

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2021-20-4-10-17>

# Оценка клеточного звена иммунитета при новой коронавирусной инфекции COVID-19

А. В. Лобов<sup>1</sup>, П. И. Иванова<sup>1</sup>, Е. А. Погодина<sup>1</sup>, В. И. Казей<sup>1</sup>, Е. Д. Максимова<sup>1</sup>, И. Ж. Шубина<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ООО «Экзакт Лабс»; Россия, 117246 Москва, Научный пр-д, 20, стр. 2;

<sup>2</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

**Контакты:** Антон Викторович Лобов [anton.lobov@exactelabs.com](mailto:anton.lobov@exactelabs.com)

В декабре 2019 г. человечество столкнулось с новой коронавирусной инфекцией, возбудитель которой был идентифицирован как SARS-CoV-2, а болезнь получила название COVID-19 (ковид). Для выявления инфицированных пациентов используют получившие широкое распространение тесты на основе полимеразной цепной реакции, способные обнаружить РНК SARS-CoV-2 в мазках из носа и ротоглотки. Однако не менее важным, а во многих случаях и единственным способом диагностики является оценка реакции на возбудитель различных звеньев иммунитета, таких как гуморальное и клеточное.

Цель предлагаемого обзора литературы – обобщить и проанализировать имеющиеся данные о формировании иммунного ответа и разрабатываемые подходы к комплексной характеристике иммунного ответа пациентов с подтвержденным контактом с возбудителем COVID-19 или в результате вакцинации.

В настоящее время эффективность антиковидной вакцинации и наличие иммунитета после перенесенного заболевания оценивают, определяя специфические антитела. Наблюдения показывают, что титры анти-S и анти-RDB IgG значительно снижаются через 6–8 мес после постановки диагноза. Важным моментом является то, что даже при падении уровней антител в крови переболевших пациентов обнаруживаются клетки памяти.

Обнаружить отдельные Т-, В-лимфоциты, отвечающие выбросом различных маркеров активации (цитокины, антитела) на представленные антигены, позволяет метод ELISPOT (Enzyme-linked immunospot), являющийся разновидностью ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay).

Для более полного понимания формирования и эффективности иммунной памяти к SARS-CoV-2 требуется оценка содержания и функциональной активности различных ее компонентов, включая В-лимфоциты, CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>-Т-лимфоциты, поскольку они имеют относительно независимые друг от друга механизмы действия клеточной памяти. В связи с этим актуальна оценка иммунитета к SARS-CoV-2, когда уровень антител становится недостаточным для их определения зарегистрированными тестами, и внедрение в клинико-диагностическую практику тест-систем, позволяющих выявить маркеры долговременной клеточной памяти.

**Ключевые слова:** коронавирусная инфекция, иммунный ответ на SARS-CoV-2, В- и Т-клеточная память, лабораторная диагностика, ELISPOT

**Для цитирования:** Лобов А. В., Иванова П. И., Погодина Е. А. и др. Оценка клеточного звена иммунитета при новой коронавирусной инфекции COVID-19. Российский биотерапевтический журнал 2021;20(4):10–7. DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-4-10-17.

## Assessment of the cellular immunity response to the new coronavirus infection COVID-19

Anton V. Lobov<sup>1</sup>, Polina I. Ivanova<sup>1</sup>, Ekaterina A. Pogodina<sup>1</sup>, Vasily I. Kazey<sup>1</sup>, Ekaterina D. Maksimova<sup>1</sup>, Irina Zh. Shubina<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Exacte Labs, LLC; Bld. 2, 20 Nauchny Proezd, Moscow 117246, Russia;

<sup>2</sup>N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

**Contacts:** Anton Viktorovich Lobov [anton.lobov@exactelabs.com](mailto:anton.lobov@exactelabs.com)

In December 2019 humanity faced a new coronavirus infection caused by SARS-CoV-2 virus and the disease referred to as COVID-19 has spread globally.

Specially adapted for the detection of SARS-CoV-2 RNA tests based on polymerase chain reaction are used to identify infected patients by processing nasal and oropharyngeal swabs. However, often it may not be sufficient to use

polymerase chain reaction only, but in many cases it is very important to assess the humoral and cellular immune reactions to the infection.

The present review aims to summarize and analyze the available literature data on the formation of the immune response and diagnostic methods used for characteristics of the immune reactions in patients who recovered from COVID-19 or received an anti-COVID-19 vaccine.

Currently, the effectiveness of anti-COVID-19 vaccination and the developing immunity after a previous illness are assessed by detecting specific antibodies. A number of observations show that anti-S and anti-RDB IgG titers significantly decline within 6–8 months after diagnosis. It is important to note that although the antibody levels in the blood of recovered patients decrease, the memory cells can be determined by the appropriate tests.

The ELISPOT (Enzyme-linked immunospot) method, which is a variation of the ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), allows estimation the T- and B-cells that release activation factors such as cytokines and antibodies in response to the presented antigens.

