

ОЦЕНКА УРОВНЯ ВИРУСНЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ АНТИТЕЛ, ИНДУЦИРОВАННЫХ НОВОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ COVID-19: РАЗРАБОТКА АНАЛИЗА БЫСТРОЙ ОЦЕНКИ ПРОТЕКТИВНЫХ АНТИТЕЛ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РЕАКЦИИ НА ОСНОВЕ ПСЕВДОВИРУСА



А.А. Фунтиков¹, Н.А. Литвинова¹, Е.В. Зуев¹, С.В. Кулемзин², Р.Р. Шукуров¹

¹АО «ГЕНЕРИУМ», пгт. Вольгинский, Петушинский район, Владимирская область, Россия

²ООО «ИМГЕН+», г. Новосибирск, Россия

Резюме. Постоянное появление новых вариантов SARS-CoV-2 со свойствами ускользания от иммунного ответа, таких как Delta (B.1.617.2) и Omicron (B.1.1.529), ставит под сомнение степень опосредованного антителами иммунного ответа на вирус. Наличие вируснейтрализующих антител (ВНА) против SARS-CoV-2 в сыворотке крови переболевших и иммунизированных добровольцев является наиболее точным показателем уровня протективной активности. Для доклинических и клинических исследований вакцин необходимы высокочувствительные методы надежного и быстрого обнаружения ВНА против SARS-CoV-2. Кроме того, количественная оценка ВНА у переболевших COVID-19 субъектов может быть полезна для выявления потенциальных доноров для пассивной иммунизации и терапевтического применения иммуноглобулинов класса G. Псевдовirus активно применяются в качестве альтернативы инфекционным вирусным изолятам I–II групп патогенности в серологических исследованиях для определения титров нейтрализующих антител, образующихся у вакцинированных или инфицированных добровольцев. Используя несколько псевдотипов с различными репортерными генами, возможно одновременное выявление антител к различным типам вирусов в одном биологическом образце. В настоящее время широко применяется псевдолентивирусная система, в которой псевдовirusные частицы получают методом трансфекции клеток-продуцентов векторами мультиплазмидной системы из 4–5 плазмид: одна для векторного генома, вторая — для Gag-Pol, третья — для Rev, еще одна или две — для белка(ов) оболочки или для коэкспрессии меченого вирусного белка, как GAG-GFP или VPR-GFP, основным преимуществом которой является безопасность, обусловленная минимальным риском образования репликационно-компетентного вируса. В статье рассматривается разработка методики, позволяющей определить наличие вирусспецифических вируснейтрализующих антител к антигену SARS-CoV-2 в сыворотке крови добровольцев, переболевших новой коронавирусной инфекцией COVID-19 и/или иммунизированных препаратами специфической профилактики здоровых добровольцев в реакции нейтра-

Адрес для переписки:

Фунтиков Андрей Александрович
601125, Россия, Владимирская область, Петушинский район,
пгт. Вольгинский, ул. Владимирская, 14, АО «ГЕНЕРИУМ».
Тел.: 8 (902) 882-08-76.
E-mail: aafuntikov@generium.ru

Contacts:

Andrey A. Funtikov
601125, Russian Federation, Vladimir Region, Petushinsky district,
Volginsky settlement, Vladimirskaia str., 14, JSC «GENERIUM».
Phone: +7 (902) 882-08-76.
E-mail: aafuntikov@generium.ru

Для цитирования:

Фунтиков А.А., Литвинова Н.А., Зуев Е.В., Кулемзин С.В., Шукуров Р.Р.
Оценка уровня вируснейтрализующих антител, индуцированных новой
коронавирусной инфекцией COVID-19: разработка анализа быстрой
оценки протективных антител с использованием реакции на основе
псевдовirusа // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 3. С. 457–468.
doi: 10.15789/2220-7619-EOV-4336

Citation:

Funtikov A.A., Litvinova N.A., Zuev E.V., Kulemzin S.V., Shukurov R.R.
Evaluation of virus-neutralizing antibody level after novel coronavirus
infection COVID-19: development of an instant assay assessing protective
antibodies using a pseudovirus-based reaction // Russian Journal
of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 3,
pp. 457–468. doi: 10.15789/2220-7619-EOV-4336

лизации на культуре клеток HEK 293-T-hAce2 с применением псевдотипированных вирусных конструкций на основе вируса иммунодефицита человека. Показаны результаты разработки и валидации метода, перспективы его дальнейшего использования.

Ключевые слова: реакция нейтрализации, псевдовиральные частицы, вируснейтрализующие антитела, COVID-19, SARS-CoV-2, иммунитет.

EVALUATION OF VIRUS-NEUTRALIZING ANTIBODY LEVEL AFTER NOVEL CORONAVIRUS INFECTION COVID-19: DEVELOPMENT OF AN INSTANT ASSAY ASSESSING PROTECTIVE ANTIBODIES USING A PSEUDOVIRUS-BASED REACTION

Funtikov A.A.^a, Litvinova N.A.^a, Zuev E.V.^a, Kulemzin S.V.^b, Shukurov R.R.^a

^aJSC "GENERIUM", Volginsky, Petushinsky District, Vladimir Region, Russian Federation

^bLLC "IMGEN+", Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. The continued emergence of SARS-CoV-2 variants with immune evasion properties of concern, such as Delta (B.1.617.2) and Omicron (B.1.1.529), calls into question the extent of the antibody-mediated immune response from the virus. The presence of virus-neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 in the blood serum of recovered and immunized volunteers is the most accurate indicator of the level of protective activity. Methods for reliable, sensitive and rapid detection of anti-SARS-CoV-2 nAbs are needed for preclinical and clinical vaccine research. In addition, quantification of virus-neutralizing antibodies in recovered COVID-19 subjects may be useful in identifying potential donors for passive immunization and therapeutic use of class G immunoglobulins. Pseudoviruses are actively used as an alternative to infectious viral isolates of pathogenicity groups I–II in serological studies to determine the titers of neutralizing antibodies formed in vaccinated or infected volunteers. In addition, using several pseudotypes with different reporter genes, it is possible to simultaneously detect antibodies to different types of viruses in one biological sample. Currently, the pseudolentiviral system is widely used, in which pseudoviral particles are obtained by transfection of producer cells with vectors of a multiplasmid system of 4–5 plasmids: one for the vector genome, the second for Gag-Pol, the third for Rev, and one or two for protein(s) envelope, or for the co-expression of a labeled viral protein such as GAG-GFP or VPR-GFP, the main advantage of which is safety due to the minimal risk of generating a replication-competent virus. The article discusses the development of a technique that allows to determine the presence of virus-specific neutralizing antibodies to the SARS-CoV-2 antigen in the blood serum of volunteers who have had a new coronavirus infection COVID-19 and/or immunized with specific prophylaxis drugs, healthy volunteers in a neutralization reaction on a HEK 293-cell culture. T-hAce2 using pseudotyped viral constructs based on human immunodeficiency virus. The results of the development and validation of the method, as well as its subsequent prospects for use, are shown.

Key words: virus neutralization reaction, pseudotyped viral constructs, neutralizing antibodies, COVID-19, SARS-CoV-2, immunity.

Введение

Коронавирусная инфекция COVID-19 была вызвана ранее неизвестным бетакоронавирусом (SARS-CoV-2), обнаруженным в образцах смывов бронхиального лаважа, полученных из легких в группе пациентов с пневмонией в китайском городе Ухань в декабре 2019 г. SARS-CoV-2 относится к роду *Coronaviridae*, подроду *Sarbecovirus* и является седьмым по счету известным коронавирусом, способным заражать человека [1].

SARS-CoV-2 является РНК-содержащим вирусом с оболочкой. На основании исследований, проведенных Xiaolu Tang установлено, что вирус представляет собой результат рекомбинации коронавируса летучих мышей со штаммом SARS-CoV-2 другого носителя. Предполагается, что человеку вирус передался от панголина: функциональные сайты белка пепломера вируса SARS-CoV-2 практически идентичны таковому у вируса, обнаруженного у панголинов [11].

В процессе эволюции у вируса происходят генетические мутации и формируются генетические линии, вместе составляющие дерево генетических поколений. Некоторые мутации могут сказываться на скорости распространения вируса, на тяжести вызываемого им заболевания или на эффективности тех или иных методов лечения. По состоянию на сентябрь 2022 г. выделяют следующие штаммы SARS-CoV-2: Alpha (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Delta (B.1.617.2), Gamma (B.1.1.248), Omicron (B.1.1.529) [6] и привлекающая особое внимание исследователей линия Lambda (C.37), известная под названиями VUI-202102/03 или UK1188, частично похожая на штамм 501.V2, но отличающаяся наличием как мутации E484K, так и новой мутации F888L (замещение фенилаланина (F) на лейцин (L) в домене S2 белка-шипа).

Достижение коллективного иммунитета против SARS-CoV-2 естественным путем или путем вакцинации является конечной долгосрочной целью, которая позволит отменить применяемые в настоящее время меры социального контроля [6].

Скрининг на наличие вируснейтрализующих антител (ВНА) также необходим для оценки коллективного иммунитета против SARS-CoV-2 и эффективности программ вакцинации, развернутых во многих странах с конца 2020 г.

Вакцины значительно сокращают количество госпитализаций и смертей от COVID-19. Те препараты, которые были разработаны в начале пандемии, продолжают обеспечивать защиту от тяжелых форм заболевания, вызванного новыми вариантами SARS-CoV-2.

Пока неизвестно, можно ли считать уровни ВНА единственной мерой защитного иммунитета против COVID-19, но недавнее успешное лечение тяжелобольных пациентов плазмой от переболевших добровольцев и препаратами моноклональных антител, содержащими высокие уровни ВНА, предполагает важную роль ВНА [3, 6, 8, 9, 13].

Первым разработанным методом, позволяющим определить ВНА, являлась реакция нейтрализации уменьшения бляшек (plaque reduction neutralization test, PRNT) или реакция нейтрализации макрометодом, которая определяет уровень ВНА путем нейтрализации вируса *in vitro*. Постановка реакции осуществлялась непосредственно в 6-, 12- или 24-луночных культуральных планшетах. Некоторые модификации реакции нейтрализации макрометодом подразумевают постановку в медицинских флаконах по типу ФО-10-НС. PRNT считается золотым стандартом для оценки ВНА (иммуноглобулинов класса G) от многих вирусных заболеваний [2, 5, 7].

Однако метод PRNT имеет несколько ограничений, которые делают его непригодным для крупномасштабных исследований образцов сыворотки, например, таких, как II–III фазы клинических исследований вакцин с участием добровольцев. PRNT технически сложен, имеет очень низкую пропускную способность, его трудно автоматизировать и, в случае SARS-CoV-2, получение результата возможно только через 72–96 ч — примерно столько времени необходимо вирусу для образования видимых бляшек. Кроме того, анализ данных обычно выполняется с использованием расчетов в электронной таблице Excel для определения титров нейтрализации (визуальный учет, например, формула Спирмена–Кербера [4]) или с помощью бесплатных статистических пакетов, таких как «Statistica», для выполнения пробит-регрессии. Визуальный учет реакции является субъективным, поскольку зависит от оценки эффекта бляшкообразования конкретным оператором, что в значительной степени может повлиять на интерпретацию результатов исследования.

Чтобы нивелировать технические недостатки метода PRNT, был разработан альтернативный тест, известный как реакция нейтрализации

микрометодом (microneutralization assay, MNA). Реакция нейтрализации микрометодом с использованием сывороток крови, содержащих специфические антитела, *in vitro* является более объективным тестом для их определения [4, 10].

Этот анализ проводится на 96-луночных планшетах и включает иммуноокрашивание для визуализации инфицированных клеток, которые могут быть подсчитаны с помощью компьютерных программ анализа изображений, что существенно увеличивает производительность анализа по сравнению с подсчетом, выполняемым в PRNT.

Дальнейшее развитие MNA заключается в замене вируса II группы патогенности по классификации патогенности, действующей на территории Российской Федерации (СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»), на псевдовирусные частицы. В связи с тем, что псевдовирусные частицы потенциально не являются возбудителем заболеваний человека или животных, они не относятся к определенной группе патогенов. Можно считать, что использование псевдовирюсов возможно и безопасно в лабораториях, имеющих разрешение на работу с микроорганизмами III–IV групп патогенности, особенно при использовании псевдовирюсов на основе лентивирусов, поскольку псевдолентивирусная система ограничивается лишь одним поколением псевдовирюсов, так как в инфицированных ими клетках отсутствуют вирусные белки, необходимые для образования вирусного потомства. Но, несмотря на отсутствие риска для персонала, населения, домашнего скота или окружающей среды, использование псевдовирюсных конструкций все же следует ограничить лабораториями III–IV групп патогенности.

Псевдотипированные вирусы состоят из нереплицирующихся генетически модифицированных вирионов, которые составляют структурное и ферментативное ядро одного вируса, например, вируса везикулярного стоматита (VSV) или лентивируса (HIV), но несут поверхностные белки другого вируса (S-белок SARS-CoV-2), и кодируют поддающийся количественной оценке репортерный ген — ген люциферазы светлячка (FLUC) или люциферазы креветки (NLUC).

Инфекционность таких частиц — псевдовирюсов — определяется уже поверхностными белками гетерологичного вируса и ограничивается лишь одним циклом инфекции, что обеспечивает биологическую безопасность этой системы.

В дополнение к вышесказанному необходимо отметить, что именно реакция нейтрализации патогенного агента ВНА, содержащимися в образцах сыворотки крови, с применением чувствительных клеточных культур является «золотым» стандартом определения протективной

активности. Ввиду использования нативного или псевдотипированного возбудителя, метод MNA позволяет максимально корректно моделировать биологический процесс, протекающий непосредственно в организме субъектов, не подвергая их какой-либо опасности, что позволяет в полной мере оценивать их иммунный статус.

Материалы и методы

Получение псевдовиральных конструкций

Рекомбинантные псевдовirusы на основе вируса иммунодефицита человека получали котрансфекцией плазмид PLV, psPAX2 и Sd19 в клетки-продуценты линии HEK-293T. Котрансфекцию проводили кальций-фосфатным методом при конфлюэнтности монослоя 50–70%. Для трансфекции клеток на одной чашке использовали 70 мкг смеси плазмид в соотношении PLV460:psPAX2:Sd19 = 3:2:2.

Через 7–8 ч после трансфекции с культуральных чашек удаляли среду с ДНК-преципитатом с помощью аспирации, однократно промывали чашки 10 мл стерильного PBS. Через 68–72 ч после трансфекции культуральную среду, содержащую псевдовиральные частицы, собирали в 50-миллилитровые конические пробирки, центрифугировали 10 мин при 4000 об/мин для удаления клеток и крупного клеточного дебриса и фильтровали с помощью системы для вакуумной фильтрации с размером пор 0,45 мкм. Затем полученную среду объемом около 900 мл концентрировали на модуле системы Vivaflow 50 (Sartorius, Германия) до объема 90 мл. Для осаждения вируса 90 мл сконцентрированной среды наслаивали на 20% раствор сахарозы и центрифугировали на ультрацентрифуге Avanti J-301 (Beckman Coulter, США) при 24 000g в течение 90 мин с использованием ротора JS-24. Осадок псевдовirusа ресуспендировали в 8 мл среды Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific, США), содержащей 2,5% инактивированной нагреванием эмбриональной сыворотки телят, аликвотировали и замораживали в жидком азоте.

После получения вирусного препарата проводили его титрование на клетках HEK 293T-hAce2. Методом проточной цитометрии находили процент трансдуцированных клеток, затем строили график уровня трансдукции от объема внесенного вирусного препарата и по его линейному участку вычисляли титр вируса в трансдукционных единицах.

Подготовка испытуемых образцов сыворотки

Первая часть биообразцов была получена от добровольцев в 2020 г. во время распространения новой коронавирусной инфекции COVID-19 в России, вторая — от добровольцев в рамках протокола клинического исследо-

вания VCI-COV-III (разрешение МЗ РФ РКИ № 869 от 20.12.2021).

Криопробирки с биоматериалом были помещены в боксы со штативами крышками вверх. Заморозка, хранение и транспортировка биообразцов осуществлялись при температуре -70°C или ниже.

Перед началом анализа образцы сывороток инактивировали на водяной бане при температуре $56\pm 2^{\circ}\text{C}$ в течение 30 мин с целью разрушения компонентов системы комплемента.

Для постановки реакции нейтрализации на панелях использовались сыворотки без признаков хлеза, гемолиза, контаминации патогенной флорой. В исследовании по определению ВНА использовались 403 образца сыворотки крови, полученные от 137 добровольцев.

Принцип постановки метода

В лунки белого 96-луночного планшета Corning-3916 либо ThermoFisher 136101 вносили по 100 мкл суспензии клеток HEK-293T-hAce2 из расчета 15 000 кл/лунку. Для заполнения одного планшета использовали около 10 мл суспензии клеток.

Далее, перед внесением в U-образный планшет сыворотки разводили 1:5 (200 мкл сыворотки + 800 мкл среды) средой Opti-MEM 2,5% FBS.

В качестве положительного контроля применялась сыворотка, содержащая антитела к SARS-CoV-2, либо коммерческий препарат нейтрализующих антител производства ФГБУН ИМКБ СО РАН. Образец использовался в фиксированной концентрации 1 мкг/мл, при которой достигалась полная нейтрализация вирусных частиц.

Во все лунки предварительно вносили 80 мкл среды разведения, после этого добавляли 80 мкл испытуемой сыворотки, и с помощью многоканальной пипетки, установленной на 80 мкл, выполняли двукратные разведения сыворотки (содержимое лунок перемешивалось минимум 6–8 раз в каждом ряду), следуя вниз по планшету и сбрасывая в контейнер для обеззараживания отходов 100 мкл после смешивания в последнем ряду.

Референтная сыворотка или коммерческий положительный контроль всегда титровались до последней лунки и использовались при любой схеме постановки. Далее во все лунки, кроме лунок первого ряда, вносили раствор вирусных частиц в среде Opti-MEM 2,5% FBS, из расчета 10 000 вирусных единиц (ТУ) на лунку в 80 мкл среды. После этого содержимое лунок перемешивали многоканальной пипеткой, начиная с ряда с наибольшим разведением сыворотки к ряду с наименьшим разведением. Далее планшет инкубировали 30 мин при 37°C .

Затем содержимое лунок (по 160 мкл из каждой лунки) переносили в белые культуральные

планшеты, содержащие суспензию культуры клеток НЕК-293Т-hAce2. Процедура проводилась крайне аккуратно, чтобы избежать перекрестной контаминации. Предварительно из белых планшетов удаляли ростовую среду, отбирая ее многоканальными пипетками таким образом, чтобы не откреплялись клетки НЕК-293Т-hAce2.

Закрытые белые планшеты перемещали в CO₂-инкубатор и инкубировали в течение 36–48 ч при стандартных условиях (37°C и 5% CO₂).

По окончании культивирования из лунок планшета многоканальными пипетками отбирали ростовую среду и вносили во все лунки по 40 мкл раствора PBS, нагретого до температуры 20–25°C. Далее во все лунки планшета добавляли по 40 мкл предварительно подготовленного и также нагретого до температуры 20–25°C реагента OneGlo Luciferase assay KIT (Promega, США). Планшеты инкубировали в течение 60–75 мин при комнатной температуре (20–25°C), после чего осуществляли детекцию люминесценции возбуждением в течение 100 мс на микропланшетном ридере Infinite 200 Pro (Tecan, Швейцария).

Данные значений относительных единиц люминесценции (RLU) контроля вируса и контроля клеток переводили в среднее значение ($n = 8$), а полученные усредненные данные — в процентное отношение. Протокол принимал за положительное значение (100%) данные, полученные в ряду с вирусным материалом, а за отрицательное значение (0%) — данные, полученные в ряду с контролем клеток.

Данные значений RLU подсчитываются по следующей формуле:

$$\% = \frac{(A - B)}{(B - C)} \times 100$$

где: А — среднее значение RLU образца в определенном разведении, переводимое в %; В — среднее значение RLU отрицательного контроля, соответствующее разведению определяемого значения А; С — среднее значение RLU положительного контроля (контроль вируса), соответствующее разведению определяемого значения А.

