

## Оценка Т-клеточного иммунитета к SARS-CoV-2 у переболевших и вакцинированных против COVID-19 лиц с помощью ELISPOT набора ТиграТест® SARS-CoV-2

Д. А. Потеряев<sup>1,\*</sup>, С. Г. Аббасова<sup>1</sup>, П. Е. Игнатьева<sup>1</sup>, О. М. Стрижакова<sup>1</sup>, С. В. Колесник<sup>2</sup>, Р. А. Хамитов<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> Акционерное общество «ГЕНЕРИУМ», ул. Тестовская, д. 10, Москва, 123112, Российская Федерация

С началом пандемии COVID-19 в мире и Российской Федерации был разработан ряд молекулярно-биологических тестов для диагностики инфекции, вызванной SARS-CoV-2. Однако результаты применения многочисленных серологических тестов свидетельствуют об их недостаточной чувствительности или специфичности. У существенной части пациентов с подтвержденным ПЦР-диагнозом COVID-19 специфические антитела не обнаруживаются. Существуют доказательства того, что у части выздоровевших гуморальный иммунный ответ является относительно кратковременным. В ряде публикаций показано, что Т-клеточный ответ на человеческие коронавирусы, включая SARS-CoV-1, MERS и SARS-CoV-2, может быть сильным и долговременным. Оценка Т-клеточного иммунитета к SARS-CoV-2 важна не только для стратификации рисков и определения потенциально защищенных групп населения с иммунитетом, приобретенным вследствие перенесенной инфекции, но и для определения иммуногенности и потенциальной эффективности разрабатываемых вакцин. Существующие методики количественной или полуквантитативной оценки специфического Т-клеточного ответа применяются в основном в научных исследованиях и не стандартизованы. **Цель работы:** разработка и апробация тест-системы для выполнения стандартизированной методики определения специфических к антигенам SARS-CoV-2 Т-клеток в периферической крови человека *in vitro*. **Материалы и методы:** разработанный компанией «ГЕНЕРИУМ» набор ТиграТест® SARS-CoV-2, принцип работы которого заключается в определении количества Т-клеток, секретирующих гамма-интерферон *in vitro*. Исследования проводили на образцах венозной крови добровольцев трех групп: условно здоровых, переболевших COVID-19, прошедших вакцинацию против COVID-19. **Результаты:** разработана тест-система для определения специфических к антигенам SARS-CoV-2 Т-клеток в периферической крови человека *in vitro*. Показана специфичность и определена предварительная чувствительность теста ТиграТест® SARS-CoV-2. Исследован диапазон и величина Т-клеточного ответа у переболевших и вакцинированных. Показан выраженный Т-клеточный ответ и у части лиц с отсутствующими симптомами или неподтвержденным диагнозом. Обнаружено, что среднее значение Т-клеточного ответа в отношении пептидов белка-шипа (S-белка) выше у вакцинированных, чем у переболевших. Найдена корреляция между тяжестью заболевания и уровнем Т-клеточного ответа. Определен удельный вклад различных групп антигенов в Т-клеточный ответ после перенесенного заболевания COVID-19. **Выводы:** набор ТиграТест® SARS-CoV-2 является специфичным и чувствительным инструментом в оценке Т-клеточного иммунитета к вирусу SARS-CoV-2, в том числе и для вакцинированных. Разработанный набор целесообразно использовать в клинической практике для комплексной оценки иммунитета к SARS-CoV-2.

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

**Для цитирования:** Потеряев ДА, Аббасова СГ, Игнатьева ПЕ, Стрижакова ОМ, Колесник СВ, Хамитов РА. Оценка Т-клеточного иммунитета к SARS-CoV-2 у переболевших и вакцинированных против COVID-19 лиц с помощью ELISPOT набора ТиграТест® SARS-CoV-2. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2021;21(3):178–192. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-3-178-192>

\* **Контактное лицо:** Потеряев Дмитрий Александрович; [poteryaev@ibcgenerium.ru](mailto:poteryaev@ibcgenerium.ru)

## Assessment of T-cell immunity to SARS-CoV-2 in COVID-19 convalescents and vaccinated subjects, using TigraTest® SARS-CoV-2 ELISPOT kit

D. A. Poteryaev<sup>1,\*</sup>, S. G. Abbasova<sup>1</sup>, P. E. Ignatyeva<sup>1</sup>, O. M. Strizhakova<sup>1</sup>, S. V. Kolesnik<sup>2</sup>, R. A. Khamitov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> International Biotechnology Center “GENERIUM”, 14 Vladimirskaia St., Volginsky town, Petushinskiy District, Vladimir Region 601125, Russian Federation

<sup>2</sup> GENERIUM JSC, 10 Testovskaya St., Moscow 123112, Russian Federation

With the onset of the COVID-19 pandemic, a number of molecular-based tests have been developed to diagnose SARS-CoV-2 infection. However, numerous available serological tests lack sufficient sensitivity or specificity. They do not detect specific antibodies in a significant proportion of patients with PCR-confirmed COVID-19. There is evidence that some convalescents have a relatively short-lived humoral immunity. In contrast, a number of publications have shown that T-cell response to human coronaviruses,

including SARS-CoV-1, MERS, and SARS-CoV-2, can be strong and long-term. Assessment of T-cell immunity to SARS-CoV-2 is important not only for stratification of risks and identification of potentially protected populations with immunity acquired as a result of previous infection, but also for determining immunogenicity and potential efficacy of vaccines under development. The existing methods of quantitative or semi-quantitative assessment of specific T-cell response are mainly used in scientific research and are not standardised. **The aim of the study** was to develop and verify experimentally a test kit to be used in a standardised procedure for *in vitro* determination of T-cells specific to SARS-CoV-2 antigens, in human peripheral blood. **Materials and methods:** the TigraTest® SARS-CoV-2 kit developed by GENERIUM, which determines the number of T-cells secreting interferon gamma *in vitro*, was tested in the study. Samples of venous blood of volunteers from three different groups were analysed in the study: presumably healthy volunteers; COVID-19 convalescents; individuals vaccinated against SARS-CoV-2. **Results:** the authors developed the TigraTest® SARS-CoV-2 kit for *in vitro* determination of T-cells specific to SARS-CoV-2 antigens in human peripheral blood, demonstrated its specificity and performed preliminary assessment of its sensitivity. The study analysed the range and magnitude of the T-cell response in convalescent and vaccinated individuals. A pronounced T-cell response was also shown in some individuals with no symptoms or with unconfirmed diagnosis. It was discovered that the mean T-cell response to peptides of the spike protein (S-protein) was higher in the vaccinated individuals than in the convalescent patients. A correlation was determined between the severity of the disease and the level of T-cell response. Specific contributions of various groups of antigens to the T-cell response after COVID-19 infection were also determined. **Conclusions:** the TigraTest® SARS-CoV-2 kit is a specific and sensitive tool for the assessment of T-cell immunity to the SARS-CoV-2 virus, which can also be used for vaccinated individuals. The kit may be used in clinical practice for comprehensive assessment of immunity to SARS-CoV-2.

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

**For citation:** Poteryaev DA, Abbasova SG, Ignatyeva PE, Strizhakova OM, Kolesnik SV, Khamitov RA. Assessment of T-cell immunity to SARS-CoV-2 in COVID-19 convalescents and vaccinated subjects, using TigraTest® SARS-CoV-2 ELISPOT kit. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2021;21(3):178–192. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-3-178-192>

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

Вирус SARS-CoV-2 вызвал глобальную пандемию, которая унесла жизни более 4 млн человек в мире (на момент написания рукописи), нанесла ущерб экономике и продолжает широко распространяться; на сегодняшний день только в Российской Федерации зарегистрировано почти 6 млн подтвержденных случаев<sup>1</sup>. Проявления заболевания варьируют от бессимптомной инфекции или инфекции с минимально выраженными симптомами до пневмонии со смертельным исходом. По какой причине у некоторых людей развивается тяжелая форма заболевания, когда другие переносят инфекцию бессимптомно, остается неясным, но степень иммунной защиты является одним из основных объяснений [1–6].

Новые эпидемиологические исследования показывают, что иммунная защита от SARS-CoV-2 формируется, но такой иммунитет не обязательно предотвращает заболевание [7, 8]. В недавнем исследовании датской популяции установлено, что уровень защиты от повторной инфекции после перенесенной инфекции SARS-CoV-2 достигает 85%, но у людей старше 65 лет этот уровень может снижаться до 47% [9]. Долговременность защитного потенциала вакцинации в зависимости от типа вакцин еще только предстоит выяснить. Один из защитных механизмов адаптивного иммунитета включает образование антител. Антитела к нуклеопротеину SARS-CoV-2 и белку-шипу (S-белку) вырабатываются в >70% случаев симптоматической инфекции [10], но у бессимптомно инфицированных лиц сообщалось о генерации Т-клеток, специфичных к SARS-CoV-2, без сероконверсии [11].

В настоящее время иммунные ответы Т-клеток на SARS-CoV-2 изучены в ряде научных исследований с использованием передовых, но сложных и не масштабируемых методов проточной цитометрии или оценки пролиферации Т-клеток. В то же время были разработаны воспроизводимые, стандартизованные и высокопроизводительные серологические методы анализа. Анализ крови на антитела к SARS-CoV-2 были развернуты в больших масштабах, иногда даже без полного понимания их полезности из-за истинного уровня кросс-реактивности некоторых тестов с так называемыми коронавирусами сезонной простуды (HCoV HKU1, 229E, OC43, NL63) [6].

Клеточные иммунные ответы на вирусные инфекции, в частности на SARS-CoV-2, развиваются следующим образом: макрофаги и дендритные клетки, презентующие пептиды вирусных белков, мигрируют в лимфатические узлы, где они избирательно активируют цитотоксические (CD8<sup>+</sup>) и хелперные (CD4<sup>+</sup>) Т-клетки, несущие Т-клеточные рецепторы (TCR), способные специфически взаимодействовать с данными пептидами в составе молекул главного комплекса гистосовместимости I и II класса соответственно. Специфическая активация пептидами вируса приводит к пролиферации отвечающих на стимуляцию Т-клеток и продукции ими внутриклеточных цитотоксических белков перфорина и гранзима В, а также секреции противовирусных Th1-цитокинов — IL-2, TNF-α, IFN-γ, и Th2-цитокинов — IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13. Активированные цитотоксические CD8<sup>+</sup> Т-клетки мигрируют из лимфоузлов в места инфекции, где уничтожают инфицированные вирусом клетки хозяина, таким образом предотвращая дальнейшую экспансию вируса. Th2-цитокины IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, секретируемые активированными CD4<sup>+</sup> Т-клетками, приводят к дополнительной активации В-клеток после их взаимодействия с антигенами вируса и усиливают продукцию вирусспецифичных антител [12]. Уровень циркулирующих в крови антител не отражает полный иммунологический статус пациентов в отношении SARS-CoV-2, поскольку около 10–30% пациентов, перенесших коронавирусную инфекцию, не имеют детектируемого уровня антител к вирусу [10] и титры антител могут быстро снижаться со временем [13]. Для более полной оценки иммунного статуса пациента, помимо гуморального ответа, необходимо определять Т-клеточный иммунитет в отношении специфических антигенов вируса SARS-CoV-2, поскольку Т-клеточный ответ может развиваться до проявления гуморального иммунного ответа [12]. В литературе есть данные о том, что специфически активированные Т-клетки (как CD4<sup>+</sup>, так и CD8<sup>+</sup>) могут быть обнаружены уже через 1 неделю после появления первых симптомов инфекции [14].