The assessment of the generation and effective function of the immune memory to SARS-CoV-2 requires the evaluation of the content and functional activity of its various components, including B-lymphocytes, CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes, since they have rather independent mechanisms of action of cellular memory.

Therefore, it is crucially important to have tools for evaluating the immunity to SARS-CoV-2 when the level of antibodies is insufficient for determination by the available registered tests, and the introduction of test systems into clinical diagnostic practice, allowing to identify markers of long-term cellular memory, are relevant.

**Key words:** coronavirus infection, immune response to SARS-CoV-2, B- and T-cell memory, laboratory diagnostics, ELISPOT

**For citation:** Lobov A.V., Ivanova P.I., Pogodina E.A. et al. Assessment of the cellular immunity response to the new coronavirus infection COVID-19. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2021;20(4): 10–7. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-4-10-17.

## Введение

В декабре 2019 г. человечество столкнулось с новой коронавирусной инфекцией, возбудитель которой был идентифицирован как SARS-CoV-2, а болезнь получила название COVID-19 (ковид). Проявления COVID-19 могут варьировать от легких и умеренных гриппоподобных симптомов до смертельного поражения легких с развитием тяжелого острого респираторного синдрома (Severe acute respiratory syndrome, SARS) [1].

SARS-CoV-2 является оболочечным РНК-содержащим вирусом. РНК вируса кодирует структурные белки: спайк-белок (S), белки оболочки (E), мембранные белки (M) и белки нуклеокапсида (N). Остальная часть генома кодирует неструктурные белки (NSP), такие как РНК-зависимая РНК-полимераза, протеаза, геликаза и другие вспомогательные белки [2].

Структура, ответственная за проникновение вируса в клетку, – поверхностный спайковый тримерный гликопротеин (S-белок). S-белок состоит из 2 субъединиц – S1 и S2, в свою очередь, S1 состоит из N-концевого (NTD) и C-концевого (CTD1, CTD2 и CTD3) доменов [3]. При этом на CTD1 расположен рецепторсвязывающий домен (receptor-binding domain, RBD), обеспечивающий проникновение вируса в клетку путем взаимодействия с рецептором ангиотензинпревращающего фермента 2-го типа (angiotensin-converting enzyme 2, ACE2) на поверхности клеток хозяина с последующим его праймированием клеточной

трансмембранной сериновой протеазой 2 (TMPRSS2) [4]. Субъединица S2 имеет ключевую роль в слиянии мембран вируса и клетки.

Установлено, что антитела к S-белку, а именно к RBD, потенциально способны нейтрализовать вирус, поскольку рецепторсвязывающий участок открыт для взаимодействия с анти-RBD-антителами, в отличие от других структур вируса, таких как нуклеопротеин (NP), который скрыт вирусной или клеточной мембранами от комплементарных антител [5].

ACE2 – нетканеспецифичный рецептор, широко представленный на поверхности клеток многих органов и тканей. Существует 2 формы белка ACE2 – клеточная (трансмембранная) и циркулирующая (растворимая); показано, что последняя способна блокировать взаимодействие S-белка SARS-CoV с его рецептором [6]. Наибольшую роль в патогенезе SARS-CoV-2 играет клеточная форма ACE2, доступная для взаимодействия с вирусом и представленная, в частности, на поверхности эпителия верхних дыхательных путей, альвеолярных клеток 2-го типа и на энтероцитах тонкого кишечника [7].

Для выявления инфицированных пациентов используют получившие широкое распространение тесты на основе полимеразной цепной реакции, способные обнаружить РНК SARS-CoV-2 в мазках из носа и ротоглотки. Однако не менее важным, а во многих случаях и единственным способом диагностики является оценка реакции на возбудитель различных звеньев иммунитета, таких как гуморальное и клеточное.

Признано, что одним из эффективных способов предотвращения распространения инфекционных заболеваний является вакцинация. Острая необходимость в вакцине против COVID-19 послужила причиной смещения фокуса в разработках научно-исследовательских институтов, фармацевтических и биотехнологических компаний по всему миру и привела к созданию вакцин с использованием различных подходов и платформ в кратчайшие сроки, что требует дальнейшего изучения их эффективности и безопасности. Наиболее полно охарактеризовать эффективность вакцинопрофилактики возможно, только применив комплексный подход, способный показать степень вовлеченности всех звеньев приобретенного специфического иммунитета.

**Цель** настоящего обзора литературы – обобщить и проанализировать имеющиеся на данный момент данные о формировании иммунного ответа и разрабатываемые подходы к комплексной характеристике иммунного ответа пациентов с подтвержденным контактом с возбудителем COVID-19 или в результате вакцинации.

В качестве источников литературы использовали статьи, размещенные в базе данных PubMed Национального центра биотехнологической информации (NCBI) США, кроме того, использовался накопленный опыт при проведении описанных ниже клеточных и серологических исследований для диагностики инфекционных заболеваний.

