

СОПОСТАВЛЕНИЕ ГУМОРАЛЬНОГО И КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА У ПЕРЕБОЛЕВШИХ COVID-19

Топтыгина А. П.^{1,3}

Семикина Е. Л.^{2,4}

Закиров Р. Ш.²

Афридонова З. Э.¹

¹ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского» Роспотребнадзора.

²ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России.

³Кафедра иммунологии Биологического факультета ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова».

⁴Кафедра педиатрии и детской ревматологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова» Минздрава России

COMPARISON OF THE HUMORAL AND CELLULAR IMMUNITY IN COVID-19 CONVALESCENTS

Toptygina Anna P.^{a,c}

Semikina Elena L.^{b,d}

Zakirov Rustam Sh.^b

Afridonova Zulfiia E.^a

^aG.N.Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia.

^bFederal State Autonomous Institution "National Medical Research Center of Children's Health" of the Ministry of Health of the Russian Federation.

^cChair of Immunology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University.

^dChair of Pediatrics and pediatric rheumatology, Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation.

Резюме. Вирус SARS-CoV-2, вызвавший пандемию COVID-19 является родственным коронавирусам SARS-CoV-1 и MERS, бывшим причиной эпидемий в 2003 и 2012гг. Антитела у больных COVID-19 появляются через 7-14 дней после появления симптомов и постепенно нарастают. Поскольку пандемия COVID-19 продолжается, трудно сказать, как долго будет сохраняться иммунологическая память к вирусу SARS-CoV-2. Цель исследования: изучить соотношение гуморального и клеточного иммунитета к S-белку вируса SARS-CoV-2, после перенесенного COVID-19. Обследованы 60 взрослых, перенесших COVID-19 легкой и средней степени тяжести за 2 - 12 месяцев до момента обследования. Контрольную группу составили 15 взрослых не болевших COVID-19 и не привитых от этой инфекции. Специфические антитела к вирусу SARS-CoV-2 определяли методом ИФА на наборе «SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ». Для определения субклассов специфических IgG и IgA, анти-IgG-конъюгат из набора заменяли конъюгатом против субклассов IgG и IgA. Для определения авидности антител использовали дополнительную инкубацию с денатурирующим раствором мочевины или без нее. Мононуклеары из крови выделяли методом градиентного центрифугирования, инкубировали с S-антигеном коронавируса, или без него 20 часов, окрашивали с помощью флюоресцентно-меченных антител и подсчитывали на проточном цитометре Canto II процент CD8highCD107a. В контрольной группе не обнаружено ни гуморального, ни клеточного иммунитета к S-белку SARS-CoV-2. У переболевших уровень IgG-антител к S-белку SARS-CoV-2 сильно различается и жестко не связан с давностью заболевания, 57% переболевших COVID-19 имели высокий уровень гуморального ответа, а 43%-низкий. Корреляция между уровнями специфических IgG и IgA составила $r=0,43$. Авидность антител нарастала с течением времени после заболевания, составив 49,9% на сроке 6-12 мес. Не было выявлено специфических IgG субклассов IgG2 и IgG4, а процент IgG1 нарастал со временем и составил

100% через 6-12 мес. после заболевания. 50% обследованных имели высокий клеточный иммунитет, и столько же – низкий, корреляций с уровнем гуморального иммунитета не выявлено. Выявлены 4 варианта сочетания гуморального и клеточного иммунитета к S-белку SARS-CoV-2: высокий гуморальный и клеточный, низкий гуморальный и клеточный, высокий гуморальный и низкий клеточный и наоборот низкий гуморальный и высокий клеточный иммунитет.

Ключевые слова: COVID-19; SARS-CoV-2; антитела; субклассы IgG; клеточный иммунитет; CD8+ лимфоциты

Abstract. The SARS-CoV-2 virus caused the COVID-19 pandemic is related to the SARS-CoV-1 and MERS coronaviruses, which were resulted in 2003 and 2012 epidemics. Antibodies in patients with COVID-19 emerge 7-14 days after the onset of symptoms and gradually increase. Because the COVID-19 pandemic is still in progress, it is hard to say how long the immunological memory to the SARS-CoV-2 virus may be retained. The aim of this study was to study a ratio between humoral and cellular immunity against the SARS-CoV-2 S-protein in COVID-19 convalescents. There were enrolled 60 adults with mild to moderate COVID-19 2 to 12 months prior to the examination. The control group consisted of 15 adults without COVID-19 or unvaccinated. Specific antibodies to the SARS-CoV-2 virus were determined by ELISA with the SARS-CoV-2-IgG-ELISA-BEST kit. To determine the specific IgG and IgA subclasses, the anti-IgG conjugate from the kit was replaced with a conjugate against the IgG subclasses and IgA. Additional incubation with or without denaturing urea solution was used to determine the avidity of antibodies. Peripheral blood mononuclear cells were isolated by gradient centrifugation, incubated with or without coronavirus S antigen for 20 hours, stained by fluorescently labeled antibodies, and the percentage of CD8^{high}CD107a cells was assessed on flow cytometer Canto II. In

the control group, neither humoral nor cellular immunity against the SARS-CoV-2 S-protein was found. In the group of convalescents, the level of IgG antibodies against the SARS-CoV-2 S-protein varies greatly not being strictly associated with the disease duration, with 57% and 43% of COVID-19 patients having high vs. low level of humoral response, respectively. A correlation between level of specific IgG and IgA was $r = 0.43$. The avidity of antibodies increased over time in convalescents comprising 49.9% at 6-12 months afterwards. No virus-specific IgG2 and IgG4 subclasses were detected, and the percentage of IgG1 increased over time comprising 100% 6-12 months after recovery. 50% of the subjects examined had high cellular immunity, no correlations with the level of humoral immunity were found. We identified 4 combinations of humoral and cellular immunity against the SARS-CoV-2 S-protein: high humoral and cellular, low humoral and cellular, high humoral and low cellular, and vice versa, low humoral and high cellular immunity.

Key words: COVID-19; SARS-CoV-2; antibodies; IgG subclasses; cellular immunity; CD8+ lymphocytes

1 **Введение**

2 Вирус SARS-CoV-2, вызвавший пандемию COVID-19 принадлежит к β -
3 коронавирусам, связывается на клетках с ангиотензин-превращающим
4 ферментом 2 и является родственным SARS (severe acute respiratory
5 syndrome), теперь называемому SARS-CoV-1, и MERS (Middle Eastern
6 respiratory syndrome) коронавирусам, бывшим причиной локальных
7 зоонозных эпидемий в 2003 и 2012гг, соответственно [12,20,34]. Антитела у
8 больных COVID-19 появляются через 7-14 дней после появления симптомов
9 и постепенно нарастают [25,30,36]. Показано, что антитела к S-белку вируса
10 SARS-CoV-2, обладают вируснейтрализующей активностью, особенно анти-
11 RBD (receptor binding domain) антитела [17]. Поскольку пандемия COVID-19
12 продолжается, трудно сказать, как долго будут сохраняться антитела к
13 вирусу SARS-CoV-2. Так антитела к CoV 229E коронавирусу, вызывающему
14 респираторное заболевание, исчезают уже через год после заболевания [9,27].
15 После инфекции SARS-CoV-1, и MERS антитела исчезали через 2-3 года
16 [10,26]. Однако есть данные, что антитела после SARS-CoV-1 определялись
17 даже 12 лет спустя [14]. У перенесших SARS-CoV-1 через 6 лет после
18 заболевания не обнаруживали IgG⁺ В-клеток памяти, специфичных к этому
19 вирусу, тогда как специфичные к SARS-CoV-1 Т-клетки памяти были
20 выявлены у обследованных переболевших [31]. Специфичные к белкам
21 вируса SARS-CoV-1 CD8⁺ Т-клетки обнаруживались даже спустя 11 лет
22 после заболевания, что свидетельствует о длительном поддержании Т-
23 клеточного иммунитета [23]. Однако уровни Т-клеточного и гуморального
24 иммунитета против коронавируса слабо коррелировали между собой [19, 24].

25 Целью настоящего исследования было изучить соотношение
26 гуморального и клеточного иммунитета к S-белку вируса SARS-CoV-2,
27 сформировавшегося после перенесенного COVID-19.

28

29 **Материалы и методы**

30 В рамках простого сравнительного исследования, проходившего с
31 января по июнь 2021 г. были обследованы 60 взрослых, перенесших COVID-
32 19 легкой и средней степени тяжести, имевших выписку с установленным
33 клиническим диагнозом и подтверждением диагноза методом ПЦР (основная
34 группа). От момента заболевания до обследования прошло от 2 до 12
35 месяцев. В контрольную группу были включены 15 взрослых, не болевших
36 COVID-19, не прививавшихся от этой инфекции и не имевших антител к
37 вирусу SARS-CoV-2 при предварительном скрининге. Обследованные
38 подписывали информированное согласие на участие в исследовании. Кровь
39 из локтевой вены брали в две вакуумные пробирки с гепарином 4 мл для
40 исследования клеточного иммунитета и с гелем 4 мл для определения
41 антител в сыворотке крови.

