

# АЛГОРИТМ ОЦЕНКИ УРОВНЯ Т-КЛЕТОЧНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА ПРОТИВ SARS-CoV-2 И РЕЗУЛЬТАТЫ ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ У НЕВАКЦИНИРОВАННЫХ И ВАКЦИНИРОВАННЫХ ЛЮДЕЙ, ПЕРЕБОЛЕВШИХ COVID-19



М.С. Бляхер, И.М. Федорова, С.И. Котелева, И.В. Капустин, Е.А. Тульская,  
З.К. Рамазанова, Е.Е. Одинцов, С.В. Сандалова, Л.И. Новикова, С.С. Бочкарева

ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского  
Роспотребнадзора, Москва, Россия

**Резюме.** Проведено сравнение активности антиген (АГ)-специфических Т-клеток у двух групп пациентов: с ПЦР-подтвержденным диагнозом «COVID-19» в 2021 г. в период циркуляции штамма дельта вируса SARS-CoV-2 (49 человек), и в 2022 г. (26 человек, штамм омикрон). 26 человек после COVID-19, вызванного SARS-CoV-2 (омикрон), являлись частью группы из 41 добровольца, которые в течение 2021–2023 гг. обследовались многократно: в ходе вакцинации, после нее, перед ревакцинацией и впоследствии после заболевания (всего 6–8 раз). Благодаря этому было возможно сравнение показателей специфического гуморального и клеточного иммунитета у одних и тех же пациентов за 1–2 месяца до прорывной инфекции и после нее. Выявление АГ-специфических Т-клеток и оценка их активности по АГ-стимулированной продукции IFN $\gamma$ , было проведено собственным разработанным ранее методом (Патент RU № 2780369 С1). Для стимуляции Т-эффекторов памяти *in vitro* были применены те же антигены, которые использовались для определения концентрации антител против SARS-CoV-2 методом ИФА. Всего проанализировано около 300 образцов крови здоровых людей и пациентов после COVID-19. Каждый образец протестирован на 3 вариантах антигенов SARS-CoV-2 и в 2 режимах стимуляции. Предложен алгоритм качественной оценки для активности АГ-специфических Т-клеток, который может быть использован для мониторинга состояния клеточного иммунитета в популяции, в которой продолжается циркуляция вируса SARS-CoV-2, и создания представлений о том, какой уровень Т-клеточной активации достаточен для предупреждения или снижения тяжести инфекции SARS-CoV-2. У непривитых лиц, перенесших COVID-19 (SARS-CoV-2, дельта), отсутствовали АГ-специфические Т-клетки к RBD SARS-CoV-2, но специфичность Т-клеток к полноразмерному S-гликопротеину на одном и том же уровне, качественно оцененном как низкий, у 52% группы сохранялась до полугода. У привитых, ранее

**Адрес для переписки:**

Федорова Ирина Михайловна  
125212, Россия, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10,  
ФБУН Московский научно-исследовательский институт  
эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского  
Роспотребнадзора.  
Тел.: 8 (903) 107-60-67. Факс: 8 (495) 452-18-30.  
E-mail: vestnik-07@mail.ru

**Contacts:**

Irina M. Fedorova  
125212, Russian Federation, Moscow, Admiral Makarov str., 10,  
G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology  
and Microbiology.  
Phone: +7 (903) 107-60-67. Fax: +7 (495) 452-18-30.  
E-mail: vestnik-07@mail.ru

**Для цитирования:**

Бляхер М.С., Федорова И.М., Котелева С.И., Капустин И.В.,  
Тульская Е.А., Рамазанова З.К., Одинцов Е.Е., Сандалова С.В.,  
Новикова Л.И., Бочкарева С.С. Алгоритм оценки уровня Т-клеточного  
иммунного ответа против SARS-CoV-2 и результаты его применения  
у невакцинированных и вакцинированных людей, переболевших  
COVID-19 // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 3. С. 451–458.  
doi: 10.15789/2220-7619-AFA-16736

**Citation:**

Blyakher M.S., Fedorova I.M., Koteleva S.I., Kapustin I.V., Tulskeya E.A.,  
Ramazanova Z.K., Odintsov E.E., Sandalova S.V., Novikova L.I.,  
Bochkareva S.S. Algorithm for assessing the level of T cell immune response  
against SARS-CoV-2 and the results of its application in unvaccinated and  
vaccinated people who have been infected with COVID-19 // Russian Journal  
of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 3,  
pp. 451–458. doi: 10.15789/2220-7619-AFA-16736

не болевших COVID-19, такая длительность сохранения АГ-специфических Т-клеток в циркулирующей крови достигается только после ревакцинации. Гибридный иммунитет, прослеженный нами как результат вакцинации после COVID-19 (штамм дельта) или как прорывная инфекция (SARS-CoV-2, омикрон), характеризуются наиболее высокими показателями активности Т-клеток памяти (у 43–46% группы — нормальная активность АГ-специфических клеток, у 30–43% — высокая) ко всем использованным антигенам и наибольшей длительностью сохранения показателей на этом уровне. Дальнейшее исследование уровня противовирусного иммунитета после COVID-19 может быть важным для прогнозирования исходов новых волн инфекции SARS-CoV-2.