### Оценка иммунного ответа на основе определения специфических антител

В настоящее время эффективность антиковидной вакцинации и наличие иммунитета после перенесенного заболевания оценивают, определяя специфические антитела [8], особое внимание уделяя анти-RBD SARS-CoV-2 IgG, при этом крайне редко проводят определение клеточного иммунитета (лишь в рамках научного исследования [9–11]; ни одного зарегистрированного теста на момент написания настоящего обзора (сентябрь 2021 г.) в Российской Федерации не представлено), который позволяет выявить специфически сенсibilизированные Т-лимфоциты.

Наблюдения показывают, что титры анти-S и анти-RDB IgG остаются относительно стабильными на протяжении периода до 6 мес после постановки диагноза, с последующим значительным снижением через 6–8 мес, что было продемонстрировано в исследовании, в то время как снижение уровней анти-S и анти-RDB IgM и IgA отмечалось уже между 1-м и 3-м месяцами после начала заболевания [12, 13].

N. Sherina и соавт. провели анализ динамики уровней антител методом иммуоферментного анализа (ИФА) у 88 пациентов, образцы крови которых были собраны в разные временные точки (через

7–240 дней после появления симптомов). Было показано, что после 28-го дня наблюдалось значительное снижение уровней анти-S и анти-RBD IgM и IgA, а значительное снижение анти-S и анти-RBD IgG наблюдалось только к 181–240-му дням (6–8 мес). В исследовании при оценке динамики антител показана относительная стабильность анти-S и анти-RBD IgG при сравнении титров антител в парных образцах от 27 человек. Сравнивались титры антител в пробах, взятых в среднем на 21-й день после появления симптомов и на 126-й день [12]. Авторы другого исследования показали в реакции истинной нейтрализующей способности достоверную корреляцию между титрами нейтрализации и связывания в ИФА, при этом отметили стабильные титры антител в течение не менее 3 мес и лишь незначительное снижение в 5-месячный период времени в 121 образце с известными титрами антител при диагностике ИФА-методом [13].

Важным наблюдением является то, что даже при падении уровней самих антител в крови переболевших пациентов обнаруживаются В-клетки памяти, которые способны продуцировать иммуноглобулины при стимуляции антигеном, что было показано N. Sherina и соавт. на 24 пациентах методом ELISPOT (Enzyme-linked immunospot), более подробно о котором будет сказано ниже. Примечательно, что RBD-специфические IgG-продуцирующие В-клетки были обнаружены у 33 % пациентов через 2–4 нед, у 93 % – через 3–6 мес и у 100 % – через 6–8 мес после появления симптомов. Можно предположить, что падение уровня антител не указывает на ослабление иммунитета против SARS-CoV-2. Соответственно, использование только антител в качестве маркера наличия иммунитета после выздоровления или вакцинации является недостаточным [12].

В другом исследовании В-клетки памяти, специфичные к S-белку, RBD и N-белку, определяли с помощью флуоресцентного окрашивания на IgD<sup>+</sup> и/или CD27<sup>+</sup> с дальнейшим подразделением поверхностных маркеров IgM, IgG или IgA. Тем самым было показано, что количество антигенспецифичных клеток нарастало до 120-го дня после начала заболевания с последующим выходом на плато. Важно то, что количество данных В-клеток памяти практически не обнаруживалось у людей, не перенесших заболевание COVID-19 [14].

### Методы определения клеточного иммунитета

Обнаружить отдельные Т-, В-лимфоциты, отвечающие выбросом различных маркеров активации (цитокины, антитела) на представленные антигены, позволяет метод ELISPOT, являющийся разновидностью метода ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay).

В основе данного метода лежит обнаружение в суспензии мононуклеарных клеток периферической крови (МНПК) специфически активированных клеток путем захвата мембраной микропланшета с иммобилизованным сорбентом (моноклональные антитела или антиген) индуцируемых ими продуктов. Для обнаружения Т-лимфоцитов в указанном методе используют различные цитокины, характерные для активированных Т-лимфоцитов, таких как интерлейкин 2, интерферон (ИФН)  $\gamma$ , фактор некроза опухоли  $\alpha$ , гранзим В и др. [15]. Для обнаружения В-клеток или плазматических клеток после стимуляции специфическим антигеном используют в качестве маркера антиген-специфические антитела [16]. После инкубации и последовательных реакций иммунодетекции на мембране образуются тени (споты) отдельных клеток, пригодных для подсчета при помощи средств фотовизуализации (рис. 1). Тест-системы на данной платформе разрабатываются и производятся многими компаниями: T-SPOT.COVID (Oxford Immunotec, Великобритания), SARS-COV-2 ELISPOT (AID GmbH, Германия), ELISpot Path (Mabtech, Швеция), Corona T-test (ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, Россия), ТиграТест SARS-CoV-2 (АО «ГЕНЕРИУМ», Россия).

