

ИЗУЧЕНИЕ АНТИГЕННЫХ СВОЙСТВ ШТАММОВ КОРОНАВИРУСА SARS-CoV-2, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РФ В 2020–2022 гг., В РЕАКЦИИ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГИПЕРИММУННЫХ СЫВОРОТОК МЫШЕЙ



А.В. Зайковская, В.А. Евсеенко, С.Е. Олькин, О.В. Пьянков

ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

Резюме. Введение. Быстрое распространение новой коронавирусной инфекции среди населения многих стран мира способствовало генетической эволюции вируса, следствием чего явилось появление множества генетических вариантов коронавируса SARS-CoV-2. Мутации в вирусном геноме могут влиять на способность вируса обходить иммунную защиту и затруднять разработку диагностических и профилактических препаратов. Данные о нейтрализующей активности сывороток, полученных против циркулировавших ранее генетических вариантов вируса, в отношении актуальных штаммов SARS-CoV-2, могут служить научным обоснованием для выбора антигенов при разработке вакцин. Целью работы явилось изучение кросс-реактивности штаммов коронавируса SARS-CoV-2, относящихся к разным генетическим вариантам, которые были выделены на территории Российской Федерации в период 2020–2022 гг. в реакции нейтрализации с использованием гипериммунных сывороток мышей. **Материалы и методы.** Использованы 10 штаммов коронавируса SARS-CoV-2, относящихся к разным генетическим вариантам (3 штамма, не являющиеся VOC, альфа, бета, гамма, дельта, дельта+AY, омикрон 1 и омикрон 2). Штамм hCoV-19/Australia/VIC01/2020 (Ухань) был включен в исследование в качестве прототипного варианта. Мышей линии BALB/c иммунизировали инактивированным концентрированным антигеном в смеси с адьювантом 1:1, в качестве которого использовали вирусоподобные иммуностимулирующие комплексы на основе сапонинов Квиллайи мыльной (*Quillaja saponaria*). Титр антител определяли в реакции нейтрализации. **Результаты.** Показано значительное снижение нейтрализующей способности антител, специфичных к генетическим вариантам коронавируса SARS-CoV-2 не относящимся к VOC, против бета VOC и, в меньшей степени, против альфа и гамма VOC. Различия уровня нейтрализующей активности антител для альфа и бета VOC между собой незначительны, с вариантом гамма VOC — не достоверны. Нейтрализующая способность антител, специфичных к дельта VOC, против вариантов альфа и бета VOC снижена в 4 раза. Нейтрализующая активность сывороток, полученных к вариантам омикрон 1 и 2, по отношению к прототипному варианту коронавируса снижена в 18 раз, к гамма-варианту — в 12 раз, к дель-

Адрес для переписки:

Зайковская Анна Владимировна
630559, Россия, Новосибирская область, р.п. Кольцово,
ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора.
Тел.: 8 (383) 363-47-00, доп. 2004.
E-mail: zaykovskaya_av@vector.nsc.ru

Contacts:

Anna V. Zaykovskaya
630559, Russian Federation, Novosibirsk region, Koltsovo,
State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector".
Phone: +7 (383) 363-47-00, доп. 2004.
E-mail: zaykovskaya_av@vector.nsc.ru

Для цитирования:

Зайковская А.В., Евсеенко В.А., Олькин С.Е., Пьянков О.В. Изучение антигенных свойств штаммов коронавируса SARS-CoV-2, выделенных на территории РФ в 2020–2022 гг., в реакции нейтрализации с использованием гипериммунных сывороток мышей // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 1. С. 37–45. doi: 10.15789/2220-7619-IAF-1998

Citation:

Zaykovskaya A.V., Evseenko V.A., Olkin S.E., Pyankov O.V. Investigating antigenic features of the SARS-CoV-2 isolated in Russian Federation in 2021–2022 by hyperimmune mouse serum neutralisation // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 1, pp. 37–45. doi: 10.15789/2220-7619-IAF-1998

та-вариантам — более чем в 30 раз, для остальных вариантов она еще ниже. *Выводы.* Полученные результаты свидетельствуют о наличии кросс-реактивности между штаммами коронавируса, относящимися к генетическим линиям Ухань, альфа, бета, гамма; для дельта-вариантов она слабее. Мутации в геноме вариантов омикрон VOC привели к значимому снижению антигенных перекрестов с более ранними генетическими вариантами коронавируса. Эти сведения объясняют низкую эффективность вакцин, созданных на основе генетического варианта вируса, циркулировавшего в первые недели пандемии, синтетических иммуногенов и рекомбинантных белков на его основе против вариантов омикрон VOC, которые вызвали подъем заболеваемости с начала 2022 г., а также случаи повторного заболевания людей при инфицировании новыми генетическими вариантами коронавируса.

Ключевые слова: COVID-19, SARS-CoV-2, антитела, кросс-реактивность, гипериммунные сыворотки, реакция нейтрализации.

INVESTIGATING ANTIGENIC FEATURES OF THE SARS-CoV-2 ISOLATED IN RUSSIAN FEDERATION IN 2021–2022 BY HYPERIMMUNE MOUSE SERUM NEUTRALISATION

Zaykovskaya A.V., Evseenko V.A., Olkin S.E., Pyankov O.V.