Данные обрабатывали в программном обеспечении GraphPad Prism 8.0 посредством построения кривой уровня полумаксимального ингибирования (ID₅₀). Кривые уровня полумаксимального ингибирования определяются четырьмя параметрами: Top (верх), Bottom (низ), HillSlope (наклон сигмоидальной кривой) и ID₅₀. Параметры Top и Bottom описывают значения, при которых кривая выходит на плато — приближаясь бесконечно близко, но никогда не достигая этих значений. HillSlope описывает наклон сигмоидальной кривой между этими двумя плато. ID₅₀ относится к концентрации

агониста (или антагониста), необходимой для увеличения (или уменьшения) измеренного ответа до половины или до 50% от его максимального значения.

В отношении реакции микронейтрализации с применением псевдовиральных частиц (pMNA) определяется абсолютное значение ID₅₀. Оно представлено концентрацией, вызывающей ответ между контролем (отсутствие антагониста, контроль клеток) и положительным контролем (контроль вируса).

Результаты

На первом этапе работы было необходимо подобрать условия и соотношения всех компонентов реакционной смеси (объем вирусного материала, исследуемой сыворотки). В результате исследований были определены:

- оптимальный сигнальный репортер, используемый при анализе протективной активности исследуемых сывороток;
- время инкубации планшетов при использовании реагента OneGlo;
- схема разведения исследуемых сывороток и схема постановки метода в планшете.
- титр псевдовиральных частиц (подбор рабочей дозы псевдотипированной вирусной конструкции варьировали от разведения 1×10^{-4} до 1×10^{-6}).

Предварительный скрининг сывороток крови для сравнительного анализа был проведен в 2020 г. в начале пандемии, вызванной коронавирусом SARS-CoV-2, с использованием диагностической тест-системы на основе иммуноферментного анализа (ИФА), а также по результатам опроса добровольцев, в ходе которого выяснялось, были ли они вакцинированы или переболели COVID-19. Таким образом были определены положительные и отрицательные образцы сывороток, используемых для разработки методики.

Используя эти образцы, определили сигнальный репортер FLUC (псевдотипированная вирусная конструкция включает данный репортер) ввиду значительно более низкой дельты в сигнале флуоресценции (25 000–45 000 fluorescence units) между исследуемыми образцами, чем при детекции люминесценции (20 000–2 500 000 luminescence units) (рис. 1–2, вклейка, с. 1).

На начальных этапах разработки методики для установления применяемого сигнала в качестве вспомогательного, контрольного метода, определяющего правильность постановки реакции, использовали сигнал флуоресценции (гена GFP как репортера).

При наличии сигнала флуоресценции в планшетах допускалось применение реагента OneGlo и детекция люминесценции.

Наибольшие различия в разных сериях экспериментов, проведенных с использованием настоящего подхода, могут быть связаны с разными партиями псевдовиральных частиц. Так как этот компонент характеризуется сложным составом и может незначительно менять свои свойства в зависимости от серии, мы проверили робастность методики с разными сериями вирусных частиц и с репортерами Fluc (люцифераза светлячка) и Nluc (люцифераза креветки).

Из табл. 1 и рис. 2 видно, что использование разных репортеров Nluc и Fluc не приводит к снижению специфичности метода. Образцы, в которых в первом разведении сыворотки полнота нейтрализации достигает 100–50% расцениваются как серопозитивные, CV ВНА в значении ID_{50} не превышает 55%, полученные на двух разных репортерах данные сопоставимы.

Параллельно с выбором репортера произошло определение оптимального времени инкубации с реагентом (от 30 до 150 мин).

При инкубации в течение 30 мин сигнал люминесценции был значительно интенсивнее, но данные, преобразованные из относительных единиц люминесценции, были менее корректны и не поддавались интерпретации. Время 60–75 мин было оптимальным по интенсивности RLU, последующее время инкубации снижало сигнал (рис. 3, вклейка, с. I).

Следующей задачей являлось определение схемы разведения исследуемых образцов сывороток, анализируемых в методе. При незначительном разведении исследуемых образцов образовывалось своеобразное плато, которое на графиках представляло собой практически прямую линию.

При шаге разведений до 1:32 исследуемая сыворотка практически во всех разведениях проявляет протективную активность, и определение титра ВНА невозможно. Данные разведения показаны на графике синим.

При шаге разведений до 1:2048 протективная активность сыворотки практически сразу теряется и определение уровня ВНА также не представляется возможным. Данные разведения показаны на графике зеленым.

Наиболее предпочтительной схемой разведения являются разведения от 1:16 до 1:256, при их использовании на графике демонстрируется оптимальная сигмоидальная кривая, поддающаяся интерпретации и корректному определению титра ВНА.

Полученные результаты были обработаны с помощью построения кривой уровня полумаксимального ингибирования (ID_{50}). Данные, представленные на рис. 4 (вклейка, с. I), подтверждают выводы, полученные в ходе постановки реакции при использовании разных разведений.

Используемое разведение псевдовиральных частиц, применяемое в качестве рабочей дозы, также влияет на взаимодействие с антителами. При внесении большего объема вирусного материала даже значительное количество антител в образце не сможет заблокировать все участки спайкового белка на поверхности вируса, однако при внесении меньшего объема псевдовirusа наблюдается обратный эффект. При подборе оптимальной рабочей дозы псевдовиральной конструкции мы ориентировались на титр активности частиц, определенный в компетентных к вирусу клетках, и использовали разведение от 1×10^{-3} до 1×10^{-6} .

В два ряда планшета последовательно внесли по 24 мкл псевдовirusа в каждую лунку восьмиканальным дозатором (рабочее разведение вируса 1×10^{-3} , или 100 000 вирусных частиц на лунку; рабочее разведение вируса 1×10^{-4} , или 10 000 вирусных частиц на лунку; рабочее разведение вируса 1×10^{-5} , или 1000 вирусных частиц на лунку и рабочее разведение вируса 1×10^{-6} , или 100 вирусных частиц на лунку), предварительно разведя псевдовirus средой DMEM F12 D8900 + 2% FBS в 4, 8 и 16 раз соответственно.

Применение рабочей дозы псевдовиральных частиц 1×10^{-4} (рис. 5, вклейка, с. II) наиболее эффективно при постановке реакции, так как именно с применением этого разведения получают наиболее четкие данные с минимальным количеством выбитых точек; при увеличении разведения рабочей дозы наблюдается значительное снижение точности метода и полученные данные не поддаются дальнейшей интерпретации.

Значения исследуемых образцов сыворотки (стандартная схема постановки), используемые в дальнейшем для сравнения метода ИФА с детекцией через 60 мин, представлены на рис. 6 (вклейка, с. II).

Сравнение результатов, полученных при постановке образцов в реакции нейтрализации, и результатов, полученных методом иммуноферментного анализа (SARS-CoV-2 IgG (количественный) «ИФА Бест», кат. № D5505, Lot № 3, годен до), представлены в табл. 2.

Из табл. 2 видно, что результаты, полученные при постановке образцов в реакции нейтрализации и методом иммуноферментного анализа, имеют лишь умеренную корреляцию в образцах переболевших добровольцев.

Это связано с тем, что метод ИФА направлен на определение в сыворотке крови добровольцев пула антител, сформированных на пептиды S, M, N и белки вириона SARS-CoV-2, поэтому даже высокое значение BAU/ml не гарантирует надлежащей защиты от инфицирования [12].

Метод рMNA направлен на взаимодействие ВНА непосредственно со спайковым белком

Таблица 1. Оценка робастности методики при постановке реакции с использованием разных репортеров Nluc и Fluc в исследовании серопозитивных сывороток

Table 1. Evaluation of method robustness using different Nluc and Fluc reporters in the study of seropositive sera

№ образца Sample	Репортер Nluc Reporter Nluc		Репортер Fluc Reporter Fluc		Среднее значение Average		Стандартное отклонение Standard deviation		CV, %	
	LogID ₅₀	ID ₅₀	LogID ₅₀	ID ₅₀	LogID ₅₀	ID ₅₀	LogID ₅₀	ID ₅₀	LogID ₅₀	ID ₅₀
33	2,141	138,3	2,076	119,1	2,108	128,7	0,032	9,6	1,54	7,45
73	3,033	1079,0	3,138	1374,0	3,085	1226,5	0,052	147,5	1,70	12,02
72	2,932	854,8	3,007	1017,0	2,969	935,9	0,037	81,1	1,26	8,66
71	2,426	266,8	2,475	298,5	2,450	282,6	0,024	15,8	0,99	5,60
76	2,165	146,2	2,364	231,2	2,264	188,7	0,099	42,5	4,39	22,52
75	1,997	99,2	2,216	164,6	2,106	131,9	0,109	32,6	5,19	24,77
67	2,949	888,4	2,946	882,4	2,947	885,4	0,001	3,0	0,05	0,33
114	2,237	172,6	2,224	167,6	2,230	170,1	0,006	2,5	0,29	1,46
121	2,596	394,4	2,623	419,9	2,609	407,1	0,013	12,7	0,51	3,13

SARS-CoV-2, так как только этот участок встроен в оболочку псевдотипированных вирусных частиц, используемых при постановке, и является составной частью рекомбинантных векторных вакцин.

Поэтому именно метод рMNA является наиболее предпочтительным при оценке протективной защиты вакцин, применяемых в профилактике COVID-19.

На втором этапе по результатам разработки метода определения ВНА было проведено лабораторное исследование, оценивающее пригодность методики, позволяющей определить наличие специфических к антигену SARS-CoV-2 ВНА в сыворотке крови добровольцев, переболевших новой коронавирусной инфекцией COVID-19 и/или иммунизированных препаратами специфической профилактики COVID-19, здоровых (не болевших и не иммунизированных) в реакции нейтрализации на культуре клеток НЕК 293-T-hAce2 с применением псевдовиральных частиц.

Полнота нейтрализации представляет собой показатель, обратный процентному отношению сигнала люминесценции. При полноте инактивации в 100% значение RLU соответствует 0% и наоборот.

Образцы, в которых в первом разведении сыворотки полнота нейтрализации не достигала 50%, расценивались как серонегативные. Образцы, в которых в первом разведении сыворотки полнота нейтрализации достигала 100–50%, расценивались как серопозитивные. Так как в результате вакцинации, равно как и в процессе естественной инфекции, вырабатываются ВНА к вирусу SARS-CoV-2, сыворотки вакцинированных и переболевших людей обладают вируснейтрализующей активностью. Необходимо отметить, что под вакцинирован-

ными в настоящем исследовании понимаются люди, получавшие дозу векторной назальной вакцины, блокирующей S-белок вируса SARS-CoV-2. В случае нулевой или низкой концентрации нейтрализующих антител в исследуемом разведении анализируемой сыворотки значения нейтрализации могут быть более 100%, что является следствием стабилизации вирусных частиц сывороточными белками и приводит к более эффективной трансдукции клеток, чем в отрицательном контроле без сывороток.

Специфичность. Специфичность — это способность аналитической методики однозначно оценивать определяемое вещество в присутствии сопутствующих компонентов. Доказательство специфичности валидируемой методики обычно основывается на рассмотрении полученных с ее использованием данных анализа модельных смесей известного состава. Образцы, в которых в первом разведении сыворотки полнота нейтрализации не достигает 50% расцениваются, как серонегативные. В настоящем исследовании в качестве критерия специфичности принималась способность методики различать образцы, характеризующиеся способностью/неспособностью нейтрализовать SARS-CoV-2, и образцы от доноров, заведомо наивных по инфекции SARS-CoV-2.

Из табл. 3 и рис. 7 (вклейка, с. II) видно, что образцы, в которых в первом разведении сыворотки полнота нейтрализации достигает 100–50%, обладают значением ID₅₀ более 50 единиц и расцениваются как серопозитивные.

Из табл. 4 видно, что образцы, в которых в первом разведении сыворотки полнота нейтрализации не более 50%, и которые обладают значением ID₅₀ менее 50 единиц, расцениваются как серонегативные. Специфичность методики была подтверждена.

Таблица 2. Результаты, полученные при постановке образцов в реакции нейтрализации и методом иммуноферментного анализа

Table 2. Results obtained using neutralization reaction and ELISA

№ образца Sample	Статус Status	Результат рМНА (LogIC ₅₀) pMNA (LogIC ₅₀)	Результат ИФАБест (BAU/ml) IFABest (BAU/ml)
001-А (А)	Вакцинирован/Vaccinated	2,786	535,726
002-Б (В)	Вакцинирован/Vaccinated	3,067	170,593
003-В (С)	Вакцинирован/Vaccinated	3,158	90,472
004-Г (D)	Вакцинирован/Vaccinated	2,605	842,665
005-Д (Е)	Вакцинирован/Vaccinated	3,321	116,691
006-Е (F)	Вакцинирован/Vaccinated	3,211	43,608
007-Ж (G)	Вакцинирован/Переболел Vaccinated/Has been ill	4,099	701,349
КОЛ (КОЛ)	Вакцинирован/Переболел Vaccinated/Has been ill	3,540	729,553

Примечание. < 10,0 BAU/мл — отрицательный (антител нет); ≥ 10,0 BAU/мл — положительный (антитела есть); при 11–79 BAU/мл = вируснейтрализующий эффект низкий (принятие решения по вакцинации); при 80–149,9 BAU/мл = вируснейтрализующий эффект действует только в 50% случаев (контроль в динамике); при > 150 BAU/мл = вируснейтрализующая активность ярко выражена в 100% случаев (достаточный уровень для защиты, вакцинация не требуется); при 500 и выше = выработан максимальный уровень антител (вакцинация не требуется).

Note. < 10.0 BAU/ml — negative (no antibodies); ≥ 10.0 BAU/ml — positive (with antibodies); at 11–79 BAU/ml = low virus neutralization effect (vaccination decision); at 80–149.9 BAU/ml = virus-neutralizing effect is effective only in 50% of cases (time-dependent control); at > 150 BAU/ml = virus-neutralizing activity is prominent in 100% of cases (sufficient level for protection, vaccination is not required); at 500 and above = the maximum level of antibodies has been developed (vaccination is not required).

Повторяемость (сходимость). Повторяемость аналитической методики оценивают по независимым результатам, полученным в одинаковых регламентированных условиях (одна серия псевдовирусных частиц с одним репортером FLUC, один оператор) в пределах короткого промежутка времени.

Данные, представленные в табл. 5 и на рис. 8 (вклейка, с. III), свидетельствуют о соответствии полученных результатов критериям приемлемости методики. Повторяемость аналитической методики, исходя из полученных в одинаковых условиях данных (при использовании одной серии псевдовирусных частиц с одним репортером FLUC, один оператор), проанализирована по критериям: стандартное отклонение (SD), относительное стандартное отклонение (RSD). Для одного образца у одного оператора в трех повторах коэффициент вариации для значений ВНА ID₅₀ не превышал 55%. Повторяемость методики была подтверждена.

Промежуточная (внутрилабораторная) прецизионность. Внутрилабораторная (промежуточная) прецизионность валидируемой методики оценивается в условиях работы одной лаборатории (один батч псевдовирусных частиц с одним репортером FLUC, три оператора).

Из табл. 6 и рис. 9 (вклейка, с. III) видно, что внутрилабораторная (промежуточная) прецизионность валидируемой методики, исходя из полученных в одинаковых регламентированных условиях в одной лаборатории резуль-

татов, соответствует критериям приемлемости методики: CV ВНА в значении ID₅₀ не превышает 55%. Прецизионность методики была подтверждена.

Табл. 7 и рис. 10 (вклейка, с. III) демонстрируют, что применение одного репортера разных серий, используемых при сборке псевдотипированной конструкции, не приводит к снижению устойчивости метода: CV ВНА в значении ID₅₀ не превышает 55%, что соответствует критериям приемлемости методики. Робастность методики была подтверждена.

Линейность. Линейность методики — это наличие линейной зависимости аналитического сигнала от концентрации или количества определяемого вещества в анализируемой пробе в пределах аналитической области методики. В диапазоне детекции должна наблюдаться линейность при сопоставлении расчетного ID₅₀ и измеренного ID₅₀. Мету линейности определяют, откладывая на графике точки log₂ (ID₅₀) от log₂ (кратность разведения) и находя R² при линейной регрессии (функция y = kx + c). За допустимый уровень линейности принят такой, при котором R² > 0,9.

Рис. 11 и 12 (вклейка, с. IV) показывают наличие линейной зависимости аналитического сигнала от концентрации ВНА в анализируемых сыворотках крови добровольцев в пределах аналитической области методики, что подтверждает значение R², не превышающее 0,9. Линейность методики подтверждена при значении R² > 0,9.

Иллюстрации к статье «Оценка уровня вируснейтрализующих антител, индуцированных новой коронавирусной инфекцией COVID-19: разработка анализа быстрой оценки протективных антител с использованием реакции на основе псевдовируса» (авторы: А.А. Фунтиков, Н.А. Литвинова, Е.В. Зуев, С.В. Кулемзин, Р.Р. Шукуров) (с. 457–468) (1-й фрагмент; продолжение см. на с. II)

Illustrations for the article “Evaluation of virus-neutralizing antibody level after novel coronavirus infection COVID-19: development of an instant assay assessing protective antibodies using a pseudovirus-based reaction” (authors: Funtikov A.A., Litvinova N.A., Zuev E.V., Kulemzin S.V., Shukurov R.R.) (pp. 457–468) (1st fragment; continued on p. II)

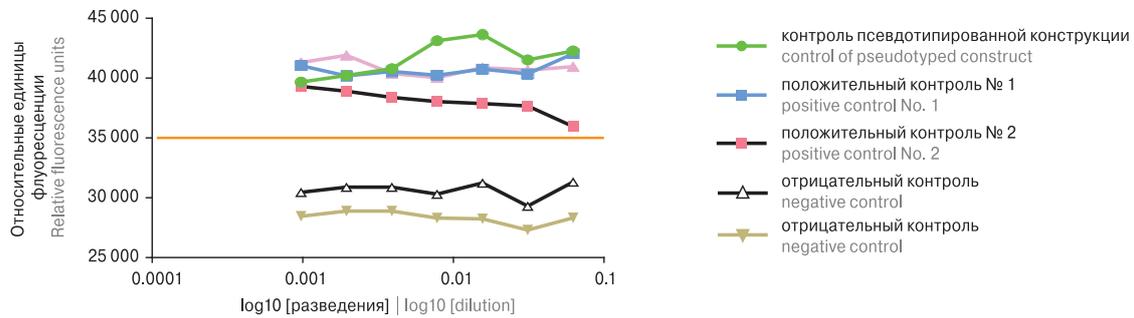


Рисунок 1. Детекция флуоресценции

Figure 1. Negative controls

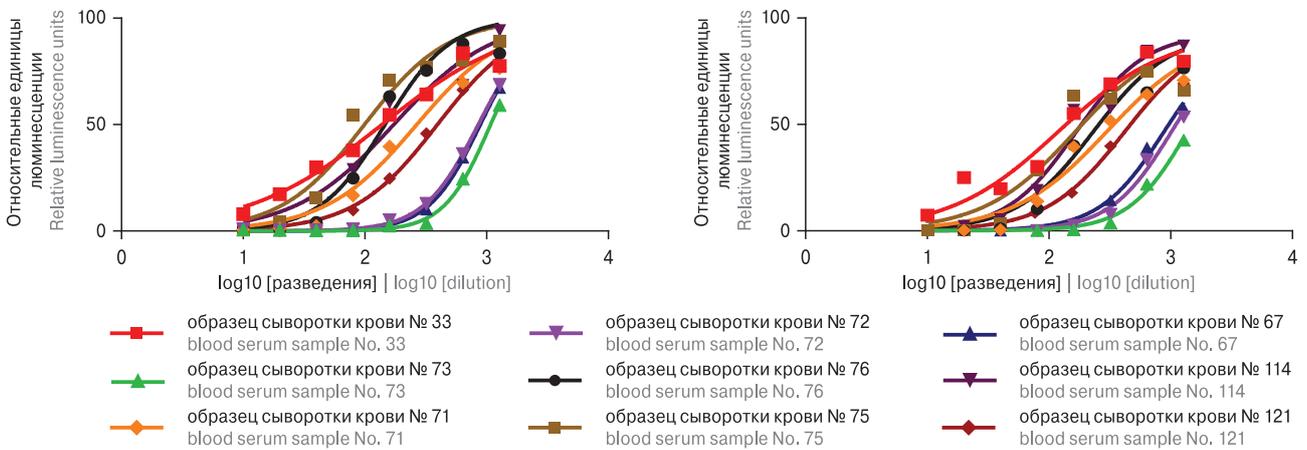


Рисунок 2. График зависимости сигнала RLU от логарифма разведения с использованием репортера Nluc (левый график) и Fluc (правый график)

Figure 2. RLU signal versus logarithm of dilution for Nluc (left plot) and Fluc (right plot) reporter

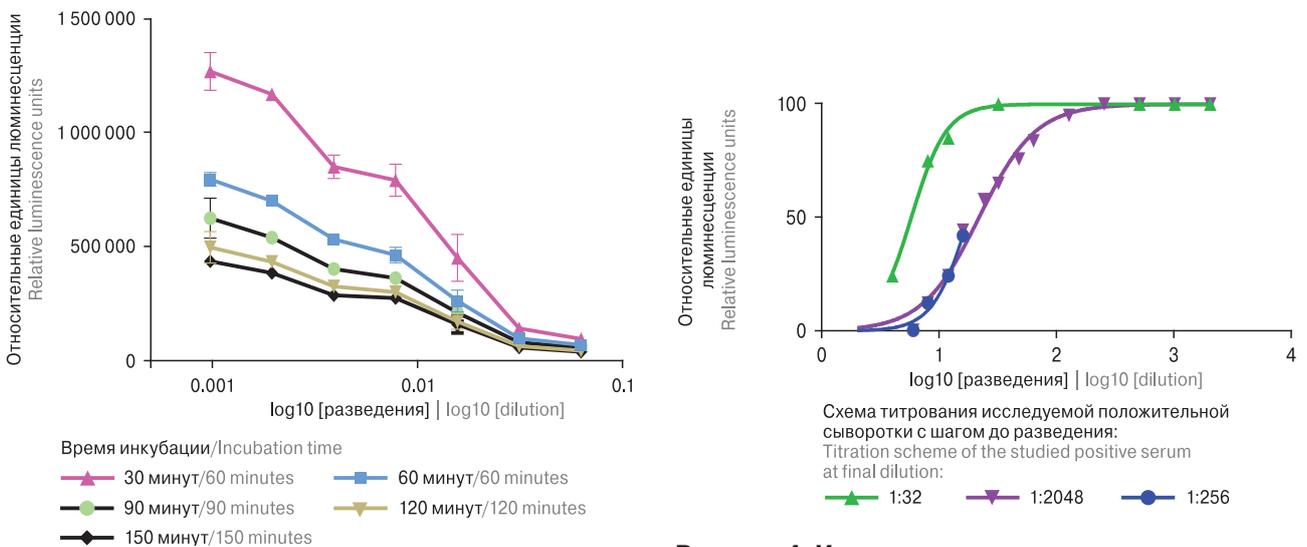


Рисунок 3. Инкубация образца с реагентом OneGlo

Figure 3. A sample incubated with OneGlo reagent

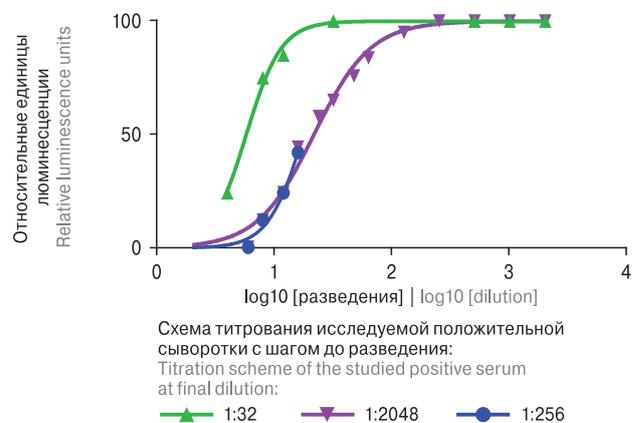


Рисунок 4. Итоговые значения исследуемых образцов сыворотки с детекцией через 60 минут

Figure 4. Summarized data on the studied serum samples by detection after 60-minute incubation

Иллюстрации к статье «Оценка уровня вируснейтрализующих антител, индуцированных новой коронавирусной инфекцией COVID-19: разработка анализа быстрой оценки протективных антител с использованием реакции на основе псевдовируса» (авторы: А.А. Фунтиков, Н.А. Литвинова, Е.В. Зуев, С.В. Кулемзин, Р.Р. Шукуров) (с. 457–468) (2-й фрагмент; начало см. на с. I; продолжение см. на с. III)

Illustrations for the article “Evaluation of virus-neutralizing antibody level after novel coronavirus infection COVID-19: development of an instant assay assessing protective antibodies using a pseudovirus-based reaction” (authors: Funtikov A.A., Litvinova N.A., Zuev E.V., Kulemzin S.V., Shukurov R.R.) (pp. 457–468) (2nd fragment; start on p. I, continued on p. III)

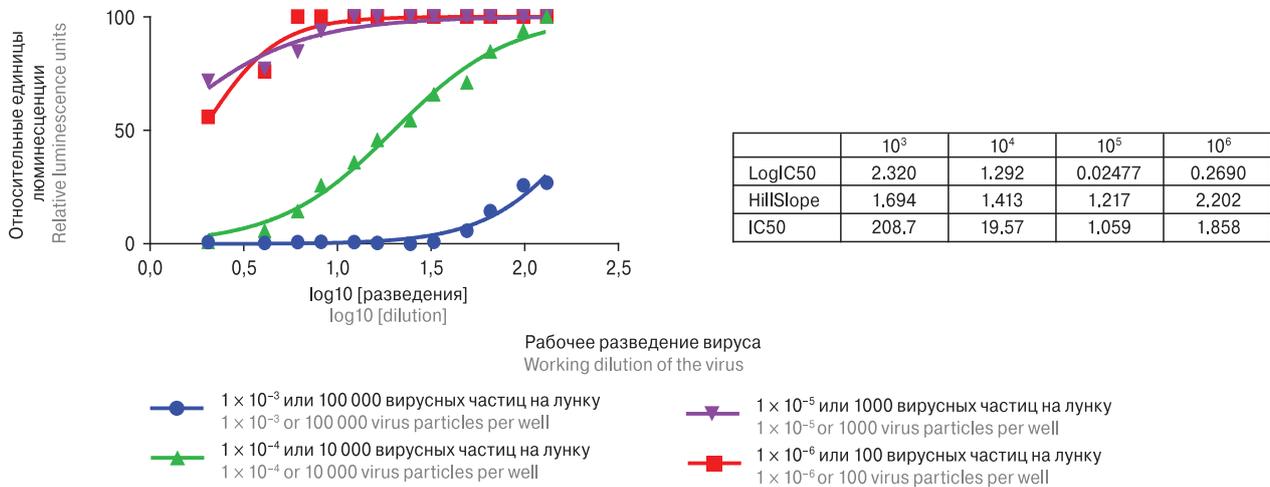


Рисунок 5. Результаты интерпретации титра пAb в сыворотке крови с применением рабочей дозы псевдовиральных частиц

Figure 5. nAb titer interpretation in blood serum using a working dose of pseudoviral particles depicted as follows

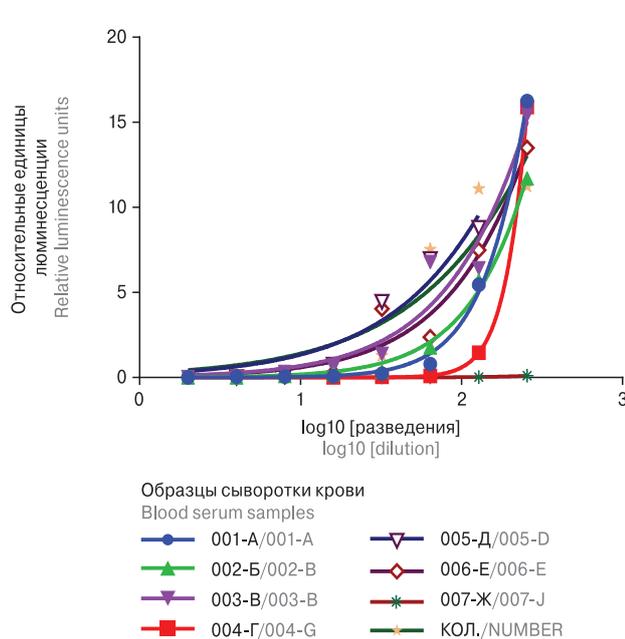


Рисунок 6. Результаты интерпретации титра вируснейтрализующих антител в сыворотке с применением рабочей дозы псевдовиральных частиц 1×10^{-4}

Figure 6. Interpretation of virus-neutralizing antibody titer in serum using a working dose of pseudoviral particles 1×10^{-4}

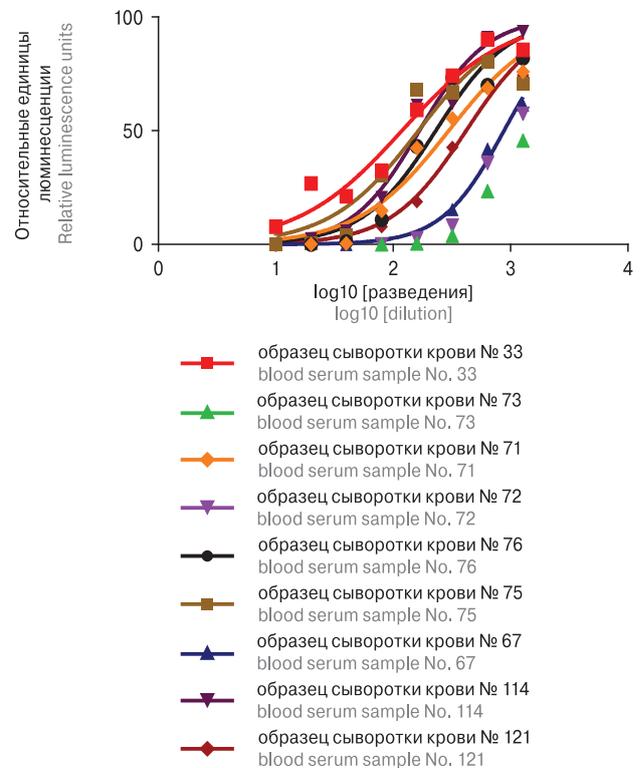


Рисунок 7. График зависимости сигнала RLU от логарифма разведения

Figure 7. RLU signal versus log dilution

Иллюстрации к статье «Оценка уровня вируснейтрализующих антител, индуцированных новой коронавирусной инфекцией COVID-19: разработка анализа быстрой оценки протективных антител с использованием реакции на основе псевдовируса» (авторы: А.А. Фунтиков, Н.А. Литвинова, Е.В. Зуев, С.В. Кулемзин, Р.Р. Шукуров) (с. 457–468) (3-й фрагмент; начало см. на с. I–II; окончание см. на с. IV)

Illustrations for the article “Evaluation of virus-neutralizing antibody level after novel coronavirus infection COVID-19: development of an instant assay assessing protective antibodies using a pseudovirus-based reaction” (authors: Funtikov A.A., Litvinova N.A., Zuev E.V., Kulemzin S.V., Shukurov R.R.) (pp. 457–468) (3rd fragment; start on p. I–II, continued on p. IV)

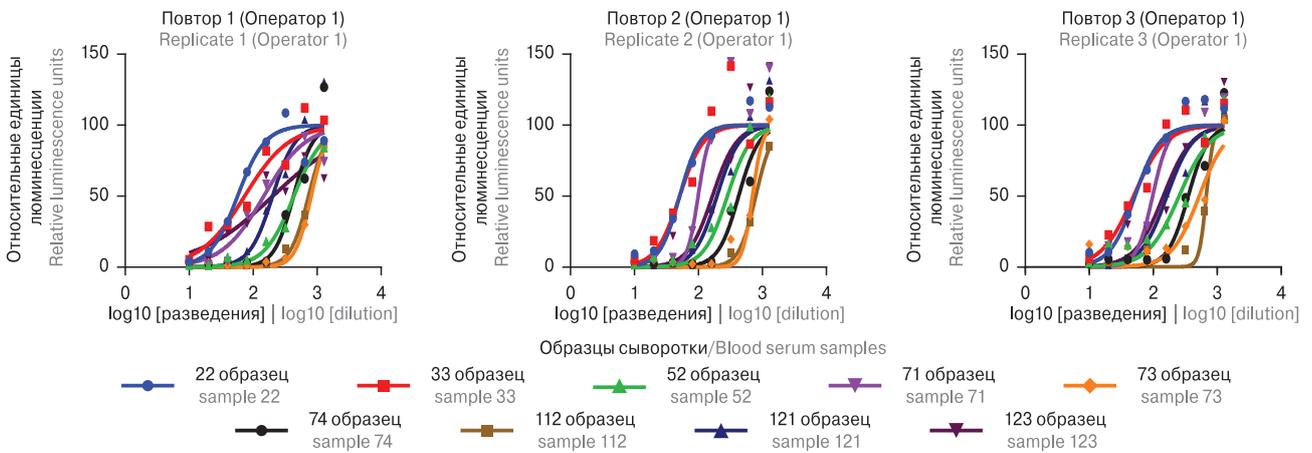


Рисунок 8. График зависимости сигнала RLU от логарифма разведения (технические повторы, выполненные одним оператором)

Figure 8. RLU signal versus logarithm of dilution (one-operator technical replicates)

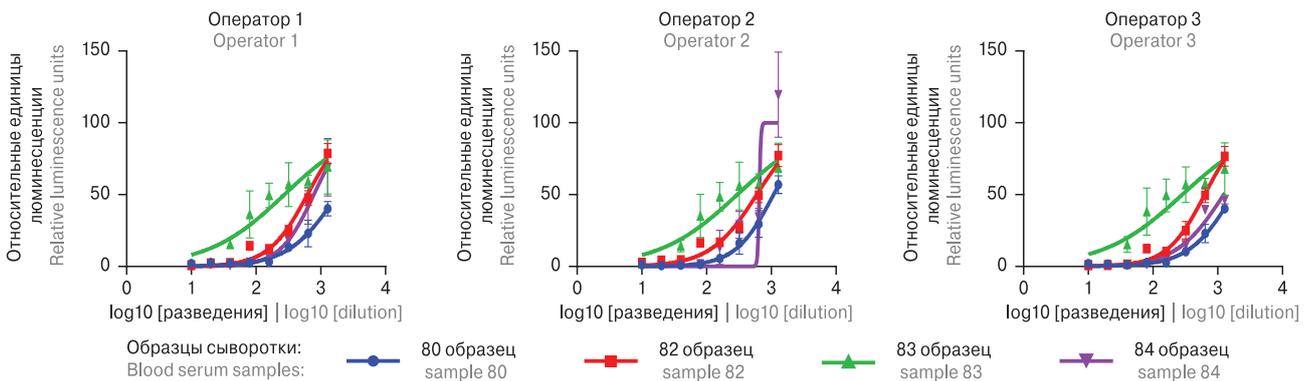


Рисунок 9. График зависимости сигнала RLU от логарифма разведения

Figure 9. RLU signal versus log dilution

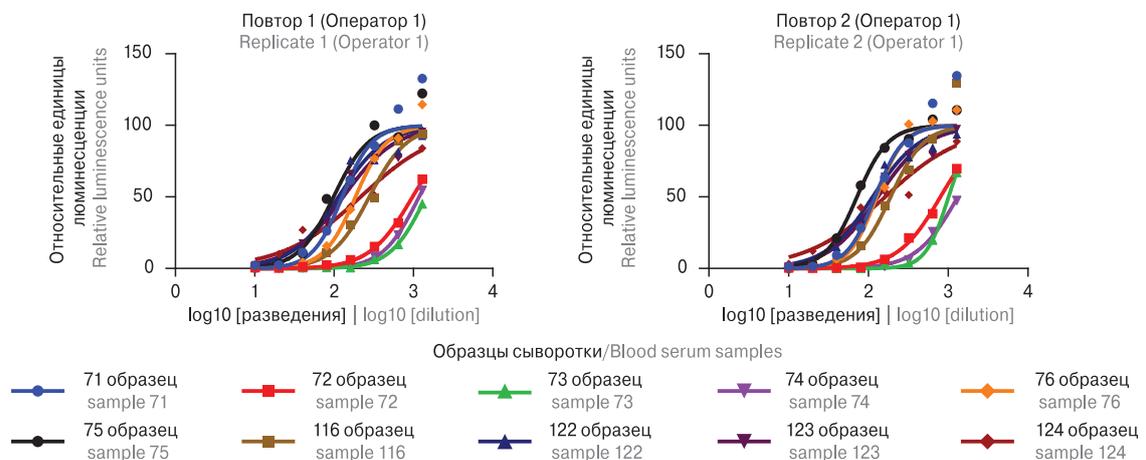


Рисунок 10. График зависимости сигнала RLU от логарифма разведения с использованием репортера Nluc (Партии 1–2)

Figure 10. RLU signal versus logarithm of dilution using the Nluc reporter (Lot 1–2)

Иллюстрации к статье «Оценка уровня вируснейтрализующих антител, индуцированных новой коронавирусной инфекцией COVID-19: разработка анализа быстрой оценки протективных антител с использованием реакции на основе псевдовируса» (авторы: А.А. Фунтиков, Н.А. Литвинова, Е.В. Зуев, С.В. Кулемзин, Р.Р. Шукуров) (с. 457–468) (4-й фрагмент; начало см. на с. I–III)

Illustrations for the article “Evaluation of virus-neutralizing antibody level after novel coronavirus infection COVID-19: development of an instant assay assessing protective antibodies using a pseudovirus-based reaction” (authors: Funtikov A.A., Litvinova N.A., Zuev E.V., Kulemzin S.V., Shukurov R.R.) (pp. 457–468) (4th fragment; start on p. I–III)

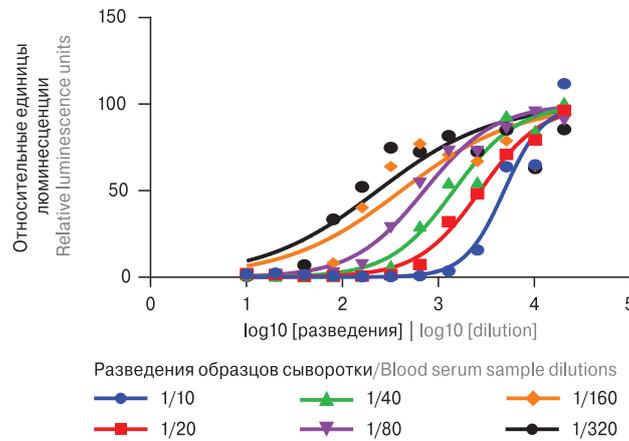
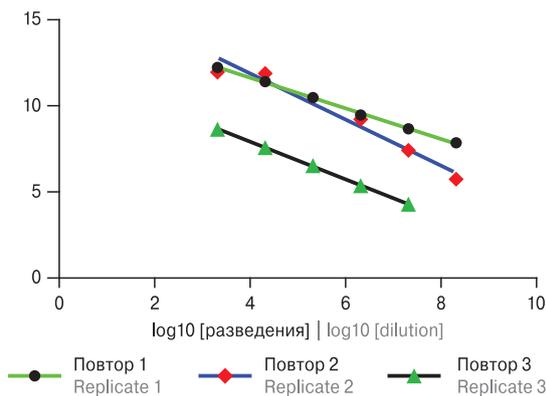


Рисунок 11. Первичные данные, полученные для обработки линейности. График зависимости сигнала RLU от логарифма разведения

Figure 11. Raw data obtained for linearity processing. RLU signal versus logarithm of dilution

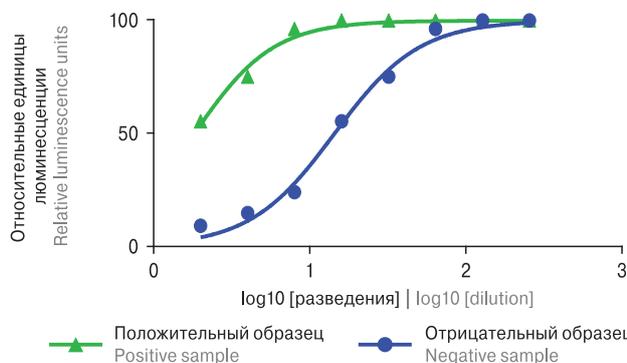


	Повтор 1 Replicate 1	Повтор 2 Replicate 2	Повтор 3 Replicate 3
YIntercept	15.21	12.30	17.06
Slope	-0.8888	-1.091	-1.307

	Повтор 1 Replicate 1	Повтор 2 Replicate 2	Повтор 3 Replicate 3
R-squared	0.9987	0.9997	0.9587

Рисунок 12. Графики точки $\log_2 (ID_{50})$ от \log_2 (кратность разведения)

Figure 12. \log_2 point (ID_{50}) versus \log_2 (dilution factor)



	Положительный образец Positive sample	Отрицательный образец Negative sample
LogIC50	1.159	0.2606
HillSlope	1.604	1.714
IC50	14.41	1.822

Рисунок 13. Типичные кривые нейтрализации, ожидаемые от pMNA

Figure 13. Representative pMNA-related neutralization curves

Обсуждение

По результатам первой постановки было показано, что ВНА, содержащиеся в исследуемых положительных сыворотках, способны к нейтрализации спайкового белка на поверхности применяемых псевдовиральных частиц. Тем самым, проникновения псевдовirusа в клетку за счет взаимодействия фермента ACE2 с S-белком на клетках HEK-293T-hAce2 не происходит и ген люциферазы FLUC не встраивается. При снижении уровня вируснейтрализующих антител в образцах повышается уровень люминесценции исследуемых образцов — сигнал более 2 500 000 RLU.

В последующих постановках применялся только репортер люциферазы FLUC ввиду значительно более низкой стоимости реагентов, применяемых при детекции сигнала люминесценции.

Было установлено, что оптимальное время инкубации планшета после внесения реагента OneGlo Promega (определяющего наличие люциферазы FLUC) — 60–75 мин. При таком сроке инкубации определялось максимальное количество люциферазы в лунке. Краситель распределялся равномерно, что препятствовало гетерогенности результатов. При этом в течение указанного времени определялось значительное для детекции количество люциферазы в лунке (1,5–2 млн единиц люминесценции).

При схеме постановки, использующей высокие разведения (до разведения 1:2048), исследуемые образцы практически сразу теряли протективную активность ввиду значительного снижения антител в первых разведениях.

Наиболее применимыми в интерпретации результатов исследования сывороток являлись двукратные разведения образца до разведения 1:256. На рис. 4 показано, что исследуемый образец корректно титруется именно при данной схеме разведения, образуя оптимальную сигмоидальную кривую и демонстрирует наличие в исследуемой сыворотке ВНА. При использовании схемы разведения до 1:32 показано, что исследуемый образец титруется некорректно, что демонстрирует характерная сигмоидальная кривая. При использовании схемы разведения до 1:2048 сигмоидальная кривая была выставлена более корректно, но пороговое значение определялось менее точно ввиду больших шагов разведения.

По результатам определения объемов реакционной смеси и подбора всех условий была разработана стандартная схема постановки метода.

Хорошей практикой является отслеживание критических параметров с использованием таблиц тенденций и сводных таблиц анализа ре-

Таблица 3. Оценка специфичности методики при постановке реакции в исследовании серопозитивных сывороток

Table 3. Evaluated technique specificity in seropositive sera examined

№ образца Sample	LogID ₅₀	ID ₅₀
33	2,076	119,1
73	3,138	1374,0
72	3,007	1017,0
71	2,475	298,5
76	2,364	231,2
75	2,216	164,6
67	2,946	882,4
114	2,224	167,6
121	2,623	419,9

зультатов, которые могут указать, где произошли изменения в характеристиках анализа.

Пример ненейтрализующей и сильно нейтрализующей сыворотки приведен на рис. 13 (вклейка, с. IV).

Исходя из полученных данных было сделано заключение, что ВНА, содержащиеся в исследуемых положительных сыворотках, способны к нейтрализации спайкового белка на поверхности применяемых псевдовиральных частиц.

Таблица 4. Оценка специфичности методики при постановке реакции в исследовании серонегативных сывороток

Table 4. Evaluated technique specificity in seronegative sera examined

№ образца Sample	LogID ₅₀	ID ₅₀
1	НПКО (LOQ)	НПКО (LOQ)
2	НПКО (LOQ)	НПКО (LOQ)
3	НПКО (LOQ)	НПКО (LOQ)
4	НПКО (LOQ)	НПКО (LOQ)
5	0,849	7,063
6	НПКО (LOQ)	НПКО (LOQ)
7	НПКО (LOQ)	НПКО (LOQ)
8	~ 0,9640	~ 9,205
9	0,8336	6,817
10	~ 0,9534	~ 8,982
11	1,843	69,72
12	0,5122	3,253
13	3,25	1779
14	НПКО (LOQ)	НПКО
15	0,5818	3,818
16	НПКО (LOQ)	НПКО (LOQ)
17	НПКО (LOQ)	НПКО (LOQ)
18	~ 0,9853	~ 9,666
19	1,056	11,38
20	НПКО (LOQ)	НПКО (LOQ)

Таблица 5. Оценка повторяемости (сходимости) методики при постановке реакции одним оператором

Table 5. Evaluated of a single-operator method repeatability (convergence)

№ образца Sample	Повтор 1 (Оператор 1) Repeat 1 (Operator 1)		Повтор 2 (Оператор 1) Repeat 2 (Operator 1)		Повтор 3 (Оператор 1) Repeat 3 (Operator 1)		Среднее значение Average		Стандартное отклонение Standard deviation		CV, %	
	LogID ₅₀	ID ₅₀	LogID ₅₀	ID ₅₀	LogID ₅₀	ID ₅₀	LogID ₅₀	ID ₅₀	LogID ₅₀	ID ₅₀	LogID ₅₀	ID ₅₀
22/2	1,756	57,1	1,706	50,8	1,716	52,1	1,726	53,3	0,021	2,7	1,25	5,09
33/2	1,867	73,7	1,707	50,9	1,694	49,4	1,756	58,0	0,078	11,1	4,47	19,16
52/4	2,637	433,4	2,452	283,1	2,405	253,9	2,498	323,4	0,101	78,6	4,01	24,31
71/2	2,166	146,6	1,995	98,8	1,991	98,0	2,050	114,4	0,081	22,7	3,97	19,85
73/2	2,907	807,2	2,843	697,2	2,719	523,6	2,823	676,0	0,078	116,7	2,76	17,27
74/2	2,631	427,5	2,627	423,8	2,547	352,7	2,602	401,3	0,039	34,4	1,49	8,58
112/4	2,866	734,4	2,895	784,8	2,829	674,7	2,863	731,3	0,027	45,0	0,94	6,15
121/2	2,304	201,2	2,289	194,5	2,214	163,5	2,269	186,4	0,039	16,4	1,74	8,81
123/2	2,307	202,9	2,218	165,4	2,158	144,0	2,227	170,7	0,061	24,3	2,74	14,25

Таблица 6. Оценка промежуточной (внутрилабораторной) прецизионности методики при постановке реакции тремя операторами

Table 6. Evaluated three-operator intermediate (intralaboratory) method precision

№ образца Sample	Оператор 1 Operator 1		Оператор 2 Operator 2		Оператор 3 Operator 3		Среднее значение Average		Стандартное отклонение Standard deviation		CV, %	
	LogID ₅₀	ID ₅₀	LogID ₅₀	ID ₅₀	LogID ₅₀	ID ₅₀	LogID ₅₀	ID ₅₀	LogID ₅₀	ID ₅₀	LogID ₅₀	ID ₅₀
80	3,256	1803,0	3,034	1082,0	3,237	1725,0	3,176	1536,7	0,100	323,1	3,16	21,02
82	2,795	623,3	2,774	594,5	2,798	627,7	2,789	615,2	0,011	14,7	0,38	2,39
83	2,440	275,1	2,474	298,1	2,452	283,2	2,455	285,5	0,014	9,5	0,57	3,34
84	2,894	783,4	2,814	652,0	3,092	1236,0	2,993	1009,7	0,099	226,3	3,31	22,41

Таблица 7. Оценка специфичности методики при постановке реакции с использованием репортера Nluc разных серий, используемых при сборке псевдотипированной конструкции

Table 7. Evaluated method specificity using the Nluc reporter of different series in assembly of the pseudotyped construct

№ образца Sample	Репортер Nluc (Партия 1) Nluc Reporter (lot 1)		Репортер Nluc (Партия 2) Nluc Reporter (lot 2)		Среднее значение Average		Стандартное отклонение Standard deviation		CV, %	
	LogID ₅₀	ID ₅₀	LogID ₅₀	ID ₅₀	LogID ₅₀	ID ₅₀	LogID ₅₀	ID ₅₀	LogID ₅₀	ID ₅₀
71	2,099	125,6	2,083	121,0	2,091	105,9	0,008	24,7	0,38	23,36
72	2,901	796,3	2,984	963,7	2,942	880	0,041	83,7	1,41	9,51
73	3,004	1010,0	3,153	1421,0	3,078	1215,5	0,074	205,5	2,42	16,91
74	3,120	1319,0	3,067	1166,0	3,093	1242,5	0,026	76,5	0,86	6,16
76	2,102	126,4	2,265	184,0	2,183	155,2	0,081	28,8	3,73	18,56
75	1,856	71,7	1,989	97,5	1,922	84,6	0,066	12,8	3,46	15,22
116	2,277	189,3	2,440	275,2	2,358	232,2	0,081	42,9	3,46	18,49
122	2,050	112,3	2,052	112,7	2,051	115,7	0,001	4,5	0,05	3,87
123	2,110	128,8	2,117	130,8	2,114	127,5	0,004	3,3	0,17	2,59
124	2,208	161,4	2,328	213,0	2,268	187,2	0,060	25,8	2,65	13,78

Определен оптимальный титр рабочей дозы псевдовирусных частиц, равный 1×10^{-4} . Представленная рабочая доза позволяет наиболее корректно определять наличие ВНА в образцах сыворотки крови.

Заключение

Нейтрализующая реактивность, вызванная естественной инфекцией с последующей вакцинацией, все больше ослабляется недавним появлением новых вирусных штаммов SARS-CoV-2 (Eta (lineage B.1.525), Kappa (lineage B.1.617.1), Mu (lineage B.1.621)). Хотя иммунная защита, сформированная препаратами специфической профилактики SARS-CoV-2 в популяции, в целом обеспечивает надлежащую протективную защиту, в дальнейшем может потребоваться доработка новых вакцинных препаратов для создания у населения перекрестного иммунитета к новым штаммам.

Данные уровня протективной активности исследуемых сывороток, полученные с помощью разработанной методики, подтверждают индукцию специфических антител у большинства добровольцев, при этом иммунный ответ у иммунизированных субъектов иногда более

сильный, чем у ранее инфицированных добровольцев, что, как следствие, подтверждает необходимость вакцинации.

Вируснейтрализующие антитела, содержащиеся в исследуемых положительных сыворотках в разведениях с 1:16 до 1:64, способны к нейтрализации спайкового белка на поверхности применяемых псевдовирусных частиц.

Следует учитывать, что метод оценки ВНА с использованием реакции на основе псевдовируса, учитывая дороговизну и трудоемкость, больше используется для аналитических, научных целей и периодического подтверждения результатов других скрининговых методов (ELISA — enzyme-linked immunosorbent assay, IGRA — Interferon- γ release assays).

Разработанная нами методика позволяет определять наличие вирусспецифических к антигену SARS-CoV-2 ВНА в сыворотке крови лиц, переболевших новой коронавирусной инфекцией COVID-19 и/или иммунизированных препаратами специфической профилактики здоровых добровольцев в реакции нейтрализации с применением псевдотипированных вирусных конструкций на основе вируса иммунодефицита человека.

Список литературы/References

1. Beeching N.J., Fletcher T.E., Fowler R. Coronavirus Disease (COVID-19). *BMJ Best Practices*. URL: <http://www.hpruezi.nih.ac.uk/publications/2020/bmj-best-practice-coronavirus-disease-covid-19> (23.01.2023)
2. Campi-Azevedo A.C., Peruhype-Magalhães V., Coelho-Dos-Reis J.G., Antonelli L.R., Costa-Pereira C., Speziali E., Reis L.R., Lemos J.A., Ribeiro J.G.L., Bastos Camacho L.A., de Sousa Maia M.L., Barbosa de Lima S.M., Simões M., de Menezes Martins R., Homma A., Cota Malaquias L.C., Tauil P.L., Costa Vasconcelos P.F., Martins Romano A.P., Domingues C.M., Teixeira-Carvalho A., Martins-Filho O.A.; Collaborative Group for Studies of Yellow Fever Vaccine. 17DD yellow fever revaccination and heightened long-term immunity in populations of disease-endemic areas, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.*, 2019, vol. 25, no. 8, pp. 1511–1521. doi: 10.3201/eid2508.181432
3. Chi X., Yan R., Zhang J., Zhang G., Zhang Y., Hao M., Zhang Z., Fan P., Dong Y., Yang Y., Chen Z., Guo Y., Zhang J., Li Y., Song X., Chen Y., Xia L., Fu L., Hou L., Xu J., Yu C., Li J., Zhou Q., Chen W. A neutralizing human antibody binds to the N-terminal domain of the Spike protein of SARS-CoV-2. *Science*, 2020, vol. 369, no. 6504, pp. 650–655. doi: 10.1126/science.abc6952
4. Cohen B.J., Audet S., Andrews N., Beeler J.; WHO working group on measles plaque reduction neutralization test. Plaque reduction neutralization test for measles antibodies: description of a standardised laboratory method for use in immunogenicity studies of aerosol vaccination. *Vaccine*, 2007, vol. 26, no. 1, pp. 59–66. doi: 10.1016/j.vaccine.2007.10.046
5. Cohen B.J., Doblaz D., Andrews N. Comparison of plaque reduction neutralisation test (PRNT) and measles virus-specific IgG ELISA for assessing immunogenicity of measles vaccination. *Vaccine*, 2008, vol. 26, no. 50, pp. 6392–6397. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.08.074
6. Duong D. Alpha, Beta, Delta, Gamma: What's important to know about SARS-CoV-2 variants of concern? *CMAJ*, 2021, vol. 193, no. 27, pp. E1059–E1060. doi: 10.1503/cmaj.1095949
7. Eyal O., Olshevsky U., Lustig S., Paran N., Halevy M., Schneider P., Zomber G., Fuchs P. Development of a tissue-culture-based enzyme-immunoassay method for the quantitation of anti-vaccinia-neutralizing antibodies in human sera. *J. Virol. Methods*, 2005, vol. 130, no. 1–2, pp. 15–21. doi: 10.1016/j.jviromet.2005.05.027
8. Liu L., Wang P., Nair M.S., Yu J., Rapp M., Wang Q., Luo Y., Chan J.F., Sahi V., Figueroa A., Guo X.V., Cerutti G., Bimela J., Gorman J., Zhou T., Chen Z., Yuen K.Y., Kwong P.D., Sodroski J.G., Yin M.T., Sheng Z., Huang Y., Shapiro L., Ho D.D. Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike. *Nature*, 2020, vol. 584, no. 7821, pp. 450–456. doi: 10.1038/s41586-020-2571-7
9. Nie J., Li Q., Wu J., Zhao C., Hao H., Liu H., Zhang L., Nie L., Qin H., Wang M., Lu Q., Li X., Sun Q., Liu J., Fan C., Huang W., Xu M., Wang Y. Quantification of SARS-CoV-2 neutralizing antibody by a pseudotyped virus-based assay. *Nat. Protoc.*, 2020, vol. 15, no. 11, pp. 3699–3715. doi: 10.1038/s41596-020-0394-5
10. Rogers T.F., Zhao F., Huang D., Beutler N., Burns A., He W.T., Limbo O., Smith C., Song G., Woehl J., Yang L., Abbott R.K., Callaghan S., Garcia E., Hurtado J., Parren M., Peng L., Ramirez S., Ricketts J., Ricciardi M.J., Rawlings S.A., Wu N.C.,

- Yuan M., Smith D.M., Nemazee D., Tejjaro J.R., Voss J.E., Wilson I.A., Andrabi R., Briney B., Landais E., Sok D., Jardine J.G., Burton D.R. Isolation of potent SARS-CoV-2 neutralizing antibodies and protection from disease in a small animal model. *Science*, 2020, vol. 369, no. 6506, pp. 956–963. doi: 10.1126/science.abc7520
11. Tang X., Wu C., Li X., Song Y., Yao X., Wu X., Duan Y., Zhang H., Wang Y., Qian Z., Cui J., Lu J. On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2. *Natl Sci. Rev.*, 2020, vol. 7, no. 6, pp. 1012–1023. doi: 10.1093/nsr/nwaa036
 12. Yun S., Ryu J.H., Jang J.H., Bae H., Yoo S.H., Choi A.R., Jo S.J., Lim J., Lee J., Ryu H., Cho S.Y., Lee D.G., Lee J., Kim S.C., Park Y.J., Lee H., Oh E.J. Comparison of SARS-CoV-2 antibody responses and seroconversion in COVID-19 patients using twelve commercial immunoassays. *Ann. Lab. Med.*, 2021, vol. 41, no. 6, pp. 577–587. doi: 10.3343/alm.2021.41.6.577
 13. Zhao H., Zhu Q., Zhang C., Li J., Wei M., Qin Y., Chen G., Wang K., Yu J., Wu Z., Chen X., Wang G. Tocilizumab combined with favipiravir in the treatment of COVID-19: a multicenter trial in a small sample size. *Biomed. Pharmacother.*, 2021, vol. 133: 110825. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110825

Авторы:

Фунтиков А.А., к.в.н., научный сотрудник АО «ГЕНЕРИУМ», Владимирская область, Петушинский район, пгт. Вольгинский, Россия;

Литвинова Н.А., к.б.н., руководитель отдела АО «ГЕНЕРИУМ», Владимирская область, Петушинский район, пгт. Вольгинский, Россия;

Зуев Е.В., старший научный сотрудник АО «ГЕНЕРИУМ», Владимирская область, Петушинский район, пгт. Вольгинский, Россия;

Кулемзин С.В., к.б.н., научный сотрудник ООО «ИМГЕН+», г. Новосибирск, Россия;

Шукуров Р.Р., к.б.н., директор департамента фармацевтического анализа АО «ГЕНЕРИУМ», Владимирская область, Петушинский район, пгт. Вольгинский, Россия.

Authors:

Funtikov A.A., PhD (Veterinary), Researcher, JSC "GENERIUM", Vladimir Region, Petushinsky district, Volginsky settlement, Russian Federation;

Litvinova N.A., PhD (Biology), Head of Department, JSC "GENERIUM", Vladimir Region, Petushinsky district, Volginsky settlement, Russian Federation;

Zuev E.V., Senior Researcher, JSC "GENERIUM", Vladimir Region, Petushinsky district, Volginsky settlement, Russian Federation;

Kulemzin S.V., PhD (Biology), Researcher, LLC "IMGEN+", Novosibirsk, Russian Federation;

Shukurov R.R., PhD (Biology), Director of the Department of the Pharmaceutical Analysis, JSC "GENERIUM", Vladimir Region, Petushinsky district, Volginsky settlement, Russian Federation.

Поступила в редакцию 06.02.2023
Отправлена на доработку 19.03.2023
Принята к печати 02.05.2023

Received 06.02.2023
Revision received 19.03.2023
Accepted 02.05.2023