**Ключевые слова:** SARS-CoV-2, Т-клетки памяти, IFN $\gamma$ , алгоритм оценки.

## ALGORITHM FOR ASSESSING THE LEVEL OF T CELL IMMUNE RESPONSE AGAINST SARS-CoV-2 AND THE RESULTS OF ITS APPLICATION IN UNVACCINATED AND VACCINATED PEOPLE WHO HAVE BEEN INFECTED WITH COVID-19

Blyakher M.S., Fedorova I.M., Koteleva S.I., Kapustin I.V., Tulskaia E.A., Ramazanov Z.K., Odintsov E.E., Sandalova S.V., Novikova L.I., Bochkareva S.S.

G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

**Abstract.** Antigen (AG)-specific T cell activity was compared in two groups of patients: those who underwent COVID-19 in 2021 during the circulation of the SARS-CoV-2 delta virus strain (43 individuals); and those who underwent COVID-19 in 2022 (Omicron strain, 23 individuals). The diagnosis was confirmed by PCR analysis of nasopharyngeal and oropharyngeal swabs. The 23 individuals following COVID-19 caused by SARS-CoV-2 (omicron) were part of a cohort of 41 volunteers who were examined multiple times during 2021–2023: during vaccination, after vaccination, before revaccination, and subsequently after illness (6–8 times in total). Due to this, it was possible to compare the indices of specific humoral and cellular immunity in the same patients 1–2 months before and after breakthrough infection. Detection of AG-specific T cells and assessment of their activity by AG-stimulated IFN $\gamma$  production was carried out by our own previously developed method (Patent RU № 2780369 C1). For stimulation of memory T effectors *in vitro*, the same antigens were used to determine the concentration of antibodies against SARS-CoV-2 by ELISA method. A total of about 300 blood samples from healthy subjects and patients after COVID-19 were analyzed. Each sample was tested against 3 SARS-CoV-2 antigens and in 2 stimulation modes. A qualitative assessment algorithm for AG-specific T cell activity has been proposed that can be used to monitor the state of cellular immunity in a population in which SARS-CoV-2 virus continues to circulate and to create insights into what level of T cell activation is sufficient to prevent or reduce the severity of SARS-CoV-2 infection. Unvaccinated COVID-19 (SARS-CoV-2, Delta) survivors lacked AG-specific T cells to RBD SARS-CoV-2, but T cell specificity to full-length S glycoprotein at the same level, qualitatively assessed as low in 52% of the group, persisted for up to six months. In previously unvaccinated COVID-19 vaccinees, this duration of persistence of AG-specific T cells in circulating blood was achieved only after revaccination. Hybrid immunity, which we traced as a result of vaccination after COVID-19 (Delta strain) or as a breakthrough infection (SARS-CoV-2, Omicron), is characterized by the highest indices of memory T cell activity (43–46% of the group — normal activity of AG-specific cells, 30–43% — high activity) to all used antigens and the longest duration of preservation of indices at this level. Further investigation of the level of antiviral immunity after COVID-19 may be important for predicting the outcome of new waves of SARS-CoV-2 infection.

**Key words:** SARS-CoV-2, T-cell memory, IFN $\gamma$ , algorithm for assessing.

## Введение

В течение 2022–2024 гг. в научной литературе появилось немало оригинальных статей и обзоров с анализом того, способны ли антитела и Т-клетки, выработанные после вакцинации или заболевания, вызванного уханьским, альфа-, бета- или дельта-штаммом SARS-CoV-2, осуществлять защиту против штамма омикрон и более поздних штаммов. Показано, что после COVID-19 (омикрон), повышается активность Т-клеток памяти как к эпитопам омикрон-штамма так и к эпитопам вакцинного штамма [7]. SARS-CoV-2 spike-специфические CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетки, индуцированные пред-

шествующей инфекцией или вакцинацией BNT162b2, обеспечивают обширный иммунный охват против B.1.1.529 (омикрон) [9]. По уровню антиген-стимулированной продукции IFN $\gamma$ , IL-2 и TNF $\alpha$  показано, что кросс-реактивные CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетки с одинаковой силой реагируют на штаммы бета, дельта и омикрон [11].

Теперь является уже общепринятым, что гибридный иммунитет, формирующийся после инфекции SARS-CoV-2 и последующей вакцинации или же вакцинации и последующей прорывной инфекции, создает наиболее устойчивый иммунитет против вариантов SARS-CoV-2, демонстрируя при этом широкий ответ на множество белков SARS-CoV-2 [6, 7, 10]. Обзор 26

исследований [8] показал, что гибридный иммунитет генерирует наиболее эффективную и надежную защиту от повторного заражения, госпитализации или тяжелого заболевания, которая сохраняется более чем у 95% пациентов в течение 11 месяцев наблюдения.

При этом для трактовки уровня иммунологических параметров важной становится его оценка как высокого, низкого или нормального. В России начиная с 2022 г., практически все население приобрело поствакцинальный или постинфекционный иммунитет против SARS-CoV-2. Заболевание, вызванное штаммом SARS-CoV-2 омикрон «завершило» этот процесс, сформировав у большей части взрослого населения гибридный иммунитет. Тем не менее приходится учитывать, что уровень иммунного ответа внутри популяции варьирует.