Специфические Т-клетки генерируются в большом количестве в ответ на инфекцию и детектируются после вакцинации (если вакцина имеет потенциал к стимуляции не только гуморального, но и клеточного иммунитета). Т-клеточные ответы

<sup>1</sup> <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>

после перенесенной инфекции более устойчивы во времени [15], в отличие от уровня антител [13]. Они комплементарны серологическим методам для выявления людей, перенесших инфекцию. Т-клеточный ответ на антигены SARS-CoV-2 с большой вероятностью является определяющим в защитном иммунитете [16].

Исследования Т-клеточного иммунитета в контексте новой коронавирусной инфекции особенно актуальны, хотя в литературе обнаруживаются противоречивые данные, вероятно, из-за отсутствия стандартизации методики.

В ноябре 2020 г. британские ученые опубликовали результаты когортного исследования сотрудников здравоохранения, полиции и пожарных («ключевых работников») в Великобритании [16]. Исследование кроме серологических методов включало определение уровня Т-клеточного иммунитета к SARS-CoV-2. Анализ данных свидетельствует о том, что определенный уровень реагирующих на SARS-CoV-2 Т-клеток может быть достаточным для защиты от COVID-19 даже у серонегативных субъектов, и одни только серологические исследования могут быть недостаточными при оценке тех, кто подвергается более низкому риску заболевания COVID-19 [16]. Кроме того, Т-клеточный ответ обнаруживался в подтвержденных ПЦР случаях инфекции COVID-19, в то время как серологический тест на антитела давал отрицательный результат [16].

Опубликованные данные позволяют предположить следующее:

- стратификация риска на индивидуальном уровне может быть более точно определена с использованием Т-клеточных анализов;
- содержание Т-клеток, специфически реагирующих на SARS-CoV-2, снижается с возрастом, что может объяснить более высокую частоту и тяжесть заболевания в этой группе, особенно при отсутствии антител (серология).

Описанный в работе D. Wyllie с соавт. [16] анализ Т-клеток выполняли с помощью технологии IGRA-ELISPOT (Interferon-Gamma Release Assay — Enzyme Linked Immunosorbent Spot analysis; тест на секрецию гамма-интерферона — иммуноферментный анализ пятен). Технология ELISPOT нашла широкое применение, например, для диагностики туберкулезной инфекции [17]. Важно, что ELISPOT приемлем как по стоимости, так и по уровню сложности выполнения и его способности к автоматизации для широкомасштабных исследований и массового применения [18].

Компания «ГЕНЕРИУМ» разработала набор ELISPOT для определения реактивных на антигены SARS-CoV-2 Т-клеток в крови (ТиграТест® SARS-CoV-2). В настоящий момент набор для исследовательских целей выпускается промышленными сериями, успешно закончена его апробация на образцах крови добровольцев и начаты клинико-лабораторные испытания для регистрации в качестве диагностического теста *in vitro*.

Цель работы — разработка и апробация тест-системы для выполнения стандартизированной методики определения специфических к антигенам SARS-CoV-2 Т-клеток в периферической крови человека *in vitro* и определение рабочих характеристик теста. В ходе работы были поставлены и решены следующие задачи:

- предварительное определение специфичности и чувствительности теста к выявлению перенесенной инфекции, вызванной SARS-CoV-2;
- определение уровня Т-клеточного ответа у переболевших и вакцинированных лиц;
- оценка зависимости степени выраженности Т-клеточного ответа от тяжести перенесенного заболевания;
- изучение Т-клеточного ответа на разные группы антигенов SARS-CoV-2.

**Таблица 1.** Группы доноров для анализа Т-клеток, специфически отвечающих на антигены SARS-CoV-2, методом ELISPOT  
**Table 1.** Donor groups in the study of T-cell specific response to SARS-CoV-2 antigens by ELISPOT

Группа по анамнезу к COVID-19 Groups by COVID-19 medical history	Распределение доноров по серологическому статусу Groups of volunteers by their serological status		
	серонегативный по антигенам SARS-CoV-2 seronegative to SARS-CoV-2 antigens	серопозитивный по антигенам SARS-CoV-2 seropositive to SARS-CoV-2 antigens	серологический статус не известен serological status not known
Условно здоров, отрицает перенесенное заболевание COVID-19 или его симптомы в анамнезе Presumed healthy subjects who claim no COVID-19 or its symptoms in the past	1	0	43
Лицо с подтвержденным лабораторными методами (ПЦР и/или серологическими) или компьютерной томографией заболеванием COVID-19 COVID-19 confirmed by laboratory methods (PCR or serology) or computed tomography	1	12	35
Условно здоров, отрицает перенесенное заболевание COVID-19 или его симптомы в анамнезе, но заявляет о близком и/или продолжительном контакте с больными COVID-19 Presumed healthy subjects who claim no COVID-19 or its symptoms in the past, but claim a close or long contact with COVID-19 patients	7	0	14
Статус не известен Status not known	0	0	129
Вакцинированный против COVID-19 Vaccinated against COVID-19	0	17	0

## Материалы и методы

### Пациенты. Образцы крови

Перед началом проведения исследования добровольцы заполняли опросный лист с указанием основных характеристик пациента, симптомов заболевания, наличия или отсутствия подтверждения инфекции SARS-CoV-2 лабораторными методами, наличия или отсутствия подтверждения диагноза пневмонии компьютерной томографией. Условно здоровые доноры также указывали наличие или отсутствие близких или продолжительных контактов с больными COVID-19.

Образцы венозной крови были отобраны в процедурном кабинете МБЦ «ГЕНЕРИУМ» в период с ноября 2020 по февраль 2021 г. в Москве или, в тот же период, в п. Вольгинский Владимирской области. От каждого донора было получено добровольное информированное согласие на забор образцов крови и включение результатов их анализа в данное исследование. Проведение исследования было одобрено локальным независимым этическим комитетом при МБЦ «ГЕНЕРИУМ» (протокол № 01 от 11.11.2020).

Всего были взяты образцы крови у 245 пациентов, у некоторых из них забор крови осуществляли более 1 раза в разное время, включая тех, от кого были получены образцы до и после перенесенного заболевания COVID-19 или проведения вакцинации. Таким образом, для анализов ELISPOT всего было собрано 279 образцов.

Доноров распределяли по группам (табл. 1). Забор крови у вакцинированных происходил в интервале 3–6 нед. после получения всех необходимых доз вакцины. У переболевших COVID-19 кровь отбирали в интервале от 2 нед. до 9 мес. после исчезновения симптомов заболевания или наличия отрицательного теста ПЦР.

Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) выделяли методом центрифугирования в градиенте фиколла не позднее чем через 8 ч после забора крови. Для анализа ELISPOT использовали либо свежeweделенные, либо криоконсервированные МКПК, замороженные согласно валидированному протоколу [19], которые хранили при минус 196 °С до анализа.

### Дизайн антигенов для ТиграТест® SARS-CoV-2

Пептиды для стимуляции специфических Т-клеток, соответствующие основным белковым антигенам коронавируса SARS-CoV-2, были выбраны на основе анализа публикаций, идентифицировавших репертуар и встречаемость различных эпитопов Т-клеточных рецепторов (TCR) у пациентов и переболевших COVID-19 [3, 20–23]. С помощью биоинформатического анализа были исключены в основном те пептиды, которые способны давать значительную кросс-реактивность с Т-клеточными эпитопами так называемых простудных коронавирусов штаммов OC43, NL63, 229E, HKU1. Для выбора оптимального набора пептидов учитывали также распространенность эпитопов TCR и их соответствие генотипам HLA в человеческой популяции [3, 21–25]. Были приготовлены пептидные пулы для 5 белков, являющихся наиболее часто встречающимися мишенями CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток у переболевших COVID-19: S-белок (шип), нуклеокапсидный белок (N), мембранный белок (M) и 2 вспомогательных белка ORF3a и ORF7a. С целью обеспечения удобства тестирования и отличия случаев естественного иммунитета после перенесенной инфекции от неинфицированных людей, получивших иммунопрофилактику вакциной, основанной только на S-белке, было сформировано 2 пула пептидов: пептиды исключительно S-белка (AG1) и смешанные пептиды белков N, M, ORF3a и ORF7a (AG2).

### IFN-γ ELISPOT

Анализ ELISPOT выполняли в соответствии с инструкцией производителя набора ТиграТест® SARS-CoV-2 (АО «ГЕНЕРИУМ», Россия). МКПК каждого добровольца инкубировали в течение 16–24 ч с пептидными антигенами (концентрация каждого пептида в пуле составляла 2 мкг/мл). Индивидуальный тест для каждого донора состоял из 4 лунок:

- отрицательный контроль, без стимуляции МКПК;
- стимуляция пептидами S-белка (AG1);
- стимуляция пептидами белков N, M, ORF3a и ORF7a (AG2);
- положительный контроль (стимуляция всех жизнеспособных и функционально активных Т-клеток с помощью антитела к CD3, клон ОКТ-3).

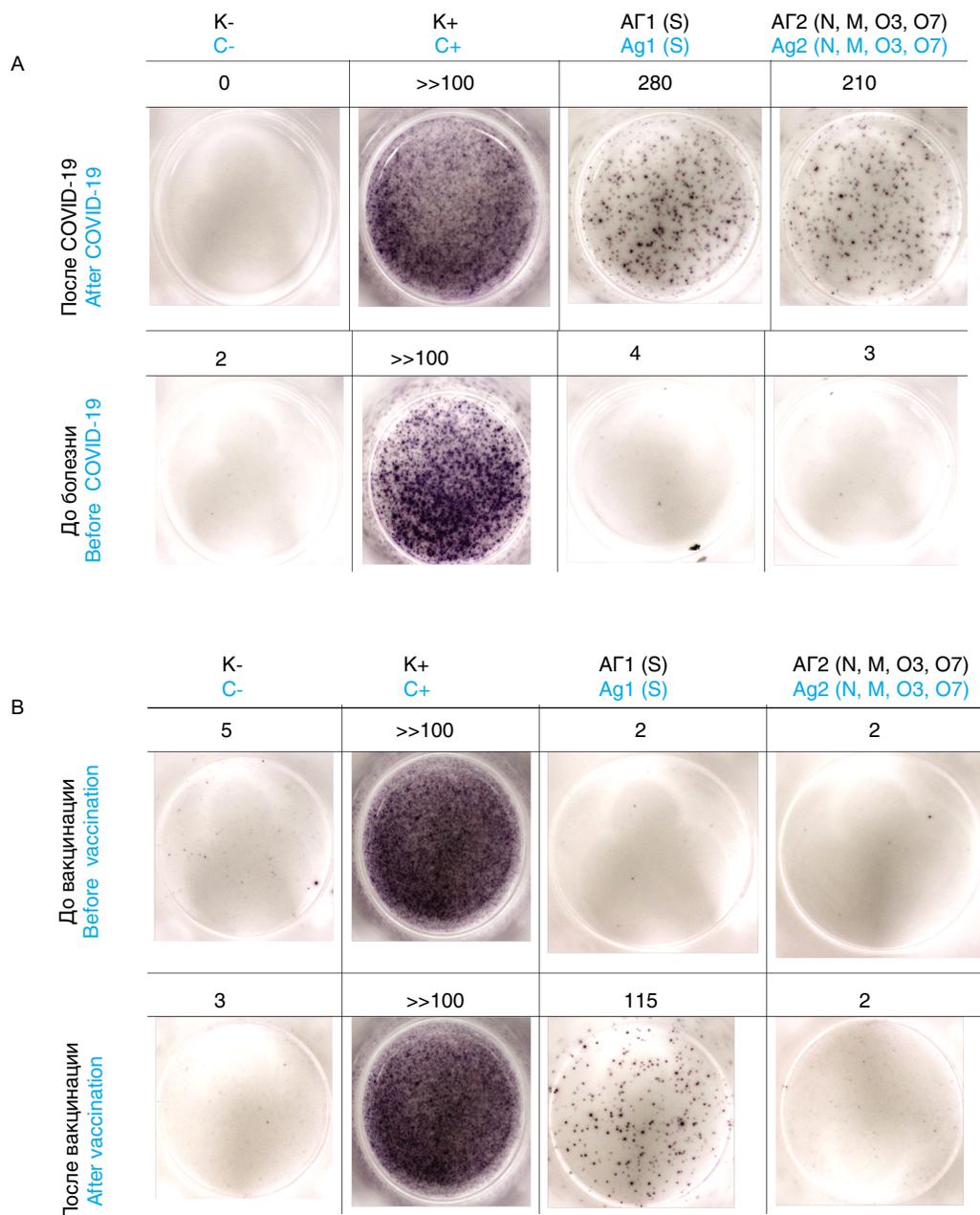
В каждую лунку вносили 350000 МКПК. На поверхности иммунологического планшета для ELISPOT (MultiScreen HTS IP с мембраной Durgapore PVDF Merk-Millipore, кат. № MVHVN4525) было предварительно сорбировано моноклональное антитело к IFN-γ (производство МБЦ «ГЕНЕРИУМ», клон K48). После инкубации и отмывки пятна проявляли с помощью другого антитела к IFN-γ, конъюгированного со щелочной фосфатазой (производство МБЦ «ГЕНЕРИУМ», клон 1G9) и хромогенного субстрата BCIP/NBT (5-бromo-4-хлоро-3-индолил-фосфат/нитросиний тетразолия хлорид, Sigma-Aldrich). Подсчет пятен (спотов) производили как визуально под стереомикроскопом, так и с помощью специализированного ELISPOT ридера AID Classic ELR08 (AID GmbH, Германия). Величину Т-клеточного ответа выражали как количество подсчитанных пятен в лунке AG1 или AG2 за вычетом количества пятен в отрицательном контроле (без стимуляции антигенами). Критерием приемлемости теста были результаты положительного и отрицательного контролей. В положительном контроле должно было быть не менее 100 пятен, в отрицательном контроле — не более 14 пятен. Наличие более 14 пятен могло свидетельствовать об остром воспалительном процессе или о случайном загрязнении образца клеток эндотоксинами. В таком случае донору предлагали повторно сдать кровь через 1–2 недели.