42 Сыворотку крови получали центрифугированием, разливали в пробирки
43 Эппендорф, замораживали и хранили при -70°C . Специфические антитела к
44 вирусу SARS-CoV-2 определяли иммуноферментным анализом (ИФА) с
45 помощью коммерческого набора «SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ» (АО
46 Вектор-Бест, Новосибирск РФ), позволяющем определять антитела
47 полуколичественным методом в коэффициентах позитивности (КП). В
48 сентябре 2021 г. было проведено ретестирование проб сывороток,
49 хранившихся при -70°C на тест-системе «SARS-CoV-2-IgG количественный-
50 ИФА-БЕСТ» (АО Вектор-Бест, Новосибирск РФ), позволяющей оценивать
51 количество специфических антител в международных единицах binding
52 antibody units (BAU). Определение субклассов специфических IgG-антител
53 осуществляли по ранее разработанной нами модификации ИФА-метода [6].
54 Кратко: мы использовали 96-луночные панели, с сорбированным
55 полноразмерным S-антигеном вируса SARS-CoV-2 от коммерческого набора
56 для определения IgG-антител к вирусу SARS-CoV-2 («SARS-CoV-2-IgG-
57 ИФА-БЕСТ» (АО Вектор-Бест, Новосибирск РФ)). Вместо анти-IgG
58 конъюгата, входящего в набор, использовали меченные пероксидазой анти-

59 IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, а также анти-IgA моноклональные антитела
60 (Полигност, Россия) в концентрации 1 мкг/мл. Для определения avidности
61 антител использовали наборы («SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ» (АО Вектор-
62 Бест, Новосибирск РФ) в модификации. Каждую сыворотку раскапывали в
63 две лунки, в два соседних стрипа. После инкубации сывороток и отмывки,
64 согласно протоколу производителя, мы добавляли следующую процедуру: в
65 лунки первого стрипа добавляли физиологический раствор 200 мкл, в лунки
66 второго стрипа добавляли 200 мкл денатурирующего раствора мочевины и
67 инкубировали 10 минут при комнатной температуре. Растворы и время
68 инкубации были взяты из набора для определения avidности антител к кори
69 «Avidity:Anti-Measles Viruses ELISA/IgG» (Euroimmun, Германия). После
70 этого жидкость из лунок удаляли и промывали 3-хратно. Далее добавляли
71 конъюгат и выполняли все процедуры по инструкции к набору «SARS-CoV-
72 2-IgG-ИФА-БЕСТ».

73 Мононуклеары периферической крови выделяли из гепаринизированной
74 крови с помощью градиентного центрифугирования на смеси фиколл-
75 верографин, $\rho = 1,077$ (ООО «ПанЭко», РФ), отмывали от тромбоцитов и
76 ресуспендировали в 1мл среды RPMI-1640 с добавлением 2мМ L-глутамина,
77 гентамицина и 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Суспензию
78 мононуклеаров (3×10^5 на лунку) вносили в лунки 96-луночной стерильной
79 панели (отрицательный контроль), добавляли раствор моненсина в конечной
80 концентрации 10 мкМ и моноклональные антитела к антигену CD107a-PE-
81 Су5 в конечном разведении 1:100 (контрольная проба), общий объем в лунке
82 составил 200 мкл. Для опытной пробы использовали лунки 96-луночной
83 панели от набора для определения антител к S-белку вируса SARS-COV-2
84 методом ИФА, в которых на дно лунок сорбирован полноразмерный S-белок,
85 согласно инструкции производителя. Использован набор «SARS-CoV-2-IgG-
86 ИФА-БЕСТ» (АО Вектор-Бест, Новосибирск РФ). Поскольку лунки набора
87 для ИФА не стерильны, перед постановкой эксперимента они были

88 простерилизованы с помощью ультрафиолетового облучения в стерильных
89 условиях в течение 30 минут. Опытные и контрольные пробы инкубировали
90 при 37°C во влажной атмосфере и 5% CO₂ 20 часов. По окончании инкубации
91 клетки ресуспендировали, переносили в пробирки для проточной цитометрии
92 и отмывали центрифугированием (300g 5 мин) в растворе CellWash.
93 Супернатант аккуратно отбирали пипеткой, а клетки окрашивали антителами
94 к антигену CD8-FITC 20 минут в темноте при 4°C, затем повторно отмывали
95 центрифугированием при тех же условиях, и осуществляли фенотипирование
96 на проточном цитометре BD FACS Canto II (технологии и программное
97 обеспечение Becton Dickinson, США). Для анализа выделяли лимфоидный
98 гейт, в нем в режиме FITC-SSS выделяли гейт лимфоцитов высоко
99 экспрессирующих антиген CD8 (CD8^{high}) – это субпопуляция
100 цитотоксических Т-лимфоцитов. Далее на графике CD107a-PE-Cy5 против
101 CD8-FITC регистрировали облако дважды положительных клеток.
102 Полученное число отражает процент цитотоксических лимфоцитов,
103 распознавших антигены S-белка коронавируса и ответивших
104 цитотоксической реакцией, заключающейся в выделении содержимого
105 цитотоксических гранул относительно общего количества CD8+
106 цитотоксических Т-лимфоцитов.

107 Результаты исследования были подвергнуты статистической обработке.
108 Для всех параметров было проведено исследование на нормальность
109 распределения методом Колмагорова-Смирнова. Данные представлены в
110 виде средней арифметической и ее ошибки (M±SE). Уровень p < 0,05 считали
111 значимым. Корреляции рассчитывали по методу Пирсона. Для расчета
112 уровня антител использовали коэффициент позитивности (КП), как
113 отношение оптической плотности в пробе к оптической плотности в
114 отрицательном контроле, к которой прибавляли 0,2, согласно инструкции
115 производителя. При этом cut off составляет 1,1. Для вычисления авидности
116 антител значение в первой лунке (инкубация с физиологическим раствором)

117 принимали за 100%, и вычисляли процент для значения во второй лунке
118 (инкубация с денатурирующим раствором).

119

120

121

122 **Результаты**

123 Среди здоровых, не болевших и не привитых против вируса SARS-CoV-
124 2 людей (контрольная группа) не было выявлено антител к этому вирусу, ни
125 IgG, ни IgA. В группе переболевших такие антитела были обнаружены
126 (Рисунок 1А). Оценку уровней антител проводили полуколичественным
127 методом в КП, поскольку на момент проведения исследований
128 количественных тест-систем не было. Средняя по группе для IgG-антител
129 составила $17,08 \pm 1,94$, а для IgA – $11,43 \pm 1,32$. Следует отметить, что в
130 использованной тест-системе при расчете КП cut off составляет 1,1.
131 Максимальное значение для IgG составило 56,08, а для IgA-48,78. При этом у
132 6-и человек не было выявлено IgG-антител, а у 7-и отсутствовали IgA-
133 антитела к вирусу SARS-CoV-2. Важно, что из этих 6-и человек без
134 специфических IgG у двоих были выявлены высокие уровни IgA, а у
135 четверых не было ни IgG, ни IgA. В то же время у троих с высокими IgG не
136 было IgA. По уровню специфических IgG-антител обследованные лица были
137 разделены на две подгруппы – с высоким и низким уровнем гуморального
138 ответа на инфекцию. Пороговый критерий составил 10 единиц. В группу с
139 высоким ответом были отнесены 34 человека, а с низким – 26 человек
140 (Рисунок 1 Б). Различия между этими группами и для IgG, и для IgA
141 оказались значимыми ($p < 0,05$), см. рисунок 1А. Корреляция между
142 уровнями специфических IgG и IgA была средняя положительная ($r=0,43$),
143 так как есть люди с высокими IgG и низкими IgA и наоборот. Не выявлено
144 корреляции между сроком, прошедшим после заболевания и высотой
145 гуморального ответа. Для сопоставления уровней IgG-антител, выраженных в

146 КП с количеством IgG-антител, выраженном в ВАУ, было проведено
147 ретестирование проб сывороток обследованных лиц. На рисунке 1А правая
148 вертикальная ось представляет калибровку в ВАУ. Важно, что 6 человек, не
149 имевших специфических IgG-антител к вирусу SARS-CoV-2 при измерении в
150 КП, также не имели их при измерении в ВАУ. Выявлена очень сильная
151 положительная корреляция между уровнями специфических IgG,
152 выраженными в КП и в ВАУ ($r=0,98$).

153 В процессе созревания гуморального иммунного ответа происходит
154 повышение авидности антител и переключение субклассов IgG-антител на
155 преимущественно IgG1. В группе переболевших COVID-19 была
156 исследована авидность специфических антител. Выявлена положительная
157 корреляция средней силы ($r=0,53$) между сроком, прошедшим после
158 заболевания и авидностью антител. Основная группа была разбита на 3
159 подгруппы в зависимости от срока после заболевания. В подгруппу до 3-х
160 мес. вошли 21 человек, 3-6 мес. – 20 человек, более 6 мес. – 19 человек. Была
161 рассчитана средняя авидность для этих подгрупп. Результаты представлены
162 на рисунке 2А. Из рисунка видно, что авидность антител к S-белку вируса
163 SARS-CoV-2 значимо растет с увеличением срока после заболевания ($p <$
164 $0,05$). Коэффициент корреляции между уровнем специфических IgG-антител
165 и их авидностью $r=0,32$ (слабая положительная). Также в основной группе
166 был исследован спектр субклассов анти-S IgG антител. Важно, что ни у
167 одного из переболевших COVID-19 не было выявлено специфичных к S-
168 белку коронавируса антител субклассов IgG2 и IgG4. Зрелость гуморального
169 иммунитета к S-белку коронавируса оценивали по проценту антител IgG1
170 субкласса в общем IgG-ответе на S-белок. Корреляция между сроком после
171 заболевания и процентом IgG1-антител в общем специфическом IgG-ответе
172 была положительная, но очень слабая ($r=0,28$). Однако при расчете этого
173 показателя по подгруппам в зависимости от срока после заболевания,
174 выявлено значимое возрастание процента IgG1 ($p < 0,05$), а в подгруппе

175 более 6 мес. у всех обследованных субкласс IgG1 составлял 100% от IgG-
176 антител против S-белка вируса SARS-CoV-2.

177 При исследовании клеточного иммунитета к S-белку вируса SARS-CoV-
178 2 было показано, что спонтанный уровень экспрессии молекулы CD107a на
179 CD8^{high} лимфоцитах не превышал уровень cut off =1%. В контрольной группе
180 уровень индуцированной S-белком экспрессии CD107a также не превышал
181 1% и не отличался от спонтанного уровня. В основной группе было выявлено
182 значимое ($p < 0,05$) превышение над спонтанным уровнем CD8^{high}CD107a⁺ в
183 ответ на индукцию S-белком коронавируса, средняя по группе составила
184 $6,48 \pm 0,61\%$ (Рисунок 3А). Так же, как и при анализе гуморального
185 иммунитета, обследованные лица были разделены на две подгруппы – с
186 высоким и низким уровнем клеточного ответа на инфекцию. Пороговый
187 критерий составил 6%. Обследованные переболевшие разделились на 2
188 группы по этому критерию строго пополам (30 и 30 человек) см. рисунок 3Б.
189 Различия в уровне индуцированной S-белком экспрессии CD107a на CD8^{high}
190 лимфоцитах для этих групп оказались значимыми ($p < 0,05$) см. рисунок 3А.
191 Корреляции между уровнем клеточного иммунитета и сроком после
192 заболевания обнаружено не было.

193 При сопоставлении специфического гуморального и клеточного
194 иммунитета к S-белку вируса SARS-CoV-2 у переболевших COVID-19 было
195 выделено 4 варианта соотношения этих параметров (Рисунок 4). В группу А
196 вошли 19 человек, имевших высокий гуморальный (средняя для IgG-
197 $26,84 \pm 3,08$; для IgA- $16,65 \pm 2,02$) и клеточный (средняя для CD8^{high}CD107a⁺-
198 $10,39 \pm 0,87\%$) иммунитет к S-белку вируса SARS-CoV-2. В группу Б вошли
199 15 человек, имевших низкий гуморальный (средняя для IgG- $6,22 \pm 0,65$; для
200 IgA- $6,88 \pm 1,17$) и клеточный (средняя для CD8^{high}CD107a⁺- $3,8 \pm 0,44\%$)
201 иммунитет к S-белку вируса SARS-CoV-2. В группу В вошли 15
202 переболевших, имевших высокий гуморальный (средняя для IgG- $29,3 \pm 3,71$;
203 для IgA- $16,37 \pm 2,05$) и низкий клеточный (средняя для CD8^{high}CD107a⁺-

204 1,64±0,31%) иммунитет к S-белку коронавируса. А в группу Г вошли 11
205 человек с низким гуморальным (средняя для IgG-1,06±0,18; для IgA-
206 6,09±2,34) и высоким клеточным (средняя для CD8^{high}CD107a⁺-8,3±0,92%)
207 иммунитетом к S-белку. Корреляции между уровнем гуморального и
208 клеточного иммунитета к S-белку выявлено не было. Важно, что у тех 6-ти
209 человек, у которых после перенесенного COVID-19 не было выявлено анти-S
210 IgG антител, был обнаружен клеточный иммунитет к S-белку вируса SARS-
211 CoV-2.

212

213 **Обсуждение**

214 В результате проведенного исследования удалось показать, что уровень
215 антител к S-белку вируса SARS-CoV-2 сильно различается от полного
216 отсутствия до очень высокого уровня и жестко не связан с давностью
217 заболевания. По-видимому, есть люди, дающие высокий уровень антител, а
218 есть индивидуумы с низким антительным ответом. Это особенность их
219 организма. Возможно, это связано с гетерогенностью HLA, а может быть и с
220 какими-то иными индивидуальными особенностями иммунной системы. По
221 нашим данным 57% переболевших COVID-19 имели высокий уровень
222 гуморального ответа, а 43%-низкий. Эти данные хорошо коррелируют с
223 данными Robbiani et al., которые показали, что среди реконвалесцентов через
224 49 дней после COVID-19 у 33% обнаруживались низкие
225 вируснейтрализующие антитела, а у 67% - высокие [28]. Аналогичные
226 результаты были получены и другими исследователями. Было оказано, что
227 уровень специфического гуморального ответа на антигены вируса SARS-
228 CoV-2 не одинаков у разных пациентов и на него влияет степень тяжести
229 заболевания. После выздоровления уровень специфического иммунитета
230 постепенно снижается [22,29]. Относительно скорости снижения уровня
231 антител после перенесенного COVID-19 существует много исследований, но
232 поскольку пандемия продолжается, трудно сказать, как реально долго будут

233 держаться антитела. Так есть работы, в которых показано, что
234 специфические IgG антитела сохраняются на прежнем уровне через 3 месяца
235 [15,16], через 5-6 месяцев [33]. Наши данные показывают, что и через 9-12
236 месяцев у определенной группы переболевших сохраняются достаточно
237 высокие уровни антител. Специфические IgA-антитела появляются на 5-7
238 день от начала заболевания [22,29], интенсивность их снижения сильно
239 различается у разных пациентов, что вполне согласуется с нашими данными.
240 Аналогичная динамика специфических IgA-антител показана и при других
241 вирусных заболеваниях, например, кори и краснухе. Также выявленные нами
242 редкие случаи, когда при отсутствии у переболевших специфических IgG,
243 имелись высокие уровни специфических IgA, наблюдались у пациентов
244 после кори и краснухи [1]. Известно, что после перенесенной кори
245 формируется пожизненный иммунитет, как гуморальный, так и клеточный,
246 тогда как про иммунитет после COVID-19 все еще многое непонятно.
247 Считаем, что сопоставление мало изученного постковидного иммунитета с
248 хорошо изученным иммунитетом после перенесенной кори дает основание
249 для анализа и, возможно, понимания особенностей поддержания
250 иммунологической памяти после COVID-19.

251 Известно, что со временем происходит созревание антител, как их Fab-
252 фрагментов, так как авидность антител возрастает, так и константной части,
253 так как нарастает процент антител, относящихся к IgG1-субклассу.
254 Интересно, что после таких вирусных инфекций, как корь или краснуха
255 авидность антител через 6-12 месяцев после заболевания достигает 90% и
256 даже выше, а после COVID-19 на тех же сроках – всего 49,9% с
257 максимальным значением 68,1% [5]. В нашей работе было показано, что
258 после перенесенного COVID-19 специфические IgG представлены IgG1 и
259 IgG3 субклассами, тогда как антител субклассов IgG2 и IgG4, специфичных к
260 S-белку коронавируса обнаружено не было. Аналогичные данные были
261 представлены и другими авторами [8,21]. Ранее нами было показано, что у

262 ранних реконвалесцентов после кори формируются специфические IgG-
263 антитела всех четырех субклассов, при этом превалируют IgG3 и IgG2,
264 постепенно на первое место выдвигаются IgG1-антитела и через год и более,
265 этот субкласс превалирует среди специфических противокоревых антител,
266 составляя около 70% IgG-антител, но антитела остальных субклассов также
267 присутствуют, сохраняясь много лет в виде минорных субклассов антител
268 [4,5]. В случае пациентов, перенесших COVID-19, уже через 6-12 месяцев
269 после заболевания специфические антитела представлены только IgG1-
270 субклассом. Известно, что IgG1 и IgG3 антитела активно вовлечены в такие
271 эффекторные механизмы иммунной системы как антителозависимая
272 активация комплемента, антителозависимая клеточная цитотоксичность НК-
273 клеток и антителозависимый фагоцитоз [32]. Показано, что эти механизмы
274 участвуют в патогенезе COVID-19 и весьма важны для выживания пациентов
275 [7]. Показано, что уровень специфических IgG3 положительно коррелирует с
276 тяжестью течения заболевания [35].

277 Клеточный иммунитет к S-белку вируса SARS-CoV-2 также сильно
278 различался по уровню. Так, 50% обследованных имели высокий клеточный
279 иммунитет, и столько же – низкий, корреляций с уровнем гуморального
280 иммунитета выявлено не было. Похожие данные были представлены Stephens
281 et al. Показано, что уровень специфического клеточного ответа у
282 переболевших COVID-19 не одинаков у разных пациентов, и на него влияет
283 степень тяжести заболевания [29]. Также было показано, что клеточный
284 ответ у реконвалесцентов после COVID-19 обнаруживается для CD4⁺ - в
285 100% случаев, а для CD8⁺ - в 70%. При этом ответ CD4⁺ лимфоцитов
286 коррелировал с уровнем специфических IgG и IgA, а ответ CD8⁺ - нет [13].
287 Однако именно CD8⁺ лимфоциты, являясь цитотоксическими клетками,
288 вовлечены в непосредственное уничтожение инфицированных вирусом
289 клеток. Интересно, что уровень специфического клеточного иммунитета на
290 антигены вируса кори, определенный тем же методом, что и в настоящей

291 работе был существенно ниже, едва достигая 6% [3], тогда как на S-белок
292 коронавируса ответ достигал 16%, а уровень 6% стал cut off для разделения
293 высокого и низкого ответа. Возможно, такой высокий уровень ответа связан
294 с вовлечением гетерологичных иммунных ответов CD8⁺ клеток [2]. Так была
295 показана перекрестная реактивность Т-лимфоцитов переболевших SARS в
296 2003 г с антигенами N-белка SARS-CoV-2 [18], но, по мнению авторов, это не
297 защищает от заболевания COVID-19. При сопоставлении гуморального и
298 клеточного иммунитета к S-белку вируса SARS-CoV-2 нами выявлены 4
299 варианта сочетания: высокий гуморальный и клеточный, низкий
300 гуморальный и клеточный, высокий гуморальный и низкий клеточный и
301 наоборот низкий гуморальный и высокий клеточный иммунитет. Это
302 объясняет отсутствие корреляции между клеточным и гуморальным ответом.
303 Действительно, антительный ответ и ответ специфических CD8⁺ лимфоцитов
304 развивается независимо и зависит от разных генетически обусловленных
305 факторов. Похожие результаты были получены группой авторов Dan et al.
306 Они исследовали 5 параметров специфического иммунитета у 185
307 реконвалесцентов: антитела IgG и IgA, В-клетки памяти, CD4⁺ и CD8⁺
308 клеточный иммунитет к вирусу SARS-CoV-2. Показано, что все параметры
309 сохраняются более 6 месяцев. Через 2 месяца после заболевания 49% имели 5
310 из 5-ти параметров; через 6 и более месяцев 40% имели 5 из 5-ти параметров,
311 а 96% имели 3 из 5-ти параметров защиты в разных сочетаниях[11].

312 Таким образом, нам удалось показать, что специфический иммунитет к
313 S-белку вируса SARS-CoV-2, как гуморальный, так и клеточный,
314 формируется у переболевших COVID-19 и сохраняется многие месяцы.
315 Среди обследованных переболевших были такие, у кого не было антител, но
316 был высокий клеточный иммунитет, и наоборот, были высокие антитела и
317 отсутствовал клеточный, но не было среди переболевших тех, у кого вообще
318 не было никакого специфического ответа на S-белок вируса SARS-CoV-2.
319 Выявленные 4 варианта сочетания уровней специфического гуморального и

- 320 клеточного иммунитета к S-белку вируса SARS-CoV-2 свидетельствуют о
321 независимом формировании и поддержании этих звеньев иммунитета.

РИСУНКИ

Рисунок 1 Гуморальный иммунный ответ на S-белок вируса SARS-CoV-2.

А. Уровень IgG и IgA антител к S-белку вируса SARS-CoV-2 в сыворотке крови переболевших COVID-19.

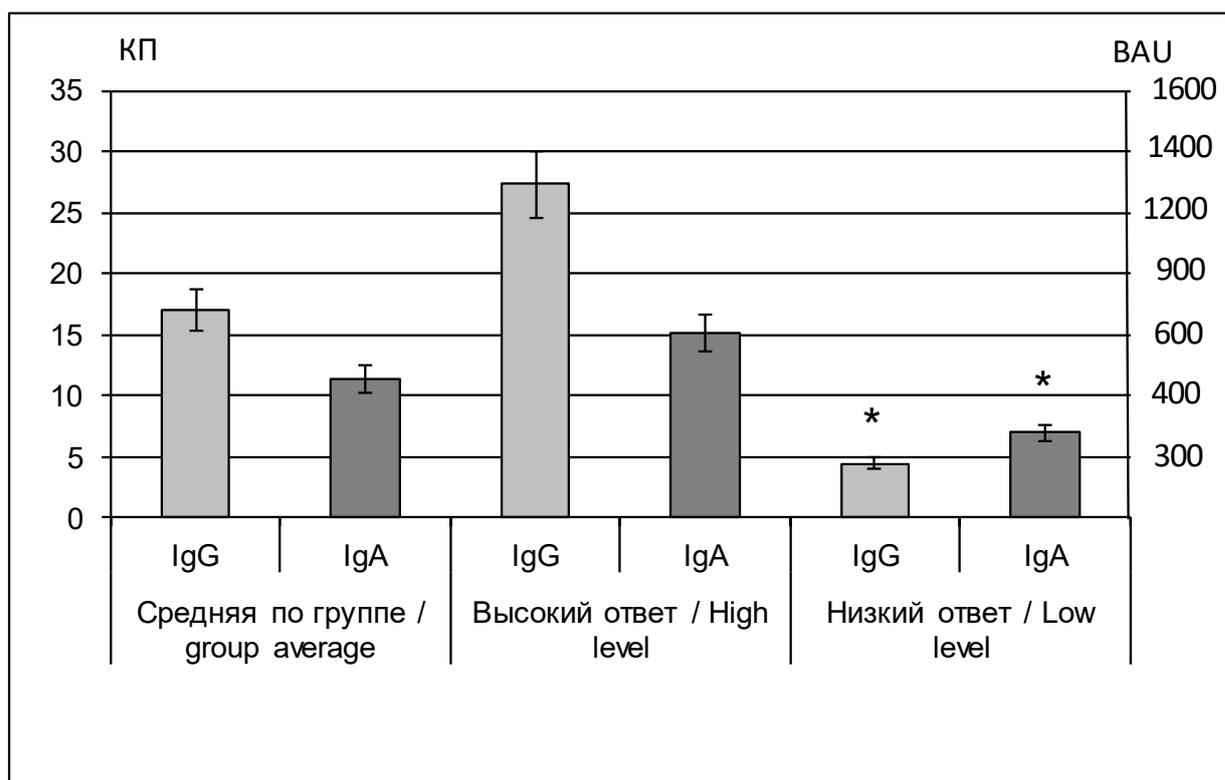
Б. Распределение переболевших COVID-19 по уровню гуморального ответа на S-белок вируса SARS-CoV-2.

Figure 1 Humoral immune response against the SARS-CoV-2 S-protein.

A. The level of serum SARS-CoV-2 S-protein-specific IgG and IgA antibodies in COVID-19 patients.

B. Distribution of COVID-19 patients based on the level of humoral response against the SARS-CoV-2 S-protein.

A/A



Б/В

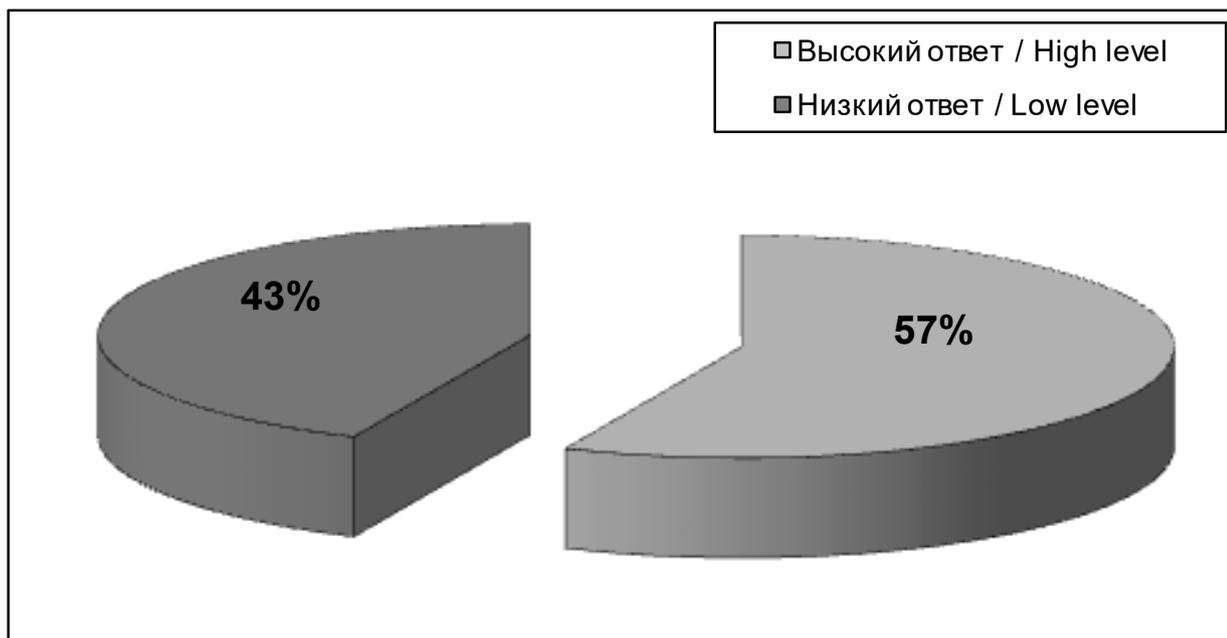


Рисунок 2 Созревание гуморального иммунного ответа на S-белок вируса SARS-CoV-2.

А. Авидность антител к S-белку вируса SARS-CoV-2 в сыворотке крови переболевших COVID-19 в зависимости от срока после заболевания.

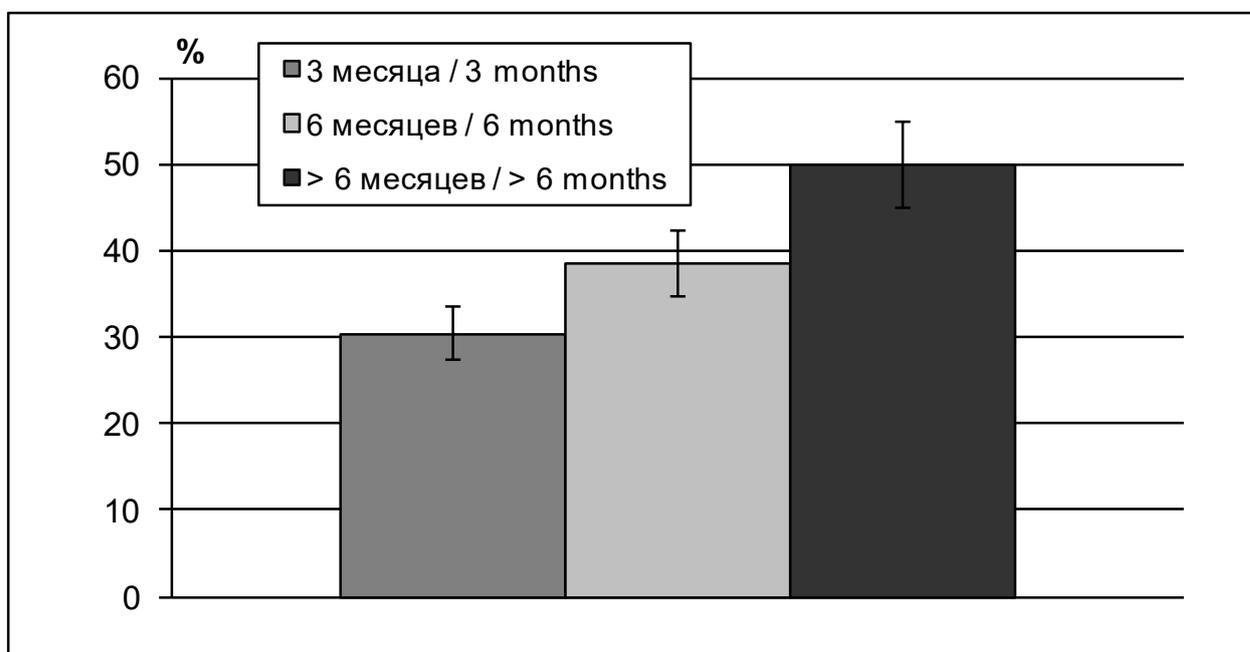
Б. Процент антител IgG1 субкласса к S-белку вируса SARS-CoV-2 в сыворотке крови переболевших COVID-19 в зависимости от срока после заболевания.

Figure 2 Maturation of humoral immune response against the SARS-CoV-2 S-protein.

A. Avidity of serum antibodies against the SARS-CoV-2 S-protein in COVID-19 patients, based on post-onset period.

B. Percentage of IgG1 subclass antibodies against the SARS-CoV-2 S-protein in the serum of COVID-19 patients, based on post-onset period.

А/А



Б/В

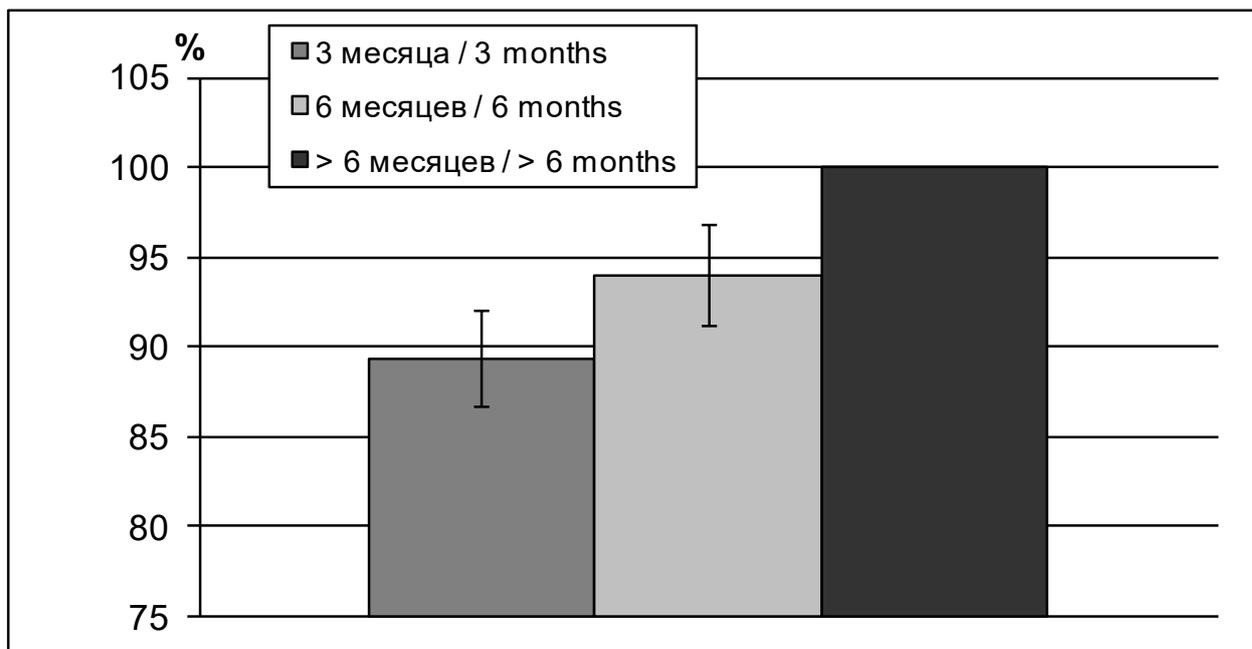


Рисунок 3 Клеточный иммунный ответ на S-белок вируса SARS-CoV-2.

А. Процент $CD8^{high}CD107a^{+}$ лимфоцитов от общего уровня цитотоксических Т-клеток после экспозиции S-белка вируса SARS-CoV-2.

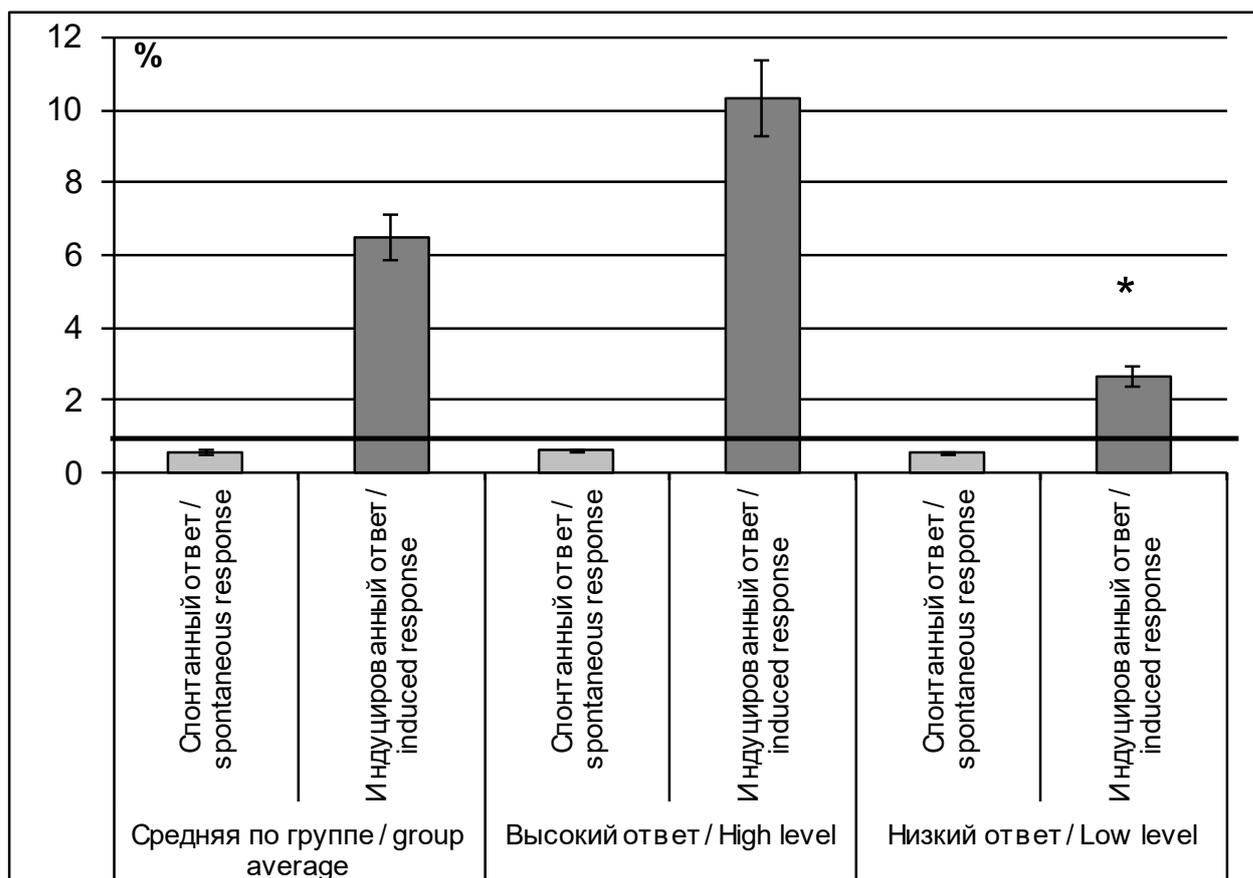
Б. Распределение переболевших COVID-19 по уровню специфического клеточного ответа на S-белок вируса SARS-CoV-2.

Figure 3 Cellular immune response against the SARS-CoV-2 S-protein.

A. Percentage of $CD8^{high}CD107a^{+}$ lymphocytes in the total cytotoxic T- cells after exposure to the SARS-CoV-2 S-protein.

B. Distribution of COVID-19 patients according to the level of SARS-CoV-2 S-protein-specific cellular response.

A/A



Б/В

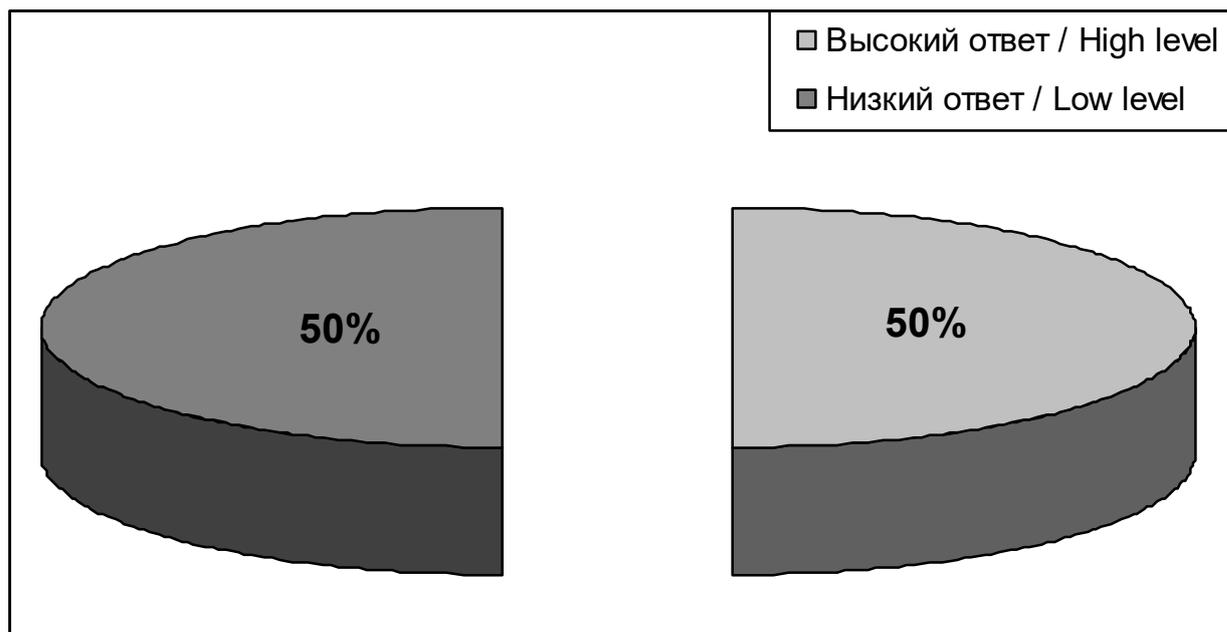


Рисунок 4 Сопоставление специфического гуморального и клеточного иммунитета к S-белку вируса SARS-CoV-2 у переболевших COVID-19.

А. Уровень гуморального и клеточного иммунитета к S-белку вируса SARS-CoV-2 в 4-х группах переболевших COVID-19 в зависимости от соотношения этих параметров.

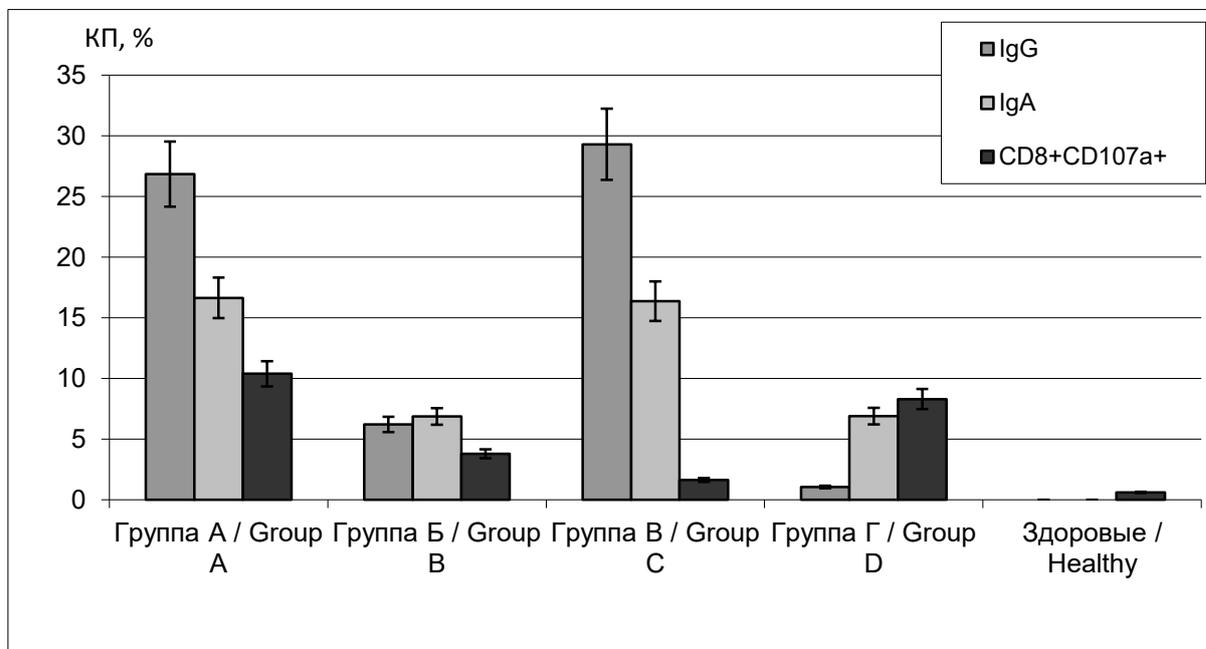
Б. Распределение переболевших COVID-19 на 4 группы по соотношению уровней специфического гуморального и клеточного иммунитета.

Figure 4 Comparison of specific humoral and cellular immunity against the SARS-CoV-2 S-protein in COVID-19 convalescents.

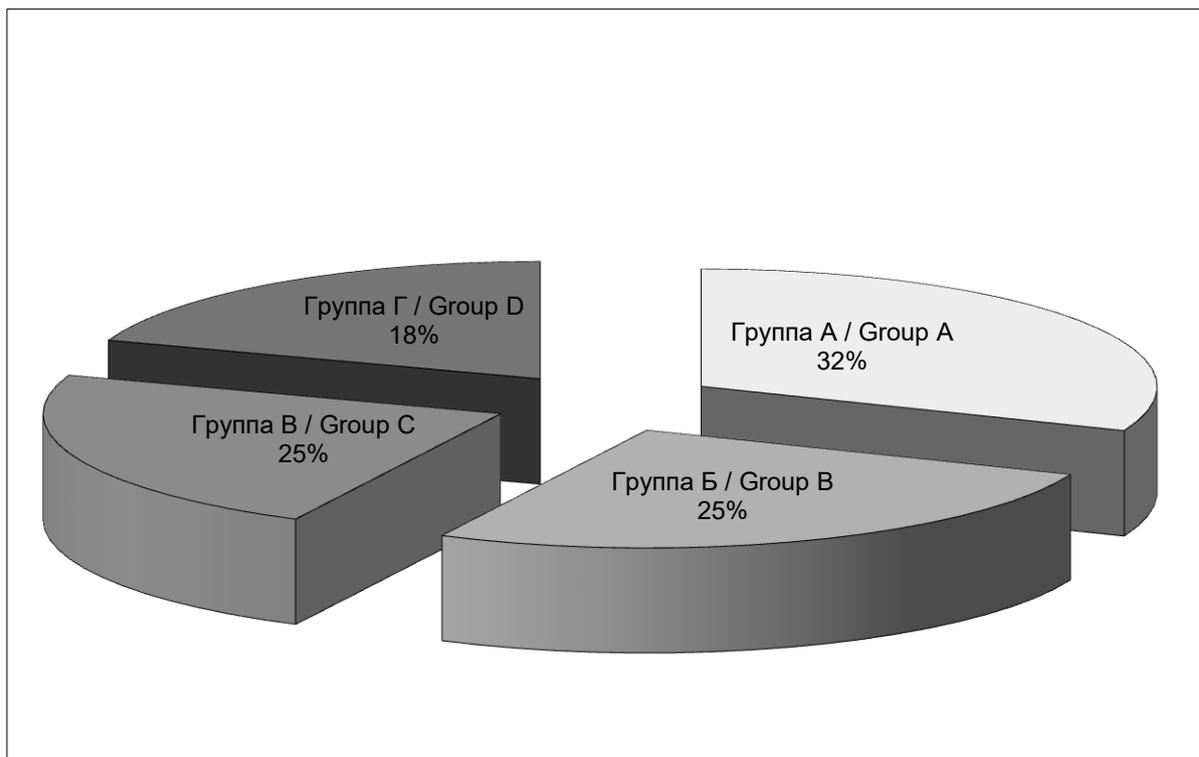
A. The level of humoral and cellular immunity against the SARS-CoV-2 S-protein in 4 groups of COVID-19 convalescents, based on the humoral / cellular immune ratio.

B. Stratification of COVID-19 convalescents into 4 groups based on the level of specific humoral / cellular immune ratio.

A/A



Б/В



ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДААННЫЕ

СОПОСТАВЛЕНИЕ ГУМОРАЛЬНОГО И КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА
У ПЕРЕБОЛЕВШИХ COVID-19

COMPARISON OF THE HUMORAL AND CELLULAR IMMUNITY IN
COVID-19 CONVALESCENTS

Блок 1. Информация об авторе, ответственном за переписку

Топтыгина Анна Павловна^{1,3}, д.м.н., ведущий научный сотрудник,
руководитель лаборатории цитокинов; профессор кафедры иммунологии
¹ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и
микробиологии им. Г.Н.Габричевского» Роспотребнадзора.

Toptygina Anna P.^{a,c}, PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Head of
the Laboratory of Cytokines; Professor Chair of Immunology

^aG.N.Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology,
Moscow, Russia

Адрес для переписки: 125212, Россия, Москва, ул. Адмирала Макарова 10,
МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского, Топтыгиной А.П. Тел.: +7(495) 452-18-01,
моб.: +7(916)389-66-04;

Факс: +7(495) 452-18-30

E-mail: toptyginaanna@rambler.ru

Address for correspondence: Toptygina Anna P.

G.N.Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology,
125212, Russia, Moscow, Admiral Makarov str., 10.

Phone: +7(495)452-18-01

Fax: +7(495) 452-18-30

E-mail: toptyginaanna@rambler.ru

Блок 2. Информация об авторах

Семикина Елена Леонидовна^{2,4}, д.м.н., главный научный сотрудник,
заведующая централизованной клинико-диагностической лабораторией;

профессор кафедры педиатрии и детской ревматологии 1 МГМУ им.

И.М.Сеченова.

Semikina Elena L.^{b,d}, PhD, MD (Medicine), Chief Research Associate, Head of Centralized Diagnostic Laboratory; Professor Chair of Pediatrics №1.

Закиров Рустам Шакирович², врач клинической лабораторной диагностики централизованной клинко-диагностической лаборатории.

Zakirov Rustam Sh.^b, Clinical laboratory specialist, Centralized Diagnostic Laboratory.

Афридонова Зульфия Энгелевна¹, аспирант лаборатории цитокинов.

Afridonova Zulfiia E.^a, PhD Student, Laboratory of Cytokines.

¹ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского» Роспотребнадзора.

^aG.N.Gabrichesky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia.

²ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России.

^bFederal State Autonomous Institution "National Medical Research Center of Children's Health" of the Ministry of Health of the Russian Federation.

³Кафедра иммунологии Биологического факультета ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова».

^cChair of Immunology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University.

⁴Кафедра педиатрии и детской ревматологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова» Минздрава России.

^dChair of Pediatrics and pediatric rheumatology, Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation.

Блок 3. Метаданные статьи

Краткое название статьи: **Иммунитет у переболевших COVID-19.
Immunity in COVID-19 convalescents.**

Ключевые слова: COVID-19; SARS-CoV-2; антитела; субклассы IgG; клеточный иммунитет; CD8+ лимфоциты.

Keywords: COVID-19; SARS-CoV-2; antibodies; IgG subclasses; cellular immunity; CD8+ lymphocytes.

11 страниц текста, 4 рисунка

Статья направлена для раздела «Оригинальная статья»

31.10.2021

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

№ ссылок	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском языке	Интернет-адрес цитируемой статьи
1	Топтыгина А.П. Общие закономерности формирования и поддержания специфического гуморального иммунного ответа на примере ответа на вирусы кори и краснухи. // Инфекция и иммунитет. – 2014. – Т. 4. – № 1. – С. 7-14.	Toptygina A.P. Common mechanisms of specific humoral immune response' shaping and sustaining by the example of immune response to measles and rubella viruses. <i>Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2014, vol. 4, no. 1, pp. 7-14. (In Russ.)</i>	doi:10.15789/2220-7619-2014-1-7-14
2	Топтыгина А.П. Гетерологичные иммунные ответы в норме и при патологии. // Инфекция и иммунитет. – 2020. – Т. 10. - №2. – С.269-276	Toptygina A.P. Heterologous immune responses in health and disease. <i>Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2020, vol. 10, no. 2, pp. 269–276 (In Russ.)</i> .	doi: 10.15789/2220-7619-HIR-1292
3	Топтыгина А.П., Андреев Ю.Ю., Смердова М.А., Зеткин А.Ю., Клыкова Т.Г. Формирование гуморального и клеточного иммунитета на коревую вакцину у взрослых. // Инфекция и иммунитет. – 2020. – Т. 10. - №1. – С.137-144.	Toptygina A.P., Andreev Yu.Yu., Smerdova M.A., Zetkin A.Yu., Klykova T.G. Formation of humoral and cellular immunity to measles vaccine in adults. <i>Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2020,</i>	doi: 10.15789/2220-7619-FOH-1334

		<i>vol. 10, no. 1, pp. 137–144 (In Russ.).</i>	
4	Топтыгина А.П., Андреев Ю.Ю., Смердова М.А., Наврузова Л.Н., Малеев В.В. Сопоставление гуморального иммунного ответа у взрослых больных корью и привитых от этой инфекции. // Инфекция и иммунитет. – 2021. – Т. 11. - №3. – С. 517-522.	Toptygina A.P., Andreev Yu.Yu., Smerdova M.A., Navruzova L.N., Maleev V.V. Comparing humoral immune response in adult measles patients and measles vaccinated subjects. <i>Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet</i> , 2021, vol. 11, no. 3, pp. 517–522 (In Russ.).	doi:10.15789/2220-7619-CHI-1396
5	Топтыгина А.П., Мамаева Т.А., Алешкин В.А. Особенности специфического гуморального иммунного ответа против вируса кори. // Инфекция и иммунитет. – 2013. – Т.3. – № 3. – С. 243-250.	Toptygina A.P., Mamaeva T.A., Alioshkin V.A. Peculiarities of specific humoral measles immune response. <i>Russian Journal of Infection and Immunity</i> . 2013, vol.3, no 3, pp.243-250. (In Russ.)	doi.org/10.15789/2220-7619-2013-3-243-250
6	Топтыгина А.П., Пухальский А.Л., Мамаева Т.А., Алешкин В.А., Спектр субклассов противокоревых иммуноглобулинов G у лиц, перенесших корь. // Бюлл. exper. биол. – 2004. – Т. 137. – № 3. – С. 293-295.	Toptygina A.P., Mamaeva T.A., Alioshkin V.A., Pukhalskii A.L. Spectrum of anti-measles immunoglobulin G subclasses in convalescents after measles. <i>Bulletin of Experimental Biology and Medicine</i> 2004, vol. 137, № 3, pp. 259-261(In Russ.)	doi: 10.1023/B:BEBM.000031564.27747.b4
7	Atyeo, C., Fischinger, S., Zohar, T., Slein, M.D., Burke, J., Loos, C., McCulloch, D.J., Newman, K.L.,		doi: 10.1016/j.immuni.20

	Wolf, C., Yu, J., Shuey K, Feldman J, Hauser BM, Caradonna T, Schmidt AG, Suscovich TJ, Linde C, Cai Y, Barouch D, Ryan ET, Charles RC, Lauffenburger D, Chu H, Alter G.. Distinct early serological signatures track with SARS-CoV-2 survival. <i>Immunity</i> 2020, vol. 53, no3, pp. 524–532.e4.		20.07.020.
8	Bobik T. V., Kostin N. N., Skryabin G. A., Tsabai P. N., Simonova M. A., Knorre V. D., Stratienco O. N., Aleshenko N. L., Vorobiev I. I., Khurs E. N., Mokrushina Yu. A., Smirnov I. V., Alekhin A. I., Nikitin A. E., Gabibov A. G. COVID-19 in Russia: Clinical and Immunological Features of the First-Wave Patients. <i>Acta Naturae</i> , 2021, vol. 13, no 1 (48), pp. 102-115		doi: 10.32607/actanaturae. 11374
9	Callow, K.A., Parry, H.F., Sergeant, M., Tyrrell, D.A. The time course of the immune response to experimental coronavirus infection of man. <i>Epidemiol. Infect.</i> , 1990, vol. 105, pp. 435–446.		
10	Cao, W.C., Liu, W., Zhang, P.H., Zhang, F., Richardus, J.H. Disappearance of antibodies to SARS-associated coronavirus after recovery. <i>N. Engl. J. Med.</i> , 2007, vol.		doi: 10.1056/NEJMc0703 48.

	<i>357, no 11, pp. 1162–1163.</i>		
11	Dan JM, Mateus J, Kato Y, Hastie KM, Yu ED , Faliti CE, Grifoni A, Ramirez SI, Haupt S, Frazier A, Nakao C, Rayaprolu V, Rawlings SA, Peters B, Krammer F, Simon V, Saphire EO, Smith DM, Weiskopf D, Sette A, Crotty S. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. <i>Science</i> , 2021, vol. 371(6529), pp. eabf4063.		doi: 10.1126/science.abf4063
12	de Wit, E., van Doremalen, N., Falzarano, D., Munster, V.J. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. <i>Nat. Rev. Microbiol.</i> , 2016, vol. 14, pp. 523–534.		doi: 10.1038/nrmicro.2016.81.
13	Grifoni A., Weiskopf D., Ramirez S..I, Mateus J., Dan J.M., Moderbacher C.R., Rawlings S.A., Sutherland A., Premkumar L., Jadi R.S., Marrama D., de Silva A.M., Frazier A., Carlin A.F., Greenbaum J.A., Peters B., Krammer F., Smith D.M., Crotty S., Sette A. Targets of T cell responses to SARS-CoV-2 coronavirus in humans with COVID-19 disease and unexposed individuals. <i>Cell</i> , 2020, vol. 181, pp. 1489–1501 e1415.		doi: 10.1016/j.cell.2020.05.015

14	<p>Guo C., Li B., Ma H., Wang X., Cai P., Yu Q., Zhu L., Jin L., Jiang C., Fang J., Liu Q., Zong D., Zhang W., Lu Y., Li K., Gao X., Fu B., Liu L., Ma X., Weng J., Wei H., Jin T., Lin J., Qu K. Single-cell analysis of two severe COVID-19 patients reveals a monocyte-associated and tocilizumab-responding cytokine storm. <i>Nat Commun.</i>, 2020, vol. 11(1), pp. 3924.</p>		doi: 10.1038/s41467-020-17834-w.
15	<p>Isho B., Abe K.T., Zuo M., Jamal A.J., Rathod B., Wang J.H., Li Z., Chao G., Rojas O.L., Bang Y.M., Pu A., Christie-Holmes N., Gervais C., Ceccarelli D., Samavarchi-Tehrani P., Guvenc F., Budykowski P., Li A., Paterson A., Yue F.Y., Marin L.M., Caldwell L., Wrana J.L., Colwill K., Sicheri F., Mubareka S., Gray-Owen S.D., Drews S.J., Siqueira W.L., Barrios-Rodiles M., Ostrowski M., Rini J.M., Durocher Y., McGeer A.J., Gommerman J.L., Gingras A.-C. Persistence of serum and saliva antibody responses to SARS-CoV-2 spike antigens in COVID-19 patients. <i>Sci Immunol.</i>, 2020, vol. 5, pp. eabe5511.</p>		doi: 10.1126/sciimmunol.abe5511
16	<p>Iyer AS, Jones FK, Nodoushani A, Kelly M, Becker M, Slater D, Mills R, Teng E, Kamruzzaman M, Garcia-</p>		doi: 10.1126/sciimmunol.

	Beltran WF, Astudillo M, Yang D, Miller TE, Oliver E, Fischinger S, Atyeo C, Iafrate AJ, Calderwood SB, Lauer SA, Yu J, Li Z, Feldman J, Hauser BM, Caradonna TM, Branda JA, Turbett SE, LaRocque RC, Mellon G, Barouch DH, Schmidt AG, Azman AS, Alter G, Ryan ET, Harris JB, Charles RC. Persistence and decay of human antibody responses to the receptor binding domain of SARS-CoV-2 spike protein in COVID-19 patients. <i>Sci Immunol.</i> , 2020, vol. 5(52), pp. eabe0367.		abe0367
17	Ju, B., Zhang, Q., Ge, X., Wang, R., Sun, J., Ge, X., Yu, J., Shan, S., Zhou, B., Song, S., Tang X., Yu J., Lan J., Yuan J., Wang H., Zhao J., Zhang S., Wang Y., Shi X., Liu L., Zhao J., Wang X., Zhang Z., Zhang L. Human neutralizing antibodies elicited by SARS-CoV-2 infection. <i>Nature</i> , 2020, vol. 584 (7819), pp. 115-119		doi: 10.1038/s41586-020-2380-z.
18	Le Bert N, Tan AT, Kunasegaran K, Tham CYL, Hafezi M, Chia A, Chng M.H.Y., Lin M., Tan N., Linster M., Chia W.N., Chen M. I-C., Wang L.-F., Ooi E.E., Kalimuddin S., Tambyah P.A., Low J.G.-H., Tan Y.-J., Bertoletti A. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and		doi: 10.1038/s41586-020-2550-z

	SARS, and uninfected controls. <i>Nature</i> , 2020, vol. 584, pp. 457–462.		
19	Li, C.K.-F., Wu, H., Yan, H., Ma, S., Wang, L., Zhang, M., Tang, X., Temperton, N.J., Weiss, R.A., Brenchley, J.M., Douek D.C., Mongkolsapaya J., Tran B.-H., Lin C.-l. S., Screaton G.R., Hou J.-l. , McMichael A. J., Xu X.-N. T cell responses to whole SARS coronavirus in humans. <i>J. Immunol.</i> , 2008, vol. 181, pp. 5490–5500.		doi: 10.4049/jimmunol.181.8.5490.
20	Lu R., Zhao X., Li J., Niu P., Yang B., Wu H., Wang W., Song H., Huang B., Zhu N., Bi Y., Ma X., Zhan F., Wang L., Hu T., Zhou H., Hu Z., Zhou W., Zhao L., Chen J., Meng Y., Wang J., Lin Y., Yuan J., Xie Z., Ma J., Liu W.J, Wang D., Xu W., Holmes E.C., Gao G.F., Wu G., Chen W., Shi W., Tan W. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. <i>Lancet</i> , 2020, vol. 395, pp. 565–574.		doi: 10.1016/S0140-6736(20)30251-8.
21	Luo H, Jia T, Chen J, Zeng S, Qiu Z, Wu S, Li X, Lei Y, Wang X, Wu W, Zhang R, Zou X, Feng T, Ding R, Zhang Y, Chen Y-Q, Sun C, Wang T, Fang S, Shu Y The Characterization of Disease Severity Associated		doi: 10.3389/fimmu.2021.632814

	IgG Subclasses Response in COVID-19 Patients. <i>Front. Immunol.</i> , 2021, vol. 12, pp. 632814.		
22	Lynch KL, Whitman JD, Lacanienta NP, Beckerdite EW, Kastner SA, Shy BR, Goldgof GM, Levine AG, Bapat SP, Stramer SL, Esensten JH, Hightower AW, Bern C, Wu AHB. Magnitude and kinetics of anti-SARS-CoV-2 antibody responses and their relationship to disease severity. <i>Clin Infect Dis.</i> , 2020, vol. 72, pp. 301–308.		doi: 10.1093/cid/ciaa979
23	Ng, O.-W., Chia, A., Tan, A.T., Jadi, R.S., Leong, H.N., Bertoletti, A., Tan, Y.-J. Memory T cell responses targeting the SARS coronavirus persist up to 11 years post-infection. <i>Vaccine</i> , 2016, vol. 34, pp. 2008–2014.		doi: 10.1016/j.vaccine.2016.02.063.
24	Ni, L., Ye, F., Chen, M.-L., Feng, Y., Deng, Y.-Q., Zhao, H., Wei, P., Ge, J., Gou, M., Li, X., Sun L, Cao T, Wang P, Zhou C, Zhang R, Liang P, Guo H, Wang X, Qin CF, Chen F, Dong C. Detection of SARS-CoV-2-Specific Humoral and Cellular Immunity in COVID-19 Convalescent Individuals. <i>Immunity</i> , 2020, vol. 52, no 6, pp. 971-977.e3.		doi: 10.1016/j.immuni.2020.04.023.
25	Okba, N.M.A., M€uller, M.A., Li, W., Wang, C., GeurtsvanKessel, C.H., Corman, V.M., Lamers, M.M.,		doi: 10.3201/eid2607.200

	Sikkema, R.S., de Bruin, E., Chandler, F.D., Yazdanpanah Y, Le Hingrat Q, Descamps D, Houhou-Fidouh N, Reusken CBEM, Bosch BJ, Drosten C, Koopmans MPG, Haagmans BL. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2-Specific Antibody Responses in Coronavirus Disease 2019 Patients. <i>Emerg. Infect. Dis.</i> , 2020, vol. 26, no 7, pp. 1478-1488		841.
26	Payne, D.C., Iblan, I., Rha, B., Alqasrawi, S., Haddadin, A., Al Nsour, M., Alsanouri, T., Ali, S.S., Harcourt, J., Miao, C., Tamin A, Gerber SI, Haynes LM, Al Abdallat MM. Persistence of Antibodies against Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. <i>Emerg. Infect. Dis.</i> , 2016, vol. 22, no 10, pp. 1824–1826.		doi: 10.3201/eid2210.160706.
27	Reed S.E. The behaviour of recent isolates of human respiratory coronavirus in vitro and in volunteers: evidence of heterogeneity among 229E related strains. <i>J. Med. Virol.</i> , 1984, vol. 13, pp. 179–192.		doi: 10.1002/jmv.1890130208.
28	Robbiani DF, Gaebler C, Muecksch F, Lorenzi JCC, Wang Z, Cho A, Agudelo M, Barnes CO, Gazumyan A, Finkin S, Hägglöf T, Oliveira TY, Viant C, Hurley		doi: 10.1038/s41586-020-2456-9

	A, Hoffmann HH, Millard KG, Kost RG, Cipolla M, Gordon K, Bianchini F, Chen ST, Ramos V, Patel R, Dizon J, Shimeliovich I, Mendoza P, Hartweger H, Nogueira L, Pack M, Horowitz J, Schmidt F, Weisblum Y, Michailidis E, Ashbrook AW, Waltari E, Pak JE, Huey-Tubman KE, Koranda N, Hoffman PR, West AP Jr, Rice CM, Hatzioannou T, Bjorkman PJ, Bieniasz PD, Caskey M, Nussenzweig MC. Convergent antibody responses to SARS-CoV-2 in convalescent individuals. <i>Nature</i> , 2020, vol. 584, pp. 437–442.		
29	Stephens DS, McElrath MJ. COVID-19 and the path to immunity. <i>JAMA.</i> , 2020, vol. 324, pp. 1279–1281.		doi:10.1001/jama.2020.16656
30	Graham NR, Whitaker AN, Strother CA, Miles AK, Grier D, McElvany BD, Bruce EA, Poynter ME, Pierce KK, Kirkpatrick BD, Stapleton RD, An G, van den Broek-Altenburg E, Botten JW, Crothers JW, Diehl SA. Kinetics and isotype assessment of antibodies targeting the spike protein receptor-binding domain of severe acute respiratory syndrome-coronavirus-2 in COVID-19 patients as a function of age, biological sex and disease severity. <i>Clin Transl Immunology.</i> , 2020, vol. 9, no 10, pp. e1189.		doi: 10.1002/cti2.1189. eCollection 2020.

31	Tang, F., Quan, Y., Xin, Z.T., Wrammert, J., Ma, M.J., Lv, H., Wang, T.B., Yang, H., Richardus, J.H., Liu, W., Cao, W.C. Lack of peripheral memory B cell responses in recovered patients with severe acute respiratory syndrome: a six-year follow-up study. <i>J. Immunol.</i> , 2011, vol. 186, pp. 7264–7268		doi: 10.4049/jimmunol.0903490.
32	Vidarsson, G., Dekkers, G., Rispens, T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. <i>Front. Immunol.</i> , 2014, vol. 5, pp. 520.		doi:10.3389/fimmu.2014.00520. eCollection 2014.
33	Wajnberg A, Amanat F, Firpo A, Altman DR, Bailey MJ, Mansour M, McMahon M, Meade P, Mendu DR, Muellers K, Stadlbauer D, Stone K, Strohmeier S, Simon V, Aberg J, Reich DL, Krammer F, Cordon-Cardo C. Robust neutralizing antibodies to SARS-CoV-2 infection persist for months. <i>Science</i> , 2020, vol. 370, pp. 1227–1230.		doi: 10.1126/science.abd7728
34	Wan Y., Shang J., Graham R., Baric R.S., Li F. Receptor Recognition by the Novel Coronavirus from Wuhan: an Analysis Based on Decade-Long Structural Studies of SARS Coronavirus. <i>J. Virol.</i> , 2020, vol. 94, e00127-20		https://doi.org/10.1128/JVI.00127-20 .

35	Yates J.L., Ehrbar D.J., Hunt D.T., Girardin R.C., Dupuis A.P. 2nd, Payne A.F., Sowizral M., Varney S., Kulas K.E., Demarest V.L., Howard K.M., Carson K., Hales M., Ejemel M., Li Q., Wang Y., Peredo-Wende R., Ramani A., Singh G., Strle K., Mantis N.J., McDonough K.A., Lee W.T. Serological analysis reveals an imbalanced IgG subclass composition associated with COVID-19 disease severity <i>Cell Rep. Med.</i> , 2021, vol. 2, no 7, pp. 100329.		doi: 10.1016/j.xcrm.2021.100329.
36	Zhao J., Yuan Q., Wang H., Liu W., Liao X., Su Y., Wang X., Yuan J., Li T., Li J., Qian S., Hong C., Wang F., Liu Y., Wang Z., He Q., Li Z., He B., Zhang T., Fu Y., Ge S., Liu L., Zhang J., Xia N., Zhang Z. Antibody Responses to SARS-CoV-2 in Patients with Novel Coronavirus Disease 2019. <i>Clin. Infect. Dis.</i> , 2020, vol. 71, no 16, pp. 2027-2034.		doi: 10.1093/cid/ciaa344.