Одной из задач настоящей работы была оценка специфического иммунитета против SARS-CoV-2 в группе пациентов с прорывной инфекцией. Особенностью группы было то, что у ее участников в 2021 г. было прослежено формирование и сохранение Т-клеточного и гуморального иммунитета в ходе вакцинации и ревакцинации вакциной «Спутник V». База данных по показателям этих людей, а также пациентов, переболевших COVID-19 до начала вакцинации на территории России, легла в основу выработки алгоритма для оценки интенсивности специфического иммунного ответа. Алгоритм был использован для сравнения параметров иммунного ответа после заболевания COVID-19 (штамм дельта), при формировании гибридного иммунитета у таких пациентов, и при прорывной инфекции SARS-CoV-2 (штамм омикрон) у ранее не болевших вакцинированных и ревакцинированных людей.

## Материалы и методы

Всего обследовано 75 человек обоего пола в возрасте 18–70 лет, перенесших заболевание легкой или средней степени тяжести формы (диагностика и лечение проведены в поликлиниках и клиниках г. Москвы). В том числе 49 пациентов перенесли в 2021 г., COVID-19 в период циркуляции в Московском региона штамма дельта SARS-CoV-2, а другие 26 — в 2022 г. COVID-19 в период доминирования штамма омикрон.

В 2021 г. пациенты обследовались однократно через 1–1,5 месяца после COVID-19 (штамм дельта). 14 человек из них через 6–10 месяцев были привиты вакциной «Спутник V» с последующей оценкой гибридного иммунитета. Пациенты 2022 г. были обследованы многократно. Эти люди по протоколу исследования, одобренному Этическим комитетом ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского (протоколы

№ 41 от 10.12.20 г. и № 64 от 22.12.21 г.), относились к группе из 41 добровольца, которые принимали обязательство обследоваться до вакцинации, не реже одного раза в 3 месяца в период вакцинации против SARS-CoV-2 и ревакцинации против данной инфекции. К моменту заболевания участники этой группы были обследованы не менее 6 раз. После перенесенного в 2022 г. COVID-19 пациенты были обследованы через 2–4 недели после выздоровления, затем через 3, 6 и 12 месяцев. В случае ОРВИ или иного острого заболевания очередной срок обследования пропускался, и участник исследования должен был предъявить сведения о том, было ли ОРВИ связано с SARS-CoV-2 этиологией.

Антитела (АТ) к SARS-CoV-2 класса IgG и класса IgM определяли в сыворотке крови с помощью тест-систем «SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ» (АО «Вектор-Бест», Россия, № РЗН 2020/10388 от 18.05.2020 г.) и «SARS-CoV-2-IgM ИФА-БЕСТ» (АО «Вектор-Бест», Россия, № РЗН 2020/10389 от 18.05.2020 г.) соответственно.

Оценка специфического клеточного иммунного ответа на антигены коронавируса (SARS-CoV-2) была проведена скрининговым методом, ранее разработанным нами [1, 3]. Он основан на измерении продукции IFN $\gamma$  в культуре мононуклеаров из крови пациентов, стимулированной различными антигенами SARS-CoV-2. Мононуклеары выделяли из цельной венозной крови в градиенте плотности Histopaque-1077 (Sigma, США), разводили до концентрации  $5 \times 10^6$ /мл в полной среде RPMI-1640 (ООО «ПанЭко», Россия) с антибиотиками и 10% эмбриональной телячьей сывороткой (Biosera, Франция). Доля лимфоцитов среди выделенных мононуклеаров составляла 85–92%.

Стимуляцию лимфоцитов (72 часа при 37°C в атмосфере 5% CO $_2$ ) проводили в 96-луночных планшетах с вариантами антигенов SARS-CoV-2, сорбированными в лунках планшетов:

- Антиген 1 (АГ1) — цельновиральный инактивированный антиген SARS-CoV-2 (ИФА-набор для выявления IgG-антител к SARS-CoV-2 пр-ва ФБУН ГНЦ «Вектор», № РЗН 2020/10017 от 10.04.2020);
- Антиген 2 (АГ2) — рекомбинантный полно-размерный поверхностный тримеризованный гликопротеин S SARS-CoV-2 (ИФА-набор для выявления IgG-антител к SARS-CoV-2 «SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ», № РЗН 2020/10388 от 18.05.2020);
- Антиген 3 (АГ3) — рекомбинантный рецептор-связывающий домен поверхностного гликопротеина S SARS-CoV-2 (ИФА-набор для выявления IgG-антител к SARS-CoV-2 «SARS-CoV-2-RBD-ИФА-Гамалеи», № РЗН 2020/10393 от 18.05.2020).

В качестве контрольного антигена использовали полистироловые планшеты для выявления IgG-антител к вирусу денге (Vircell S.L., Испания, REF-G1018), с сорбированным вирусом денге (тип 1 — штамм Гавайи, тип 2 — Новая Гвинея, тип 3 — штамм H87 и тип 4 — штамм H241). Спонтанную продукцию IFN $\gamma$  оценивали в пробах, инкубированных без антигена.