### Статистический анализ

Статистическая обработка результатов, включая определение достоверности различий между группами и ROC (receiver operating characteristic) анализ, выполнялась с использованием программы GraphPad Prizm 6.

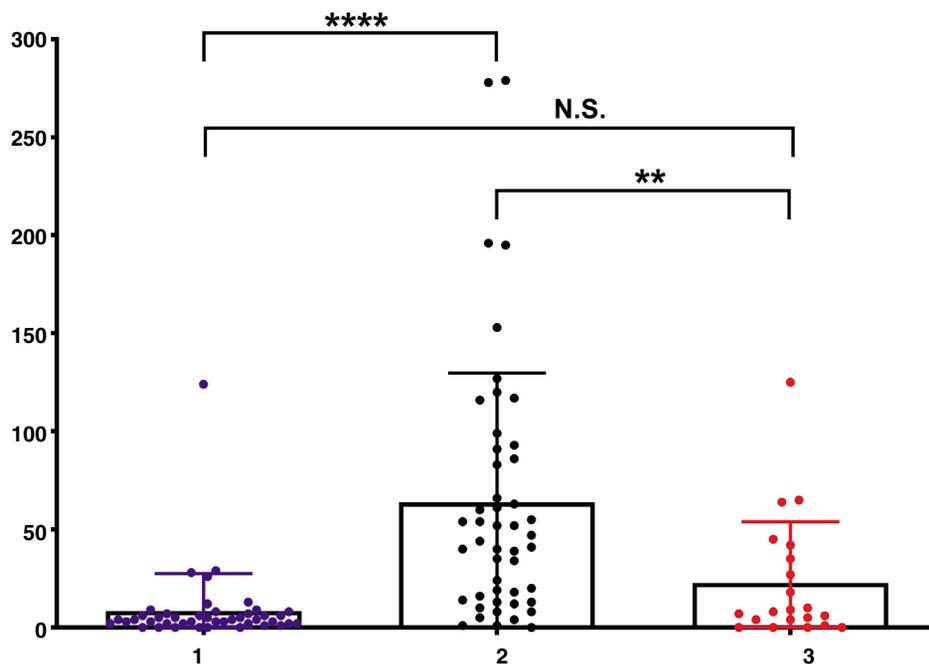
### Результаты

Иммунологический набор ТиграТест® SARS-CoV-2 был разработан для оценки специфического Т-клеточного иммунитета у лиц, перенесших коронавирусную инфекцию, а также у прошедших иммунопрофилактические мероприятия (вакцинацию) против COVID-19. В ходе апробации набора анализ IGRA-ELISPOT, выявляющий эффекторные CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетки, специфически реагирующие на антигены SARS-CoV-2, был проведен у 245 добровольцев. Распределение групп доноров описано в разделе «Материалы и методы» и в таблице 1. На рисунке 1 показаны типичные примеры положительного результата анализа у переболевшего COVID-19 и вакцинированного человека. У этих же лиц ТиграТест® SARS-CoV-2 не выявлял специфических к SARS-CoV-2 Т-клеток в количестве, превышающем фоновый уровень, если анализ был сделан до болезни или вакцинации Гам-КОВИД-Вак (Спутник V) (рис. 1А, 1В). У переболевших COVID-19 Т-клеточный ответ, как правило, был выявлен как на пептиды пула AG1, так и на пептиды пула AG2, что согласуется с ранее опубликованными данными [3]. У вакцинированных Гам-КОВИД-Вак лиц, которые до анализа



**Рис. 1.** Примеры результатов анализа ТиграТест® SARS-CoV-2. А — нижняя панель («До болезни»): анализ выполнен у пациента X до заболевания COVID-19. МПКК выделены в ноябре 2020 г. Верхняя панель («После COVID-19»): анализ выполнен у того же пациента после перенесенного заболевания COVID-19. МПКК выделены в январе 2021 г. В — верхняя панель («До вакцинации»): анализ выполнен у не болевшего COVID-19 пациента Y до вакцинации. МПКК выделены в ноябре 2020 г. Нижняя панель («После вакцинации»): анализ выполнен у того же пациента через 1 неделю после 2 необходимых доз вакцины Гам-КОВИД-Вак. МПКК выделены в декабре 2020 г. К<sup>-</sup> — отрицательный контроль (без антигенов); К<sup>+</sup> — положительный контроль (стимуляция всех функционально активных Т-клеток анти-CD3 антителом); АГ1 (S) — стимуляция пулом пептидов S-белка; АГ2 (N, M, O3, O7) — стимуляция пулом пептидов белков N, M, ORF3a, ORF7a. Цифры над фотографиями лунок означают число пятен, подсчитанных автоматическим ELISPOT-ридером.

**Fig. 1.** Examples of results obtained with the TigraTest® SARS-CoV-2 kit. A—the bottom panel (“Before COVID-19”): the analysis was performed in the patient X prior to COVID-19. PBMCs were isolated in November 2020. The upper panel (“After COVID-19”): the analysis was performed in the same patient after recovery from COVID-19. PBMCs were isolated in January 2021. B—the upper panel (“Before vaccination”): the analysis was performed in the non-COVID-19 patient Y before vaccination. PBMCs were isolated in November 2020. The bottom panel (“After vaccination”): the analysis was performed in the same patient 1 week after 2 required doses of the SARS-CoV-2 vaccine Gam-COVID-Vac. PBMCs were isolated in December 2020. C<sup>-</sup>—negative control (without antigens); C<sup>+</sup>—positive control (stimulation of all functionally active T cells with an anti-CD3 antibody); Ag1 (S)—stimulation with a pool of S-protein peptides; Ag2 (N, M, O3, O7)—stimulation with a pool of peptides of N, M, ORF3a, ORF7a proteins. The numbers above the photographs of the wells indicate the number of spots counted by the automatic ELISPOT reader.



**Рис. 2.** Распределение и сравнение величины Т-клеточного ответа, выявляемого набором ТиграТест® SARS-CoV-2, у различных групп пациентов. Продукцию IFN $\gamma$  после инкубации МКПК пациентов с пептидами SARS-CoV-2 детектировали с помощью ELISPOT. Ось ординат — количество пятен в лунке после культивирования 350000 МКПК с антигенами SARS-CoV-2. Для сравнительного анализа между группами использовали наибольшее из полученных значений для лунок с антигенами — либо АГ1 (пептиды S-белка), либо АГ2 (пептиды белков S, N, M, ORF3a, ORF7a) для каждого индивидуального пациента. Ось абсцисс — наименование групп доноров. 1 — условно здоровые доноры, отрицающие перенесенное заболевание COVID-19 ( $n = 44$ ); 2 — перенесенная инфекция SARS-CoV-2 или перенесенное заболевание COVID-19, подтвержденные лабораторными или клиническими методами ( $n = 48$ ); 3 — условно здоровые доноры, заявляющие о близком или продолжительном контакте с больным COVID-19 ( $n = 21$ ). Показано различие Т-клеточного ответа на антигены SARS-CoV-2 у условно здоровых субъектов и пациентов, перенесших инфекцию SARS-CoV-2. Для статистического анализа использовали тест Крускала–Уоллиса (множественное сравнение). \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . N. S. — отличия статистически незначимы ( $p > 0,05$ ).

**Fig. 2.** Distribution and comparison of the magnitude of the T-cell response detected by the TigratTest® SARS-CoV-2 kit in different groups of patients. IFN $\gamma$  production was determined by ELISPOT after incubation of patient PBMCs with SARS-CoV-2 peptides. Y-axis shows the number of spots in the well after cultivation of 350000 PBMCs with SARS-CoV-2 antigens. The comparative analysis of the groups used the highest value obtained for the wells with antigens—either Ag1 (S-protein peptides) or Ag2 (peptides of S, N, M, ORF3a, ORF7a proteins)—for each individual patient. X-axis—groups of donors. 1—presumably healthy donors who claim no COVID-19 in the past ( $n = 44$ ); 2—previous SARS-CoV-2 infection or COVID-19 disease, confirmed by laboratory or clinical methods ( $n = 48$ ); 3—presumably healthy donors who claim a close or long-term contact with a COVID-19 patient ( $n = 21$ ). The T-cell response to SARS-CoV-2 antigens in the presumably healthy subjects differs from that in the patients after SARS-CoV-2 infection. The Kruskal–Wallis test (multiple comparison) was used for statistical analysis. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ . N. S. — the differences are not statistically significant ( $p > 0.05$ ).

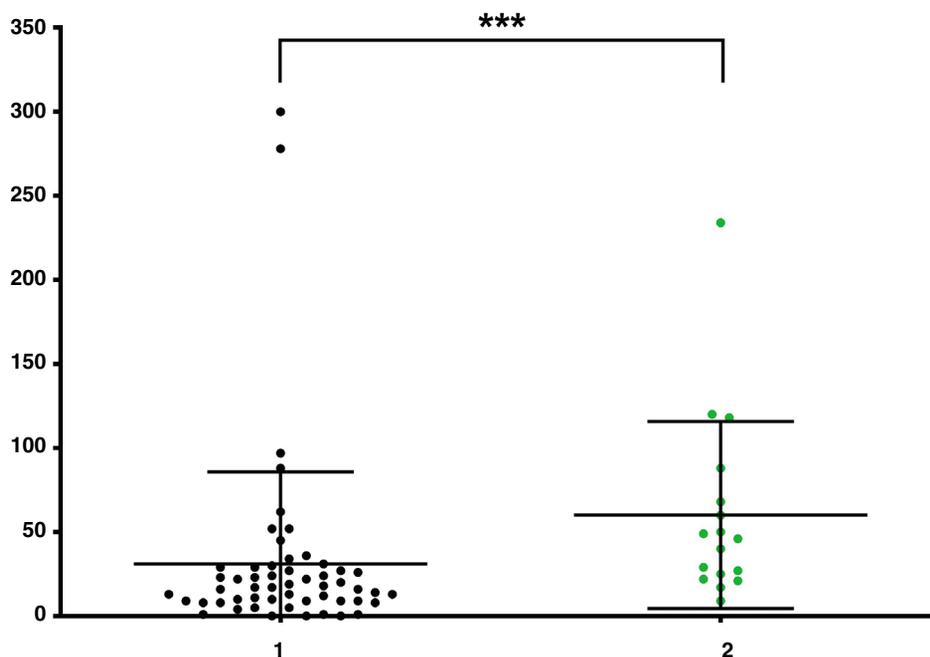
не имели продолжительного контакта с больными COVID-19, ответ выявляли только на пептид АГ1 (пептиды S-белка), что свидетельствует о том, что Т-клеточный ответ сформировался именно в результате вакцинации, а не является следствием естественно перенесенной инфекции.

Оценку специфичности и величины Т-клеточного ответа на новую коронавирусную инфекцию с помощью набора ТиграТест® SARS-CoV-2 проводили на трех группах добровольцев. Для оценки специфичности была взята группа с низким риском перенесенной инфекции COVID-19. Необходимо отметить, что мы не имели возможности работать с банком МКПК доноров до начала пандемии. Поэтому в этой популяции также могли быть люди, перенесшие инфекцию без заметных симптомов и имеющие специфический Т-клеточный ответ. Вторая группа состояла из лиц, перенесших COVID-19 или бессимптомную инфекцию COVID-19, подтвержденную лабораторными методами. Третья группа состояла из лиц, отрицающих перенесенную инфекцию в анамнезе, но заявляв-

ших о близких или продолжительных контактах с больными COVID-19.

Т-клеточный ответ в группе инфицированных SARS-CoV-2 (рис. 2) значительно отличается от группы условно здоровых с низким риском перенесенной инфекции и от условно здоровых с высоким риском перенесенной инфекции. Средняя величина ответа у инфицированных людей составила 65 ( $\pm 66$ ) пятен на 350000 МКПК против 9 ( $\pm 19$ ) и 23 ( $\pm 31$ ) у условно здоровых с низким и высоким риском перенесенной инфекции соответственно. Несмотря на то что в данной выборке не наблюдается статистически значимого различия по уровню Т-клеточного ответа между условно здоровыми донорами с высоким и низким риском перенесенной инфекции, тенденция к такому различию прослеживается.

На момент проведения исследования в Российской Федерации уже началась иммунопрофилактика COVID-19 отечественными вакцинами. Была набрана группа лиц, получивших вакцинацию зарегистрированным в Российской Федерации препаратом Гам-КОВИД-Вак. Т-клеточный ответ на S-белок SARS-CoV-2,



**Рис. 3.** Распределение и сравнение величины Т-клеточного ответа в отношении пептидов S-белка SARS-CoV-2, выявляемого набором ТиграТест® SARS-CoV-2 у переболевших COVID-19 (реконвалесценты), включая предположительно бессимптомную инфекцию ( $n = 51$ ), и вакцинированных против COVID-19 здоровых добровольцев ( $n = 17$ ). Ось ординат — количество пятен в лунке с 350000 МКПК. Оценивались только пятна в лунке АГ1 (пептиды S-белка). Ось абсцисс — наименование групп доноров. 1 — реконвалесценты и серопозитивные; 2 — вакцинированные. Среднее значение Т-клеточного ответа у вакцинированных значительно превышает таковой у реконвалесцентов COVID-19 и серопозитивных по SARS-CoV-2 лиц. Для статистического анализа использовался тест Манна–Уитни (непараметрический, для групп с ненормальным распределением). \*\*\*  $p < 0,0001$ .

**Fig. 3.** Distribution and comparison of the magnitude of the T-cell response to the peptides of the SARS-CoV-2 S-protein detected by the TigratTest® SARS-CoV-2 kit in the patients with COVID-19 (convalescents), including presumably asymptomatic infection ( $n = 51$ ), and healthy subjects vaccinated against SARS-CoV-2 ( $n = 17$ ). Y-axis shows the number of spots in a well with 350000 PBMCs. The experiment assessed only the spots in the Ag1 well (S-protein peptides). X-axis—groups of donors. 1—convalescent and seropositive patients; 2—vaccinated individuals. The mean T-cell response in the vaccinated individuals significantly exceeds those of the COVID-19 convalescents and SARS-CoV-2 seropositive individuals. The Mann–Whitney test (nonparametric, for groups with non-normal distribution) was used for statistical analysis. \*\*\*  $p < 0.0001$ .

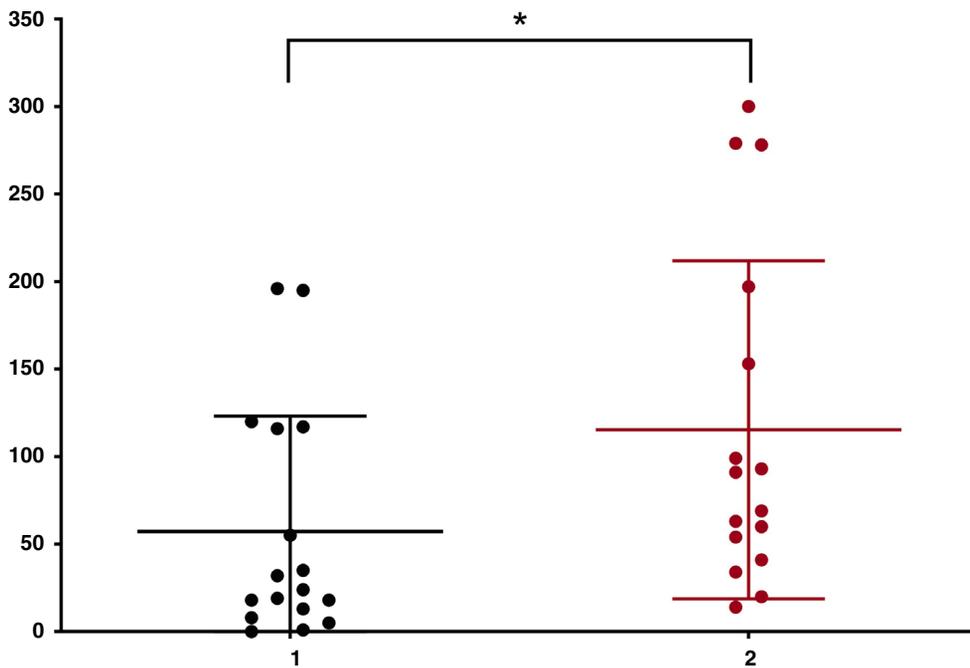
определенный с помощью набора ТиграТест® SARS-CoV-2, был сравнен с таковым у группы переболевших COVID-19 (реконвалесцентов) и серопозитивных по антигенам SARS-CoV-2. Среднее количество Т-клеток, специфичных к S-белку, было значимо выше ( $p < 0,0001$ ) у вакцинированных добровольцев, чем у естественного перенесших коронавирусную инфекцию (рис. 3).

Следующим этапом работы было определение возможной корреляции между уровнем Т-клеточного ответа, детектируемого набором ТиграТест® SARS-CoV-2, и тяжестью перенесенного заболевания COVID-19. Действительно, среднее количество Т-клеток, специфичных для антигенов SARS-CoV-2, значимо ( $p < 0,05$ ) выше у переболевших COVID-19 с перенесенной умеренной или тяжелой формой заболевания, чем у лиц с инфекцией, протекавшей в легкой форме (рис. 4).

В ходе предварительного анализа ROC (данные не представлены) определяли пороговое значение для интерпретации результатов теста ТиграТест® SARS-CoV-2: более 12 пятен в лунках с пептидами (после вычета количества пятен в отрицательном контроле) было определено как «положительный результат». На основании этого порога проанализировали частоты Т-клеточных ответов на разные группы антигенов во всей исследовательской выборке, давшей положительный результат теста ( $n = 119$ ). Было показано, что S-белок является одной из основных, но не иммунодоминантной мишенью для Т-клеток. В среднем более сильные ответы наблюдались

на пептиды объединенной группы структурных белков N, M, ORF3a, ORF7a (NMO) (рис. 5 и 6).

Пороговое значение теста между положительным и отрицательным результатом было дополнительно подтверждено проведением анализа ТиграТест® SARS-CoV-2 на выборке из 43 реконвалесцентных пациентов с подтвержденной инфекцией SARS-CoV-2 (для определения чувствительности) и 44 условно здоровых добровольцев с низким риском перенесенной инфекции (для определения специфичности). Основным математическим средством оценки эффективности диагностических тестов является метод, основанный на анализе так называемой операционной характеристической кривой (ROC-кривая; ROC — receiver operating characteristic curve); ROC-анализ предусматривает сравнение операционных характеристик теста — чувствительности и специфичности. В качестве интегральной характеристики для оценки эффективности теста используется площадь под ROC-кривой. Для расчета порогового значения, при превышении которого негативный результат теста меняется на позитивный, использовался метод Юдена. Индекс Юдена ( $J$ ) — один ключевой компонент ROC-анализа, определяет максимальную потенциальную эффективность биомаркера, определяется как  $J = \max_c \{Se(c) + Sp(c) - 1\}$ , где  $Se$  — чувствительность,  $Sp$  — специфичность при каждом выбранном пороговом значении ( $c$ ) на кривой ROC.



**Рис. 4.** Распределение и сравнение величины Т-клеточного ответа, выявляемого набором ТиграТест® SARS-CoV-2 у переболевших COVID-19 в зависимости от тяжести перенесенного заболевания. Ось ординат — количество пятен в лунке с 350000 МКПК. Ось абсцисс — наименование групп доноров. 1 — легкая форма COVID-19, при инфекции SARS-CoV-2, подтвержденной ПЦР, была определена при наличии следующих симптомов: повышение температуры тела ( $\leq 37,8$  °C) в течение не более 3 сут; боль в горле, заложенность носа или насморк, изменение/потеря обоняния, усталость; 2 — умеренная и тяжелая формы. Умеренная форма при подтверждении инфекции SARS-CoV-2 ПЦР была определена при наличии следующих симптомов: повышение температуры тела ( $>38$  °C) более 3 сут, лихорадка, усталость, боль в теле и мышцах, общее болезненное состояние. Тяжелая форма характеризовалась любыми из симптомов умеренной формы дополнительно к одышке, дискомфорту в грудной клетке, признакам гипоксии или диагностированной пневмонии с помощью компьютерной томографии. Для статистического анализа использовался тест Манна–Уитни (непараметрический, для групп с ненормальным распределением). \*  $p < 0,05$ .