State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Abstract. *Introduction.* The rapid spread of a new coronavirus infection among populations in many countries worldwide has contributed to the genetic evolution of the virus, resulting in the emergence of multiple genetic variants of the SARS-CoV-2 coronavirus. Mutations in the viral genome can affect the ability of the virus to bypass the immune system and complicate development of diagnostic and prophylactic drugs. Data on the neutralizing activity of the sera obtained against previously circulating genetic variants of the virus in relation to current SARS-CoV-2 strains may serve as a scientific basis for the selection of the antigens in vaccine development. The aim of this work was to study cross-reactivity of SARS-CoV-2 coronavirus strains belonging to different genetic variants, which were isolated in the territory of the Russian Federation during 2020–2022 in the neutralization reaction using mouse hyperimmune sera. *Materials and methods.* Ten strains of SARS-CoV-2 coronavirus belonging to different genetic variants were used (three non-VOC strains, alpha, beta, gamma, delta, delta+AY, omicron 1 and omicron 2). The hCoV-19/Australia/VIC01/2020 strain (Wuhan) was included in the study as a prototypical variant. BALBc mice were immunized with inactivated concentrated antigen mixed with a 1:1 adjuvant, which was a virus-like immunostimulatory complex based on Quillaja saponaria (Quillaja saponaria). The antibody titer was determined in the neutralization reaction. *Results.* Essential decrease of neutralizing ability of antibodies specific to non-vOC genetic variants of SARS-CoV-2 coronavirus was revealed against beta VOC and to a lesser degree against alpha and gamma VOC variants. The differences in the neutralizing activity level of antibodies for alpha and beta VOC variants are not significant among themselves, and with gamma VOC variants — there are no significant differences. Neutralizing ability of antibodies specific to delta VOC against alpha and beta VOC variants decreased 4-fold. Neutralizing activity of sera obtained to omicron 1 and 2 variants in relation to the prototype coronavirus variant was reduced 18-fold, to the gamma variant — 12-fold, to delta variants — more than 30-fold; for other variants it was even lower. *Conclusions.* The results obtained testify to the presence of cross-reactivity between strains of coronavirus belonging to genetic lines Wuhan, alpha, beta, gamma; it is weaker for delta variants. Mutations in the genome of VOC omicron variants led to a significant decrease in antigenic cross-links with earlier genetic variants of the coronavirus. These findings explain the low efficacy of vaccines based on the Wuhan strain, synthetic immunogens, and recombinant proteins based on it against omicron VOC variants, which have caused a rise in morbidity since early 2022, as well as cases of re-infection of humans with new genetic variants of the coronavirus.

Key words: COVID-19, SARS-CoV-2, antibodies, cross-reactivity, hyperimmune sera, neutralization reaction.

Введение

Быстрое распространение новой коронавирусной инфекции среди населения многих стран мира способствовало генетической эволюции вируса, следствием чего явилось появление множества генетических вариантов коронавируса SARS-CoV-2. Мутации в вирусном геноме могут влиять на способность вируса обходить иммунную систему и затруднять разработку диагностических и профилактических препаратов [12]. В настоящее время Всемирная

организация здравоохранения выделяет пять основных генетических вариантов, вызывающих обеспокоенность (VOC, Variant of Concern): Alpha, Beta, Gamma, Delta и Omicron [2].

Было установлено, что иммунодоминантным белком-мишенью коронавируса SARS-CoV-2 является поверхностный гликопротеин S, который в форме тримера выполняет функции связывания с рецептором клеток и слияния оболочек вирусного капсида и клетки-мишени [6]. В поверхностном гликопротеине S вириона SARS-CoV-2 рецептор-связывающий домен

(RBD) содержит 11 из 14 эпитопов, ответственных за связь с вируснейтрализующими антителами [6, 9]. Данные другого исследования, представленного Harvey W.T. и соавт., свидетельствуют о том, что около 90% нейтрализующих антител связываются с RBD-доменом [7].

При циркуляции в человеческой популяции под давлением иммунитета происходит отбор вариантов вируса, способных уклоняться от нейтрализующих факторов и при этом сохранять репродуктивный потенциал. Эти варианты и характеризующие их мутации генома детально описаны в молекулярно-генетических исследованиях, однако они не позволяют сделать вывод о формировании эскейп-мутантов или нейтральности тех или иных аминокислотных замен [10].

Совокупность научных данных свидетельствует о том, что вакцины, созданные на основе штаммов коронавируса SARS-CoV-2, выделенных в первые недели пандемии, постепенно утрачивают эффективность в отношении циркулирующих в настоящий период вариантов [5]. Данные о нейтрализующей активности сывороток, полученных против циркулировавших ранее генетических вариантов вируса, в отношении актуальных штаммов SARS-CoV-2 могут служить научным обоснованием для выбора антигена при разработке вакцин. Так, например, анализ кросс-реактивности сывороток в серологических реакциях применяется на протяжении десятилетий для выбора вакцинных штаммов противогриппозных вакцин и подтвердил свою эффективность [15].

Целью работы явилось изучение кросс-реактивности штаммов коронавируса SARS-CoV-2, относящихся к разным генетическим вариантам, которые были выделены на территории РФ в период 2020–2022 гг., в реакции нейтрализации с использованием гипериммунных сывороток мышей.

Материалы и методы

Культуры клеток. В работе использовали культуру клеток Vero E6 (клетки эпителия почки африканской зеленой мартышки) (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора). Клетки культивировали при 37°C в питательной среде DMEM («Gibco», Thermo Fisher Scientific, США) с L-глутамином, с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки («Gibco», Thermo Fisher Scientific, США), Antibiotic-Antimycotic («Gibco», Thermo Fisher Scientific, США) в атмосфере с 5% CO₂.

