group (B). Electropherogram lanes (A): 1–protein molecular weight standard (Abcam, USA, Cat. No. ab116027); 2–recombinant SARS-CoV-2 RBD. Immunoblot lanes (B): 1, 3, 5, 7–protein molecular weight standard (Abcam, USA, Cat. No. ab116027); 2–pooled serum sample of the convalescent group; 4, 6–monoclonal antibodies to SARS-CoV-2 RBD (positive control); 8–pooled serum sample of the Gam-COVID-Vac group.

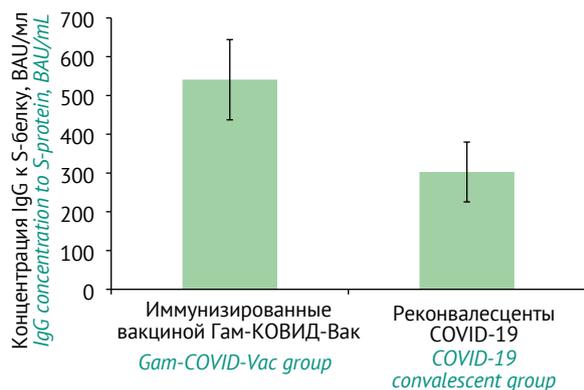


Рис. 2. Результаты сравнения уровня IgG к S-белку вируса SARS-CoV-2 в сыворотках крови группы иммунизированных и группы реконвалесцентов. Погрешность среднего геометрического значения уровня антител по оси ординат представлена доверительным интервалом I_{95} .

Fig. 2. Comparison results for serum levels of anti-SARS-CoV-2 spike IgG in vaccinated subjects and convalescents. Error bars along the Y axis show confidence intervals, I_{95} , for geometric means of antibody levels.

заболевания, можно ожидать, что при расширении выборки в группе переболевших различие между группами возрастет.

На втором этапе исследований было проведено сравнительное изучение в реакции нейтрализации и ИФА уровня специфических антител в образцах сыворотки крови от 477 добровольцев (потенциальных доноров иммунной плазмы), иммунизированных вакциной Гам-КОВИД-Вак, взятых на 21–28 сут после введения второго компонента вакцины. С этой целью использовали набор реагентов «SARS-CoV-2-RBD-ИФА-Гамалеи», в котором для сенсibilизации лунок планшета и связывания антител использовали рекомбинантный RBD S-белка вируса SARS-CoV-2. Полуколичественное определение уровня антител с помощью данного набора реагентов проводили путем титрования сывороток крови двукратным шагом начиная с разведения 1:200. Был продемонстрирован средний уровень корреляции ($r=0,67$) между титром ВНА, определяемым в реакции нейтрализации, и титром IgG к RBD S-белка вируса SARS-CoV-2, выявляемым в ИФА (рис. 3). Ранее в проведенных работах [14, 15] была получена различная степень корреляции результатов определения антител к вирусу SARS-CoV-2 с помощью иммунохимических методов с результатами определения ВНА в реакции нейтрализации. По результатам данного исследования было показано, что выявленное в реакции нейтрализации среднее геометрическое

значение титров ВНА составило 1:27. Значение титра ВНА, установленное в реакции нейтрализации, в 75% образцов сыворотки крови составило от 1:10 до 1:80. Максимальное значение титра ВНА (1:5120) было выявлено у одного вакцинированного, что было связано с наличием у данного лица иммунитета после перенесенной инфекции COVID-19 в течение 6 месяцев, предшествующих вакцинации, при этом среднее геометрическое значение титров составило 1:2840 (142 ВАУ/мл).

Важно отметить, что в группе, состоящей из 477 иммунизированных вакциной Гам-КОВИД-Вак, положительный результат в реакции нейтрализации, свидетельствующий о наличии ВНА, был выявлен у 90,1%, а в ИФА положительными были 95,4%. Оценка иммуногенной эффективности вакцины Гам-КОВИД-Вак в зависимости от возраста вакцинированных показала, что у иммунизированных вакциной Гам-КОВИД-Вак лиц старше 50 лет отмечается снижение уровня антител в реакции нейтрализации и в ИФА (табл. 1), что подтверждается ранее полученными данными клинических исследований [1, 16].

С целью выбора оптимального варианта проведения ИФА, позволяющего определять уровень антител с высоким значением коэффициента корреляции с результатами их оценки в реакции нейтрализации, нами были проведены сравнительные исследования концентрации ВНА и IgG к S-белку вируса SARS-CoV-2, выявляемых в ИФА с помощью наборов реагентов для их количественного определения. Для этого использовали набор реагентов «SARS-CoV-2-IgG количественный-ИФА-БЕСТ» на основе рекомбинантного полноразмерного S-белка вируса SARS-CoV-2, набор реагентов «SARS-CoV-2-RBD-ИФА-Гамалеи» на основе RBD S-белка вируса SARS-CoV-2 и экспериментальный набор реагентов для конкурентного ИФА с использованием рекомбинантного человеческого рецептора ACE-2 «SARS-CoV-2-ВНА-ИФА-РХБЗ».

Данные наборы предназначены для количественного определения уровня антител, в которых для построения калибровочной кривой использованы калибровочные пробы с известной концентрацией антител, выраженной в международных единицах относительно Международного стандарта ВОЗ². Образцы сыворотки крови от 97 лиц, иммунизированных вакциной Гам-КОВИД-Вак, группировали в соответствии с уровнем титра IgG к вирусу SARS-CoV-2, определенным ранее в ИФА. Более высокие средние геометрические значения титров антител были

² WHO International Standard. First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin (human). NIBSC code: 20/136. <https://www.nibsc.org/documents/ifu/20-136.pdf>

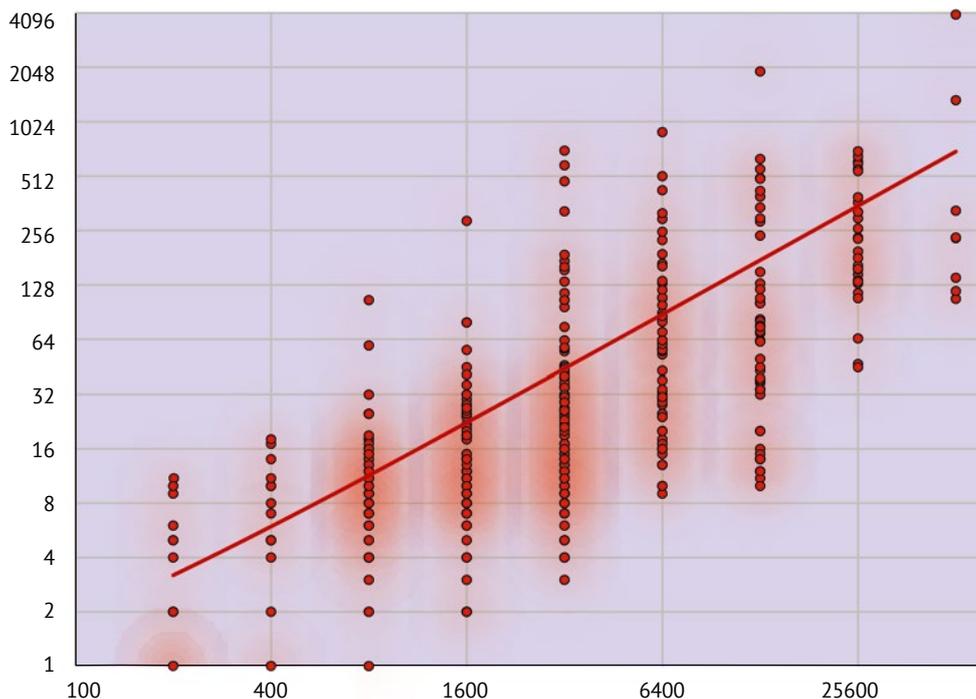


Рис. 3. Распределение уровней вируснейтрализующих антител (ВНА) в реакции нейтрализации в зависимости от уровней IgG к RBD S-белка вируса SARS-CoV-2, выявляемых в ИФА, в группе лиц, иммунизированных вакциной Гам-КОВИД-Вак. По оси абсцисс – обратная величина титра IgG в ИФА, по оси ординат – обратная величина титра ВНА в реакции нейтрализации.

Fig. 3. Distribution of neutralising antibody levels detected by virus neutralisation versus anti-SARS-CoV-2 RBD IgG levels detected by ELISA in the subjects immunised with Gam-COVID-Vac. The X axis shows reciprocal IgG titres determined by ELISA; the Y-axis shows reciprocal neutralising antibody titres determined by virus neutralisation.

Таблица 1. Оценка гуморального иммунитета в различных возрастных группах после иммунизации вакциной Гам-КОВИД-Вак
Table 1. Assessment of humoral immunity after vaccination with Gam-COVID-Vac in different age groups

Метод оценки <i>Assessment method</i>	Показатель оценки гуморального иммунитета в возрастной группе <i>Humoral immunity statistics for the age group of</i>			
	≤50 лет <i>≤50 years</i>		>50 лет <i>>50 years</i>	
	Среднее геометрическое значение титров антител <i>Geometric mean of the antibody titre</i>	Доверительный интервал $I_{95}(X_{min} - X_{max})$ <i>Confidence interval, $I_{95}(X_{min} - X_{max})$</i>	Среднее геометрическое значение титров антител <i>Geometric mean of the antibody titre</i>	Доверительный интервал $I_{95}(X_{min} - X_{max})$ <i>Confidence interval, $I_{95}(X_{min} - X_{max})$</i>
ИФА <i>ELISA</i>	1:3210	(1:2080–1:5470)	1:1820	(1:770–1:3920)
Реакция нейтрализации <i>Virus neutralisation</i>	1:38	(1:32–1:50)	1:23	(1:16–1:37)

получены при использовании набора реагентов «SARS-CoV-2-IgG количественный-ИФА-БЕСТ». В то же время наибольшая степень корреляции ($r=0,84$) между результатами определения уровня антител в ИФА и в реакции нейтрализации была установлена при использовании набора реагентов «SARS-CoV-2-ВНА-ИФА-РХБЗ» (табл. 2).

В дальнейшем оценку динамики уровня гуморального иммунитета после вакцинации исследовали с помощью набора реагентов на основе

конкурентного ИФА с использованием рекомбинантного человеческого рецептора ACE2 «SARS-CoV-2-ВНА-ИФА-РХБЗ». С этой целью провели сравнительное исследование образцов сывороток крови в группе иммунизированных вакциной Гам-КОВИД-Вак на наличие ВНА через 1, 2, 3 и 4 мес. после введения второго компонента вакцины. В результате проведенного исследования установлено, что снижение уровня ВНА отмечается уже на 2 мес. после введения второго компонента,

Таблица 2. Данные корреляционного анализа между результатами определения уровня антител, полученными при использовании ИФА с помощью различных наборов реагентов и реакции нейтрализации, $n=97$

Table 2. Correlation analysis results for antibody levels obtained by ELISA with different reagent kits and by virus neutralisation, $n=97$

Метод оценки (набор реагентов) <i>Test method (reagent kit)</i>	Единица измерения уровня антител <i>Unit of measurement for antibody levels</i>	Среднее геометрическое значение уровня антител <i>Geometric mean of antibody titres</i>	Коэффициент корреляции между уровнем антител, выявляемых с помощью ... <i>Correlation coefficient between antibody levels detected by</i>			
			Реакция нейтрализации <i>Virus neutralisation</i>	«SARS-CoV-2-RBD-ИФА-Гамалея» <i>Kit 1</i>	«SARS-CoV-2-IgG количественный-ИФА-БЕСТ» <i>Kit 2</i>	«SARS-CoV-2-ВНА-ИФА-РХБЗ» <i>Kit 3</i>
Реакция нейтрализации <i>Virus neutralisation</i>	Титр <i>Titre</i>	1:23	–	0,67 ^А	0,72 ^В	0,84 ^С
ИФА («SARS-CoV-2-RBD-ИФА-Гамалея») <i>Kit 1</i>	Титр <i>Titre</i>	1:2026	0,67 ^А	–	0,91	0,82
ИФА («SARS-CoV-2-IgG количественный-ИФА-БЕСТ») <i>Kit 2</i>	BAU/мл <i>BAU/mL</i>	460	0,72 ^В	0,91	–	0,88
ИФА («SARS-CoV-2-ВНА-ИФА-РХБЗ») <i>Kit 3</i>	IU/мл <i>IU/mL</i>	204	0,84 ^С	0,82	0,88	–

Примечание. Различия между значениями А и С и между значениями В и С статистически достоверны при уровне значимости $p<0,05$. IU – международные единицы; BAU – единицы связывания антител; «–» – неприменимо.

Note. The differences between A and C and between B and C are statistically significant ($p<0.05$). IU—international units; BAU—binding antibody units; – not applicable; Kit 1—SARS-CoV-2-RBD-ELISA-Gamaleya by the N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology; Kit 2—SARS-CoV-2-IgG quantitative-EIA-BEST by Vector-Best, AO; Kit 3—SARS-CoV-2-VNA-ELISA-NCBS by the 48 Central Scientific Research Institute (experimental kit).

а через три месяца отмечается достоверное снижение среднего геометрического значения уровня антител более чем в 2 раза (рис. 4).

С появлением различных вариантов SARS-CoV-2 встал вопрос об изучении напряженности гуморального иммунитета к ним у лиц, иммунизированных вакциной Гам-КОВИД-Вак. С этой целью была проведена оценка эффективности гуморального иммунитета в реакции нейтрализации с образцами сывороток крови в группе лиц, иммунизированных вакциной Гам-КОВИД-Вак, со значениями титра антител в ИФА после вакцинации от 1:800 до 1:25600 к наиболее актуальным на момент исследования вариантам SARS-CoV-2 (табл. 3).

Сравнительный анализ результатов оценки напряженности гуморального иммунитета методом ИФА и в реакции нейтрализации в отношении всех пяти значимых вариантов SARS-CoV-2 свидетельствует о том, что показатели ВНА иммунных сывороток крови, включая индийский вариант «дельта», подтверждают эпидемиологическую эффективность вакцины Гам-КОВИД-Вак. При этом отмечается, что для нейтрализации данного варианта вируса необходим в три раза более высокий уровень ВНА по сравнению с исходным (уханьским) вариантом, что под-

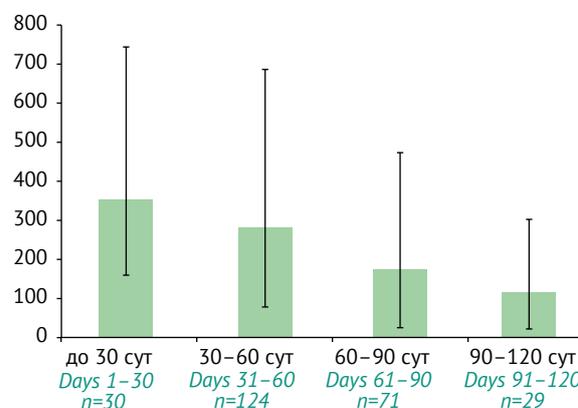


Рис. 4. Динамика изменения уровня антител к вирусу SARS-CoV-2 в группе иммунизированных вакциной Гам-КОВИД-Вак. По оси абсцисс – сутки после введения второго компонента вакцины. По оси ординат – уровень антител, Международные единицы (IU/мл) вируснейтрализующих антител относительно стандарта WHO 20/136. Погрешность среднего геометрического значения уровня антител по оси ординат представлена доверительным интервалом I_{95} .

Fig. 4. Time course of anti-SARS-CoV-2 antibody levels after immunisation with Gam-COVID-Vac. The X axis represents days after administration of the second vaccine component; the Y axis indicates virus neutralising antibody levels expressed in international units (IU/mL) using WHO standard 20/136. Error bars along the Y axis show confidence intervals, I_{95} for geometric means of antibody levels.

Таблица 3. Результаты оценки значений титра вируснейтрализующих антител (ВНА) в образцах сыворотки крови в группе лиц, иммунизированных вакциной Гам-КОВИД-Вак, в отношении пяти вариантов вируса SARS-CoV-2, $n=30$ **Table 3.** Evaluation results for serum neutralising antibody (NA) titres in the Gam-COVID-Vac group with reference to five SARS-CoV-2 variants, $n=30$

Вариант вируса SARS-CoV-2 <i>SARS-CoV-2 variant</i>	Количество уникальных мутаций в S-белке (общее количество) ^a <i>Unique spike protein mutations (total number)</i>	Обратная величина среднего геометрического значения титров ВНА <i>Reciprocal geometric mean of NA titres</i>	Кратность снижения вируснейтрализующей активности сыворотки ^a , $X_{cp} \pm \sigma$ <i>Serum neutralising activity reduction^a factor, $X_{mean} \pm \sigma$</i>
Исходный вариант В.1 (вариант В) <i>Original variant B.1 (variant B)</i>	–	125,5	–
Вариант «альфа» В.1.1.7 (британский) <i>Alpha, B.1.1.7 (UK)</i>	4 (11)	88,8	1,4±0,8
Вариант «бета» В.1.351 (южно-африканский) <i>Beta, B.1.351 (South Africa)</i>	6 (10)	28,2	4,5±4,2
Вариант «гамма» Р.1 (бразильский) <i>Gamma, P.1 (Brazil)</i>	8 (12)	41,4	3,0±2,9
Вариант «дельта» В.1.617 (индийский) <i>Delta, B.1.617 (India)</i>	7 (10)	45,9	2,7±2,3

Примечание. «–» – неприменимо.^a Относительно исходного варианта В.1 (вариант В) вируса SARS-CoV-2.*Note.* – not applicable.^a Compared to original SARS-CoV-2 variant B.1 (variant B).

тверждается подъемом заболеваемости в период распространения в популяции индийского варианта, в том числе и среди лиц, вакцинированных более шести месяцев назад.

Анализ иммунного ответа у ряда ранее вакцинированных лиц, поступивших в стационар с манифестной формой COVID-19, вызванной индийским вариантом вируса SARS-CoV-2, показал, что даже в случае критического снижения уровня специфических антител после иммунизации вакциной Гам-КОВИД-Вак, которое может отмечаться на 6 месяц после введения второго компонента, происходит быстрый и значительно более высокий прирост уровня антител. Титр IgG к S-белку SARS-CoV-2, выявляемый в ИФА, в ряде таких случаев достигал значений 1:102400, что превышало максимальный уровень 1:51200, отмечаемый ранее у некоторых вакцинированных после перенесенного COVID-19. Полученные результаты позволяют предположить длительное сохранение у лиц, иммунизированных вакциной Гам-КОВИД-Вак, популяции В-клеток памяти, ответственных за выработку антител при повторном инфицировании.

Выводы

1. Оценка иммуногенной эффективности вакцины Гам-КОВИД-Вак показала, что среди привитых положительный результат в реакции нейтрализации был выявлен у 90,1%, среднее геометрическое значение титров вируснейтрализующих антител в реакции нейтрализации на 21–28-е сутки после введения второго компонента вакцины Гам-КОВИД-Вак составило 1:27. С помощью ИФА IgG к RBD S-белка

вируса SARS-CoV-2 выявлены у 95,4% вакцинированных лиц со средним геометрическим значением титров 1:2840. У иммунизированных лиц в возрасте старше 50 лет отмечается снижение уровня специфических антител, выявляемых в реакции нейтрализации и в ИФА.

2. Концентрация IgG к S-белку вируса SARS-CoV-2, определяемая в ИФА у группы лиц, иммунизированных вакциной Гам-КОВИД-Вак, достоверно выше, чем в группе пациентов, переболевших новой коронавирусной инфекцией COVID-19, вызванной исходным вариантом В.1 вируса SARS-CoV-2, с уровнем значимости $p < 0,05$.
3. Коэффициент корреляции между значениями титров антител в реакции нейтрализации и уровнем IgG к S-белку вируса SARS-CoV-2, выявляемых в ИФА с помощью различных наборов реагентов, составил от 0,67 до 0,84. Наибольший уровень корреляции выявлен при использовании экспериментального набора реагентов для количественного выявления вируснейтрализующих антител методом конкурентного ИФА с использованием рекомбинантного человеческого рецептора ACE2.
4. Изучение динамики уровня вируснейтрализующих антител показало, что через три месяца после введения второго компонента вакцины Гам-КОВИД-Вак отмечается снижение среднего геометрического значения титров антител в два раза, что свидетельствует о необходимости проведения ревакцинации через 6 месяцев после введения второго компонента вакцины.

Литература/References

1. Logunov DY, Dolzhikova IV, Shcheblyakov DV, Tukhvatulin AI, Zubkova OV, Dzharullaeva AS, et al. Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. *Lancet*. 2021;397(10275):671–81. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00234-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00234-8)
2. Logunov DY, Dolzhikova IV, Zubkova OV, Tukhvatullin AI, Shcheblyakov DV, Dzharullaeva AS, et al. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia. *Lancet*. 2020;396(10255):887–97. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31866-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31866-3)
3. Львов ДК, ред. *Руководство по вирусологии: Вирусы и вирусные инфекции человека и животных*. М.: Медицинское информационное агентство; 2013. [Lvov DK, ed. *Guide to Virology: Viruses and Viral Infections of Humans and Animals*. Moscow: Medicinskoe Informatsionnoe Agentstvo; 2013 (In Russ.)]
4. Bundschuh C, Egger M, Wiesinger K, Gabriel C, Clodi M, Mueller T, Dieplinger B. Evaluation of the EDI enzyme linked immunosorbent assays for the detection of SARS-CoV-2 IgM and IgG antibodies in human plasma. *Clin Chim Acta*. 2020;509:79–82. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.05.047>
5. Xiang F, Wang X, He X, Peng Z, Yang B, Zhang J, et al. Antibody detection and dynamic characteristics in patients with Coronavirus Disease 2019. *Clin Infect Dis*. 2020;71(8):1930–4. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa461>
6. Гинсбург НН, Касымов КТ, Альтштейн АД. Сравнительное изучение различных методов титрования вируснейтрализующих антител к вирусу полиомиелита в культуре ткани. *Вопросы вирусологии*. 1960;(1):20–5. [Ginsburg NN, Kasymov KT, Altshtein AD. Comparative study of various methods of titration of virus-neutralising antibodies to poliomyelitis virus in tissue culture. *Voprosy Virologii = Problems of Virology*. 1960;5:20–5 (In Russ.)]
7. Пшеничников ВА, Семенов БФ, Зезеров ЕГ, ред. *Стандартизация методов вирусологических исследований*. М.: Медицина; 1974. [Pshenichnov VA, Semenov BF, Zezerov EG, eds. *Standardization of Virological Research Methods*. Moscow: Meditsina; 1974 (In Russ.)]
8. Case JB, Rothlauf PW, Chen RE, Liu Z, Zhao H, Kim AS, et al. Neutralizing antibody and soluble ACE2 inhibition of a replication-competent VSV-SARS-CoV-2 and a clinical isolate of SARS-CoV-2. *Cell Host Microbe*. 2020;28(3):475–85. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.06.021>
9. Kim B. Western blot techniques. *Methods Mol Biol*. 2017;1606:133–9. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6990-6_9
10. Towbin H, Gordon J. Immunoblotting and dot immunobinding – current status and outlook. *J Immunol Methods*. 1984;72(2):313–40. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(84\)90001-2](https://doi.org/10.1016/0022-1759(84)90001-2)
11. Ашмарин ИП, Воробьев АА. *Статистические методы в микробиологических исследованиях*. Л.: Гос. изд. мед. лит.; 1962. [Ashmarin IP, Vorobyov AA. *Statistical Methods in Microbiological Research*. Leningrad: Gosudarstvennoe Izdanie Meditsinskoy Literatury; 1962 (In Russ.)]
12. Генес ВС. *Некоторые простые методы кибернетической обработки данных диагностических и физиологических исследований*. М.; 1967. [Genes VS. *Some Simple Methods for Cybernetic Processing of Data from Diagnostic and Physiological Studies*. Moscow; 1967 (In Russ.)]
13. Урбах ВЮ. *Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях*. М.: Медицина; 1975. [Urbakh VYu. *Statistical Analysis in Biological and Medical Research*. Moscow: Meditsina; 1975 (In Russ.)]
14. Nam M, Seo JD, Moon HW, Kim H, Hur M, Yun YM. Evaluation of humoral immune response after SARS-CoV-2 vaccination using two binding antibody assays and a neutralizing antibody assay. *Microbiol Spectr*. 2021;9(3):e0120221. <https://doi.org/10.1128/Spectrum.01202-21>
15. Mahmoud SA, Ganesan S, Naik S, Bissar S, Zamel IA, Warren KN, et al. Serological assays for assessing postvaccination SARS-CoV-2 antibody response. *Microbiol Spectr*. 2021;9(2):e0073321. <https://doi.org/10.1128/Spectrum.00733-21>
16. Hoshida S, Koeda N, Hattori H, Tanaka M, Tanaka I, Fukui H, et al. Age- and sex-based changes in spike protein antibody status after SARS-CoV-2 vaccination and effect of past-infection in healthcare workers in Osaka. *BMC Infect Dis*. 2022;22(1):709. <https://doi.org/10.1186/s12879-022-07695-7>

Вклад авторов. И.А. Кириллов – обоснование актуальности исследования и организация исследований; А.П. Пирожков – дизайн исследования, сбор, анализ и интерпретация результатов работы, написание текста рукописи статьи; В.В. Рубцов – проведение реакции нейтрализации и анализ результатов; С.Я. Логинова – проведение реакции нейтрализации с вариантами вируса SARS-CoV-2 и анализ результатов; Н.А. Сайфулина – проведение иммуноферментного анализа; Т.М. Плеханова – проведение иммуноблоттинга; М.А. Тимофеев – оценка достоверности результатов

Authors' contributions. I.A. Kirillov—substantiation of the study concept, initiation and coordination of the study; A.P. Pirozhkov—elaboration of the study design, collection, analysis and interpretation of the study results, writing of the text of the manuscript; V.V. Rubtsov—performance of virus neutralisation tests and analysis of their results; S.Ya. Loginova—performance of virus neutralisation tests with SARS-CoV-2 variants and analysis of the results; N.A. Saifulina—performance of enzyme immunoassays; T.M. Plekhanova—performance of immunoblotting; M.A. Timofeev—evaluation of the

исследования; **Д.А. Кутаев** – анализ и интерпретация результатов исследования; **Д.Ю. Логунов** – существенный вклад в концепцию работы; **А.Л. Гинцбург** – критический пересмотр содержания текста рукописи; **С.В. Борисевич** – дизайн исследования, утверждение окончательного варианта статьи для публикации.

Соответствие принципам этики. Исследование было одобрено на заседании биоэтической комиссии ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России, протокол заседания № 6(924) от 04.05.2022.

Согласие пациентов. Получено информированное добровольное согласие пациентов на обработку персональных данных и их использование с научной и образовательной целью, в том числе на публикацию персональной медицинской информации в обезличенной форме.

Благодарности. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. С.В. Борисевич и А.Л. Гинцбург являются членами редколлегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение».

reliability of the study results; **D.A. Kutaev**—analysis and interpretation of the study results; **D.Y. Logunov**—substantial contribution to the study concept, **A.L. Gintsburg**—critical revision of the text of the manuscript; **S.V. Borisevich**—elaboration of the study design, approval of the final version of the manuscript for publication.

Ethics approval. The study was approved by the Bioethics Committee at the 48th Central Scientific Research Institute of the Russian Ministry of Defense under meeting minutes No. 6(924) of 04.05.2022.

Informed consent. The patients gave informed consent for the processing of their protected personal and health information, as well as for its use and anonymised publication for scientific and educational purposes.

Acknowledgements. The study was performed without external funding.

Conflict of interest. S.V. Borisevich and A.L. Gintsburg are members of the Editorial Board of the *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

Об авторах / Authors

Кириллов Игорь Анатольевич, канд. воен. наук.

Пирожков Алексей Петрович, канд. мед. наук. SPIN-code РИНЦ: 7202-3827.

48cnii@mil.ru

Рубцов Владимир Васильевич, канд. биол. наук.

48cnii@mil.ru

Логина Светлана Яковлевна, д-р биол. наук. SPIN-code РИНЦ: 8764-7946.

48cnii@mil.ru

Сайфулина Наталья Александровна.

48cnii@mil.ru

Плекханова Тамара Михайловна, канд. биол. наук.

48cnii@mil.ru

Тимофеев Михаил Анатольевич.

Кутаев Дмитрий Анатольевич, канд. биол. наук.

48cnii@mil.ru

Логунов Денис Юрьевич, д-р биол. наук, член-корр. РАН. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4035-6581>
info@gamaleya.org

Гинцбург Александр Леонидович, д-р биол. наук, проф., академик РАН. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1769-5059>

info@gamaleya.org

Борисевич Сергей Владимирович, д-р биол. наук, проф., академик РАН. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6742-3919>

48cnii@mil.ru

Igor A. Kirillov, Cand. Sci. (Military).

Aleksey P. Pirozhkov, Cand. Sci. (Med.). SPIN-code: 7202-3827.

48cnii@mil.ru

Vladimir V. Rubtsov, Cand. Sci. (Biol.).

48cnii@mil.ru

Svetlana Ya. Loginova, Dr. Sci. (Biol.).

SPIN-code: 8764-7946.

48cnii@mil.ru

Natalya A. Saifulina.

48cnii@mil.ru

Tamara M. Plekhanova, Cand. Sci. (Biol.).

48cnii@mil.ru

Mikhail A. Timofeev.

Dmitry A. Kutaev, Cand. Sci. (Biol.).

48cnii@mil.ru

Denis Y. Logunov, Dr. Sci. (Biol.), Corr. Member of RAS. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4035-6581>
info@gamaleya.org

Aleksandr L. Gintsburg, Dr. Sci. (Biol.), Professor, Academician of RAS. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1769-5059>

info@gamaleya.org

Sergey V. Borisevich, Dr. Sci. (Biol.), Professor, Academician of RAS. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6742-3919>

48cnii@mil.ru

Поступила 23.06.2022

После доработки 31.10.2022

Принята к публикации 07.12.2022

Received 23 June 2022

Revised 31 October 2022

Accepted 7 December 2022