**Fig. 4.** Distribution and comparison of the magnitude of the T-cell response detected by the TigratTest® SARS-CoV-2 kit in the COVID-19 patients, depending on the severity of the disease. Y-axis—spot number per well with 350000 PBMCs. X-axis—groups of donors. 1—mild COVID-19, with SARS-CoV-2 infection confirmed by PCR, was determined based on the following symptoms: an increase in body temperature ( $\leq 37.8$  °C) for no more than 3 days; sore throat, nasal congestion or runny nose, change/loss of smell, fatigue; 2—moderate and severe COVID-19. The moderate form, with SARS-CoV-2 infection confirmed by PCR, was determined based on the following symptoms: an increase in body temperature ( $>38$  °C) for more than 3 days, fever, fatigue, pain in the body and muscles, general sickliness. The severe form was characterised by any of the moderate symptoms in addition to shortness of breath, chest discomfort, signs of hypoxia, or computed tomography diagnosed pneumonia. The Mann–Whitney test (nonparametric, for groups with non-normal distribution) was used for statistical analysis. \*  $p < 0.05$ .

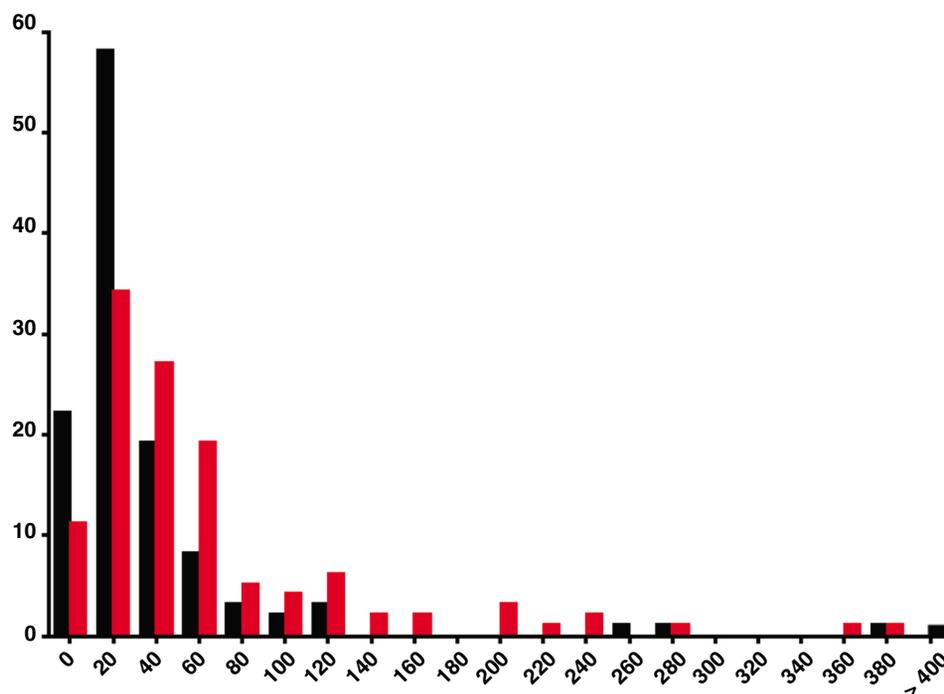
Пороговое значение, дающее максимальную величину  $J$ , считается оптимальным, поскольку оно оптимизирует дифференцирующую способность биомаркера в том случае, когда чувствительность и специфичность одинаково важны.

Результаты тестов ТиграТест® SARS-CoV-2 для данной выборки реконвалесцентов и условно здоровых добровольцев использовались для проведения анализа ROC (рис. 7). Пороговое значение 12 пятен в любой из лунок АГ1 или АГ2 за вычетом количества пятен в отрицательном контроле обеспечивает максимальное разделение двух когорт доноров. При выборе этого порогового значения чувствительность и специфичность теста по способности определять факт перенесенной инфекции SARS-CoV-2 составляют 92 и 89% соответственно.

Эти же данные, но с добавлением когорты условно здоровых доноров, заявлявших о близких или продолжительных контактах с больными COVID-19, были использованы для демонстрации полезности введения категории «пограничного результата» (рис. 8). Так, у 86% доноров в когорте с низким риском перенесенной инфекции SARS-CoV-2, не проявляющих никакой или имеющих низкий уровень реактивности на антигены SARS-CoV-2, было менее 10 пятен; менее 12 пятен было уже

у 89% субъектов этой когорты. В когорте с подтвержденной инфекцией SARS-CoV-2 60% реконвалесцентов имели результат теста более 35 пятен в лунке, а 27% пациентов в этой же когорте — результат теста с числом пятен в интервале от 13 до 35. Таким образом, в пограничной зоне от 10 до 12 пятен наблюдали наибольшее перекрытие когорт. Вследствие этого при получении такого «пограничного» результата рекомендовали повторить тест.

В целом наблюдалась хорошая сходимости положительных результатов теста ТиграТест® SARS-CoV-2 с подтвержденным диагнозом COVID-19. В группе из 48 добровольцев, состоящей из переболевших COVID-19 или предположительно инфицированных SARS-CoV-2 в прошлом, чей диагноз был подтвержден либо ПЦР, либо типичной симптоматикой и компьютерной томографией, либо серологическими методами (но без характерных клинических симптомов), при условии, что интервал между установлением диагноза и выполнением ТиграТест® SARS-CoV-2 составлял от 2 нед. до 9 мес., сходимость положительных результатов — 83,8% (40/48). Если из этой группы исключить добровольцев, чей диагноз был подтвержден только серологическими методами, но у кого типичная симптома-



**Рис. 5.** Распределение количества пятен, выявляемых тестом ТиграТест® SARS-CoV-2 у пациентов с положительным результатом теста. Показана относительная частота различного количества пятен. Ось абсцисс — количество пятен в лунке (на 350000 МКПК). ■ количество определенных пятен в панели антигенов АГ1 (пептиды S-белка) за вычетом пятен в лунке отрицательного контроля; ■ количество пятен в панели АГ2 (пептиды белков NMO: N, M, ORF3a, ORF7a) за вычетом пятен в лунке отрицательного контроля. Ось ординат — количество положительных тестов для данного значения количества пятен в лунке.

**Fig. 5.** Distribution of the number of spots detected by the Tigratest® SARS-CoV-2 kit in the patients with a positive test result. The figure shows the relative frequency of different numbers of spots. X-axis—the number of spots in the well (per 350000 PBMCs). ■ number of spots in the Ag1 antigen panel (S-protein peptides) minus the spots in the negative control well; ■ the number of spots in the Ag2 panel (peptides of NMO proteins: N, M, ORF3a, ORF7a) minus the spots in the negative control well. Y-axis—the number of positive tests for the number of spots in the well.

тика COVID-19 отсутствовала, сходимость составляла уже 93% (40/43). Сходимость достигала 97,6% (40/41), если дополнительно исключить переболевших COVID-19, у которых время между установлением диагноза и анализом с применением ТиграТест® SARS-CoV-2 было более 6 мес.

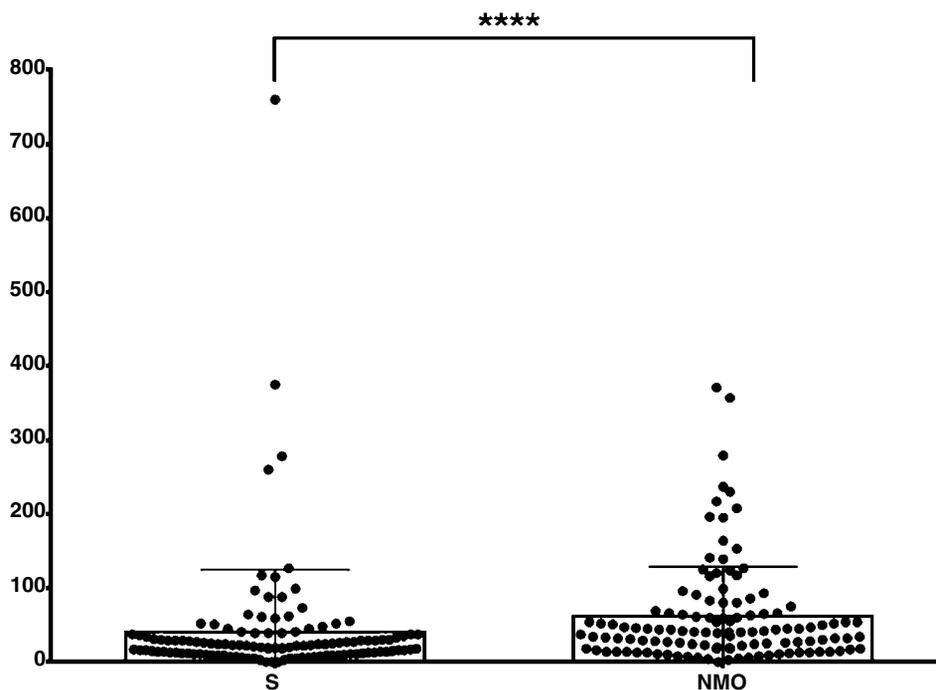
### Обсуждение

В то время как иммунная память является источником долгосрочного иммунитета к SARS-CoV-2, еще рано делать прямые выводы о его защитном потенциале, основываясь только на количественных оценках циркулирующих антител, В-клеток памяти, реактивных CD8<sup>+</sup> Т-клеток и CD4<sup>+</sup> Т-клеток, поскольку механизм действия защитного иммунитета против SARS-CoV-2 у людей недостаточно изучен. Тем не менее уже в настоящее время можно дать некоторые разумные интерпретации. Антитела — единственный компонент иммунной памяти, который может обеспечить действительно стерилизующий иммунитет. Например, исследования вакцин на приматах показали положительную корреляцию между титрами нейтрализующих вирус SARS-CoV-2 антител и дозами попадающего в верхние дыхательные пути вируса, от которых обеспечивается полная защита (стерилизующий иммунитет) [26]. Несмотря на это прямые сравнения клинических исследований вакцин не всегда возможны, поскольку анализы нейтрализующих антител не стандартизированы [27].

Помимо стерилизующего иммунитета, ограничение распространения SARS-CoV-2 только верхними дыхательными путями снизит тяжесть заболевания COVID-19 до «обычной простуды»

или бессимптомного заболевания. Достижение такого результата является основной целью применяемых и разрабатываемых вакцин против COVID-19. Такой результат потенциально может быть опосредован координированным действием CD4<sup>+</sup> Т-клеток, CD8<sup>+</sup> Т-клеток и В-клеток как эффекторных, так и клеток памяти, специфичных для антигенов коронавируса. Такое действие приводит к высокому уровню нейтрализующих антител, как было продемонстрировано для других вирусных инфекций [2, 28]. Наличие у пациента CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> Т-клеток, специфичных к SARS-CoV-2, связано с уменьшением тяжести заболевания COVID-19 при текущей инфекции, а быстрая сероконверсия ассоциируется со значительным снижением вирусной нагрузки при остром заболевании COVID-19 в течение 14 суток [4]. Данные наблюдения согласуются с гипотезой о том, что Т- и В-клетки памяти при повторной инфекции могут существенно ограничить распространение SARS-CoV-2 и/или снизить кумулятивную вирусную нагрузку, что приведет к значительному снижению тяжести заболевания COVID-19. Вероятность таких исходов будет определяться кинетикой инфекции, поскольку активация В- и Т-клеток памяти может занимать от 3 до 5 суток, чтобы успешно отреагировать на инфекцию. Учитывая относительно медленное течение тяжелой формы заболевания COVID-19 у людей, имеется большое временное окно для активации покоящихся отделов иммунной памяти, которые могут внести значимый вклад в защитный иммунитет против пневмонии, тяжелого или смертельного заболевания COVID-19.

При рассмотрении потенциальных связей между иммунной памятью и защитным иммунитетом важно учитывать до-



**Рис. 6.** Распределение и сравнение величины Т-клеточного ответа, выявляемого набором ТиграТест® SARS-CoV-2 у всех пациентов с положительным результатом теста, в зависимости от тестируемых антигенов. Ось ординат: количество пятен в лунке (на 350000 МКПК). Ось абсцисс: S — пептиды S-белка, NMO — пептиды белков N, M, ORF3a, ORF7a. Для статистического анализа использовался тест Манна–Уитни (непараметрический, для групп с ненормальным распределением). \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

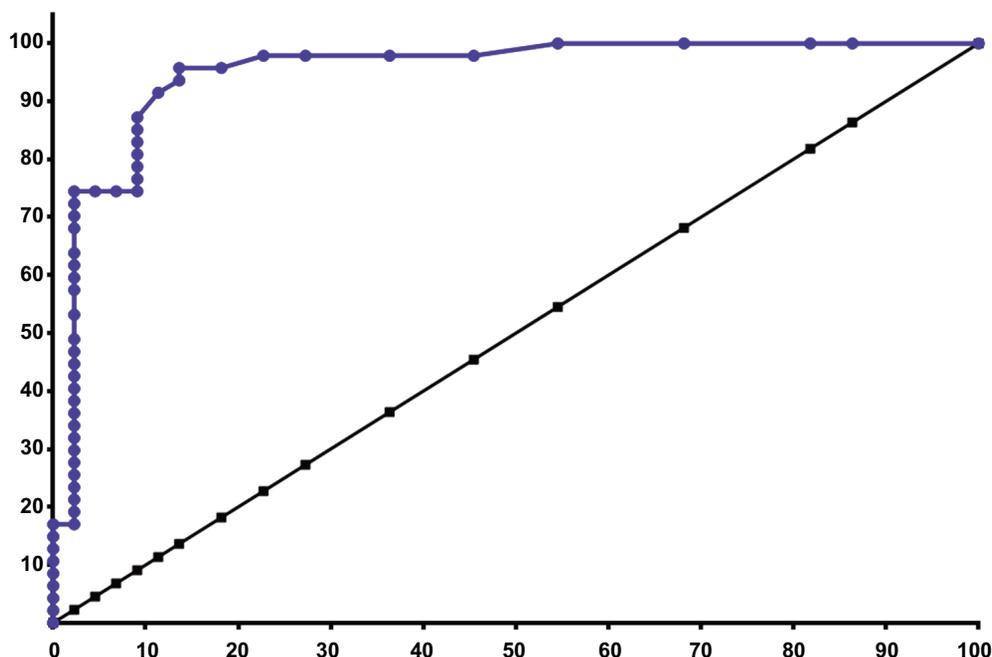
**Fig. 6.** Distribution and comparison of the magnitude of the T-cell response detected by the TиграТест® SARS-CoV-2 kit in all patients with a positive test result, depending on the antigens tested. Y-axis: number of spots in the well (per 350000 PBMCs). X-axis: S—peptides of S-protein, NMO—peptides of N, M, ORF3a, ORF7a proteins. The Mann–Whitney test (nonparametric, for groups with non-normal distribution) was used for statistical analysis. \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

ступные эпидемиологические данные. Уже можно считать задокументированным факт о том, что повторное инфицирование SARS-CoV-2 происходит [7, 8]. С увеличением возраста пациентов (>65 лет) вероятность повторного заражения достигает угрожающего значения [8]. Адаптивный иммунный ответ на повторное инфицирование коронавирусом отличается высокой степенью неоднородности. В результате неоднородности иммунного ответа можно ожидать, что по крайней мере часть инфицированной SARS-CoV-2 популяции с недостаточным уровнем иммунной памяти будет подвержена повторной инфекции [29].

За прошедший год выполнено множество исследований гуморального и клеточного ответа на COVID-19; также опубликованы результаты клинических исследований иммуногенности и эффективности нескольких вакцин. Если первые исследования были ограничены по выборке пациентов и времени наблюдения, то сейчас появляются работы [29], оценивающие многие компоненты иммунитета у переболевших в динамике на протяжении более 6 мес. В этих работах продемонстрировано, что если у переболевших COVID-19 уровень антител, в первую очередь нейтрализующих антител к SARS-CoV-2, был достаточно высоким после перенесенного заболевания, то он остается относительно стабильным в течение около полугода, хотя и имеет некоторую тенденцию к снижению. Поддержание достаточного для защиты от болезни уровня циркулирующих нейтрализующих антител в течение года или, тем более, нескольких лет, маловероятно. При этом уровень В-клеток памяти остается стабильным в перспективе на годы [30]. Количество специфичных для SARS-CoV-2 Т-клеток также ожидается снижается (в среднем снижение на 50% в течение полу-

года), с одновременным нарастанием и стабилизацией уровня Т-клеток памяти. В работе J. Zuo с соавт. [15] продемонстрировано, что устойчивый Т-клеточный иммунитет к SARS-CoV-2 поддерживается и через полгода после первичной инфекции. Важно, что показана положительная корреляция между устойчивым уровнем содержания Т-клеток памяти и изначальным уровнем вирусспецифических эффекторных Т-клеток [28]. Следовательно, ответ эффекторных Т-клеток на коронавирус, измеренный в первые 3–6 мес. после перенесенной инфекции или вакцинации (определенный, например, методом ELISPOT), будет коррелировать с уровнем долгоживущих Т-клеток иммунной памяти.

То, что определенный уровень эффекторных Т-клеток является защитным от инфекции SARS-CoV-2 даже у лиц с недетектируемыми антителами (серонегативными), было недавно установлено в исследовании британских ученых [16]. В цитируемом исследовании Т-клеточные тесты ELISPOT проводились у 2672 участников. Затем участники исследования наблюдались на предмет последующего развития симптоматической инфекции COVID-19, подтвержденной ПЦР. Ни у одного из серонегативных участников с высоким Т-клеточным ответом ( $n = 284$ ) в течение периода наблюдения не развилось симптоматической инфекции COVID-19, тогда как среди серонегативных участников с низким Т-клеточным ответом ( $n = 1913$ ) было 20 подтвержденных случаев инфекции. Исследователями планируется дальнейшее наблюдение, позволяющее проводить обновление данных анализов по мере роста числа случаев, что может помочь получить дополнительную информацию о риске заболевания. Авторами исследования [16] был определен численный порог реактивных в отношении пептидов SARS-CoV-2



**Рис. 7.** Кривая ROC (Receiver Operating Characteristic — операционная характеристическая кривая), созданная на основании валидационных данных 43 реконвалесценто с подтвержденной инфекцией SARS-CoV-2 (для определения чувствительности) и 44 условно здоровых людей с низким риском перенесенной инфекции (для определения специфичности). Ось абсцисс —  $(1-\text{специфичность}) \times 100$ , %. Ось ординат — чувствительность, %. Порог отсечения 12 пятен был определен методом Юдена, позволившем максимально отделить эти две когорты пациентов. Чувствительность — 92%, специфичность — 89%. Площадь под кривой (AUC) — 0,95. Доверительный интервал 0,9040–0,9968.

**Fig. 7.** Receiver Operating Characteristic (ROC) curve based on validation data for 43 convalescent patients with confirmed SARS-CoV-2 infection (sensitivity assessment) and 44 presumably healthy individuals with a low risk of previous infection (specificity assessment). X-axis— $(1-\text{specificity}) \times 100$ , %. Y-axis—sensitivity, %. The cut-off threshold of 12 spots was determined by the Youden method which allowed for maximum separation of the two patient cohorts. Sensitivity—92%, specificity—89%. Area under the curve (AUC)—0.95. Confidence interval: 0.9040–0.9968.

Т-клеток (более 12 на 250000 МКПК), который является защитным от симптоматического заболевания COVID-19.

Эти и дополнительные результаты на основе полученных данных позволяют выдвинуть следующие предположения.

1. Проведение только серологических исследований, без определения вирус-специфических Т-клеток, может привести к недооценке доли населения с более низким риском заболевания COVID-19 с выраженными симптомами.

2. Стратификация риска на индивидуальном уровне возможна с использованием Т-клеточных анализов.

3. Уровень Т-клеток, чувствительных к SARS-CoV-2, снижается с возрастом, и это может объяснять более высокую частоту и тяжесть заболевания в старшей возрастной группе.

Набор ТиграТест® SARS-CoV-2 (производства АО «ГЕНЕРИУМ») измеряет уровень содержания эффекторных Т-клеток, специфичных к 5 белкам SARS-CoV-2, являющихся наиболее частыми мишенями Т-клеточного ответа.

В настоящей работе продемонстрированы результаты апробации набора ТиграТест® SARS-CoV-2, проведенной на достаточно убедительной выборке добровольцев, как условно здоровых (контактировавших и неконтактировавших с больными COVID-19), так и перенесших подтвержденное лабораторными методами заболевание COVID-19, что позволило установить рабочие характеристики набора, подтверждающие чувствительность, специфичность и воспроизводимость результатов оценки Т-клеточного иммунитета в отношении SARS-CoV-2.

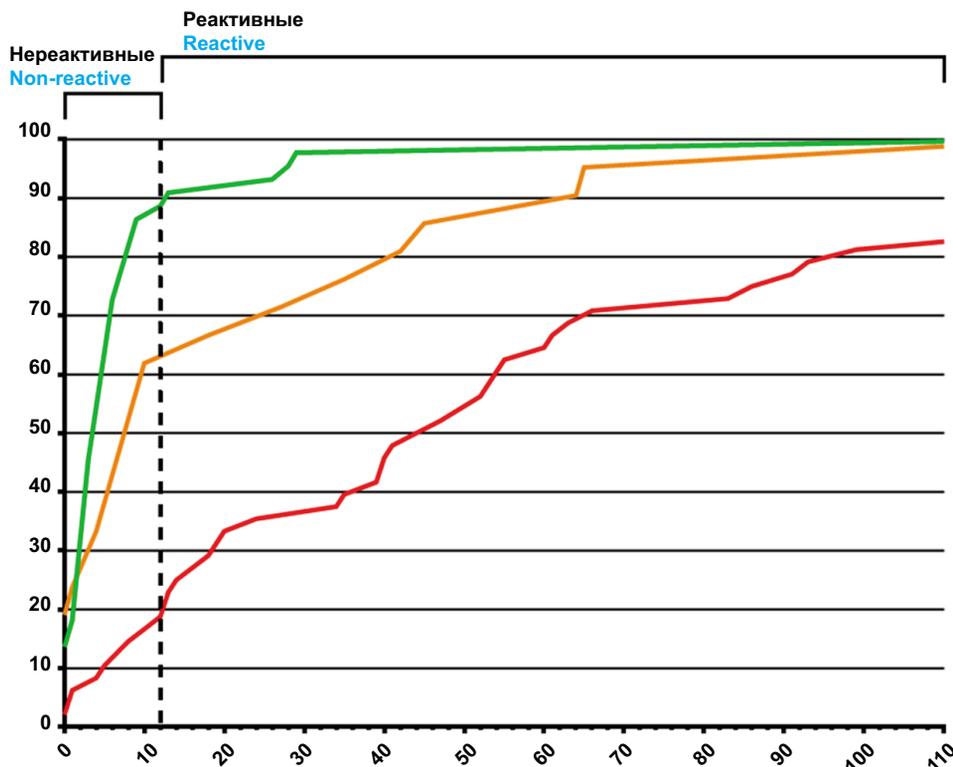
Подавляющее большинство результатов теста ТиграТест® SARS-CoV-2 были либо положительными, либо отрицатель-

ными. Небольшой процент результатов теста может быть пограничным (сомнительным), где большее из значений «панель АГ1 минус нулевой контроль» или «панель АГ2 минус нулевой контроль» составляет 10–12 пятен. Пограничная категория предназначена для снижения вероятности ложноположительных или ложноотрицательных результатов около пороговой точки теста ТиграТест® SARS-CoV-2. В отличие от неопределенного или недействительного результата, пограничный результат поддается клинической интерпретации и должен сопровождаться повторным тестированием, поскольку значительная часть людей может получить положительный результат при повторном тестировании. Это показано, например, для IGRA-ELISPOT тестов на туберкулезную инфекцию. В исследовании, проведенном в США, 23% субъектов с пограничным результатом теста повторно имели положительный результат, что свидетельствует о том, что пограничная категория полезна для увеличения чувствительности теста<sup>2</sup>.

Следует отметить, что определенные в нашем исследовании чувствительность и специфичность теста нуждаются в уточнении в последующих клинико-лабораторных исследованиях, в которых когорты пациентов будут контролировать более строго на предмет перенесенной ранее инфекции SARS-CoV-2. С другой стороны, было показано, что Т-клеточный ответ формируется не у всех переболевших COVID-19 [24], поэтому истинная чувствительность теста может быть выше номинально определенной здесь.

При подборе пептидов, антигенов SARS-CoV-2, служащих стимулами для активации Т-клеток, встал вопрос о сте-

<sup>2</sup> <https://www.tspot.com/uk/resources/frequently-asked-questions/>



**Рис. 8.** Кумулятивное распределение количества пятен, выявленных анализом ТиграТест® SARS-CoV-2, с наложением порога отсечения для интерпретации результата теста (пунктирная линия, >12 пятен). — условно здоровые доноры, отрицающие перенесенное заболевание COVID-19. — лица, перенесшие заболевание COVID-19, подтвержденное лабораторными или клиническими методами. — условно здоровые доноры, заявляющие о близком или продолжительном контакте с больным COVID-19. Ось ординат — относительная частота, %. Ось абсцисс — количество пятен в лунке (на 350000 МКПК). График обрезан по оси абсцисс после 110 пятен.

**Fig. 8.** Cumulative distribution of the number of spots detected by the TigratTest® SARS-CoV-2 kit with an overlaid cut-off threshold for interpreting the test result (dashed line, >12 spots). — presumably healthy donors who claim no COVID-19 in the past. — previous SARS-CoV-2 infection or COVID-19 disease, confirmed by laboratory or clinical methods. — presumably healthy donors who claim a close or long-term contact with a COVID-19 patient. Y-axis—relative frequency, %. X-axis—the number of spots in the well (per 350000 PBMCs). The plot is cropped on the X-axis after 110 spots.

пени покрытия аминокислотной последовательности каждой из выбранных белковых мишеней. С одной стороны, наиболее полное покрытие теоретически поможет повысить чувствительность теста. В условиях ограниченного знания о мишенях Т-клеточного ответа на какой-либо патоген распространена практика создания 15-мерных синтетических пептидов, покрывающих 100% аминокислотной последовательности белка-антигена, причем каждый пептид на 10 аминокислотных остатков перекрывается со следующим [23]. Но при разработке набора ТиграТест® SARS-CoV-2 мы отказались от такого подхода, поскольку 100% покрытие всей последовательности выбранных белков или даже всех идентифицированных Т-клеточных эпитопов привело бы к значительному снижению специфичности теста, поскольку в таком случае выявлялись бы Т-клеточные ответы на простудные коронавирусы штаммов HKU1, 229E, OC43, NL63 [23]. Согласно нашим неопубликованным данным (материалы готовятся к публикации) Т-клеточный ответ на антигены простудных коронавирусов детектируется методом IGRA-ELISPOT у подавляющего большинства исследованных добровольцев, в частности, и у всех тех, у которых результат ТиграТест® SARS-CoV-2 был отрицательным. Следовательно, мы можем говорить о специфичности и отсутствии кросс-реактивности ТиграТест® SARS-CoV-2 с Т-клетками, специфичными для простудных коронавирусов. С другой стороны, уже были опубликованы работы, идентифицирующие репертуар Т-клеточных эпитопов у переболевших

COVID-19, более того, были найдены эпитопы, встречающиеся практически у всех перенесших инфекцию SARS-CoV-2. Поэтому для повышения специфичности набора мы исключили пептиды, обладающие перекрестной специфичностью в отношении простудных коронавирусов, которыми переболели более 70% населения [6]. В состав пептидов, представляющих мишени TCR Т-клеток, были включены только те эпитопы, которые встречаются у подавляющего большинства переболевших COVID-19. Включение такого ограниченного набора пептидов позволило также оставить себестоимость набора ТиграТест® SARS-CoV-2 на приемлемом уровне и сделать его достаточно доступным для клинико-диагностических лабораторий. Поскольку Т-клеточный ответ на SARS-CoV-2 распространяется на большое количество разных эпитопов более чем одного вирусного белка, такое пептидное покрытие с гарантией детектирует репертуар Т-клеточного ответа как CD8<sup>+</sup> эфektorных, так и CD4<sup>+</sup> хелперных Т-клеток. В доказательство этого можно привести работу А. Р. Ferretti и соавт. [31], в которой авторы идентифицировали набор из 29 эпитопов, в отношении которых развивается Т-клеточный ответ у практически всех переболевших COVID-19. Важно то, что эти эпитопы соответствуют 6 наиболее часто встречающимся аллелям HLA (главного комплекса гистосовместимости). Около 90% населения США и около 85% мирового населения несет хотя бы один из этих 6 аллелей. Вероятность встречаемости хотя бы одного из этих аллелей в популяции Российской Федерации

более 90%<sup>3</sup>. В набор ТиграТест® SARS-CoV-2 входят такие же и несколько дополнительных пептидов, соответствующих эпитопам TCR, распознаваемых каждым из 6 основных аллелей HLA. Остальные пептиды в наборе соответствуют более редким в популяции аллелям. Все это дает основание полагать, что набор ТиграТест® SARS-CoV-2 обладает высокой специфичностью и достаточной чувствительностью для детекции Т-клеточного ответа на коронавирус SARS-CoV-2.

Передовой зарубежный опыт указывает на важность использования Т-клеточных тестов в борьбе с COVID-19. В ноябре 2020 г. британская рабочая группа по вакцинам (орган, созданный правительством Великобритании для оценки пригодности вакцин для использования среди населения Великобритании) сделала обязательным выявление специфических Т-клеточных ответов на SARS-CoV-2 методом IGRA-ELISPOT при испытаниях любых новых вакцин против COVID-19. Данная рабочая группа заявляет, что «понимание роли Т-клеток в борьбе с SARS-CoV-2 признается все более; определение наличия и величины любого ответа Т-клеток может дать дополнительную информацию к той, которую дают серологические исследования»<sup>4</sup>. Мы полагаем, что вакцины, стимулирующие только гуморальный иммунитет, могут быть недостаточно эффективны против нового коронавируса, особенно с точки зрения долговременной защиты.

Для того чтобы раскрыть истинный потенциал клинического применения набора ТиграТест® SARS-CoV-2, нужно не просто определять наличие Т-клеток, специфичных к SARS-CoV-2, а установить их количественный порог, для которого будет убедительно доказано, что он является защитным от инфекции или тяжелого течения заболевания. Это задача для будущих наблюдательных клинических исследований.

Количественное значение защитного уровня Т-клеток, определяемое одним набором ELISPOT, нельзя прямо экстраполировать на другой набор. Для того чтобы набор ТиграТест® SARS-CoV-2 трансформировался из полуколичественного инструмента, определяющего наличие или отсутствие специфических для SARS-CoV-2 Т-клеток, в прогностический, определяющий уровень иммунной защиты от симптоматической инфекции COVID-19, необходимо проведение клинико-лабораторных исследований. После этого набор ТиграТест® SARS-CoV-2 может стать высокоэффективным инструментом для исследования популяционного иммунитета и выявлению защищенных групп населения и людей, находящихся в зоне риска.

В настоящий момент мы начинаем клинико-лабораторное исследование на большой группе добровольцев, чтобы ответить на вопрос, может ли определенный уровень специфических Т-клеток (или комбинация уровня антител и Т-клеток), наблюдаемый в течение 3–6 месяцев, быть надежным маркером иммунитета, защищающего от симптоматической инфекции, пневмонии или тяжелого течения COVID-19 в течение периода наблюдения. Каков этот уровень, количественно определяемый в тесте ТиграТест® SARS-CoV-2 и выраженный в количестве пятен на 1 млн мононуклеарных периферических клеток крови. Если удастся с большой степенью надежности ответить на эти вопросы, то набор ТиграТест® SARS-CoV-2 станет действительно мощным прогностическим инструментом.

Мы также полагаем, что методика IGRA-ELISPOT и стандартизованные наборы, подобные ТиграТест® SARS-CoV-2, оценивающие наличие Т-клеточной компоненты иммунитета, помо-

гут в выработке стратегии вакцинации переболевших COVID-19 и бустирования иммунитета ранее вакцинированных.

## Заключение

Разработана и апробирована тест-система для выполнения стандартизованной методики определения специфических к антигенам SARS-CoV-2 Т-клеток в периферической крови человека *in vitro*. Определены рабочие характеристики теста: референсное значение, отделяющее положительный и отрицательный результат теста, равное 12 пятнам в лунке с антигенами за вычетом отрицательного контроля; специфичность и чувствительность теста к выявлению перенесенной инфекции SARS-CoV-2 определены как 92 и 89% соответственно; сходимость теста с предшествующими результатами ПЦП тестирования на SARS-CoV-2 достигала 97,6%. Среднее значение уровня Т-клеточного ответа у переболевших COVID-19 ниже, чем у вакцинированных Гам-КОВИД-Вак добровольцев. Показано, что степень выраженности Т-клеточного ответа положительно коррелирует с тяжестью перенесенного заболевания. S-белок не является иммунодоминантной мишенью для Т-клеточного ответа.

Созданный тест на основе метода IGRA ELISPOT может специфично и воспроизводимо определять Т-клеточный ответ у перенесших инфекцию SARS-CoV-2 или вакцинированных.

**Вклад авторов.** Д. А. Потеряев — разработка дизайна набора ТиграТест® SARS-CoV-2, анализ литературы и биоинформатический анализ Т-клеточных эпитопов антигенов SARS-CoV-2, написание текста статьи; С. Г. Аббасова — разработка протокола выполнения анализа ELISPOT, критическое обсуждение текста статьи; П. Е. Игнатьева — оптимизация и выполнение анализа ELISPOT; О. М. Стрижакова — оптимизация и выполнение анализа ELISPOT; С. В. Колесник — оптимизация анализа ELISPOT, организация сбора биологических материалов, критическое обсуждение текста статьи; Р. А. Хамитов — критическое обсуждение, утверждение окончательной версии статьи для публикации.

**Authors' contributions.** Dmitry A. Poteryaev—developed the design of the TigratTest® SARS-CoV-2 kit, performed bioinformatic and literature analysis of T-cell epitopes of SARS-CoV-2 antigens, and wrote the paper; Svetlana G. Abbasova—developed the ELISPOT protocol, and reviewed the paper; Polina E. Ignatyeva—optimized and performed the ELISPOT analysis; Olga M. Strizhakova—optimized and performed the ELISPOT analysis; Svetlana V. Kolesnik — optimized the ELISPOT analysis, organized the collection of biological specimens, reviewed the paper; Ravil A. Khamitov—reviewed and edited the paper.

**Благодарности.** Авторы благодарны коллективу группы компаний «ГЕНЕРИУМ» за помощь в организации работы. Набор для исследовательских целей ТиграТест® SARS-CoV-2 разработан ООО «МБЦ «ГЕНЕРИУМ» в рамках контракта на выполнение НИР с АО «ГЕНЕРИУМ».