Вирусы. Эксперименты с инфекционным материалом были проведены в лаборатории, соответствующей уровню биобезопасности BSL-3 во ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора,

имеющем СЭЗ на право проведения работ с особо опасными вирусами. В работе использовали штаммы коронавируса SARS-CoV-2, депонированные в Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, которые были выделены от больных людей на территории РФ. В качестве прототипного варианта использовали Штамм hCoV-19/Australia/VIC01/2020 (Ухань), который был любезно предоставлен Mike Catton (Victorian Infectious Diseases Reference Laboratory, Melbourne, Australia) в феврале 2020 г. Для получения панели гипериммунных сывороток были использованы штаммы, относящиеся к разным генетическим линиям коронавируса SARS-CoV-2. Сведения о генетических характеристиках, инфекционных титрах штаммов представлены в табл. 1. Штаммы вирусов были наработаны на культуре клеток Vero E6, для проведения реакции нейтрализации были приготовлены аликвоты, которые хранили при –80°C. Для каждого пула вируса были определены инфекционные титры.

Определение инфекционного титра вируса. Культуру клеток выращивали в 96-ти луночном культуральном планшете. После удаления ростовой среды из лунок культурального планшета в них вносили последовательные десятикратные разведения вируссодержащей жидкости в поддерживающей среде не менее чем в трех повторах. Планшеты инкубировали в течение 4 суток, результат учитывали визуально по наличию ЦПД после окрашивания раствором генцианвиолета. Для окрашивания клеток в каждую лунку планшета вносили по 0,1 мл 0,2% раствора генцианвиолета (1 г генцианвиолета растворяли в 20 мл 96% этилового спирта, добавляли 120 мл 40% формалина и 350 мл раствора Хенкса). Через 30 мин жидкость из лунок удаляли и планшеты промывали водопроводной водой. Специфическое поражение монослоя культуры клеток в лунке учитывали как ЦПД. Расчет титра вируса проводили по формуле Рида–Менча и выражали в lg ТЦД₅₀/мл [11].

Подготовка антигенов. Пулы штаммов вируса были наработаны на культуре клеток Vero E6, трехкратно заморожены и разморожены, затем центрифугированы при 4 тыс. об/мин в течение 10 мин, фильтрованы через фильтрующие насадки (0,22 Merck, Millipore), концентрированы при помощи центрифужных концентраторов (50 kDa, Amicon Ultra-15, Merck, Millipore), согласно инструкции производителя. По объему вирусные суспензии были сконцентрированы в 20 раз. На каждом этапе подготовки антигена определяли титр инфекционного вируса (табл. 1). Полученную концентрированную фракцию инактивировали бета-пропиолактоном (BPL) (Acros Organics). Конечная

Таблица 1. Информация о штаммах коронавируса SARS-CoV-2, использованных для иммунизации животных

Table 1. Data on SARS-CoV-2 coronavirus strains, used for animals' immunization

| Сокращение названия штамма Abbreviations of the strain name | Название штамма, (GISAID ID), обозначение штамма согласно ВОЗ, генетическая линия Name of the strain, (GISAID ID), WHO label variants of concern VOC, genetic lineage | Инфекционный титр вируса (lg ТЦД ₅₀ /мл) Infectious virus titers (lg TCD ₅₀ /ml) | |
|--|--|---|--|
| | | исходный титр Initial virus titer | концентрированная фракция concentrated fraction |
| Ухань Wuhan | hCoV-19/Australia/VIC01/2020, (EPI_ISL_406844), -, B | 7,0±0,29 | 8,5±0,35 |
| Russia/Omsk | hCoV-19/Russia/Omsk202118_1707/2020, (EPI_ISL_1242008), -, B1.1 | 7,25±0,38 | 8,17±0,33 |
| Russia/SPE | hCoV-19/Russia/SPE-57701/2020, (EPI_ISL_6565013), -, B1.1 | 7,0±0,29 | 8,5±0,0 |
| Альфа Alfa | hCoV-19/Russia/MOS-2512/2020, (EPI_ISL_6565012), Alfa, B1.1.7 | 6,75±0,25 | 8,5±0,0 |
| Бета Beta | hCoV-19/Russia/MOS-SAB-1502/2021, (EPI_ISL_6492245), Beta, B1.351 | 6,75±0,25 | 6,83±0,33 |
| Гамма Gamma | hCoV-19/Russia/SA-17620-080521/2021, (EPI_ISL_6565014), Gamma, P1 | 6,5±0,35 | 7,25±0,25 |
| Дельта Delta | hCoV-19/Russia/PSK-2804/2021, (EPI_ISL_7338814), Delta, B1.617.2 | 6,5±0,0 | 7,0±0,29 |
| Дельта+AY Delta+AY | hCoV-19/Russia/MOS-2406/2021, (EPI_ISL_7338789), Delta, B.1.617.2+AY. | 6,75±0,25 | 7,25±0,38 |
| Омикрон 1 Omicron 1 | hCoV-19/Russia/Moscow171619-031221/2021, (EPI_ISL_8920444), Omicron 1, BA.1 | 7,25±0,25 | 8,25±0,38 |
| Омикрон 2 Omicron 2 | hCoV-19/Russia/Amursk-1603/2022, (EPI_ISL_12809000), Omicron 2, BA.2 | 7,0±0,29 | 8,0±0,29 |

Примечание. Значения указаны в виде среднего значения ± стандартное отклонение.
Note. Values are indicated as mean value ± standard deviation.

концентрация ВРЛ в растворе составила 0,1%. Процедуру инаktivации вирусосодержащей жидкости проводили согласно инструкции производителя. Остаточную инфекционность инаktivированных фракций проверяли путем инфицирования культуры клеток Vero E6. Остаточная инфекционность отсутствовала для всех образцов.