Концентрацию IFN $\gamma$  в супернатантах определяли методом ИФА с помощью тест-системы (АО «Вектор-Бест», Россия). Результаты учитывали как разницу между АГ-стимулированной и спонтанной продукцией IFN $\gamma$  и представляли в виде медианы (Me) и межквартильного диапазона (Q<sub>0,25</sub>–Q<sub>0,75</sub>). Статистический анализ данных проведен с использованием пакета программ STATISTICA 10 (StatSoft Inc., США). Применяли непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Справедливость проверяемой гипотезы исследования оценивали по величине p-value, критическим значением которой считали  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Данные о состоянии специфического Т-клеточного иммунитета у пациентов после COVID-19, вызванного SARS-CoV-2 (штамм дельта), подробно описаны ранее [2], а в настоящей работе использованы в ходе разработки алгоритма. Коротко следует отметить, что через 1–1,5 месяца после COVID-19 (SARS-CoV-2, штамм дельта) *in vitro* стимуляция мононуклеаров крови антигенами вируса (АГ1 или АГ2) вызывала увеличение среди CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток процента активированных (CD69<sup>+</sup>) лимфоцитов и увеличение концентрации IFN $\gamma$  в культуральном супернатанте. Стимуляция контрольным антигеном таких изменений в культуре мононуклеаров крови не вызывала. В присут-

ствии АГ3 стимуляция Т-клеток не происходила. К моменту вакцинации (через 6–10 месяцев) у переболевших людей активность АГ1 или АГ2-специфических Т-клеток практически не снижалась, а после введения вакцины «Спутник V» увеличивалась.

В отличие от этого у лиц, перенесших COVID-19 в 2021 г., показатели как гуморального, так и клеточного специфического иммунитета через полгода после вакцинации «Спутник V» значительно снизились. Перед ревакцинацией у половины группы (52,1%) отсутствовали в крови Т-клетки, специфичные в отношении АГ3, Т-клетки, распознающие АГ2, отсутствовали у 30,7%, а АГ1 — у 34,6%.

После ревакцинации Т-клетки, активирующиеся в присутствии АГ3, обнаруживались у 82,3%, а отвечающие на стимуляцию АГ1 или АГ2 — у 100% обследуемых. Активность Т-клеток в плане АГ-стимулированной продукции увеличилась в 1,4–3,5 раза. Через 6 месяцев после ревакцинации достигнутые показатели практически не снижались.

Заражение SARS-CoV-2 (штамм омикрон) произошло у пациентов через различные сроки после ревакцинации: от 2 недель до 16 месяцев (Me = 5,5; 4,0–8,0) на фоне высокой активности АГ-специфических Т-клеток и при средней концентрации IgG-антител к АГ2 (полноразмерному spike-белку SARS-CoV-2) 492,0 (167,8–500) BAU/мл. Концентрация IgG-антител менее 150 BAU/мл (порога, выше которого 100% сывороток обладают ярко выраженной вируснейтрализующей активностью) регистрировалась не более чем у 25% группы.

Некоторые из людей в этой группе были ревакцинированы за 3–4 недели до заболевания, и активность Т-клеток памяти в их крови была высока. Поэтому в ранние сроки после выздо-

**Таблица 1. Реакция Т-клеток памяти на стимуляцию антигенами вируса SARS-CoV-2 перед заболеванием, связанным со штаммом омикрон, и после него (Me [Q<sub>1</sub>–Q<sub>3</sub>])**

Table 1. Response of memory T cells to stimulation with antigens of the SARS-CoV-2 virus before and after the disease associated with the omicron strain (Me [Q<sub>1</sub>–Q<sub>3</sub>])

Срок до и после перенесенного заболевания Timing before and after disease		Продукция IFN $\gamma$ (пг/мл), стимулированная антигенами SARS-CoV-2 IFN $\gamma$ production (pg/ml) stimulated by SARS-CoV-2 antigens		
		АГ1 AG1	АГ2 AG2	АГ3 AG3
За 1–3 месяца перед заболеванием 1–3 months before disease		301,9 78,5–1237,2	404,8 79,1–1226,1	41,9 14,4–184,1
После выздоровления After reconvalescence	через 2–4 нед. in 2–4 weeks	541,8 138,0–779,2	609,3 93,0–859,2	59,9 24,4–646,1
	через 6 мес. in 6 months	1189,6* 679,0–1775,6	1270,5* 225,8–1874,2	146 43,8–357,5
	через 12 мес. in 12 months	1135,1* 395,1–1795,0	679,0 349,2–1245,1	83,8 35,1–154,3

**Примечание.** \* — значимое отличие от величины параметра до заболевания ( $p < 0,05$ ).

Note. \* — significant difference from the parameter value before the disease ( $p < 0.05$ ).

**Таблица 2. Вариабельность антиген-стимулированной продукции IFN $\gamma$  Т-клетками памяти, специфичными к антигенам вируса SARS-CoV-2**Table 2. Variability of antigen-stimulated IFN $\gamma$  production by memory T cells specific to antigens of the SARS-CoV-2 virus

Антиген вируса SARS-CoV-2 Virus antigen SARS-CoV-2	Статистический параметр антиген-стимулированной продукции IFN $\gamma$ (пг/мл) Statistical parameter of antigen-stimulated IFN $\gamma$ production (pg/ml)			Нормальный диапазон реакции Normal response range
	Me	Q <sub>1</sub>	Q <sub>3</sub>	
<b>АГ1: цельновирионный инактивированный</b> AG1: whole virion inactivated	343,6	106,5	932,2	100–900
<b>АГ2: рекомбинантный гликопротеин S</b> AG2: recombinant glycoprotein S	404,8	103,5	1031,7	100–1000
<b>АГ3: рекомбинантный RBD-домен гликопротеина S</b> AG3: recombinant RBD domain of glycoprotein S	114,3	52,9	320,7	60–300
<b>Для всех вариантов метода</b> For all method options				70–900

рождения нет значимого отличия средней активности Т-клеток от величин, зарегистрированных до заболевания (табл. 1). Однако через 6 месяцев активность значимо выше и остается высокой до 12 месяцев, по крайней мере, при АГ1-стимуляции.

Повышение активности Т-клеток, специфичных в отношении АГ1 и АГ2, после прорыв-

ной инфекции гораздо более значительно и более длительно сохраняется, чем после ревакцинации. Если после ревакцинации наблюдается 1,5–3,5-кратное увеличение активности специфических Т-клеток, то после прорывной инфекции происходит дополнительное 2–3-кратное увеличение, сохраняющееся 6 месяцев, а у 30–50% пациентов до 12 месяцев.

**Таблица 3. Частота встречаемости Т-клеток памяти с разной степенью активации на 72-часовую стимуляцию АГ2 при формировании противовирусного иммунитета к SARS-CoV-2**

Table 3. Frequency of occurrence of memory T cells with varying degrees of activation upon 72-hour stimulation with AG-2 during the formation of antiviral immunity to SARS-CoV-2

Вариант состояния The status variants	Стадия формирования противовирусного иммунитета The stage of antiviral immunity formation	Степень антигенной активации Т-клеток Degree of T-cells antigenic activations		
		низкая low	нормальная normal	высокая high
1	<b>После COVID-19 в 2021 г. у непривитых людей (n = 43)</b> Unvaccinated people after COVID-19 in 2021 (n = 43)	52,0%±12,5	28,0%±10,1	20,0%±8,0
2	<b>После вакцинации здоровых людей в 2020–2021 гг. (n = 41)</b> Healthy people vaccinating in 2020–2021 (n = 41)	30,6%±6,1	50,0%±7,8	19,4%±6,7
3	<b>После вакцинации переболевших в 2020–2021 гг. (n = 14)</b> After vaccination of those who did have COVID-19 2020–2021 before (n = 14)	26,1%±4,3*	43,5%±5,5	30,4%±4,7
4	<b>После ревакцинации лиц, не болевших COVID-19 (n = 37)</b> After revaccination of persons who did not have COVID-19 (n = 37)	13,5%±1,9***	67,6%±3,6	18,9%±6,1
5	<b>После COVID-19 (штамм омикрон) прорывная инфекция (n = 63)</b> After breakthrough infection via COVID-19 (omicron strain) (n = 63)	11,1%±1,2	46,0%±3,1**	42,9%±3,1**

**Примечание.** Серая заливка ячейки — частота встречаемости признака ~ 50%. \* — значимое различие между вариантом 1 и вариантом 3 ( $p < 0,05$ ); \*\* — значимое различие между вариантом 4 и вариантом 5 ( $p < 0,05$ ); \*\*\* — значимое различие между вариантом 2 и вариантом 4 ( $p < 0,05$ ).

Note. Cells filled in gray — frequency of occurrence of the trait ~ 50%. \* — significant difference between option 1 and option 3 ( $p < 0.05$ ); \*\* — significant difference between option 4 and option 5 ( $p < 0.05$ ); \*\*\* — significant difference between option 2 and option 4 ( $p < 0.05$ ).

Гибридный иммунитет, сформировавшийся после прорывной инфекции SARS-CoV-2 (омикрон), характеризовался большей активностью Т-клеток памяти, чем гибридный иммунитет после вакцинации пациентов, перенесших COVID-19 (SARS-CoV-2, штамм дельта). АГ1-стимуляция мононуклеаров крови через 2–4 недели после выздоровления или вакцинации, соответственно, выражалась продукцией IFN $\gamma$  на уровне 541,8 и 266,5 пг/мл ( $p < 0,05$ ). В присутствии АГ2 происходила стимуляция продукции IFN $\gamma$  609,3 и 381,6 пг/мл соответственно ( $p < 0,05$ ), и только АГ3-стимуляция Т-лимфоцитов была в обеих группах одинаковой: 59,9 и 52,0 пг/мл.

Алгоритм качественной оценки специфического Т-клеточного иммунитета против антигенов вируса SARS-CoV-2 был необходим для понимания биологического значения наблюдаемых изменений в Т-клеточных ответах в ходе вакцинации, ревакцинации, формирования гибридного иммунитета и после прорывной инфекции. Он включал разработку шкалы с разделением величины антигенной активации на низкую, нормальную и высокую. В качестве нормального уровня активации Т-клеток памяти был определен диапазон концентраций IFN $\gamma$ , продуцируемого при АГ-специфической стимуляции Т-клеток у 50% переболевших COVID-19 или вакцинированных людей, то есть диапазон от  $Q_{0,25}$  до  $Q_{0,75}$ .

Для расчета указанного диапазона использовано 249 образцов мононуклеаров. Не использовались для расчета образцы крови здоровых людей до вакцинации, и тех из них, у которых до введения 2-го компонента вакцины «Спутник V» не проявлялась специфическая Т-клеточная реакция ни при одном из режимов антигенной стимуляции. В табл. 2 приведены статистические показатели по каждому из антигенов, использованных для 72-часовой стимуляции лимфоцитов *in vitro*.

Для удобства практического использования граничные значения концентраций установлены кратными 10. Далее для всех вариантов антигенспецифической стимуляции Т-клеток определили единый нормальный диапазон реакции на уровне 70–900 пг/мл.

Применение этих граничных значений для анализа формирования первичного, вторичного и гибридного иммунитета показано в табл. 3. При первичном ответе на SARS-CoV-2 в ходе заболевания или вакцинации (варианты состояния 1–2) на spike-антигены вируса наблюдалась преимущественно низкая и нормальная реакция Т-клеток памяти, а при вторичном ответе (варианты 3–5) наблюдался сдвиг показателей активации Т-клеток в сторону нормальных и высоких значений.

У непривитых людей, перенесших COVID-19 до появления в России вакцины против SARS-CoV-2, отсутствовали АГ-специфические Т-клетки к RBD SARS-CoV-2 (АГ3), а активность Т-клеток, специфичных к полноразмерному S-гликопротеину (АГ2) у 52% группы была низкой. Вторичный иммунный ответ после вакцинации этих лиц резко меняет ситуацию: 73,9% группы имеют нормальную и высокую активность АГ2-специфических Т-клеток, в том числе, 30,4% — высокую. Прорывная инфекция SARS-CoV-2 (омикрон) дает такой же эффект у ревакцинированных ранее не болевших людей: 88,9% группы имеют нормальную и высокую активность АГ2-специфических Т-клеток, в том числе, 42,9% — высокую. До заболевания COVID-19 вторичный иммунный ответ у здоровых людей (ревакцинация) не приводит к появлению и длительному сохранению в циркулирующей крови АГ2-специфических Т-клеток с высокой активностью.

Иммунный ответ на COVID-19 сложен и сильно варьирует у разных людей, представляя собой различные комбинации интенсивности антителообразования и интенсивности различных показателей специфического Т-клеточного ответа. Так, было обнаружено, что у некоторых пациентов после COVID-19 CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>Т-клетки памяти слабо пролиферируют а присутствии антигенов SARS-CoV-2, однако при этом продуцируют IFN $\gamma$  и гранзим В (играющие важную роль в ограничении тяжести заболевания и выздоровления при COVID-19) на том же уровне, что и у пациентов, в крови которых содержатся клетки с высоким пролиферативным потенциалом на антигены вируса [12]. Имеют место различия в динамике количества Т-клеток эффекторной и центральной памяти [6, 7].

Тем не менее для понимания биологического значения наблюдаемых изменений в специфическом иммунном ответе введение оценки их интенсивности весьма желательно. Например, в случае увеличения концентрации антител против вируса при исходно низком их уровне можно ожидать сероконверсии, тогда как при исходно высоком уровне антител она может быть не выражена.

Определенные выводы могут быть сделаны, если авторами отдельно рассматриваются подгруппы с исходно низкими показателями Т-клеточной памяти и с относительно высокими. В ряде работ оценка показателя как высокого или низкого базируется на показателях Т-клеточного ответа на антигены SARS-CoV-2 при тяжелом, умеренном и легком течении COVID-19 [12]. В других статьях разделение показателей по их интенсивности проводится, однако его критерии не указаны [4, 5, 13].

Наш подход, при котором нижний квартиль распределения активности Т-клеток памяти (способности к АГ-стимулированной продукции IFN $\gamma$ ) соответствует низкой активности, а верхний квартиль — высокой, позволил нам проанализировать развитие Т-клеточного иммунитета в ходе вакцинации и ревакцинации, а также формирования гибридного иммунитета или прорывной инфекции.

Сложность и многоуровневость Т-клеточной памяти не позволяет по 1–2 показателям пол-

ностью характеризовать защищенность организма от реинфекции, однако мониторинг иммунной структуры населения с разным риском инфицирования необходим, и введение качественной оценки регистрируемых параметров может способствовать как практическим так и перспективным целям этого мониторинга, в том числе, созданию представлений о том, какой уровень активности Т-клеточной памяти достаточен для предупреждения или снижения тяжести инфекции SARS-CoV-2.

## Список литературы/References

1. Бляхер М.С., Федорова И.М., Тульская Е.А., Капустин И.В., Котелева С.И., Рамазанова З.К., Одинцов Е.Е., Сандалова С.В., Новикова Л.И. Определение специфического Т-клеточного иммунитета к антигенам вируса SARS-CoV-2 у людей, переболевших COVID-19 // Вопросы вирусологии, 2022. Т. 67, № 6. С. 527–537. [Blyakher M.S., Fedorova I.M., Tulskaia E.A., Kapustin I.V., Koteleva S.I., Ramazanova Z.K., Odintsov E.E., Sandalova S.V., Novikova L.I. Assessment of specific T-cell immunity to SARS-CoV-2 virus antigens in COVID-19 reconvalescents. *Voprosy Virusologii = Problems of Virology*, 2022, vol. 67, no. 6, pp. 527–537. (In Russ.)]
2. Бляхер М.С., Федорова И.М., Тульская Е.А., Капустин И.В., Котелева С.И., Рамазанова З.К., Одинцов Е.Е., Сандалова С.В., Новикова Л.И., Алешкин А.В., Бочкарева С.С. Формирование и сохранение специфического Т-клеточного иммунитета после перенесенной SARS-CoV-2 инфекции или вакцинации против нее // Вопросы вирусологии, 2023. Т. 68, № 3. С. 205–214. [Blyakher M.S., Fedorova I.M., Tulskaia E.A., Kapustin I.V., Koteleva S.I., Ramazanova Z.K., Odintsov E.E., Sandalova S.V., Novikova L.I., Aleshkin A.V., Bochkareva S.S. Development and preservation of specific T-cell immunity after a SARS-CoV-2 infection or vaccination against it. *Voprosy Virusologii = Problems of Virology*, 2023, vol. 68, no. 3, pp. 205–214. (In Russ.)]
3. Патент № 2780369 Российская Федерация, МПК G01N 33/68 (2006.01), G01N 33/569 (2006.01), G01N 33/543 (2006.01), G01N 33/573 (2006.01), G01N 33/531 (2006.01), C12N 5/0786 (2010.01). Способ определения специфического клеточного иммунного ответа на антигены коронавируса (SARS-CoV-2): № 2021139712; заявлено 29.12.2021; опубликовано 21.09.2022 / Бляхер М.С., Капустин И.В., Одинцов Е.Е., Рамазанова З.К., Сандалова С.В., Тульская Е.А., Федорова И.М.; заявитель и патентообладатель ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора. 16 с. [Patent No. 2780369 Russian Federation, Int. G01N 33/68 (2006.01), G01N 33/569 (2006.01), G01N 33/543 (2006.01), G01N 33/573 (2006.01), G01N 33/531 (2006.01), C12N 5/0786 (2010.01). Method for determining the specific cellular immune response to coronavirus antigens (SARS-CoV-2). No. 2021139712; application: 29.12.2021; date of publication 21.09.2022 / Blyakher M.S., Kapustin I.V., Odintsov E.E., Ramazanova Z.K., Sandalova S.V., Tulskaia E.A., Fedorova I.M. Proprietors: Federalnoe Byudzhethnoe uchrezhdenie nauki "Moskovskij nauchno-issledovatel'skij institut epidemiologii i mikrobiologii im. G.N. Gabrichevskogo" Federalnoj sluzhby po nadzoru v sfere zashchity prav potrebitel'ej i blagopoluchiya cheloveka. 16 p.]
4. Топтыгина А.П., Афридонова З.Э., Закиров Р.Ш., Семикина Е.Л. Поддержание иммунологической памяти к вирусу SARS-CoV-2 в условиях пандемии // Инфекция и иммунитет, 2023. Т. 13, № 1. С. 55–66. [Toptygina A.P., Afridonova Z.E., Zakirov R.Sh., Semikina E.L. Maintaining immunological memory to the SARS-CoV-2 virus during COVID-19 pandemic. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2023, vol. 13, no. 1, pp. 55–66. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-MIM-2009.
5. Agallou M., Koutsoni O.S., Michail M., Zisimopoulou P., Tsitsilonis O.E., Karagouni E. Antibody and T-cell subsets analysis unveils an immune profile heterogeneity mediating longterm responses in individuals vaccinated against SARS-CoV-2. *J. Inf. Dis.*, 2023, vol. 227, no. 3, pp. 353–363.
6. Almendro-Vazquez P., Laguna-Goya R. Paz-Artal E. Defending against SARS-CoV-2: the T cell perspective. *Front. Immunol.*, 2023, vol. 14, 1107803. doi: 10.3389/fimmu.2023.1107803.
7. Barros-Martins J., Hammerschmidt S.I., Morillas R.G., Cossmann A., Hetzel L., Odak I., Köhler M., Stankov M.V., Ritter C., Friedrichsen M., Ravens I., Schimrock A., Ristenpart J., Janssen A., Willenzon S., Bernhardt G., Lichtinghagen R., Bošnjak B., Behrens G.M.N., Förster R. Omicron infection-associated Tand B cell immunity in antigen-naive and triple COVID-19 vaccinated individuals. *Front. Immunol.*, 2023, vol. 14, 1166589. doi: 10.3389/fimmu.2023.1166589
8. Bobrovitz N., Ware H., Ma X., Li Z., Hosseini R., Cao C., Selemo A., Whelan M., Premji Z., Issa H., Cheng B., Abu Raddad L.J., Buckeridge D.L., Van Kerkhove M.D., Piechotta V., Higdon M.M., Wilder-Smith A., Bergeri I., Feikin D.R., Arora R.K., Patel M.K., Subissi L. Protective effectiveness of previous SARS-Cov-2 infection and hybrid immunity against the omicron variant and severe disease: a systematic review and meta-regression. *Lancet Infect. Dis.*, 2023, vol. 23, pp. 556–567.
9. Gao Y., Cai C., Grifoni A., Muller T.R., Niessl J., Olofsson A., Humbert M., Hansson L., Österborg A., Bergman P., Chen P., Olsson A., Sandberg J.K., Weiskopf D., Price D.A., Ljunggren H.G., Karlsson A.C., Sette A., Aleman S., Buggert M. Ancestral SARS-CoV-2-specific T cells cross-recognize the Omicron variant. *Nat. Med.*, 2022, vol. 28, no. 3, pp. 472–476.
10. Jacobsen H., Jimenez V.C., Sitaras I., Bar-Zeev N., Cicin-Sain L., Higdon M.M., Deloria-Knoll M. (2022) Postvaccination T cell immunity to omicron. *Front. Immunol.*, 2022, vol. 13, 944713. doi: 10.3389/fimmu.2022.944713.
11. Keeton R., Tincho M.B., Ngomti A., Baguma R., Benede N., Suzuki A., Khan K., Cele S., Bernstein M., Karim F., Madzorera S.V., Moyo-Gwete T., Mennen M., Skelem S., Adriaanse M., Mutithu D., Aremu O., Stek C., du Bruyn E., Van Der Mescht M.A., de Beer Z., de Villiers T.R., Bodenstern A., van den Berg G., Mendes A., Strydom A., Venter M., Giandhari J., Naidoo Y.,

- Pillay S., Tegally H., Grifoni A., Weiskopf D., Sette A., Wilkinson R.J., de Oliveira T., Bekker L.G., Gray G., Ueckermann V., Rossouw T., Boswell M.T., Bhiman J.N., Moore P.L., Sigal A., Ntusi NAB, Burgers W.A., Riou C. T cell responses to SARS-CoV-2 spike cross-recognize Omicron. *Nature*, 2022, vol. 603, no. 7901, pp. 488–492. doi: 10.1038/s41586-022-04460-3
12. Lin J., Law R., Korosec C.S., Zhou C., Koh W.H., Ghaemi M.S., Samaan P., Ooi H.K., Matveev V., Yue F., Gingras A.C., Estacio A., Buchholz M., Cheatley P.L., Mohammadi A., Kaul R., Pavinski K., Mubareka S., McGeer A.J., Leis J.A., Heffernan J.M., Ostrowski M. Longitudinal assessment of SARS-CoV-2-specific T cell cytokine-producing responses for 1 year reveals persistence of multicytokine proliferative responses, with greater immunity associated with disease severity. *J. Virol.*, 2022, vol. 96, no. 13, e0050922. doi: 10.1128/jvi.00509-22
13. Naranbhai V., Nathan A., Kaseke C., Berrios C., Khatri A., Choi S., Getz M.A., Tano-Menka R., Ofoman O., Gayton A., Senjobe F., Zhao Z., St Denis K.J., Lam E.C., Carrington M., Garcia-Beltran W.F., Balazs A.B., Walker B.D., Iafraite A.J., Gaiha G.D. T cell reactivity to the SARS-CoV-2 Omicron variant is preserved in most but not all individuals. *Cell*, 2022, vol. 185, no. 6, pp. 1041–1051. doi: 10.1016/j.cell.2022.01.029

**Авторы:**

**Бляхер М.С.**, д.м.н., профессор, руководитель лаборатории по изучению клеточных и молекулярных основ иммунитета ФБУН Московский научноисследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

**Федорова И.М.**, к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории по изучению клеточных и молекулярных основ иммунитета ФБУН Московский научноисследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

**Котелева С.И.**, к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории по изучению клеточных и молекулярных основ иммунитета ФБУН Московский научноисследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

**Капустин И.В.**, к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории по изучению клеточных и молекулярных основ иммунитета иммунобиологических препаратов ФБУН Московский научноисследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

**Тулская Е.А.**, к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории по изучению клеточных и молекулярных основ иммунитета ФБУН Московский научноисследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

**Рамазанова З.К.**, к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории по изучению клеточных и молекулярных основ иммунитета ФБУН Московский научноисследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

**Одинцов Е.Е.**, к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории по изучению клеточных и молекулярных основ иммунитета ФБУН Московский научноисследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

**Сандалова С.В.**, научный сотрудник лаборатории по изучению клеточных и молекулярных основ иммунитета ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

**Новикова Л.И.**, к.м.н., руководитель лаборатории иммунобиологических препаратов ФБУН Московский научноисследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

**Бочкарева С.С.**, д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунобиологических препаратов ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия.

**Authors:**

**Blyakher M.S.**, DSc (Medicine), Professor, Head, Laboratory for the Study of Cellular and Molecular Bases of Immunity, G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

**Fedorova I.M.**, PhD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory for the Study of Cellular and Molecular Bases of Immunity, G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

**Koteleva S.I.**, PhD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory for the Study of Cellular and Molecular Bases of Immunity, G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

**Kapustin I.V.**, PhD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory for the Study of Cellular and Molecular Bases of Immunity, G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

**Tulskaya E.A.**, PhD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory for the Study of Cellular and Molecular Bases of Immunity, G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

**Ramazanova Z.K.**, PhD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory for the Study of Cellular and Molecular Bases of Immunity, G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

**Odintsov E.E.**, PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory for the Study of Cellular and Molecular Bases of Immunity, G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

**Sandalova S.V.**, Research Associate, Laboratory for the Study of Cellular and Molecular Bases of Immunity, G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

**Novikova L.I.**, PhD (Medicine), Head of the Laboratory of Immunobiological Preparations, G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

**Bochkareva S.S.**, DSc (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Immunobiological Preparations, G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation.