

## КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА CLINICAL LABORATORY DIAGNOSTICS

### ОЦЕНКА ИММУННОГО ОТВЕТА SARS-COV-2-СПЕЦИФИЧНЫХ Т-КЛЕТОК МЕТОДОМ ELISPOT

Герасимова В.В.<sup>1</sup>,  
Колесник С.В.<sup>2</sup>,  
Кудлай Д.А.<sup>3,4</sup>,  
Гольдерова А.С.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова» (677007, г. Якутск, ул. Кулаковского, 42, Россия)

<sup>2</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова» (117198, г. Москва, ул. Академика Опарина, 4, Россия)

<sup>3</sup> ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (119435, г. Москва, Большая Пироговская ул., 2, стр. 4, Россия)

<sup>4</sup> ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России (115522, г. Москва, Каширское шоссе, 24, Россия)

Автор, ответственный за переписку:  
Кудлай Дмитрий Анатольевич,  
e-mail: d624254@gmail.com

#### РЕЗЮМЕ

Пандемия COVID-19 стимулировала интерес к развитию биотехнологий, а также к поиску новых решений в сфере диагностики иммунных процессов. Для оценки вирус-специфических иммунных реакций большая роль отводилась ответу иммуноглобулинов классов А, М, G. Позднее появилось понимание, что для комплексной оценки процессов адаптивного иммунитета целесообразно исследование его клеточной составляющей. Одним из наиболее доступных методов оценки Т-клеточного иммунитета, зарекомендовавшим себя в диагностике других инфекционных заболеваний, например, латентной туберкулезной инфекции, является IGRA ELISPOT.

**Цель работ.** Определение SARS-CoV-2-специфического иммунного ответа Т-лимфоцитов *in vitro* в периферической крови добровольцев различных групп методом IGRA ELISPOT. Мы оценили возможность применения метода для оценки Т-клеточного иммунного ответа на инфекцию и вакцинацию. Кроме того, мы определяли продолжительность периода сохранения активности SARS-CoV-2-специфического иммунного ответа Т-лимфоцитов, индуцированного вакцинацией.

**Материалы и методы.** Исследования проводили на образцах венозной крови добровольцев трёх групп: 1) госпитализированные в стационар с диагнозом COVID-19; 2) перенёвшие COVID-19; 3) вакцинированные против COVID-19. Т-клеточный иммунный ответ оценивали с помощью тест-системы «ТиграТест® SARS-CoV-2», принцип работы которой заключается в определении *in vitro* количества Т-клеток, секретирующих гамма-интерферон в ответ на стимуляцию пептидами SARS-CoV-2 в двух панелях антигенов: 1) пептиды спайк-белка (S); 2) пептиды N-, M-, Orf3a-, Orf7a-белков.

**Заключение.** Метод IGRA ELISPOT является специфичным и чувствительным инструментом в оценке Т-клеточного иммунитета к вирусу SARS-CoV-2. Он позволяет оценить SARS-CoV-2-специфические Т-клеточные реакции, индуцированные как естественной встречей с возбудителем, так и вакцинацией. Метод целесообразно использовать в рутинной практике для комплексной оценки иммунитета к SARS-CoV-2.

**Ключевые слова:** ELISPOT, SARS-CoV-2, COVID-19, Т-лимфоциты, иммунный ответ, «Тигра Тест», клеточный иммунитет

Статья поступила: 30.08.2022

Статья принята: 30.09.2022

Статья опубликована: 08.12.2022

**Для цитирования:** Герасимова В.В., Колесник С.В., Кудлай Д.А., Гольдерова А.С. Оценка иммунного ответа SARS-CoV-2-специфических Т-клеток методом ELISPOT. *Acta biomedica scientifica*. 2022; 7(5-2): 96-102. doi: 10.29413/ABS.2022-7.5-2.10

## ELISPOT ASSAY OF THE SARS-COV-2 SPECIFIC T CELLS IMMUNE RESPONSE

Gerasimova V.V.<sup>1</sup>,  
Kolesnik S.V.<sup>2</sup>,  
Kudlay D.A.<sup>3,4</sup>,  
Golderova A.S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> North-Eastern Federal University  
named after M.K. Ammosov  
(Kulakovskogo str. 42, Yakutsk 677007,  
Russian Federation)

<sup>2</sup> National Medical Research Center  
for Obstetrics, Gynecology and Perinatology  
named after Academician V.I. Kulakov  
(Akademika Oparina str. 4, Moscow 117198,  
Russian Federation)

<sup>3</sup> The First Sechenov Moscow State  
Medical University (Sechenov University)  
(Trubetskaya str. 8, building 2,  
Moscow 119991, Russian Federation)

<sup>4</sup> National Research Center – Institute  
of Immunology, Federal Medical-Biological  
Agency of Russia (Kashirskoye highway 24,  
Moscow 115522, Russian Federation)

Corresponding author:  
**Dmitry A. Kudlay**,  
e-mail: d624254@gmail.com

## ABSTRACT

The COVID-19 pandemic has stimulated interest in the development of biotechnology, as well as in the search for new solutions in the diagnostics of immune processes. The response of immunoglobulins A, M and G had a significant role in the assessment of virus-specific immune responses. Later, it was understood that for a comprehensive assessment of adaptive immunity processes, it is reasonable to study its cellular component. One of the most affordable methods for assessing T cell immunity, which has proven itself in the diagnosis of other infectious diseases, such as latent tuberculosis infection, is IGRA ELISPOT.

**The aim of the study.** To determine SARS-CoV-2 specific immune response of T lymphocytes in vitro in the peripheral blood of volunteers from various groups using IGRA ELISPOT method. We evaluated the applicability of the method to assess T cell immune response to infection and vaccination. In addition, we determined the duration of the maintenance period of the SARS-CoV-2 specific T cells immune response induced by vaccination.

**Materials and methods.** The study was carried out on venous blood samples of volunteers from three groups: 1) hospital patients with COVID-19; 2) COVID-19 convalescents; 3) vaccinated against COVID-19. The T cell immune response was assessed using the TigraTest® SARS-CoV-2 test system, which determines in vitro the number of T cells secreting interferon-gamma in response to stimulation with SARS-CoV-2 peptides in two antigens panels: 1) peptides of the spike protein (S); 2) peptides of N, M, Orf3a and Orf7a proteins.

**Conclusion.** The IGRA ELISPOT assay is a specific and sensitive tool in the assessment of T cell immunity to the SARS-CoV-2 virus. The method makes it possible to assess SARS-CoV-2 specific T cell responses induced both by natural encounter with the pathogen and by vaccination. It is advisable to use the method in routine practice for comprehensive assessment of immunity to SARS-CoV-2.

**Keywords:** ELISPOT, SARS-CoV-2, COVID-19, T lymphocytes, T cells, immune response, TigraTest®, cellular immunity, vaccination

Received: 30.08.2022  
Accepted: 30.09.2022  
Published: 08.12.2022

**For citation:** Gerasimova V.V., Kolesnik S.V., Kudlay D.A., Golderova A.S. ELISPOT assay of the SARS-CoV-2 specific T cells immune response. *Acta biomedica scientifica*. 2022; 7(5-2): 96-102. doi: 10.29413/ABS.2022-7.5-2.10

## ВВЕДЕНИЕ

Приобретённый, или адаптивный, иммунитет представлен клеточным и гуморальным компонентами. Суть гуморального иммунитета заключается в синтезе В-лимфоцитами специфических антител [1, 2]. Т-клетки играют ключевую роль в реализации клеточного звена адаптивного иммунитета [3–5]. В начале пандемии COVID-19 большое внимание уделялось диагностике гуморального иммунитета. Одним из вариантов диагностики гуморального иммунитета является иммуноферментный анализ (ИФА) – лабораторный иммунологический метод качественного или количественного определения различных соединений, основанный на специфической реакции антиген – антитело [6]. В рамках ИФА-диагностики COVID-19 в основном определялся уровень антител (IgG, IgM, IgA). Позже несколько исследований показали, что Т-клетки, специфичные для SARS-CoV-2, могут быть более чувствительным маркером предыдущей инфекции COVID-19, а одно только серологическое исследование гуморального адаптивного ответа может недооценивать долю населения, обладающего иммунной защитой [7, 8]. В связи с этим широкое распространение получил лабораторный метод ELISPOT (Enzyme-Linked ImmunoSpot), используемый для изучения Т-клеточного иммунного ответа человека и животных. Исследования показали, что наиболее иммуногенными являются: шиповидный (S), нуклеокапсидный (N), мембранный (M) белки, а также структурные белки ORF-3a, ORF-7a [9]. Эти рекомбинантные пептиды используются для стимуляции мононуклеарных клеток периферической крови для идентификации эффекторных Т-клеток. ELISPOT позволяет визуализировать секретлируемый эффекторной клеткой интерферон-гамма в ответ на её стимуляцию синтетическими пептидами SARS-CoV-2. Каждая такая клетка образует пятно (spot) на дне планшета. По количеству пятен оценивается напряжённость Т-клеточного ответа. Таким образом, количество Т-клеток, специфичных к SARS-CoV-2, позволяет оценить уровень иммунной защиты на индивидуальном уровне, в том числе у серонегативных лиц.

**Целью настоящего исследования** является оценка особенностей Т-клеточного ответа на антигены SARS-CoV-2 у больных COVID-19, переболевших и вакцинированных лиц [10, 11].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Настоящее исследование было проведено с ноября по декабрь 2021 г. в г. Якутске, на базе научно-исследовательской лаборатории «Клеточные технологии и регенеративная медицина» Медицинского института ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова».

Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) выделяли из образцов цельной крови пациентов и промывали для удаления любых источников фонового сигнала, мешающего анализу. Затем МКПК подсчи-

тывали, для того чтобы внести в анализируемый образец стандартное количество клеток. Подсчёт служит гарантией того, что для анализа образцов крови лиц с низким содержанием Т-клеток вследствие иммунодефицита или иммуносупрессии в лунки планшета будет внесено стандартное количество клеток, что исключит наличие ложноотрицательного результата. Для каждого образца требуются 4 лунки: 1) панель антигенов 1 (ПАГ 1) – пептиды S-белка (spike), содержит 25 % диметилсульфоксида (ДМСО); 2) панель антигенов 2 (ПАГ 2) – пептиды белков N, M, ORF3a и ORF7a, содержит 25 % ДМСО; 3) положительный контроль (К+) – моноклональное антитело ОКТ-3, среда AIM-V + AlbuMAX, антимикробные средства (100-кратный концентрированный раствор) для подтверждения функциональности МКПК; 4) негативный контроль (К-) – AIM-V® + AlbuMAX для выявления неспецифической активации клеток. МКПК инкубируют с антигенами SARS-CoV-2 для стимуляции специфичных Т-клеток. Цитокин интерферон-гамма (IFN $\gamma$ ) связывается и удерживается рядом с секретлирующей его Т-клеткой специфическими анти-IFN $\gamma$  антителами, находящимися на поверхности мембраны, выстилающей лунку. После активации все клетки удаляются промыванием, и для детекции цитокина прибавляются другие анти-IFN $\gamma$  антитела, конъюгированные щелочной фосфатазой и узнающие другой эпитоп молекулы IFN $\gamma$ . После инкубации не связавшийся конъюгат удаляется промыванием. В каждую лунку вносится раствор хромогенного субстрата, который преобразуется щелочной фосфатазой в окрашенное пятно нерастворимого преципитата в месте реакции. Каждое пятно является отпечатком одной Т-клетки, секретлирующей IFN $\gamma$ , а количество полученных пятен характеризует содержание специфичных для антигенов патогена CD4 $^{+}$  и CD8 $^{+}$  Т-клеток в периферической крови. Результатом анализа является подсчёт количества пятен в лунках с контролями и антигенами.

Образцы крови забирали в пробирки Vacutainer с литий-гепарином. Для выделения МКПК в центрифужные пробирки (15 мл) помещали 3 мл раствора фикола и выдерживали их при температуре от 15 до 25 °C не менее 10 мин. Кровь (4 мл) для выделения МКПК перед центрифугированием разводили в 2 раза стерильным фосфатно-солевым буферным (ФСБ) раствором (4 мл). Далее 8 мл разведённой крови осторожно насливали на 3 мл раствора фикола. Центрифугировали при 1000 g при температуре от 15 до 25 °C в течение 20–25 мин. Образовавшееся мутное кольцо МКПК переносили в стерильные пробирки и доводили средой RPMI-1640 до 10 мл, затем центрифугировали при 600 g в течение 7–10 мин (1-я отмывка) и при 400 g в течение 7–10 мин (2-я и 3-я отмывки). Сливали супернатант и ресуспендировали осадок в 0,5 мл среды AIM-V® + AlbuMAX® – исходная суспензия МКПК. Для анализа одного образца необходимо в каждую лунку внести от  $3,0 \times 10^5$  до  $4,0 \times 10^5$  МКПК (оптимально –  $3,5 \times 10^5$  на 100 мкл). Чтобы добиться оптимальной концентрации МКПК в лунках использовали формулу пересчёта с инструкции. Подготовку планшетов, порядок промывки стрипов, внесение образцов в планшет и инкубацию МКПК с антигенами, внесение рабочего раствора конъюгата и проявление пятен проводили по инструкции ТиграТест® SARS-CoV-2.

В каждую из четырёх лунок, меняя наконечники, внесли по 100 мкл рабочей суспензии МКПК. Планшет помещали в инкубатор с влажной камерой на 16–20 часов. Условия инкубации: температура  $37 \pm 1$  °C;  $5 \pm 0,5$  % CO<sub>2</sub>; влажность 95 %.

При оценке результатов в позитивном контроле количество спотов должно быть более 100. При оценке результатов в негативном контроле допускается наличие до 14 спотов. Для определения количества пятен в лунках с антигенами необходимо из числа спотов в ПАГ 1 и ПАГ 2 вычесть число спотов в К–. Результат теста рассматривали как отрицательный, если в результате анализа количество спотов как в лунке с ПАГ 1, так и в лунке с ПАГ 2, за вычетом количества пятен в отрицательном контроле, не превышает 10. Отрицательный результат показывает, что образец, вероятно, не содержит Т-клеток, специфически сенсibilизированных в отношении определённых антигенов коронавируса SARS-CoV-2. Результат теста следует рассматривать как положительный, если в результате анализа количество пятен как в лунке с ПАГ 1, так и в лунке с ПАГ 2, за вычетом количества пятен в К–, превышает 12. Положительный результат может потенциально свидетельствовать о сформировавшемся Т-клеточном иммунитете к вирусу SARS-CoV-2 в результате перенесённого заболевания COVID-19 (в том числе в бессимптомной форме) и/или вакцинации [12].

Статистический анализ проведён с использованием программы IBM SPSS Statistics 23 (IBM Corp., США). Проверку на нормальность распределения изучаемых количественных показателей проводили по тесту Колмогорова – Смирнова. Совокупности количественных показателей, распределение которых отличалось от нормального, описывались при помощи значений медианы (Me) и нижнего и верхнего квартилей (Q1–Q3). При сравнении количественных показателей групп статистическую значимость различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента при нормальном распределении и с помощью критерия Манна – Уитни при ненормальном. Для сравнения частот качественных признаков в несвязанных группах применялся критерий  $\chi^2$ . Результаты считались статистически значимыми при величинах достигнутого уровня значимости  $p < 0,05$ .

Исследования соответствовали этическим стандартам комитетов по биомедицинской этике, разработанной в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации. Соблюдены принципы добровольности, прав и свобод личности, гарантированных статьями 21 и 22 Конституции РФ.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Всего нами обследовано 67 человек, средний возраст которых составил  $57,75 \pm 17,12$  года. Соотношение обследованных лиц по полу было следующим: 19 мужчин (средний возраст –  $53,68 \pm 15,57$  года) и 48 женщин (средний возраст –  $59,35 \pm 17,58$  года). 49 из 67 человек (средний возраст –  $55,29 \pm 16,39$  года) были добровольцами, сдавали кровь в условиях поликлиники. Другие

18 человек (средний возраст –  $64,04 \pm 17,71$  года) были пациентами стационарных отделений, специализированных по COVID-19. Выявлена тенденция к повышению возраста ( $p = 0,062$ ) у госпитализированных, в сравнении с амбулаторно обследованными лицами. Из всех 67 обследованных лиц к моменту взятия венозной крови переболевшими COVID-19 оказалось 44 человека, что составило 65,7 %. Переболевшими считали лиц, которым был поставлен клинический диагноз COVID-19.

Выявлено статистически значимое различие в распределении ранжированных данных количества спотов ПАГ 2 (пептиды белков N, M, ORF3a и ORF7a) по группам в зависимости от клинического диагноза COVID-19 обследованных больных ( $\chi^2 = 12,11$ ;  $p = 0,033$ ), т. е. в группе переболевших COVID-19 ( $n = 44$ ) медиана количества спотов положительного результата (25,50 (6,00; 40,00)) статистически значимо ( $p = 0,009$ ) превышает значения непереболевших лиц ( $n = 23$ ) (8,00 (1,00; 16,00)) (рис. 1).

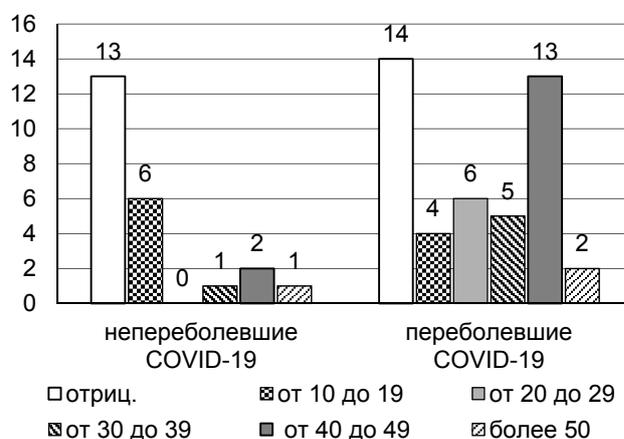


РИС. 1.

Распределение обследованных лиц по результатам теста в ПАГ 2

FIG. 1.

Distribution of the examined persons according to the results of Antigen Panel 2 test

Следует отметить, что было выполнено ранжирование количества спотов (с учётом вычета спотов в негативном контроле) в лунках на 5 групп: 0-я – отрицательный результат; 1-я – от 10 до 19 спотов; 2-я – от 20 до 29 спотов; 3-я – от 30 до 39 спотов; 4-я – от 40 до 49 спотов; 5-я – более 50 спотов в лунках.

Несмотря на то, что в обеих сравниваемых группах количество лиц с отрицательным результатом Т-клеточного ответа в ПАГ 2 почти одинаково, у переболевших COVID-19 отмечаются выраженные различия по положительным данным числа спотов. Так, максимальная доля переболевших с положительным Т-клеточным ответом в ПАГ 2 (43,3 %) относится к 4-й группе (от 40–49 спотов).

Необходимо отметить, что у 43,7 % лиц ( $n = 23$ ), которые в анамнезе отрицали факт болезни COVID-19, были выявлены положительный Т-клеточный ответ в ПАГ 2 (пептиды белков N, M, ORF3a и ORF7a). При этом у 60 %

лиц с положительным результатом количество спотов наименьшее – 10–19. Таким образом, можно говорить о том, что у лиц с клинически подтверждённым диагнозом COVID-19 статистически значимо чаще встречается положительный Т-клеточный ответ в панели антигенов 2 и статистически значимо большее количество спотов, чем у непереболевших COVID-19.

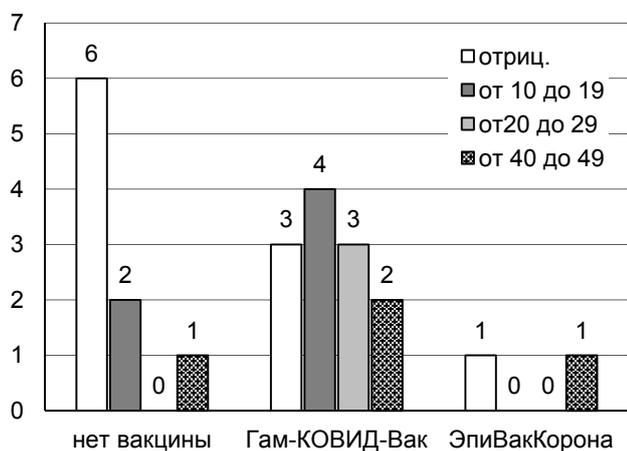
Анализ данных Т-клеточного ответа в ПАГ 1 (пептиды Spike-белка) показал, что у переболевших лиц имеется тенденция ( $p = 0,081$ ) к повышению количества спотов (22,50 (4,25; 39,50)) в сравнении с непереболевшими (14,00 (4,00; 23,00)).

Статистически значимое различие в ПАГ 1 выявлено при сравнении групп в зависимости от факта проведённой вакцинации против COVID-19 и независимо от вида вакцины (рис. 2а). У вакцинированных лиц ( $n = 37$ ) медиана спотов, положительных по ПАГ 1 (23,00 (14,00; 44,00)), статистически значимо ( $p = 0,014$ ) выше, чем у невакцинированных ( $n = 30$ ) (12,00 (3,00; 27,25)). Проведён ана-

лиз оценки Т-клеточного ответа на SARS-CoV-2 в зависимости от вида вакцины. Из 37 вакцинированных лиц вакцину «Гам-КОВИД-Вак» получили 28 (76,7%), «ЭпиВакКорона» – 5 (13,5%), «КовиВак» – 4 (10,8%). При этом процент дважды вакцинированных составил 67,6% ( $n = 25$ ), трижды вакцинированных – 8,1% ( $n = 3$ ).

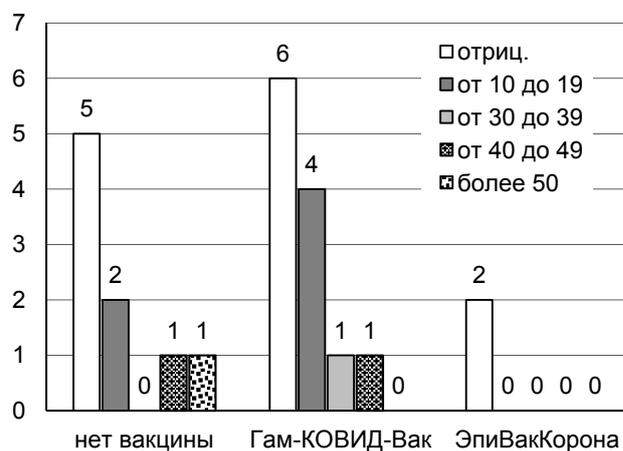
Среди 23 лиц, отрицающих факт болезни COVID-19 в анамнезе, т. е. отнесённых к группе непереболевших, существует тенденция ( $\chi^2 = 3,24$ ;  $p = 0,072$ ) зависимости от наличия вакцины (Гам-КОВИД-Вак, ЭпиВакКорона, КовиВак) и положительного результата в ПАГ 1 (рис. 2). У вакцинированных вырабатывается преимущественно Т-клеточный иммунитет к ПАГ 1, нежели к ПАГ 2.

В группе непереболевших COVID-19, вакцинированных «Гам-КОВИД-Вак», наблюдался чёткий Т-клеточный иммунный ответ в ПАГ 1 и ПАГ 2 (20–50 спотов) (рис. 3), тогда как у вакцинированных препаратом «ЭпиВакКорона» в ПАГ 2 отсутствовал Т-клеточный иммунный ответ, а в ПАГ 1 (более 40 спотов) иммунный ответ отмечен



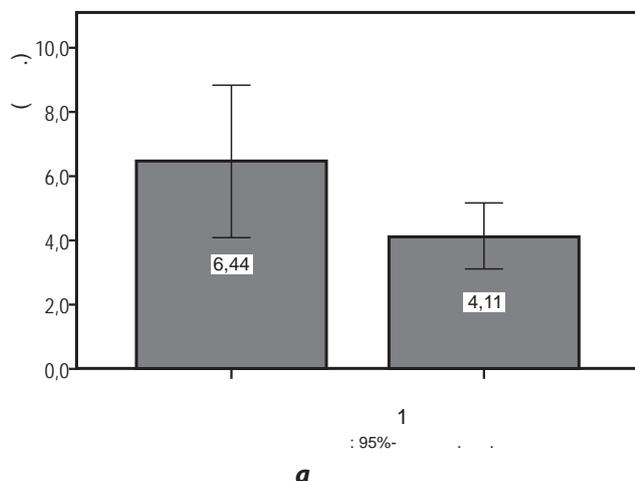
а

**РИС. 2.**  
Распределение по ранжированным данным спотов в ПАГ 1 (а) и ПАГ 2 (б) в зависимости от вида вакцины



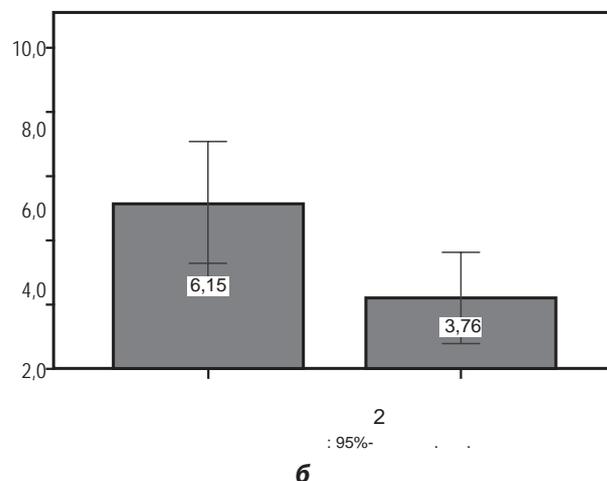
б

**FIG. 2.** Distribution according to the ranked data of spots in Antigen Panel 1 (а) and Antigen Panel 2 (б) depending on the vaccine type



а

**РИС. 3.**  
Средние значения сроков с момента последней вакцинации по результатам Т-клеточного ответа в ПАГ 1 (а) и ПАГ 2 (б)



б

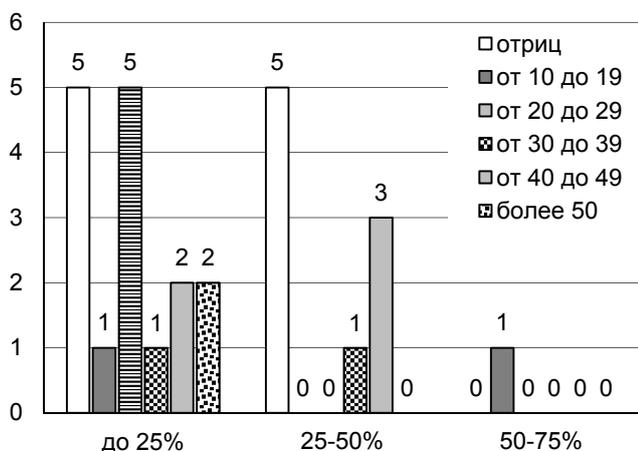
**FIG. 3.** Average values of time since last vaccination according to the results of T cell response in Antigen Panel 1 (а) and Antigen Panel 2 (б)

лишь у незначительного количества пациентов (10 %). Следует отметить, что все вакцинированные ( $n = 4$ ) препаратом «Ковивак» оказались в группе переболевших COVID-19. Представленные данные указывают на более эффективное формирование Т-клеточного ответа на SARS-CoV-2 при вакцинации «Гам-КОВИД-Вак».

Медиана срока с момента получения последней вакцинации для всех вакцинированных лиц ( $n = 37$ ) составила 5,00 (1,87; 6,87) месяцев (рис. 3). Сравнительный анализ по результатам формирования Т-клеточного ответа в ПАГ 1 и ПАГ 2 установил статистически значимые различия в зависимости от срока вакцинирования.

Медиана отрицательного результата в ПАГ 1 составила 6,7 (6,12; 7,43) месяцев, что статистически значимо больше ( $p = 0,039$ ), чем у положительного результата (4,00 (1,12; 6,00) месяца). Аналогично, медиана отрицательного результата в ПАГ 2 составила 6,5 (5,00; 7,50) месяцев, положительного – 4,00 (1,00; 6,00) месяца ( $p = 0,014$ ). Таким образом, косвенно можем утверждать, что срок более 6 месяцев, видимо, является критичным по отношению к снижению Т-клеточного ответа к SARS-CoV-2.

Анализ данных компьютерной томографии (КТ) у госпитализированных лиц ( $n = 26$ ) выявил следующее распределение: 25%-е поражение лёгких имели 16 пациентов; 25–50%-е поражение – 9 пациентов; 50–75%-е – 1 пациент (рис. 4).



**РИС. 4.** Распределение ранжированных спотов в ПАГ 1 и ПАГ 2 в зависимости от площади поражения лёгких (КТ-исследование)

**FIG. 4.** Distribution of ranked spots in Antigen Panel 1 and Antigen Panel 2 depending on the volume of tissue lung damage (according to CT scan)

Выявлена статистически значимая ( $\chi^2 = 19,23$ ;  $p = 0,037$ ) зависимость ранжированных данных в ПАГ 1 от результатов компьютерной томографии (площади поражения лёгких). При этом максимальное значение медианы спотов (21,50 (4,50; 43,25)) отмечается в группе с 25%-м поражением лёгких; у лиц с поражением лёгких от 25 % до 50 % медиана спотов составила 3,00 (1,00; 43,00).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При оценке Т-клеточного ответа к SARS-CoV-2 методом ELISPOT выявлены следующие особенности.

В группе переболевших медиана количества спотов в ПАГ 2 (пептиды белков N, M, Orf7a, Orf3a) статистически значимо выше ( $p = 0,009$ ), чем у лиц, не переболевших COVID-19. Количество спотов в ПАГ 1 (пептиды S-белка) в группе переболевших имеет тенденцию к повышению ( $p = 0,081$ ).

У вакцинированных лиц Т-клеточный иммунитет вырабатывается преимущественно в ПАГ 1 (пептиды S-белка), нежели в ПАГ 2 (пептиды N-, M-, Orf7a-, Orf3a-белков). Медиана спотов в ПАГ 1 в группе вакцинированных статистически значимо выше ( $p = 0,014$ ), чем у невакцинированных.

Более эффективное формирование Т-клеточного ответа на SARS-CoV-2 наблюдается при вакцинации «Гам-КОВИД-Вак» (Спутник V).

Срок более 6 месяцев, видимо, является критичным по отношению к снижению Т-клеточного ответа к SARS-CoV-2 после вакцинации.

Максимальное значение медианы количества спотов отмечается у лиц с меньшим поражением лёгких (до 25 %);

Таким образом, полученные нами результаты указывают на высокую степень обоснованности и достоверности метода ELISPOT. Простота, высокая чувствительность и воспроизводимость метода дают основание для его широкого применения.

## Конфликт интересов

Авторы данной статьи заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

- Bonilla FA, Oettgen HC. Adaptive Immunity. *J Allergy Clin Immunol.* 2010; 125(Suppl 2): S33–S40. doi: 10.1016/j.jaci.2009.09.017
- Kanellopoulos JM, Ojcius DM. Development of humoral immunity. *Biomed J.* 2019; 42(4): 207-208. doi: 10.1016/j.bj.2019.08.003
- Moss P. The T cell immune response against SARS-CoV-2. *Nat Immunol.* 2022; 23: 186-193. doi: 10.1038/s41590-021-01122-w
- Grifoni A, Sidney J, Vita R, Peters B, Crotty S, Weiskopf D, et al. SARS-CoV-2 human T cell epitopes: Adaptive immune response against COVID-19. *Cell Host Microbe.* 2021; 29(7): 1076-1092. doi: 10.1016/j.chom.2021.05.010
- Kudlay D, Kofidi I, Khaitov M. Peculiarities of the T-cell immune response in COVID-19. *Vaccines (Basel).* 2022; 10(2): 242. doi: 10.3390/vaccines10020242
- Козлов В.А., Тихонова Е.П., Савченко А.А., Кудрявцев И.В., Андропова Н.В., Анисимова Е.Н., и др. *Клиническая иммунология. Практическое пособие для инфекционистов.* Красноярск: Поликор; 2021.
- Wyllie D, Jones HE, Mulchandani R, Trickey A, Taylor-Phillips S, Brooks T, et al. SARS-CoV-2 responsive T cell numbers and anti-Spike IgG levels are both associated with protection from COVID-19: A prospective cohort study in keyworkers. *medRxiv.* 2020; 20222778. doi: 10.1101/2020.11.02.20222778

8. Sekine T, Perez-Potti A, Rivera-Ballesteros O, Strålin K, Gorin J-B, Olsson A, et al. Robust T cell immunity in convalescent individuals with asymptomatic or mild COVID-19. *Cell*. 2020; 183: 158-168.e14. doi: 10.1016/j.cell.2020.08.017

9. Shomuradova AS, Vagida MS, Sheetikov SA, Zornikova KV, Kiryukhin D, Titov A, et al. SARS-CoV-2 epitopes are recognized by a public and diverse repertoire of human T-cell receptors. *Immunity*. 2020; 53(6): 1245-1257.e5. doi: 10.1016/j.immuni.2020.11.004

10. Потеряев Д.А., Аббасова С.Г., Игнатъева П.Е., Стрижакова О.М., Колесник С.В., Хамитов Р.А. Оценка Т-клеточного иммунитета к SARS-CoV-2 у переболевших и вакцинированных против COVID-19 лиц с помощью ELISPOT набора ТиграТест® SARS-CoV-2. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2021; 21(3): 178-192. doi: 10.30895/2221-996X-2021-21-3-178-192

11. Kudlay D, Svistunov A, Satyshev O. COVID-19 vaccines: An updated overview of different platforms. *Bioengineering*. 2022; 9: 714. doi: 10.3390/bioengineering9110714

12. Инструкция по применению медицинского изделия для диагностики *in vitro* «ТиграТест® SARS-CoV-2». Тест на высвобождение интерферона гамма *in vitro* для определения в крови Т-лимфоцитов, специфически отвечающих на антигены вируса SARS-CoV-2 по ТУ 21.20.23-001-89761464-2020.

response against COVID-19. *Cell Host Microbe*. 2021; 29(7): 1076-1092. doi: 10.1016/j.chom.2021.05.010

5. Kudlay D, Kofiadi I, Khaitov M. Peculiarities of the T-cell immune response in COVID-19. *Vaccines (Basel)*. 2022; 10(2): 242. doi: 10.3390/vaccines10020242

6. Kozlov VA, Tikhonova EP, Savchenko AA, Kudryavtsev IV, Andronova NV, Anisimova EN, et al. *Clinical immunology. A practical guide for infectious disease specialists*. Krasnoyarsk: Polikor; 2021. (In Russ.).

7. Wyllie D, Jones HE, Mulchandani R, Trickey A, Taylor-Phillips S, Brooks T, et al. SARS-CoV-2 responsive T cell numbers and anti-Spike IgG levels are both associated with protection from COVID-19: A prospective cohort study in keyworkers. *medRxiv*. 2020; 20222778. doi: 10.1101/2020.11.02.20222778

8. Sekine T, Perez-Potti A, Rivera-Ballesteros O, Strålin K, Gorin J-B, Olsson A, et al. Robust T cell immunity in convalescent individuals with asymptomatic or mild COVID-19. *Cell*. 2020; 183: 158-168.e14. doi: 10.1016/j.cell.2020.08.017

9. Shomuradova AS, Vagida MS, Sheetikov SA, Zornikova KV, Kiryukhin D, Titov A, et al. SARS-CoV-2 epitopes are recognized by a public and diverse repertoire of human T-cell receptors. *Immunity*. 2020; 53(6): 1245-1257.e5. doi: 10.1016/j.immuni.2020.11.004

10. Poteryaev DA, Abbasova SG, Ignatyeva PE, Strizhakova OM, Kolesnik SV, Khamitov RA. Assessment of T-cell immunity to SARS-CoV-2 in COVID-19 convalescents and vaccinated subjects, using TigraTest® SARS-CoV-2 ELISPOT kit. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2021; 21(3): 178-192. (In Russ.). doi: 10.30895/2221-996X-2021-21-3-178-192

11. Kudlay D, Svistunov A, Satyshev O. COVID-19 vaccines: An updated overview of different platforms. *Bioengineering*. 2022; 9: 714. doi: 10.3390/bioengineering9110714

12. Instructions for using medical product for *in vitro* diagnostics "TigraTest® SARS-CoV-2". Test for the release of interferon gamma *in vitro* to determine T-lymphocytes in the blood which specifically respond to antigens of the SARS-CoV-2 virus according to TU 21.20.23-001-89761464-2020. (In Russ.).

## REFERENCES

1. Bonilla FA, Oettgen HC. Adaptive Immunity. *J Allergy Clin Immunol*. 2010; 125(Suppl 2): S33-S40. doi: 10.1016/j.jaci.2009.09.017

2. Kanellopoulos JM, Ojcius DM. Development of humoral immunity. *Biomed J*. 2019; 42(4): 207-208. doi: 10.1016/j.bj.2019.08.003

3. Moss P. The T cell immune response against SARS-CoV-2. *Nat Immunol*. 2022; 23: 186-193. doi: 10.1038/s41590-021-01122-w

4. Grifoni A, Sidney J, Vita R, Peters B, Crotty S, Weiskopf D, et al. SARS-CoV-2 human T cell epitopes: Adaptive immune re-

## Сведения об авторах

**Герасимова Вилена Васильевна** – кандидат медицинских наук, доцент кафедры «Общественное здоровье и здравоохранение, общая гигиена и биоэтика», Медицинский институт, ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова», e-mail: virlab@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0592-3272>

**Колесник Светлана Владимировна** – младший научный сотрудник отделения «Лаборатория клинической иммунологии», ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова», e-mail: svetlab.kolesnik@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2398-4615>

**Кудлай Дмитрий Анатольевич** – доктор медицинских наук, член-корреспондент РАН, профессор кафедры фармакологии Института фармации, ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет); ведущий научный сотрудник лаборатории персонализированной медицины и молекулярной иммунологии № 71, ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, e-mail: d624254@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-1878-4467>

**Гольдерова Айталина Семеновна** – доктор медицинских наук, профессор кафедры «Общественное здоровье и здравоохранение, общая гигиена и биоэтика», главный научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории «Клеточные технологии и регенеративная медицина», Медицинский институт, ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова», e-mail: hoto68@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6739-9453>

## Information about the authors

**Vilena V. Gerasimova** – Cand. Sc. (Med.), Associate Professor at the Department of Public Health and Health Care, General Hygiene and Bioethics, North-Eastern Federal University named after M.K. Ammosov, e-mail: virlab@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0592-3272>

**Svetlana V. Kolesnik** – Junior Research Officer at the Laboratory of Clinical Immunology, National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov, e-mail: svetlab.kolesnik@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2398-4615>

**Dmitry A. Kudlay** – Dr. Sc. (Med.), Corresponding Member of RAS, Professor at the Department of Pharmacology, Institute of Pharmacy, The First Sechenov Moscow State Medical University (Sechenov University); Leading Research Officer at the Laboratory of Personalized Medicine and Molecular Immunology, National Research Center – Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency of Russia, e-mail: d624254@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-1878-4467>

**Aytalina S. Golderova** – Dr. Sc. (Med.), Professor at the Department of Public Health and Health Care, General Hygiene and Bioethics, Chief Research Officer at the Research Laboratory "Cell Technologies and Regenerative Medicine", Medical Institute, North-Eastern Federal University named after M.K. Ammosov, e-mail: hoto68@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6739-9453>