Получение мышинных гипериммунных сывороток. Для иммунизации были использованы мыши линии BALBc массой 18–20 г (Питомник лабораторных животных, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора), по 4–10 животных в каждой группе. Инаktivированный антиген вводили животным внутримышечно двукратно с интервалом 3 недели по 0,1 мл/животное в смеси с адьювантом 1:1. В качестве адьюванта использовали вирусоподобные иммуностимулирующие комплексы (ИСКОМ) на основе сапонинов Квиллаи мыльной (*Quillaja saponaria*) в концентрации 160 мкг/мл [1].

Содержание сапонинов Квиллаи мыльной в ИСКОМ-адьюванте определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографе LC-20 Prominence (Shimadzu) с диодно-матричным детектором SPD M20A и колонкой Kromasil 300-5-C4 (4,6 mm id × 150 mm). Объем анализируемой

пробы — 50 мкл. Подвижная фаза А: 95% воды деионизованной, 5% ацетонитрила, 0,1% трифторуксусной кислоты. Подвижная фаза В: 5% воды деионизованной, 95% ацетонитрила, 0,1% трифторуксусной кислоты. Линейный градиент: увеличение содержания подвижной фазы В с 20 до 65% за время от 0 мин до 30 мин с последующим выдерживанием 65% уровня В — до 35 мин. Скорость подвижной фазы — 0,5 мл/мин, детектирование — 215 нм. В качестве образца сравнения использовали сухой препарат Saponin from Quillaja Bark pure (PanReac, Code — A2542).

Отбор проб крови был проведен под инъекционным внутримышечным наркозом Zoletil 100 (Virbac, Франция) из орбитального синуса через 6 недель после начала иммунизации. Все эксперименты на животных были одобрены Биоэтическим комитетом Центра и проводились согласно соответствующим национальным и международным руководящим принципам по уходу и гуманному использованию животных.

Реакция нейтрализации. Культуру клеток Vero E6 выращивали в 96-ти луночном культуральном планшете. Исследуемые сыворотки прогревали при +56°C в течение 30 мин, затем готовили последовательные двукратные раз-

ведения, начиная с разведения 1:10. Для разведения сывороток использовали среду ДМЕМ с глутамином и добавлением антибиотиков. Готовили рабочую концентрацию вируса с титром $2 \times 3 \lg$ ЦПД₅₀/0,1мл. Готовили смесь разведений сыворотки и рабочего разведения вируса в равных объемах. Смесь инкубировали 1 ч при комнатной температуре, затем добавляли в лунки 96-луночного планшета с монослоем культуры клеток Vero E6 и инкубировали в течение 4 дней при 37°C, 5% CO₂. Результат учитывали визуально по наличию ЦПД после окрашивания раствором генцианвиолета. Любое специфическое повреждение клеточной культуры в лунке считали цитопатическим эффектом (ЦПД). При постановке реакции нейтрализации были предусмотрены следующие контроли: контроль клеток (КК) — лунки не инфицированные вирусом, отрицательный контрольный образец сыворотки мышей (К-) в разведении 1/10, контроль вируса (КВ) — лунки инфицированные рабочим разведением вируса разведенным в 2 раза, контроль рабочей концентрации вируса — готовили два последовательных десятикратных разведения рабочей концентрации вируса (КВ/10, КВ/100). Титром сыворотки считали обратное значение ее последнего разведения, в котором признаков ЦПД не регистрировали. Значения контрольных показателей учитывали следующим образом: КК — клеточный монослой в контрольных лунках должен быть сохранен полностью, К-, КВ и КВ/10 — полная дегенерация монослоя клеток, КВ/100 — половина инфицированных лунок имеет признаки ЦПД.

Анализ данных. Анализ данных проведен с использованием программы Microsoft Excel, Statistica v13.0. Для значений титров вируснейтрализующих антител вычисляли среднее геометрическое обратных титров. При математических вычислениях среднего геометрического значения обратных титров ниже 10 приняты за 5. Значение 5 является обратным титром разведения, предыдущего первому, использованному в реакции. Статистическую значимость разницы титров антител оценивали с помощью U-теста Манна–Уитни. Достоверной считали разницу при $p < 0,05$.

Результаты

Были получены мышинные гипериммунные сыворотки к 9 штаммам коронавируса SARS-CoV-2, выделенным на территории РФ в период 2020–2022 гг. и к референс-штамму hCoV-19/Australia/VIC01/2020 (Ухань), исследована их кросс-реактивность. Результаты реакции нейтрализации гипериммунных сывороток мышей, полученных к различным генетическим

вариантам коронавируса SARS-CoV-2, в отношении к вирусным штаммам, использованным для получения этих сывороток представлены в табл. 2.

При подготовке антигенов кратность концентрирования вируса контролировали по изменению его инфекционного титра. На основании сведений, представленных в табл. 1, можно сказать, что концентрация исходных пулов вирусов была практически одинаковой. Среднее значение для титра пулов вируса составило $6,88 \pm 0,27 \lg$ ТЦД₅₀/мл. При использованном методе подготовки антигена вирус был сконцентрирован в 20 раз по объему, при этом инфекционный титр увеличился в среднем на $0,95 \pm 0,40 \lg$ ТЦД₅₀/мл, потери после центрифугирования и фильтрования составили $0,23 \pm 0,09 \lg$ ТЦД₅₀/мл, потери после использования концентраторов составили $0,62 \pm 0,68 \lg$ ТЦД₅₀/мл. Остаточной инфекционности концентрированных фракций после инактивации бета-пропиолактоном не обнаружено. Антигены были приготовлены одним методом, исходя из вышеприведенных данных можно предположить, что использованные для иммунизации животных концентрации антигенов не имели существенных различий.

В качестве адьюванта использовали вирусоподобные иммуностимулирующие комплексы на основе сапонинов. Сапонинсодержащие адьюванты стимулируют врожденный и адаптивный клеточный иммунитет, а также гуморальный ответ всех изотипов IgG. Первоначально для иммунизации животных той же дозой антигена в качестве адьюванта использовали адьювант Фрейнда (данные в статье не приводятся), при этом титры антител были в среднем в 8 раз ниже, что не позволило полноценно оценить кросс-реактивность.

В период первого подъема заболеваемости коронавирусом в РФ циркулировали штаммы, не являющиеся VOC. В работе были использованы три штамма этой генетической группы: референс-штамм Ухань, штамм Russia/Omsk, который был выделен от больного человека в Сибирском регионе, и штамм Russia/SPE, являющийся завозным случаем в Россию из Италии. По антигенным свойствам они являются очень схожими. На основании результатов, представленных в табл. 2, можно сказать, что достоверных отличий нейтрализующей активности сывороток, специфичных к вирусам Ухань и Russia/Omsk по отношению к штаммам этой же группы вирусов не выявлено. Можно предположить, что штамм Russia/SPE является наиболее иммуногенным штаммом из этой группы вирусов (среднее значение титров антител с гомологичным штаммом превышает 1:1000). Выявлено достоверное снижение ней-

Таблица 2. Результаты реакции нейтрализации различных генетических вариантов коронавируса SARS-CoV-2 гипериммунными сыворотками мышей, полученными к этим же штаммам вируса

Table 2. The results of the neutralization test different genetic variants of the coronavirus SARS-CoV-2 with hyperimmune mice sera, obtained to these virus strains

| Штамм вируса, к которому были получены гипериммунные сыворотки Virus strain for obtained hyperimmune serums | Штамм вируса, использованный в реакции нейтрализации Virus strains used in neutralization test | | | | | | | | | |
|--|---|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | Ухань Wuhan | Russia/ Omsk | Russia/SPE | Альфа Alfa | Бета Beta | Гамма Gamma | Дельта Delta | Дельта +AY Delta+AY | Омикрон 1 Omicron 1 | Омикрон 2 Omicron 2 |
| Ухань/Wuhan | 202 (160–320) | 160 (80–320) | 202 (160–320) | 160 (160–160) | 160 (160–160) | 254 (160–320) | 50* (40–80) | 64* (40–80) | 32* (20–40) | 40* (20–80) |
| Russia/Omsk | 160 (80–320) | 269 (160–320) | 226 (160–320) | 160 (160–160) | 57* (40–80) | 135 (80–320) | 80* (40–160) | 80* (40–160) | 10* (5–20) | 28* (20–40) |
| Russia/SPE | 226* (160–640) | 229* (160–320) | 1076 (1280–640) | 229* (80–640) | 67* (40–160) | 381 (1280–160) | 160* (80–320) | 190* (320–80) | 40* (40–40) | 48* (40–80) |
| Альфа/Alfa | 160* (160–160) | 243 (160–320) | 160* (160–160) | 320 (320–320) | 184* (160–320) | 368 (320–640) | 46* (20–80) | 80* (40–160) | 35* (20–80) | 40* (20–80) |
| Бета/Beta | 145* (80–320) | 131* (80–320) | 119* (80–160) | 131* (80–160) | 390 (160–640) | 476 (640–320) | 33* (20–80) | 44* (20–80) | 33* (20–80) | 49* (20–80) |
| Гамма/Gamma | 640 (1280–320) | 453* (160–640) | 640 (230–1280) | 640 (320–1280) | 718 (320–2560) | 1280 (320–1280) | 113* (80–160) | 180* (80–320) | 160* (40–320) | 90* (40–160) |
| Дельта/Delta | 101* (80–160) | 101* (40–160) | 123* (80–320) | 63* (40–80) | 63 (40–160) | 202 (80–640) | 254 (160–320) | 254 (160–320) | 63* (40–80) | 80* (40–160) |
| Дельта+AY/Delta+AY | 285 (160–640) | 101* (40–160) | 285 (160–640) | 226 (160–320) | 160 (40–640) | 143 (40–640) | 320 (160–640) | 403 (160–1280) | 28* (10–160) | 71* (20–320) |
| Омикрон 1/Omicron 1 | 80* (40–160) | 25* (20–80) | 50* (40–80) | 10* (5–40) | 36* (10–80) | 127* (80–320) | 45* (20–160) | 16* (10–40) | 1437 (640–5120) | 180* (80–320) |
| Омикрон 2/Omicron 2 | 20* (5–40) | 6* (5–10) | 35* (20–80) | 6* (5–10) | 7* (5–10) | 29* (10–80) | 10* (5–20) | 7* (5–20) | 58* (20–160) | 368 (160–1280) |

Примечание. Значения указаны в виде среднего геометрического обратного титра сывороток (наименьшее значение — наибольшее значение). Титры ниже 10 приняты за 5. Серым выделен результат с гомологичным антигеном. * — статистическая значимость при $p < 0,05$, анализ проведен с помощью U-теста Манна-Уитни.

Note. Values as the geometric mean of the reverse titers of sera (the lowest value is the highest value). Titters below 10 are taken as 5. The result with the homologous antigen highlighted in gray. * — statistical significance at $p < 0.05$, analysis performed using Mann-Whitney U-test.

трализующей способности антител специфичных к вирусу Russia/Omsk против варианта бета VOC. Антитела специфичные к вирусу Russia/SPE нейтрализуют штаммы альфа и бета VOC соответственно в 4,7 и 16 раз хуже гомологичного вируса. Показано значительное снижение нейтрализующей активности сывороток, специфичных к штаммам, не относящимся к VOC, по отношению к омикрон VOC, в меньшей степени — к дельта VOC.

Генетические варианты коронавируса альфа, бета и гамма VOC циркулировали в основном в период второй волны пандемии. Способность антител, специфичных к этим штаммам, нейтрализовать вирусы, относящиеся к генетическим вариантам омикрон и дельта VOC, низкая. Отличия уровня нейтрализующей активности антител для альфа и бета VOC между собой не значительны, и с вариантом гамма VOC они не имеют достоверных различий. Наиболее иммуногенным из вирусов этой группы является штамм hCoV-19/Russia/SA-17620-080521/2021 (гамма VOC). Иммуногенность дельта VOC, использованных в эксперименте, относительно не высокая. При анализе кросс-реактивности двух дельта VOC между собой показано отсутствие достоверных различий, несмотря на то, что штамм дельта+AY при генетическом анализе отличается от штамма дельта наличием пяти замен в S-сегменте (G142D, E156del, L452R, P681R(674), R685H(692)). Нейтрализующая способность антител специфичных к варианту дельта VOC против альфа и бета VOC снижена в 4 раза, с гамма VOC-вариантом значимых различий не имеет. Антитела, специфичные к варианту дельта+AY, нейтрализуют вирусы альфа, бета и гамма VOC соответственно в 2, 2,5 и 2,8 раз менее эффективно, чем гомологичный штаммы вируса. Кросс-реактивность с вариантами омикрон VOC у дельта VOC низкая.

При анализе кросс-реактивности омикрон VOC показано, что со всеми штаммами, использованными для анализа, она крайне низкая, нейтрализующая активность сывороток, полученных к вариантам омикрон 1 и 2, по отношению к прототипному штамму Ухань снижена в 18 раз, к гамма VOC-варианту — в 12 раз, к дельта VOC-вариантам — более чем в 30 раз, для остальных вариантов она еще ниже. Следует отметить, что сыворотки, полученные к варианту омикрон 2, имеющие титры 1:640 и менее в реакции нейтрализации, с другими вариантами вируса имеют титр нейтрализации > 1:10. Таким образом, кросс-реактивность для этих образцов полноценно оценить не удалось. При анализе кросс-реактивности двух омикрон-вариантов выявлены статистически значимые различия, нейтрализующая активность сывороток мышей, иммунизированных омикрон 1 против

штамма омикрон 2 снижена в 8 раз, сывороток, специфичных к варианту омикрон 2 по отношению к омикрон 1, — в 6 раз. Штамм омикрон 1 вероятно имеет большую иммуногенность, чем омикрон 2.

Следует отметить, что при использовании штамма hCoV-19/Russia/SA-17620-080521/2021 (гамма) в качестве антигена в реакции нейтрализации, были получены результаты, которые указывают на то, что этот штамм позволяет выявлять антитела в титрах выше, чем с гомологичными антигенами для прототипного варианта вируса Ухань штаммов альфа и бета, а также сероконверсия со штаммами омикрон 1 и 2 была выше, чем с остальными штаммами. Подобные результаты наблюдаются и для штамма Russia/SPE, но в меньшей степени.

Обсуждение

В результате проведенного исследования были получены результаты, которые наглядно демонстрируют состояние кросс-реактивности между штаммами коронавируса SARS-CoV-2, относящимися к разным генетическим линиям, а также внутри одной из групп.

В эксперименте были исследованы сыворотки гипериммунных линейных животных, которых иммунизировали убитыми антигенами с использованием адъювантов, что гарантирует чистоту эксперимента и позволяет получить сыворотки с высокими титрами антител. Следует подчеркнуть необходимость получения сывороток с высокими титрами вируснейтрализующих антител, это позволит получить более высокую статистическую достоверность различий. Выбор адъюванта был обусловлен данными, полученными в ходе испытаний вакцин Ковивак, в состав которой входит гидроксид алюминия, и NuvaXovid (NVX-CoV2373), содержащей ИСКОМ-адъювант на основе сапонинов. При сопоставимой концентрации гликопротеина S в препаратах титр нейтрализующих антител в сыворотке крови составил 1:80 и 1:7680–1:20 000 соответственно [8, 14].

В предыдущих работах [4, 16] анализировали сыворотки переболевших людей. В подобных случаях следует учитывать, что индивидуальные особенности организма добровольцев оказывают влияние на формирование иммунного ответа. При использовании линейных лабораторных животных выборка является однородной. Кроме этого, в настоящее время сложно найти добровольцев, переболевших известным генетическим вариантом коронавируса и не имеющих антител к другим вариантам вируса и вакцинным препаратам. В работе представлены результаты реакции нейтрализации с живыми вирусными штамма-

ми в отличие от предыдущих работ, в которых приведены методы оценки нейтрализующей активности антител с использованием псевдо-вирусной системы [3].

Полученные результаты свидетельствуют о наличии кросс-реактивности между штаммами коронавируса, вызвавшими первую и вторую волны пандемии (Ухань, альфа, бета, гамма). Для дельта-вариантов она слабее, в то время как для вариантов омикрон является крайне низкой. Вероятно, это связано с тем, что генетический вариант омикрон VOC имеет наибольшее количество мутаций по сравнению с предыдущими VOC [13].