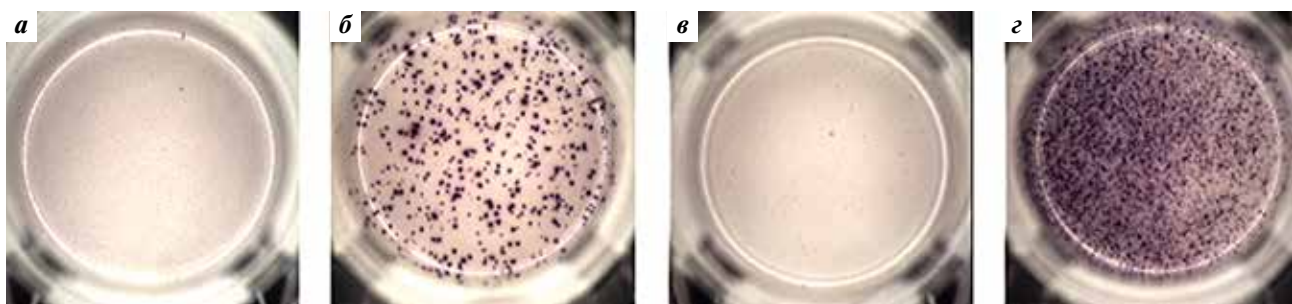
На рис. 1 представлены фотографии, полученные в результате собственного исследования. Фотографии лунок культурального микропланшета получены после проведенного исследования методом ELISPOT ТиграТест SARS-CoV-2 (АО «ГЕНЕРИУМ», Россия). МНПК были выделены на градиенте фиколла с плотностью 1,077 г/мл от субъекта спустя 3 нед после 2-го компонента вакцины Гам-КОВИД-Вак (Спутник V). Суспензия клеток была внесена в лунки культурального микропланшета. Затем клетки стимулировали пулом пептидов SARS-CoV-2 в течение 16 ч в усло-

виях 37°C и 5 % CO<sub>2</sub>. После чего продукцию ИФН- $\gamma$  оценивали с помощью ELISPOT. Фото лунок было сделано с помощью Elispot Reader System (AID, Германия).

Представленные 4 фотографии иллюстрируют результат исследования Т-клеточного иммунитета для 1 субъекта. Обнаружен выраженный индуцированный выброс ИФН- $\gamma$  в ответ на представленные пептиды S-белка, что свидетельствует об их вакциноиндуцированной сенсibilизированности. Ответ на структурные белки (N, M, ORF3a, ORF7a) не выявлен. Спонтанная продукция ИФН- $\gamma$  Т-лимфоцитами не превышает допустимого уровня. Способность индуцированной выработки ИФН- $\gamma$  соответствует установленному критерию.

Описанный метод в модификации с использованием соответствующего протокола и культурального микропланшета способен выявить, помимо Т-клеточного иммунного ответа, специфические В-лимфоциты – плазматические клетки или клетки, секретирующие антитела (antibody secreting cells, ASC), в основе обнаружения которых лежит регистрация секретируемых ими антител.

Определение антигенспецифических антител не позволяет в полной мере охарактеризовать гуморальное звено иммунного ответа, поскольку не отражает наличие и активность В-клеток памяти, которые могут приобретать фенотип клеток памяти CD19<sup>+</sup>/CD27<sup>+</sup> и становиться ASC. Это было показано при исследовании В-клеток памяти (методом ELISPOT), специфических к антигенам коклюша, столбняка, кори и гриппа. Авторы исследования В-клеток памяти [17] производили поликлональную стимуляцию человеческих МНПК, что приводило к пролиферации и дифференцировке В-клеток памяти с фенотипом CD19<sup>+</sup>/CD27<sup>+</sup> в секретирующие



**Рис. 1.** Визуализация Т-клеточного ответа с помощью ELISPOT: а – после инкубации без добавления специфического антигенного индуктора с целью оценки спонтанной продукции интерферона  $\gamma$ ; б – после инкубации с добавлением специфического антигенного индуктора: пул пептидов S-белка; в – после инкубации с добавлением специфического антигенного индуктора: пул пептидов структурных белков (N, M, ORF3a, ORF7a); з – после инкубации с добавлением моноклонального антитела ОКТ-3, для неспецифической индукции интерферона  $\gamma$  в целях оценки функциональной активности Т-лимфоцитов.  $\times 20$

**Fig. 1.** Visualization of the T-cell response with ELISPOT: a – after incubation without any specific antigen inducer in order to evaluate the spontaneous production of interferon  $\gamma$ ; б – after incubation with the addition of a specific antigenic inducer, a pool of S-protein peptides; в – after incubation with the addition of a specific antigenic inducer, a pool of structural protein peptides (N, M, ORF3a, ORF7a); з – after incubation with the addition of monoclonal antibody OKT-3, for non-specific induction of interferon  $\gamma$  in order to assess the functional activity of T-lymphocytes.  $\times 20$

антитела клетки. Тем самым авторам удалось обнаружить антигенспецифические В-клетки памяти против компонентов бактериальных вакцин (*Bordetella pertussis* и столбняка), а также вирусных вакцин (против кори и гриппа) даже у людей с низкими титрами сывороточных антител [17].

Установлено, что В-клетки памяти могут существовать при отсутствии определяемых уровней антител в сыворотке [18] и их быстрая дифференцировка и выработка антител могут иметь большое значение для формирования протективного гуморального ответа. Таким образом, комбинированное использование методов анализа В-клеток и уровней антител в сыворотке может дать более полное понимание индивидуального иммунного статуса, опосредованного В-клетками, и служить маркером наличия долгосрочного клеточного иммунитета.

Впервые применение метода ELISPOT для количественной оценки В-клеток, продуцирующих специфические антитела, было описано в 1983 г. [19]. С тех пор регулярно предпринимаются попытки оптимизировать протокол исследования, в частности осуществляется поиск оптимальных неспецифических активаторов В-клеток, таких как агонист TLR R848 совместно с интерлейкином 2, которые были выбраны в качестве наиболее эффективной комбинации [20]. В то время как активные плазмоциты, потенциально присутствующие в крови, можно исследовать непосредственно без активации *in vitro* в В-клеточном ELISPOT, для В-клеток памяти требуется предварительная длительная (не менее 72–98 ч) стимуляция антигеннезависимым активатором для их дифференцировки в определяемые ASC, что является существенным недостатком [21].

Альтернативным вариантом анализа IGRA (Interferon gamma release assay) является количественное определение уровня ИФН- $\gamma$  (без подсчета теней (спотов) отдельных клеток) в плазме после инкубации цельной крови со смесью антигенов (индукторов). Тест-система QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold (QIAGEN, Нидерланды), разрешенная и зарегистрированная в России для диагностики туберкулезного инфицирования, в том числе латентного, основана на данном подходе, однако разработанный вариант для диагностики COVID-19 под названием QuantiFERON SARS-CoV-2 и аналог от немецкой компании – CoV-2 IGRA (EUROIMMUN, Германия) не зарегистрированы и не применяются на территории Российской Федерации (на момент написания обзора, сентябрь 2021 г.).

### Оценка Т-клеточного звена иммунитета

Клеточный иммунный ответ является крайне важным фактором в сдерживании SARS-CoV-2, что подробно рассматривается в одном из обзоров литературы по иммунологическим механизмам, ле-

жащим в основе COVID-19 [22]. Также на важность клеточного иммунного ответа указывает связь умеренного и тяжелого течения COVID-19 с частой выраженной лимфопенией [23].

Помимо вышесказанного, возросший интерес к изучению клеточного иммунитета обусловлен распространением новых штаммов вируса SARS-CoV-2 и возможной неэффективностью ранее приобретенных антител по отношению к ним. В отличие от антител, паратопы которых после успешной вакцинации нацелены на RBD-фрагмент S-белка (для большинства полученных вакцин), Т-клетки нацелены как минимум на 15–20 различных фрагментов белков коронавируса [24]. Это может послужить дополнительным аргументом в пользу классических инактивированных цельновирусных вакцин, которые способны формировать Т-клеточный иммунитет и антитела к различным эпитомам большого числа белков возбудителя SARS-CoV-2. Антитела способны нейтрализовать вирус, тогда как Т-лимфоциты уничтожают инфицированные клетки (цитотоксические Т-клетки, цитотоксические лимфоциты CD8<sup>+</sup>) или инициируют иммунный ответ, стимулируя выработку антител и активность цитотоксических лимфоцитов путем создания оптимального цитокинового окружения для направления иммунного ответа (с помощью CD4<sup>+</sup>-Т-хелперов). Формирование сенсibilизации к большему количеству антигенных детерминант значительно усложняет ускользание возбудителя от иммунной системы в результате возникновения точечных мутаций.

Способность Т-клеток распознавать новые мутации вируса SARS-CoV-2, проявляя перекрестную реактивность, была показана при исследовании различных пулов МНПК, собранных до появления COVID-19, но специфичных к простудным коронавирусам человека, таким как HCoV-OC43, HCoV-229E, HCoV-NL63 и HCoV-NKU1 [25], что можно использовать в качестве доказательной базы того, что последующие мутации SARS-CoV-2 не смогут в полной мере ускользнуть от уже сформированного специфического клеточного иммунитета. При этом указанные данные вносят свой вклад в понимание различий в восприимчивости к инфекции и клинических результатах лечения пациентов после контакта с новой коронавирусной инфекцией.

Интерес к оценке индивидуального клеточного иммунитета в научной среде вызывает исследование T. Sekine и соавт., где показано наличие Т-клеточного иммунитета у серонегативных членов семьи и выздоравливающих лиц с бессимптомным и легким течением COVID-19 в анамнезе, что может объясняться низкой, но эпизодической вирусной нагрузкой. В исследовании были обнаружены SARS-CoV-2-специфические CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-Т-клетки у серонегативных

лиц с частотой 41 %. Причем подобная ситуация наблюдалась у 3 из 31 пациента, перенесших COVID-19 в легкой степени, у 9 из 28 серонегативных членов семьи и у 5 из 31 человека с бессимптомной формой [26]. Вероятно, сочетание низких эпизодических вирусных нагрузок с имеющейся клеточной памятью к другим коронавирусам позволяет быстро нарастить перекрестно реагирующий пул Т-лимфоцитов, который препятствует развитию инфекции SARS-CoV-2 [27]. Описанные выше обстоятельства могут объяснить отсутствие специфических антител у контактировавших с инфицированными пациентами как результат того, что реакции Т-клеточного иммунитета оказывается достаточно для элиминации вируса без необходимости запуска гуморального звена с синтезом антител.

Немалую роль в таких случаях, вероятно, играют и неспецифические факторы защиты, такие как система комплемента, натуральные киллеры (НК-клетки), интерфероны. В случае SARS-CoV-2 предполагается, что вирус очень эффективно уклоняется от запуска ранних врожденных иммунных реакций, опосредованных, например, функцией ИФН 1-го и 3-го типов. Было показано, что SARS-CoV-2 оказывает влияние на запуск внутриклеточных врожденных механизмов, связанных с ИФН 1-го и 3-го типов *in vitro* и *in vivo* [28, 29]. Отсутствие полноценного отклика врожденного иммунитета ограничивает активацию адаптивных иммунных реакций. Отмечается, что если компоненты врожденного звена иммунитета не были подавлены вирусом, то инфекция протекает в бессимптомной или легкой форме, так как активация адаптивных иммунных реакций происходит относительно быстро [30].

Существенным ограничением определения Т-клеточного иммунитета к SARS-CoV-2 является то, что он основан на выявлении эффекторных Т-клеток, продолжительность циркуляции которых в периферической крови исчисляется месяцами (до 6–8 мес) [14] в случае их активации [12].

### Оценка В-клеточного звена иммунитета

В связи с вышесказанным изучение и внедрение тестов для оценки В-клеточного звена долговременной памяти, особенно в случаях когда специфические поствакцинальные или после перенесенного заболевания антитела либо Т-клеточный иммунитет уже не определяют, имеют определяющее значение для установления иммунного статуса и прогноза результата контактов с SARS-CoV-2.

Установлено наличие В-клеток памяти к гомологичным участкам других простудных коронавирусов (HCoV) у лиц, не имевших контакта с SARS-CoV-2 [18]. Важно, что обнаружена возможность их пролиферации с последующим синтезом антител к гомо-

логичным участкам S2-субъединицы (имеющей более высокую гомологию среди коронавирусов, чем S1 [16, 17]) и нуклеокапсида, обладающих перекрестной активностью в отношении SARS-CoV-2. Эти данные имеют существенное значение для установления иммунного статуса по отношению к COVID-19 для лиц, у которых нет в анамнезе SARS-CoV-2 или вакцинации [18]. Особенно следует отметить наличие перекрестных комплементарных антител, что было показано для детей и подростков [20], и, по-видимому, является следствием более высокой частоты встречаемости простудных заболеваний, вызванных коронавирусами (HCoV) в детских коллективах. Примечательно, что в исследовании W. Kevin и соавт. была выявлена специфическая нейтрализующая активность сыворотки доноров, не инфицированных SARS-CoV-2, против псевдотипов SARS-CoV-2 и SARS-CoV-2-S в соответствии с уровнями S-связывающего IgG SARS-CoV-2 и с эффективностью, сопоставимой с эффективностью сыворотки пациентов с COVID-19 [19].

Одним из ключевых аспектов оценки клеточного иммунитета является обнаружение В-клеточной памяти после вакцинации или перенесенной инфекции SARS-CoV-2. Формирование и сохранение ее было показано и при уменьшении антител [31], при этом долгоживущие В-клетки памяти способны обеспечить быстрое производство специфических анти-RBD S1 и S2 COVID-19-антител.

В исследовании J.M. Dan и соавт. с участием 188 пациентов с подтвержденным COVID-19, 43 из которых были протестированы через 6 и более месяцев после заболевания, было показано, что количество В-клеток памяти в образцах крови пациентов через 6 мес после заболевания было больше, чем через 1 мес после заболевания, и не снижалось значимым образом в период до 8 мес. RBD-специфические В-клетки памяти отображали кинетику, аналогичную кинетике S-специфических В-клеток памяти. Однако подобного не наблюдалось для SARS-CoV-2-специфических CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-Т-клеток, период полужизни которых составил 3–5 мес [14]. Предполагается, что долгоживущие В-клетки памяти способны обеспечить быстрое производство специфических анти-RBD S1 и S2 COVID-19-антител.

### Заключение

Для более полного понимания формирования и эффективности иммунной памяти к SARS-CoV-2 требуется оценка содержания и функциональной активности различных ее компонентов, включая В-лимфоциты, CD8<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>-Т-лимфоциты, поскольку они имеют относительно независимые друг от друга механизмы действия клеточной памяти. При этом В-клеточный механизм действия приводит к формированию

наиболее долговременной памяти (через 5–8 мес уровень специфических антител и количество В-клеток памяти сохранялись практически неизменными). В связи с этим актуальна оценка иммунитета к SARS-CoV-2, когда уровень антител становится недостаточным для их определения зарегистрированными тестами, и внедрение в клинико-диагностическую практику тест-систем, позволяющих выявить маркеры долговременной клеточной памяти. Очевидно, что для проведения мероприятий, направленных на диагностику и лечение новой коронавирус-

ной инфекции требуется оптимальная тест-система или установленный комплекс исследований, способных, помимо гуморального звена, оценивать Т- и В-клеточный иммунитет и долговременную иммунологическую память и при этом пригодных для рутинной клинико-диагностической практики. Важным становится и повышение осведомленности врачей клинических специальностей о способах оценки клеточного звена иммунитета и значении комплексного подхода к определению иммунного статуса пациентов.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)». Версия 11 (07.05.2021). М., 2020. Р. 6. [Temporary guidelines "Prevention, diagnosis and treatment of new coronavirus infection (COVID-19)" Version 11 (07.05.2021). Moscow, 2021. С. 6. (In Russ.)].
2. Kim D.S., Rowland-Jones S., Gea-Malvarqui E. Will SARS-CoV-2 Infection Elicit Long-Lasting Protective or Sterilising Immunity? Implications for Vaccine Strategies (2020). *Front Immunol* 2020;11:571481. DOI: 10.3389/fimmu.2020.571481.
3. Gui M., Song W., Zhou H. et al. Cryo-electron microscopy structures of the SARS-CoV spike glycoprotein reveal a prerequisite conformational state for receptor binding. *Cell Res* 2017;27(1):119–29. DOI: 10.1038/cr.2016.152.
4. Hoffmann M., Kleine-Weber H., Schroeder S. et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* 2020;181(2):271–80. DOI: 10.1016/j.cell.2020.02.052.
5. Amanat F., Krammer F. SARS-CoV-2 Vaccines: Status Report. *Immunity* 2020;52(4):583–9. DOI: 10.1016/j.immuni.2020.03.007.
6. Lambert D.W., Yarski M., Warner F.J. et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  convertase (ADAM17) mediates regulated ectodomain shedding of the severe-acute respiratory syndrome-coronavirus (SARS-CoV) receptor, angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2). *J Biol Chem* 2005;280(34):30113–9. DOI: 10.1074/jbc.M505111200.
7. Ziegler C.G.K., Allon S.J., Nyquist S.K. et al. SARS-CoV-2 Receptor ACE2 Is an Interferon-Stimulated Gene in Human Airway Epithelial Cells and Is Detected in Specific Cell Subsets across Tissues. *Cell* 2020;181(5):1016–35. DOI: 10.1016/j.cell.2020.04.035.
8. Logunov D.Y., Dolzhikova I.V., Shcheblyakov D.V. 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. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)00234-8.
9. Потеряев Д.А., Хамитов Р.А., Ефимов Г.А. и др. Перспективы использования технологической платформы ELISPOT в системе противоэпидемических мероприятий против новой коронавирусной инфекции COVID-19. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение* 2020;20(3):146–58. DOI: 10.30895/2221-996X-2020-20-3-146-158. [Poteryaev D.A., Khamitov R.A., Efimov G.A. et al. Prospects for Using the ELISPOT Technological Platform as Part of Anti-Epidemic Measures Against the New Coronavirus Infection COVID-19. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение* 2020;20(3):146–58. DOI: 10.30895/2221-996X-2020-20-3-146-158. (In Russ.)].
10. Cassaniti I., Percivalle E., Bergami F. et al. SARS-CoV-2 specific T-cell immunity in COVID-19 convalescent patients and unexposed controls measured by ex vivo ELISpot assay. *Clin Microbiol Infect* 2021;27(7):1029–34. DOI: 10.1016/j.cmi.2021.03.010.
11. Wu S., Zhong G., Zhang J. et al. A single dose of an adenovirus-vectored vaccine provides protection against SARS-CoV-2 challenge. *Nat Commun* 2020;11(1):1–7. DOI: 10.1038/s41467-020-17972-1.
12. Sherina N., Piralla A., Du L. et al. Persistence of SARS-CoV-2-specific B and T cell responses in convalescent COVID-19 patients 6–8 months after the infection. *Med (N Y)* 2021;2(3):281–95. DOI: 10.1016/j.medj.2021.02.001.
13. Wajnberg A., Amanat F., Firpo A. et al. Robust neutralizing antibodies to SARS-CoV-2 infection persist for months. *Science* 2020;370(6521):1227–30. DOI: 10.1126/science.abd7728.
14. Dan J.M., Mateus J., Kato Y. et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science* 2021;371(6529):eabf4063. DOI: 10.1126/science.abf4063.
15. Slota M., Lim J.B., Dang Y. et al. ELISpot for measuring human immune responses to vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2011;10(3):299–306. DOI: 10.1586/erv.10.169.
16. Crotty S., Aubert R.D., Glidewell J. et al. Tracking human antigen-specific memory B cells: a sensitive and generalized ELISPOT system. *J Immunol Methods* 2004;286(1–2):111–22. DOI: 10.1016/j.jim.2003.12.015.
17. Buisman A.M., de Rond C.G., Oztürk K. et al. Long-term presence of memory B-cells specific for different vaccine components. *Vaccine* 2009;28(1):179–86. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.09.102.
18. West D.J., Calandra G.B. Vaccine induced immunologic memory for hepatitis B surface antigen: implications for policy on booster vaccination. *Vaccine* 1996;14(11):1019–27. DOI: 10.1016/0264-410x(96)00062-x.
19. Czerkinsky C.C., Nilsson L.A., Nygren H. et al. A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *J Immunol Methods* 1983;65(1–2):109–21. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90308-3.
20. Jahnmatz M., Kesa G., Netterlid E. et al. Optimization of a human IgG B-cell ELISpot assay for the analysis of vaccine-induced B-cell responses. *J Immunol Methods* 2013;391(1–2):50–9. DOI: 10.1016/j.jim.2013.02.009.
21. Bernasconi N.L., Traggiai E., Lanzavecchia A. Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells.

- Science 2002;298(5601):2199–202.  
DOI: 10.1126/science.1076071.
22. Vabret N., Britton G.J., Gruber C. et al. Immunology of COVID-19: Current State of the Science. *Immunity* 2020;52(6):910–41.  
DOI: 10.1016/j.immuni.2020.05.002.
23. Ni L., Ye F., Cheng M.L. et al. Detection of SARS-CoV-2-Specific Humoral and Cellular Immunity in COVID-19 Convalescent Individuals. *Immunity* 2020;52(6):971–7.  
DOI: 10.1016/j.immuni.2020.04.023.
24. Tarke A., Sidney J., Kidd C.K. et al. Comprehensive analysis of T cell immunodominance and immunoprevalence of SARS-CoV-2 epitopes in COVID-19 cases. *Cell Rep Med* 2021;2(2):100204.  
DOI: 10.1016/j.xcrm.2021.100204.
25. Mateus J., Grifoni A., Tarke A. et al. Selective and cross-reactive SARS-CoV-2 T cell epitopes in unexposed humans. *Science* 2020;370(6512):89–94.  
DOI: 10.1126/science.abd3871.
26. Sekine T., Perez-Potti A., Rivera-Balateros O. et al. Robust T Cell Immunity in Convalescent Individuals with Asymptomatic or Mild COVID-19. *Cell* 2020;183(1):158–168.  
DOI: 10.1016/j.cell.2020.08.017.
27. Braun J., Loyal L., Frentsch M. et al. SARS-CoV-2-reactive T cells in healthy donors and patients with COVID-19. *Nature* 2020;587(7833):270–4.  
DOI: 10.1038/s41586-020-2598-9.
28. Bastard P., Rosen L.B., Zhang Q. et al. Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19. *Science* 2020;370(6515);eabd4585.  
DOI: 10.1126/science.abd4585.
29. Blanco-Melo D., Nilsson-Payant B.E., Liu W.C. et al. Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. *Cell* 2020;181(5):1036–45.  
DOI: 10.1016/j.cell.2020.04.026.
30. Sette A., Crotty S. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell* 2021;184(4):861–80.  
DOI: 10.1016/j.cell.2021.01.007.
31. Nguyen-Contant P., Embong A.K., Kanagaiah P. et al. S Protein-Reactive IgG and Memory B Cell Production after Human SARS-CoV-2 Infection Includes Broad Reactivity to the S2 Subunit. *mBio* 2020;11(5):e01991–20.  
DOI: 10.1128/mBio.01991-20.

**Вклад авторов**

А.В. Лобов, П.И. Иванова: сбор и анализ данных литературы, написание текста статьи;  
И.Ж. Шубина: разработка дизайна обзора, участие в написании текста статьи;  
Е.А. Погодина, В.И. Казей, Е.Д. Максимова: анализ источников литературы.

**Authors contributions**

A.V. Lobov, P.I. Ivanova: collection and analysis of literature data, writing the text of the article;  
I.Zh. Shubina: review design development, participation in writing the text of the article;  
E.A. Pogodina, V.I. Kazey, E.D. Maksimova: analysis of literature sources.

**ORCID авторов / ORCID of authors**

А.В. Лобов / A.V. Lobov: <https://orcid.org/0000-0002-4703-5863>  
П.И. Иванова / P. I. Ivanova: <https://orcid.org/0000-0002-3481-2854>  
Е.А. Погодина / E.A. Pogodina: <https://orcid.org/0000-0002-0421-3287>  
Е.Д. Максимова / E.D. Maksimova: <https://orcid.org/0000-0003-2027-6621>  
В.И. Казей / V.I. Kazey: <https://orcid.org/0000-0003-2032-6289>  
И.Ж. Шубина / I.Zh. Shubina: <https://orcid.org/0000-0002-9374-3158>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** Работа выполнена без спонсорской поддержки.

**Financing.** The work was performed without external funding.

Статья поступила: 01.10.2021. Принята к публикации: 22.10.2021.

Article submitted: 01.10.2021. Accepted for publication: 22.10.2021.