**Acknowledgements.** The authors are grateful to the Genierium group of companies for help in organising this study. The TigratTest® SARS-CoV-2 kit was developed by IBC GENERIUM, LLC under an R&D contract with GENERIUM, JSC.

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

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

<sup>3</sup> [http://www.allelefrequencies.net/hla6006a.asp?hla\\_population=3322](http://www.allelefrequencies.net/hla6006a.asp?hla_population=3322)

<sup>4</sup> <https://www.globenewswire.com/news-release/2020/10/22/2112577/0/en/UK-Vaccines-Taskforce-has-Selected-Oxford-Immunitec-as-the-Sole-Supplier-of-T-cell-Testing-for-SARS-CoV-2-Specific-Responses-in-New-COVID-Vaccine-Trials.html>

## Литература/References

- Melgaço JG, Azamor T, Ano Bom APD. Protective immunity after COVID-19 has been questioned: What can we do without SARS-CoV-2-IgG detection? *Cell Immunol.* 2020;353:104114. <http://doi.org/10.1016/j.cellimm.2020.104114>
- Altmann DM, Boyton RJ. SARS-CoV-2 T cell immunity: specificity, function, durability, and role in protection. *Science Immunology.* 2020;5(49):eabd6160. <http://doi.org/10.1126/sciimmunol.abd6160>
- Peng Y, Mentzer AJ, Liu G, Yao X, Yin Z, Dong D, et al. Broad and strong memory CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19. *Nat Immunol.* 2020;21(11):1336–45. <http://doi.org/10.1038/s41590-020-0782-6>
- Swadling L, Maini MK. T cells in COVID-19 — united in diversity. *Nat Immunol.* 2020;21(11):1307–8. <http://doi.org/10.1038/s41590-020-0798-y>
- Weiskopf D, Schmitz KS, Raadsen MP, Grifoni A, Okba NM, Endeman H, et al. Phenotype and kinetics of SARS-CoV-2-specific T cells in COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome. *Sci Immunol.* 2020;5(48):eabd2071. <http://doi.org/10.1126/sciimmunol.abd2071>
- Woldemeskel BA, Kwaa AK, Garliss CC, Laeyendecker O, Ray SC, Blankson JN. Healthy donor T cell responses to common cold coronaviruses and SARS-CoV-2. *J Clin Invest.* 2020;130(12):6631–8. <http://doi.org/10.1172/JCI143120>
- Dos Santos LA, Filho PGG, Silva AMF, Santos JVG, Santos DS, Aquino MM, et al. Recurrent COVID-19 including evidence of reinfection and enhanced severity in thirty Brazilian healthcare workers. *J Infect.* 2021;82(3):399–406. <http://doi.org/10.1016/j.jinf.2021.01.020>
- Boyton RJ, Altmann DM. Risk of SARS-CoV-2 reinfection after natural infection. *Lancet.* 2021;397(10280):1161–3. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00662-0](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00662-0)
- Hansen CH, Michlmayr D, Gubbels SM, Mølbak K, Ethelberg S. Assessment of protection against reinfection with SARS-CoV-2 among 4 million PCR-tested individuals in Denmark in 2020: a population-level observational study. *Lancet.* 2021;397(10280):1204–12. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00575-4](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00575-4)
- Tan W, Lu Y, Zhang J, Wang J, Dan Y, Tan Z, et al. Viral kinetics and antibody responses in patients with COVID-19. *MedRxiv.* 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.03.24.20042382>
- Gallais F, Velay A, Nazon C, Wendling M-J, Partisani M, Sibilia J, et al. Intrafamilial exposure to SARS-CoV-2 associated with cellular immune response without seroconversion, France. *Emerg. Infect. Diseases.* 2021;27(1):113–21. <https://doi.org/10.3201/eid2701.203611>
- Channappanavar R, Zhao J, Perlman S. T cell-mediated immune response to respiratory coronaviruses. *Immunol Res.* 2014;59(1-3):118–28. <https://doi.org/10.1007/s12026-014-8534-z>
- Ibarrondo FJ, Fulcher JA, Goodman-Meza D, Elliott J, Hofmann C, Hausner MA, et al. Rapid decay of anti-SARS-CoV-2 antibodies in persons with mild Covid-19. *N Engl J Med.* 2020;383(11):1085–7. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2025179> Erratum in: *N Engl J Med.* 2020; 383(11):e74. <https://doi.org/10.1056/NEJMx200017>
- Tay MZ, Poh CM, Rénia L, MacAry PA, Ng LF. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat Rev Immunol.* 2020;20(6):363–74. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0311-8>
- Zuo J, Dowell AC, Pearce H, Verma K, Long HM, Begum J, et al. Robust SARS-CoV-2-specific T cell immunity is maintained at 6 months following primary infection. *Nat Immunol.* 2021;22(5):620–6. <https://doi.org/10.1038/s41590-021-00902-8>
- Wyllie D, Jones HE, Mulchandani R, Trickey A, Taylor-Phillips S, Brooks T, et al. SARS-CoV-2 responsive T cell numbers and anti-Spike IgG levels are both associated with protection from COVID-19: a prospective cohort study in keyworkers. *medRxiv.* 2020.11.02.20222778. <https://doi.org/10.1101/2020.11.02.20222778>
- Mandalakas AM, Highsmith HY, Harris NM, Pawlicka A, Kirchner HL. T-SPOT.TB performance in routine pediatric practice in a low TB burden setting. *Pediatr Infect Dis J.* 2018;37(4):292–7. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000001792>
- Потеряев ДА, Хамитов РА, Ефимов ГА, Шустер АМ. Перспективы использования технологической платформы ELISPOT в системе противозидемической мероприятий против новой коронавирусной инфекции COVID-19. *БИОпрепараты Профилактика, диагностика, лечение.* 2020;20(3):146–58. [Poteryaev DA, Khamitov RA, Efimov GA, Shuster AM. Prospects for using the ELISPOT technological platform as part of anti-epidemic measures against the new coronavirus infection COVID-19. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2020;20(3):146–58 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-3-146-158>
- Mallone R, Mannering S, Brooks-Worrell BM, Durinovic-Belló I, Cilio CM, Wong FS, et al. Isolation and preservation of peripheral blood mononuclear cells for analysis of islet antigen-reactive T cell responses: position statement of the T-Cell Workshop Committee of the Immunology of Diabetes Society. *Clin Exp Immunol.* 2011;163(1):33–49. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2010.04272.x>
- Sekine T, Perez-Potti A, Rivera-Ballesteros O, Strálin K, Gorin JB, Olsson A, et al. Robust T cell immunity in convalescent individuals with asymptomatic or mild COVID-19. *Cell.* 2020;183(1):158–68.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.017>
- Shomuradova AS, Vagida MS, Sheetikov SA, Zornikova KV, Kiryukhin D, Titov A, et al. SARS-CoV-2 epitopes are recognized by a public and diverse repertoire of human T cell receptors. *Immunity.* 2020;53(6):1245–57.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.11.004>
- Le Bert N, Tan AT, Kunasegaran K, Tham CYL, Hafezi M, Chia A, et al. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. *Nature.* 2020;584(7821):457–62. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2550-z>
- Mateus J, Grifoni A, Tarke A, Sidney J, Ramirez SI, Dan JM, et al. Selective and cross-reactive SARS-CoV-2 T cell epitopes in unexposed humans. *Science.* 2020;370(6512):89–94. <https://doi.org/10.1126/science.abd3871>
- Reynolds CJ, Swadling L, Gibbons JM, Pade C, Jensen MP, Diniz MO, et al. Discordant neutralizing antibody and T cell responses in asymptomatic and mild SARS-CoV-2 infection. *Sci Immunol.* 2020;5(54):eabf3698. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abf3698>
- Nolan S, Vignali M, Klinger M, Dines JN, Kaplan IM, Svejnova E, et al. A large-scale database of T-cell receptor beta (TCRβ) sequences and binding associations from natural and synthetic exposure to SARS-CoV-2. 2020. Preprint. *Res Sq.* 2020;rs.3.rs-51964. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-51964/v1>
- Yu J, Tostanoski LH, Peter L, Mercado NB, McMahan K, Mahrokhian SH, et al. DNA vaccine protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. *Science.* 2020;369(6505):806–11. <https://doi.org/10.1126/science.abc6284>
- 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)
- Todryk SM, Pathan AA, Keating S, Porter DW, Berthoud T, Thompson F, et al. The relationship between human effector and memory T cells measured by ex vivo and cultured

- ELISPOT following recent and distal priming. *Immunology*. 2009;128(1):83–91. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03073.x>
29. Dan JM, Mateus J, Kato Y, Hastie KM, Yu ED, Faliti CE, et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science*. 2021;371(6529):eabf4063. <https://doi.org/10.1126/science.abf4063>
30. Bauer T, Jilg W. Hepatitis B surface antigen-specific T and B cell memory in individuals who had lost protective antibodies after hepatitis B vaccination. *Vaccine*. 2006;24(5):572–7. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.08.058>
31. Ferretti AP, Kula T, Wang Y, Nguyen DMV, Weinheimer A, Dunlap GS, et al. Unbiased screens show CD8+ T cells of COVID-19 patients recognize shared epitopes in SARS-CoV-2 that largely reside outside the spike protein. *Immunity*. 2020;53(5):1095–107.e3. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.10.006>

## Об авторах / Authors

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

**Аббасова Светлана Георгиевна**, д-р биол. наук. *Svetlana G. Abbasova*, Dr. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5841-7587>

**Игнатъева Полина Евгеньевна**. *Polina E. Ignatyeva*

**Стрижакова Ольга Михайловна**, канд. вет. наук. *Olga M. Strizhakova*, Cand. Sci. (Vet.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0023-0028>

**Колесник Светлана Владимировна**. *Svetlana V. Kolesnik*. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2398-4615>

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

Поступила 28.05.2021  
После доработки 26.07.2021  
Принята к печати 03.09.2021

Received 28 May 2021  
Revised 26 July 2021  
Accepted 3 September 2021

## Актуальная информация

### Клинические исследования Всемирной организации здравоохранения новых препаратов против COVID-19

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) объявила о начале следующего этапа организованного исследования Solidarity – Solidarity PLUS<sup>1</sup>. Исследование будет проводиться с участием госпитализированных пациентов для испытания эффективности новых препаратов против новой коронавирусной инфекции COVID-19 в условиях стационара. Препараты (артесунат, иматиниб, инфликсимаб) отобраны независимой экспертной комиссией с учетом их потенциальной способности снижать риск летальных исходов у пациентов, госпитализированных с COVID-19.

Исследование Solidarity PLUS служит платформой для беспрецедентно широкого международного сотрудничества между государствами-членами ВОЗ. В нем участвуют тысячи исследователей из более 600 стационарных медицинских учреждений 52 стран (что на 16 стран больше, чем на первом этапе исследований). Это позволяет в ходе испытаний на основе единого протокола оценивать сразу несколько лекарственных средств, привлекая тысячи пациентов и тем самым получая достоверные данные о потенциальном (даже незначительном) воздействии препарата на показатели смертности, а также включать новые препараты в испытания и прекращать дальнейшее изучение неэффективных лекарственных средств.

Благодаря исследованию Solidarity PLUS у исследователей всего мира появляется возможность задействовать свой экспертный опыт и ресурсы в глобальных исследованиях по проблеме COVID-19.

<sup>1</sup> <https://www.who.int/ru/news/item/11-08-2021-who-s-solidarity-clinical-trial-enters-a-new-phase-with-three-new-candidate-drugs>