Делать вывод на основании представленных данных о степени иммуногенности вирусных штаммов, использованных в эксперименте, мы не можем в связи с отсутствием информации о концентрации антигена. Тем не менее на основании полученных результатов можно сделать предположение о разной иммуногенности штаммов коронавируса. Из исследованных штаммов наибольшей иммуногенностью обладают штаммы омикрон 1, гамма, Russia/SPE. Следует отметить, что высокоиммуногенные варианты коронавируса есть в разных генетических группах. В начале пандемии коронавирусной инфекции много внимания было уделено влиянию тяжести болезни на напряженность иммунитета после перенесенного заболевания. На основании представленной

информации можно предположить, что на величину титров вируснейтрализующих антител у переболевших в большей степени оказывает влияние иммуногенность вируса, который вызвал заболевание.

Заключение

Результаты анализа гипериммунных сывороток линейных животных указывают на наличие кросс-реактивности между штаммами коронавируса Ухань, альфа, бета, гамма, для дельта-вариантов она слабее. Мутации в геноме вариантов омикрон VOC привели к значимому снижению антигенных перекрестов с более ранними генетическими вариантами коронавируса.

Полученные результаты объясняют низкую эффективность вакцин, созданных на основе генетического варианта вируса, циркулировавшего в первые недели пандемии, синтетических иммуногенов и рекомбинантных белков на его основе против вариантов омикрон VOC, которые вызвали подъем заболеваемости с начала 2022 г. А также случаи повторного заболевания людей при инфицировании новыми генетическими вариантами коронавируса. Подбор штаммов для создания вакцинных и диагностических препаратов должен обеспечивать максимальный охват антигенных вариантов вируса.

Список литературы/References

1. Евсеенко В.А., Гудымо А.С., Данильченко Н.В., Святченко С.В., Таранов О.С., Рыжиков А.Б. Разработка и лабораторное получение вирусоподобных иммуностимулирующих комплексов на основе сапонинов, оценка их адьювантных свойств при иммунизации мышей гриппозными антигенами // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2022. Т. 22, № 2. С. 170–186. [Evseenko V.A., Gudymo A.S., Danilchenko N.V., Svyatchenko S.V., Taranov O.S., Ryzhikov A.B. Development and laboratory production of virus-like immune-stimulating complexes based on saponins and evaluation of their adjuvant potential using mice immunisation with influenza antigens. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*, 2022, vol. 22, no. 2, pp. 170–186. (In Russ.)] doi: 10.30895/2221-996X-2022-22-2-170-186
2. Aleem A., Akbar Samad A.B., Slenker A.K. Emerging variants of SARS-CoV-2 and novel therapeutics against coronavirus (COVID-19) [Updated 2022 Oct 10]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK570580>
3. Choi A., Koch M., Wu K., Dixon G., Oestreicher J., Legault H., Stewart-Jones G.B.E., Colpitts T., Pajon R., Bennett H., Carfi A., Edwards D.K. Serum neutralizing activity of mRNA-1273 against SARS-CoV-2 variants. *J. Virol.*, 2021, vol. 95, no. 23: e0131321. doi: 10.1128/JVI.01313-21
4. Edara V.V., Hudson W.H., Xie X., Ahmed R., Suthar M.S. Neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 variants after infection and vaccination. *JAMA*, 2021, vol. 325, no. 18, pp. 1896–1898. doi: 10.1001/jama.2021.4388
5. Harvey W.T., Carabelli A.M., Jackson B., Gupta R.K., Thomson E.C., Harrison E.M., Ludden C., Reeve R., Rambaut A.; COVID-19 Genomics UK (COG-UK) Consortium, Peacock S.J., Robertson D.L. SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2021, vol. 19, no. 7, pp. 409–424. doi: 10.1038/s41579-021-00573-0
6. Hoffmann M., Kleine-Weber H., Schroeder S., Krüger N., Herrler T., Erichsen S., Schiergens T.S., Herrler G., Wu N.H., Nitsche A., Müller M.A., Drosten C., Pöhlmann S. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell*, 2020, vol. 181, no. 2, pp. 271–280.e8. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.052
7. Jennewein M.F., MacCamy A.J., Akins N.R., Feng J., Homad L.J., Hurlburt N.K., Seydoux E., Wan Y.H., Stuart A.B., Edara V.V., Floyd K., Vanderheiden A., Mascola J.R., Doria-Rose N., Wang L., Yang E.S., Chu H.Y., Torres J.L., Ozorowski G., Ward A.B., Whaley R.E., Cohen K.W., Pancera M., McElrath M.J., Englund J.A., Finzi A., Suthar M.S., McGuire A.T., Stamatatos L. Isolation and characterization of cross-neutralizing coronavirus antibodies from COVID-19+ subjects. *Cell Rep.*, 2021, vol. 36, no. 2: 109353. doi: 10.1016/j.celrep.2021.109353

8. Kozlovskaya L.I., Pinaeva A.N., Ignatyev G.M., Gordeychuk I.V., Volok V.P., Rogova Y.V., Shishova A.A., Kovpak A.A., Ivin Y.Y., Antonova L.P., Mefyod K.M., Prokosheva L.S., Sibirskina A.S., Tarasova Y.Y., Bayurova E.O., Gancharova O.S., Illarionova V.V., Glukhov G.S., Sokolova O.S., Shaitan K.V., Moysenovich A.M., Gulyaev S.A., Gulyaeva T.V., Moroz A.V., Gmyl L.V., Ipatova E.G., Kirpichnikov M.P., Egorov A.M., Siniugina A.A., Ishmukhametov A.A. Long-term humoral immunogenicity, safety and protective efficacy of inactivated vaccine against COVID-19 (CoviVac) in preclinical studies. *Emerg. Microbes Infect.*, 2021, vol. 10, no. 1, pp. 1790–1806. doi: 10.1080/22221751.2021.1971569
9. Logunov D.Y., Dolzhikova I.V., Zubkova O.V., Tukhvatullin A.I., Shcheplyakov D.V., Dzharullaeva A.S., Grousova D.M., Erokhova A.S., Kovyrshina A.V., Botikov A.G., Izhaeva F.M., Popova O., Ozharovskaya T.A., Esmagambetov I.B., Favorovskaya I.A., Zrelkin D.I., Voronina D.V., Shcherbinin D.N., Semikhin A.S., Simakova Y.V., Tokarskaya E.A., Lubenets N.L., Egorova D.A., Shmarov M.M., Nikitenko N.A., Morozova L.F., Smolyarchuk E.A., Kryukov E.V., Babira V.F., Borisevich S.V., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L. 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, vol. 396, no. 10255, pp. 887–897. doi: 10.1016/S0140-6736(20)31866-3
10. Piccoli L., Park Y.J., Tortorici M.A., Czudnochowski N., Walls A.C., Beltramello M., Silacci-Fregni C., Pinto D., Rosen L.E., Bowen J.E., Acton O.J., Jaconi S., Guarino B., Minola A., Zatta F., Sprugasci N., Bassi J., Peter A., De Marco A., Nix J.C., Mele F., Jovic S., Rodriguez B.F., Gupta S.V., Jin F., Piumatti G., Lo Presti G., Pellanda A.F., Biggiogero M., Tarkowski M., Pizzuto M.S., Cameroni E., Havenar-Daughton C., Smithy M., Hong D., Lepori V., Albanese E., Ceschi A., Bernasconi E., Elzi L., Ferrari P., Garzoni C., Riva A., Snell G., Sallusto F., Fink K., Virgin H.W., Lanzavecchia A., Corti D., Veesler D. Mapping neutralizing and immunodominant sites on the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain by structure-guided high-resolution serology. *Cell*, 2020, vol. 183, no. 4, pp. 1024–1042.e21. doi: 10.1016/j.cell.2020.09.037
11. Reed L.I.J., Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Epidemiol.*, 1938, vol. 27, no. 3, pp. 493–497. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a118408
12. Shiliaev N., Lukash T., Palchevska O., Crossman D.K., Green T.J., Crowley M.R., Frolova E.I., Frolov I. Natural and recombinant SARS-CoV-2 isolates rapidly evolve in vitro to higher infectivity through more efficient binding to heparan sulfate and reduced S1/S2 cleavage. *J. Virol.*, 2021, vol. 95, no. 21: e0135721. doi: 10.1128/JVI.01357-21
13. Thakur V., Ratho R.K. OMICRON (B.1.1.529): a new SARS-CoV-2 variant of concern mounting worldwide fear. *J. Med Virol.*, 2022, vol. 94, pp. 1821–1824. doi: 10.1002/jmv.27541
14. Tian J.H., Patel N., Haupt R., Zhou H., Weston S., Hammond H., Logue J., Portnoff A.D., Norton J., Guebre-Xabier M., Zhou B., Jacobson K., Maciejewski S., Khatoon R., Wisniewska M., Moffitt W., Kluepfel-Stahl S., Ekechukwu B., Papin J., Boddapati S., Jason Wong C., Piedra P.A., Frieman M.B., Massare M.J., Fries L., Bengtsson K.L., Stertman L., Ellingsworth L., Glenn G., Smith G. SARS-CoV-2 spike glycoprotein vaccine candidate NVX-CoV2373 immunogenicity in baboons and protection in mice. *Nat. Commun.*, 2021, vol. 12, no. 1: 372. doi: 10.1038/s41467-020-20653-8
15. Tregoning J.S., Flight K.E., Higham S.L., Wang Z., Pierce B.F. Progress of the COVID-19 vaccine effort: viruses, vaccines and variants versus efficacy, effectiveness and escape. *Nat. Rev. Immunol.*, 2021, vol. 21, no. 10, pp. 626–636. doi: 10.1038/s41577-021-00592-1
16. Trombetta C.M., Marchi S., Viviani S., Manenti A., Benincasa L., Ruello A., Bombardieri E., Vicenti I., Zazzi M., Montomoli E. Serum neutralizing activity against B.1.1.7, B.1.351, and P.1 SARS-CoV-2 variants of concern in hospitalized COVID-19 patients. *Viruses*, 2021, vol. 13, no. 7: 1347. doi: 10.3390/v13071347

Авторы:

Зайковская А.В., к.б.н., старший научный сотрудник отдела «Коллекция микроорганизмов» ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия;

Евseenko В.А., к.б.н., ведущий научный сотрудник отдела зоонозных инфекций и гриппа ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия;

Олькин С.Е., ведущий научный сотрудник отдела биофизики и экологических исследований ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия;

Пьянков О.В., к.б.н., зав. отделом «Коллекция микроорганизмов» ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия.

Authors:

Zaykovskaya A.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Microorganisms Collection Department, State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector" of Rosпотребнадзор, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation;

Evseenko V.A., PhD (Biology), Leading Researcher, Department of Zoonotic Infections and Influenza, State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector" of Rosпотребнадзор, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation;

Olkin S.E., Leading Researcher, Department of Biophysics and Environmental Studies, State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector" of Rosпотребнадзор, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation;

Pyankov O.V., PhD (Biology), Head of the Microorganisms Collection Department, State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector" of Rosпотребнадзор, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation.