

ПСЕВДОНЕЙТРАЛИЗУЮЩИЙ ТЕСТ ДЛЯ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ВАКЦИН ПРОТИВ SARS-CoV-2

Черепович Б.С.¹, Кудряшова А.М.¹, Карташова Н.П.¹, Грачева А.В.¹, Мануйлов В.А.², Ленева И.А.¹, Борисова О.В.¹, Свитич О.А.¹

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

² ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Цель данного исследования – оценка эффективности конкурентного иммуноферментного метода, определяющего антитела, специфически связывающие рецептор-связывающий домен субъединицы S1 шиповидного белка коронавируса SARS-CoV-2 и блокирующие образование инициаторного инфицирующего комплекса между RBD и ангиотензин-превращающим ферментом 2 (псевдонейтрализующий тест, ПНТ) на стадии доклинических исследований вакцины против SARS-CoV-2.

Исследовали 37 сывороток крови животных (8 коров, 10 собак, 19 трансгенных мышей линии B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2Prlmn/HEMI Hemizygous for Tg(K18-ACE2)2Prlmn, самки и самцы (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, США)), иммунизированных кандидатными вакцинными препаратами против COVID-19, содержащими белок Spike SARS-CoV-2. В данном исследовании использовали 3 метода определения антител к вирусу SARS-CoV-2, а именно: 1) псевдонейтрализующий тест (ПНТ) для выявления антител, блокирующих взаимодействие RBD и ACE-2; 2) реакцию нейтрализации (РН) для выявления вируснейтрализующих антител и 3) твердофазный иммуноферментный анализ для определения антител класса G к RBD SARS-CoV-2. Результаты выражались, соответственно, в виде коэффициента подавления (КП), титра вируснейтрализующих антител (ВНА) и индекса позитивности (ИП).

Полученные данные показывают выраженную, статистически значимую корреляцию между результатами, полученными иммуноферментными методами с титрами ВНА, определенными в вирусологической РН в исследуемых группах животных. Так, коэффициент Спирмена, определенный для корреляции между титрами ВНА и КП, составил, соответственно, 0,9151; 0,8085 и 0,9207 для собак, трансгенных мышей и коров. Коэффициент Спирмена для титров ВНА и ИП составил 0,8854 и 0,8955 для собак и трансгенных мышей. Таким образом, для целей оценки иммуногенности вакцинных препаратов в настоящем исследовании, адекватными и безопасными аналогами РН являются оба метода – ИФА для определения IgG к RBD и ПНТ для определения антител, блокирующих образование комплекса между RBD и ACE-2. Однако преимуществом ПНТ является его универсальность, исклю-

Адрес для переписки:

Черепович Богдан Сергеевич
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»
115088, Россия, Москва, ул. 1-я Дубровская, 15.
Тел.: 8 (495) 674-54-97.
E-mail: bogdancherepovich@mail.ru

Address for correspondence:

Bogdan S. Cherepovich
I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera
15 1st Dubrovskaya St
Moscow
115088 Russian Federation
Phone: +7 (495) 674-54-97.
E-mail: bogdancherepovich@mail.ru

Образец цитирования:

Б.С. Черепович, А.М. Кудряшова, Н.П. Карташова, А.В. Грачева, В.А. Мануйлов, И.А. Ленева, О.В. Борисова, О.А. Свитич «Псевдонейтрализующий тест для доклинических исследований вакцин против SARS-CoV-2» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 3. С. 569-576. doi: 10.15789/1563-0625-PTF-2905

© Черепович Б.С. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

B.S. Cherepovich, A.M. Kudryashova, N.P. Kartashova, A.V. Gracheva, V.A. Manuilov, I.A. Leneva, O.V. Borisova, O.A. Svitich "Pseudoneutralizing test for preclinical studies of vaccines against SARS-CoV-2", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 3, pp. 569-576. doi: 10.15789/1563-0625-PTF-2905

© Cherepovich B.S. et al., 2024

The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-PTF-2905

чающая необходимость использования различных конъюгатов для выявления антител в сыворотках крови разных видов животных.

Данные, полученные нами для образцов трех видов животных (трансгенных мышей, собак и коров), хорошо соотносятся с аналогичными, полученными нами и другими исследователями для сывороток крови людей и демонстрирующими высокую корреляцию между результатами ПНТ-подобных конкурентных тестов для определения антител, блокирующих образование комплекса RBD и ACE-2, с результатами определения ВНА в вирусологической РН. Следовательно, предлагаемый в настоящей работе ПНТ может найти применение при проведении доклинических и клинических испытаний кандидатных вакцинных и лекарственных препаратов.

Ключевые слова: COVID-19, SARS-CoV-2, твердофазный ИФА, вируснейтрализующие антитела, псевдонейтрализующий тест, сыворотки крови животных

PSEUDONEUTRALIZING TEST FOR PRECLINICAL STUDIES OF VACCINES AGAINST SARS-CoV-2

Cherepovich B.S.^a, Kudryashova A.M.^a, Kartashova N.P.^a,
Gracheva A.V.^a, Manuilov V.A.^b, Leneva I.A.^a, Borisova O.V.^a,
Svitich O.A.^a

^a I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

^b N. Gamaleya Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Abstract. The purpose of this study was to evaluate efficiency of a competitive enzyme immunoassay which specifically detects antibodies that recognize the receptor-binding domain at the S1 subunit of SARS-CoV-2 coronavirus spike protein and block the formation of initiator infection complex between RBD and angiotensin-converting enzyme 2 (pseudo-neutralizing test, PNT) being applied at the stage of preclinical studies of anti-SARS-CoV-2 vaccine.

We studied 37 animal blood sera (8 cows, 10 dogs) as well as 19 male and female transgenic mice of the B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2PrImn/HEMI line hemizygous for Tg(K18-ACE2)2PrImn (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) immunized with candidate COVID-19 vaccine preparations containing SARS-CoV-2 Spike protein. In this study, 3 techniques were used for detection of antibodies to SARS-CoV-2 virus, as follows: 1) a pseudo-neutralizing test (PNT) to detect antibodies that block interaction between RBD and ACE-2; 2) neutralization test (RN) to detect virus-neutralizing antibodies, and 3) enzyme-linked immunosorbent assay to detect class G antibodies to RBD SARS-CoV-2. The results were expressed, respectively, as the suppression quotients (SC), titers of virus-neutralizing antibodies (VNA), and the positivity index (IP).

The data obtained show a pronounced, statistically significant correlation between the results obtained by immunoassay methods with VNA titers determined in the studied animals by the virological neutralization test. E.g., the Spearman correlation quotients for VNA and SC titers, were, respectively, 0.9151; 0.8085, and 0.9207 for dogs, transgenic mice and cows. The Spearman quotient for VNA and PI titers was 0.8854 and 0.8955 for dogs and transgenic mice. Thus, in order to evaluate immunogenicity of vaccine preparations in our study, both methods are adequate and safe analogues to RN-ELISA for determination of IgG to RBD and PNT aiming for detection of antibodies blocking the formation of RBD/ACE-2 complex. However, the advantage of PNT is its versatility, eliminating the need to use different conjugates to detect antibodies in blood sera of different animal species.

The data obtained for samples of three animal species (transgenic mice, dogs and cows) well agree with similar data obtained by us and other researchers for human blood sera, thus demonstrating high correlation between the results of PNT-like competitive tests to determine antibodies that block the formation of the RBD/ACE-2 complex, with VNA results in virologic neutralization test (RN). Therefore, the proposed PNT technique may be used in preclinical and clinical trials of candidate vaccines and drugs.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, solid-phase ELISA, virus-neutralizing antibodies, pseudo-neutralizing test, blood serum, animals

Введение

Титр вируснейтрализующих антител (ВНА) является основным серологическим параметром, используемым для оценки эффективности иммунизации против SARS-CoV-2 [6, 9]. Титр ВНА определяется при помощи реакции нейтрализации (РН), результатом которой является последнее разведение анализируемой сыворотки, в котором антитела предотвращают репликацию живого вируса в перmissive для него компетентной культуре клеток [2]. Метод является трудозатратным и требует соблюдения условий биобезопасности. В связи с этим предпринимаются попытки создания эффективного и безопасного метода определения ВНА без использования живого вируса.

В ранее опубликованной нами работе [7] сыворотки крови пациентов, иммунизированных вакциной «Спутник V» [6], были протестированы параллельно в РН на культуре клеток Vero [4] и в псевдонейтрализующем тесте (ПНТ) [7]. ПНТ – конкурентный иммуноферментный метод, позволяющий определять антитела, специфически связывающие RBD-домен (рецептор-связывающий домен субъединицы S1 шиповидного белка) коронавируса SARS-CoV-2 и блокирующие образование инициаторного инфицирующего комплекса между RBD и белком клеток человека ACE2 (ангиотензин-превращающий фермент 2). Коэффициент корреляции между титрами, полученный для ПНТ и РН, составил 0,86 (95% ДИ: 0,79-0,90, $p < 0,0001$) [7], что указывает на то, что ПНТ является привлекательной альтернативой классической вирусологической РН. Метод ПНТ не различает изоформы иммуноглобулинов (IgG, IgM и пр.) и определяет наличие в образце любых антител или препаратов, которые обладают нейтрализующим действием в отношении образования комплекса RBD-ACE2. Важным моментом является то, что твердофазный иммуноферментный анализ обладает ценовой доступностью и высокой пропускной способностью. Кроме того, поскольку ПНТ не является видоспецифичным (определяет ВНА любых иммунных к SARS-CoV-2 животных), он выглядит особенно перспективным для применения в рамках доклинических исследований (ДКИ) вакцин против SARS-CoV-2 на животных моделях.

В настоящем исследовании мы приводим сравнительный анализ данных, полученных в классической РН и в ПНТ для образцов сывороток крови животных (трансгенных мышей, коров и собак) на стадии ДКИ экспериментальных вакцинных препаратов против COVID-19, содержащих белок Spike SARS-CoV-2.

Материалы и методы

Сыворотки животных

Исследовали 37 сывороток крови животных (8 коров, 10 собак, 19 трансгенных мышей линии B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2Prlnn/HEMI Hemizygous for Tg(K18-ACE2)2Prlnn, самки и самцы (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, США)), иммунизированных кандидатными вакцинными препаратами против COVID-19, содержащими белок Spike SARS-CoV-2. Образцы предоставлены разработчиком указанных препаратов ООО «Фирн М» (Россия). Сыворотки аликвотировали по 100 мкл и хранили при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Все эксперименты проведены в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 № 755) и «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» от 18.03.1986.

Реакция нейтрализации

Использовали лабораторный штамм SARS-CoV-2 Dubrovka (GenBank: MW514307.1), выделенный из назофарингеального мазка больного COVID-19 на культуре клеток Vero CCL81 (ATCC) из коллекции НИИВС им. И.И. Мечникова. Для проведения РН клетки Vero CCL81 предварительно культивировали в 96-луночных планшетах при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ в питательной среде DMEM на основе буфера Эрла (НПП «ПанЭко», Россия) с добавлением 5% эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, США), 300 мкг/мл L-глутамин (НПП «ПанЭко», Россия), 40 мкг/мл гентамицина (НПП «ПанЭко», Россия) в атмосфере с 5% CO_2 в течение 72 часов до образования монослоя.

Перед постановкой РН образцы сывороток размораживали, прогревали при $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 30 минут, готовили последовательные двукратные разведения средой для культивирования без эмбриональной сыворотки. Разведения сывороток смешивали с равным объемом вирусного материала SARS-CoV-2 в титре $2 \cdot 10^3$ ТЦД₅₀/мл в той же среде. Из планшета с 3-дневным монослоем клеток Vero удаляли среду, в лунки вносили смесь вируса и сыворотки в 4 повторах по 100 мкл (доза вируса – 100 ТЦД₅₀ на лунку) в разведении 1/20–1/2056 и инкубировали в течение 5 сут. при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ в атмосфере с 5% CO_2 . В качестве контролей использовали: клеточный контроль (незараженная клеточная культура), вирусный контроль (клетки, зараженные рабочим разведением вируса), контроль сыворотки (сыворотка в разведении 1:20), контроль дозы (пятикратные разведения вируса). Учет результата РН проводили визуально путем микроскопического исследования клеток. При визуальном учете нейтрализу-

юшим титром сыворотки (титром ВНА) считали обратное значение ее последнего разведения, в котором признаков ЦПД не обнаруживалось в 2 или более лунках.

Определения антител класса G к RBD SARS-CoV-2

Рекомбинантный антиген RBD SARS-CoV-2 (ООО «Хайтест», Россия, кат. № 8COV1) в концентрации 2 мкг/мл в 100 мМ карбонатно-бикарбонатном буфере (рН 9,6) вносили по 100 мкл в лунки 96-луночного планшета (Corning, США, кат. №2592) и выдерживали в течение 18 часов при температуре 4–8 °С. Затем удаляли раствор из лунок планшет, планшеты промывали 1 раз дистиллированной водой и вносили по 150 мкл блокирующего раствора, представляющего собой 0,02 М фосфатный буферный раствор, содержащий 5% сахарозы, 0,09% казеината натрия, 0,05% Tween 20. После инкубирования планшета в течение 1,5 часов при комнатной температуре удаляли блокирующий раствор и высушивали лунки планшета (иммуносорбента).

При проведении анализа в лунки иммуносорбента вносили образцы сывороток в разведении 1/100 в 0,02 М фосфатном буферном растворе (рН 7,2), содержащем 0,2% бычьего сывороточного альбумина и 0,05% Tween 20. После инкубирования в течение 30 минут при 37 °С и отмывки вносили для определения антител в сыворотках крови мышей 100 мкл конъюгата антител к IgG мыши с пероксидазой хрена (ООО «ИМТЕК», Россия); к сыворотке собак – 100 мкл конъюгата белка А с пероксидазой (Sigma-Aldrich, Германия) (в сыворотках коров IgG не определяли, см. ниже). Повторяли этап инкубирования и вносили по 100 мкл 33 мМ цитратного буферного раствора рН 4,0, содержащего 0,01% перекиси водорода и 0,5 мМ 3,3',5,5'-тетраметилбензидина. Через 15 мин реакцию останавливали добавлением 100 мкл 2N серной кислоты, измеряли оптическую плотность (ОП) в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения 680 нм.

Результаты выражали в виде индекса позитивности (ИП):

$$\text{ИП} = \text{ОП}_{\text{образца}} / \text{ОП}_{\text{порог.}}$$

где $\text{ОП}_{\text{порог.}} = \text{ОП}_{\text{ср. К-}} + 3\sigma$, $\text{ОП}_{\text{ср. К-}}$ – среднее арифметическое значение регистрируемого сигнала для выборки образцов неиммунизированных животных, σ – стандартное отклонение. Образец считали содержащим антитела к RBD Spike SARS-CoV-2 при $\text{ИП}_{\text{Обр.}} \geq 1$.

Выявление антител, блокирующих взаимодействие RBD и ACE-2 (псевдонейтрализующий тест)

Рекомбинантный антиген ACE-2 (Vazyme Technologies, Китай, кат. № CG206) в концентрации 2 мкг/мл в 100 мМ карбонатно-бикарбонат-

ном буфере рН 9,6 вносили по 100 мкл в лунки планшет и выдерживали в течение 18 часов при температуре 4–8 °С. Затем удаляли раствор из лунок планшет, планшеты промывали 1 раз дистиллированной водой, вносили по 150 мкл блокирующего раствора, представляющего собой 0,02 М фосфатный буферный раствор, содержащий 5% сахарозы, 0,09% казеината натрия, 0,05% Tween 20. После инкубирования планшета в течение 1,5 часов при комнатной температуре, удаляли блокирующий раствор и высушивали лунки иммуносорбента.

При проведении анализа в лунки другого (чистого) планшета вносили по 50 мкл образцов сывороток в разведении 1/10 в 0,02 М фосфатном буферном растворе рН 7,2, содержащем 0,2% бычьего сывороточного альбумина, 0,05% Tween 20, а также 50 мкл рекомбинантного белка Spike, конъюгированного с пероксидазой хрена (Vazyme Technologies, Китай, кат. № CG204H-00H-C1) в том же буферном растворе в разведении 1/150. После инкубирования в течение 30 минут при 37 °С смесь переносили в лунки иммуносорбента и инкубировали еще 30 минут при 37 °С. Внесение субстратной буферной смеси, остановку реакции и измерение ОП проводили аналогично описанному для определения антител класса G к RBD SARS-CoV-2.

Для каждого образца рассчитывали коэффициент подавления (КП, %) по формуле:

$$\text{КП} = \frac{\text{ОП}_{\text{ср. (К-)}} - \text{ОП}_{\text{Обр.}}}{\text{ОП}_{\text{ср. (К-)}}} \times 100\%,$$

где $\text{ОП}_{\text{ср. (К-)}}$ – среднее арифметическое значение ОП для группы неиммунизированных животных; $\text{ОП}_{\text{Обр.}}$ – значение ОП для тестируемого образца. Образец считали содержащим антитела, блокирующие взаимодействие RBD и ACE-2, в случае $\text{КП} \geq \text{КП}_{\text{отр. ср.}} - 3\sigma$, где $\text{КП}_{\text{отр. ср.}}$ – среднее арифметическое значение КП для группы неиммунизированных животных, σ – стандартное отклонение.

Статистическая обработка данных

Для оценки корреляции между количественными характеристиками, полученными разными методами, использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Доверительный интервал оценивали при $p < 0,05$. Полученные данные анализировали с помощью программного обеспечения Microsoft Excel, GraphPad Prism.

Требования к безопасности работ

Все работы с вирусом SARS-CoV-2 проводили в условиях, отвечающих требованиям безопасности работ с патогенными биологическими объектами II группы патогенности. Сотрудники, работающие с вирусом, прошли инструктаж по технике безопасности и имеют действующее

удостоверение о повышении квалификации по программе «Бактериология. Вирусология. Биологическая безопасность», выданное ФКУН РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора.

Результаты

Образцы сывороток крови животных протестировали параллельно в вирусологической РН и иммуноферментном ПНТ. Для собак и коров анализируемые парные образцы получены от животных до и после иммунизации (табл. 1). В случае трансгенных мышей в эксперименте участвовали две группы животных – контрольная группа и группа вакцинированных животных (табл. 2). Для образцов сывороток мышей и собак также определяли антитела класса G к RBD SARS-CoV-2

(табл. 1, 2). Результаты представлены в таблицах 1 и 2 и на рисунках 1 и 2. Результаты статистической обработки результатов, представленных на рисунках 1 и 2 (корреляции между измеряемыми параметрами) суммированы в таблице 3.

Обсуждение

Полученные данные (рис. 1, 2; табл. 3) показывают выраженную, статистически значимую корреляцию между КП и ИП, полученных иммуноферментными методами, с титрами ВНА, определенными в вирусологической РН в исследуемых группах. Таким образом, для целей оценки иммуногенности вакцинных препаратов в настоящем исследовании, адекватными (и безопасными) аналогами РН являются оба метода –

ТАБЛИЦА 1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИТЕЛ МЕТОДАМИ ИФА, ПНТ И РН В СЫВОРОТКЕ КРОВИ СОБАК И КОРОВ

TABLE 1. DETERMINATION OF ANTIBODIES BY ELISA, PNT AND RN IN THE BLOOD SERUM OF DOGS AND COWS

Собаки Dogs						
№ No.	До имм. Before imm.	После имм. After imm.	До имм. Before imm.	После имм. After imm.	До имм. Before imm.	После имм. After imm.
	IgG к RBD, ИП IgG to RBD, PI	IgG к RBD, ИП IgG to RBD, PI	КП, % SC, %	КП, % SC, %	ВНА, титр VNA, titer	ВНА, титр VNA, titer
1	1,1	27,1	0,0	98,9	< 10	640,0
2	1,9	3,3	8,6	76,4	< 10	20,0
3	0,3	30,8	6,9	97,6	< 10	1280,0
4	1,1	5,2	4,0	78,4	< 10	20,0
5	0,7	12,5	0,0	86,7	< 10	40,0
6	0,6	10,0	9,5	88,8	< 10	40,0
7	0,3	7,2	0,0	84,9	< 10	40,0
8	0,5	24,2	3,1	84,5	< 10	20,0
9	0,4	13,3	0,0	91,8	< 10	20,0
10	0,3	7,2	4,1	68,0	< 10	10,0
Коровы Cows						
1	–	–	2,3	72,8	< 10	15,0
2	–	–	3,1	89,7	< 10	60,0
3	–	–	3,8	94,1	< 10	80,0
4	–	–	0,9	66	< 10	15,0
5	–	–	0,0	43,8	< 10	0,0
6	–	–	2,6	73,6	< 10	60,0
7	–	–	2,1	70,9	< 10	30,0
8	–	–	0,0	30,4	< 10	20,0

Примечание. ИП – индекс позитивности; КП – коэффициент подавления; ВНА – вируснейтрализующие антитела, см. раздел «Материалы и методы» для определения; для сывороток коров определение IgG к RBD не проводили.

Note. PI, positivity index; SC, suppression coefficient; VNA, virus neutralizing antibody, see the section "Materials and methods" for determination; for cow serums, IgG to RBD was not determined.

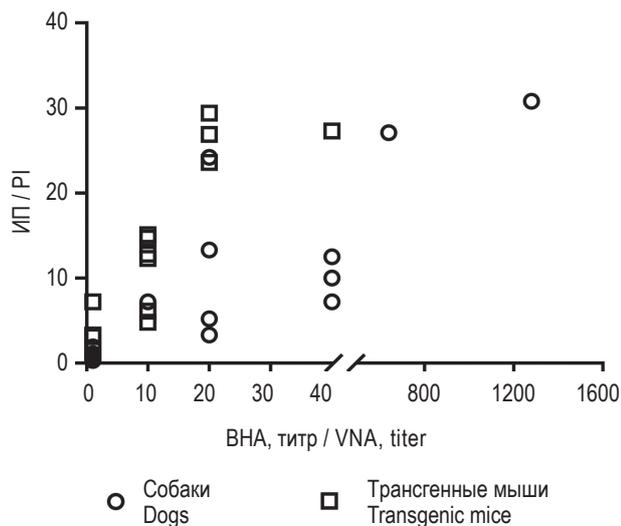


Рисунок 1. График корреляция между концентрацией IgG к RBD (выраженном в ИП, ось X) и титром ВНА, полученным в РН (ось Y) в исследуемых сыворотках собак и трансгенных мышей линии B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2PrImn/HEMI Hemizygous for Tg(K18-ACE2)2PrImn
Примечание. Коэффициент корреляции между измеряемыми параметрами представлен в таблице 3.

Figure 1. Plot of the correlation between the concentration of IgG to RBD (expressed in PI, x-axis) and the VNA titer obtained in RN (y-axis) in the studied sera of dogs and transgenic mice B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2PrImn/HEMI Hemizygous for Tg(K18-ACE2)2PrImn

Note. The correlation coefficient between the measured parameters is presented in Table 3.

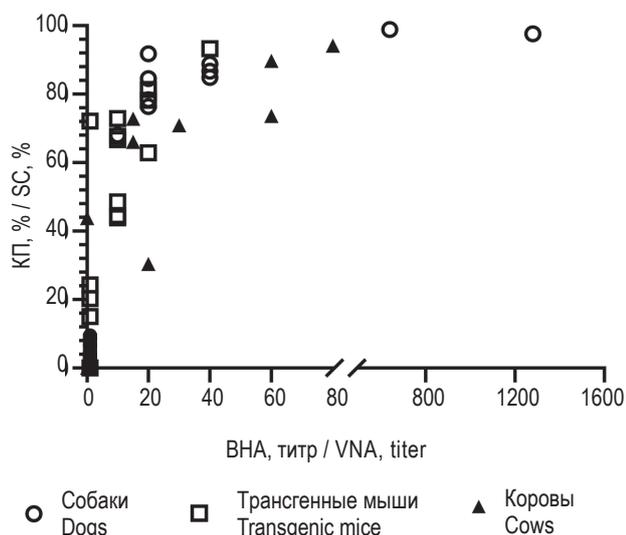


Рисунок 2. График корреляции между результатами ПНТ (выражены в КП,%, ось X) и титром ВНА, полученным в РН (ось Y) исследуемых сывороток собак, мышей и коров

Figure 2. Plot of the correlation between SC (X-axis) and VNA titer obtained in the RN (Y-axis) of the dog, mouse and cow sera tested

ТАБЛИЦА 2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИТЕЛ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ТРАНСГЕННЫХ МЫШЕЙ ЛИНИИ B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2PrImn/HEMI HEMIZYGOUS FOR Tg(K18-ACE2)2PrImn МЕТОДАМИ ИФА, ПНТ И РН

TABLE 2. DETERMINATION OF ANTIBODIES IN THE BLOOD SERUM OF TRANSGENIC MICE B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2PrImn/HEMI HEMIZYGOUS FOR Tg(K18-ACE2)2PrImn BY ELISA, PNT, AND RN

Группы Groups	№ живот-ного Animal No.	IgG к RBD, ИП IgG to RBD, IP	ВНА, титр VNA, titer	КП, % SC, %
Контроль Control	1-4	0,52-0,75	< 10	2,7-8,1
Опыт Experiment	5	12,3	10	43,9
	6	14,7	10	66,7
	7	6,1	10	67,7
	8	23,6	20	81,4
	9	27,3	40	93,3
	10	3,1	< 10	72,1
	11	15,1	10	72,9
	12	29,4	20	62,9
	13	12,8	10	48,5
	14	7,2	< 10	24,3
	15	3,3	< 10	20,3
	16	0,8	< 10	15
	17	26,9	20	78,2
	18	1,6	< 10	0
	19	4,8	10	44,5

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

ИФА для определения IgG к RBD и ПНТ для определения антител, блокирующих образование комплекса между RBD и ACE-2. Однако преимуществом ПНТ является его универсальность, исключающая необходимость использования различных конъюгатов для выявления антител в сыворотках крови разных видов животных.

Данные, полученные нами для образцов трех видов животных (трансгенных мышей, собак и коров), хорошо соотносятся с аналогичными, полученными нами и другими исследователями для сывороток крови людей и демонстрирующими высокую корреляцию между результатами ПНТ-подобных конкурентных тестов для определения антител, блокирующих образование комплекса RBD и ACE-2, с результатами определения ВНА в вирусологической РН [1, 5, 7, 8].

ТАБЛИЦА 3. КОЭФФИЦИЕНТЫ КОРРЕЛЯЦИИ МЕЖДУ ИЗУЧАЕМЫМИ ПАРАМЕТРАМИ, РАССЧИТАННЫЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КРИТЕРИЯ СПИРМЕНА

TABLE 3. CORRELATION COEFFICIENTS BETWEEN THE STUDIED PARAMETERS CALCULATED USING SPEARMAN'S TEST

	Титр ВНА v. КП, собаки Titer VNA v. SC, dogs	Титр ВНА, v. КП, мыши Titer VNA v. SC, mice	Титр ВНА v. КП, коровы Titer VNA v. SC, cows	Титр ВНА v. ИП, собаки Titer VNA v. PI, dogs	Титр ВНА v. ИП, мыши Titer VNA v. PI, mice
Коэф. корреляции Spearman r	0,9151	0,8085	0,9207	0,8854	0,8955
95% доверительный интервал 95% confidence interval	0,7890-0,9672	0,5499-0,9257	0,7662-0,9746	0,7215-0,9553	0,7373-0,9606
P (two-tailed)	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

Следует отметить, что в настоящем исследовании анализировали образцы сыворотки крови животных, иммунизированных кандидатными вакцинными препаратами против COVID-19, содержащими белок Spike SARS-CoV-2 варианта «Ухань». Соответственно, в разработанном псевдонейтрализующем тесте использовался рекомбинантный антиген RBD Spike SARS-CoV-2 (HyTest, RF, Cat.No.8COV1) соответствующий также варианту «Ухань». Описываемый вариант ПНТ, однако, позволял выявлять антитела и в образцах людей, перенесших коронавирусную инфекцию вариан-

та «Омикрон» (результаты не опубликованы), однако для обоснования универсальности метода в отношении различных вариантов коронавирусов требуются дополнительные исследования.

Заключение

Предлагаемый в настоящей работе ПНТ может найти применение при проведении доклинических и клинических испытаний кандидатных вакцинных и лекарственных препаратов, а также для отбора плазмы доноров, переболевших COVID-19, собираемой в целях терапии [3, 9].

Список литературы / References

1. Adams O., Andrée M., Hermsen D., Lübke N., Timm J., Schaal H., Müller L. Comparison of commercial SARS-CoV-2 surrogate neutralization assays with a full virus endpoint dilution neutralization test in two different cohorts. *J. Virol. Methods*, 2022, Vol. 307, 114569. doi: 10.1016/j.jviromet.2022.114569.
2. Amanat F., White K.M., Miorin L., Strohmeier S., McMahon M., Meade P., Liu W.C., Albrecht R.A., Simon V., Martinez-Sobrido L., Moran T., García-Sastre A., Krammer F. An *in vitro* microneutralization assay for SARS-CoV-2 serology and drug screening. *Curr. Protoc. Microbiol.*, 2020, Vol. 58, no. 1, e108. doi: 10.1002/cpmc.108.
3. Benner S.E., Patel E.U., Laeyendecker O., Pekosz A., Littlefield K., Eby Y., Fernandez R.E., Miller J., Kirby C.S., Keruly M., Klock E., Baker O.R., Schmidt H.A., Shrestha R., Burgess I., Bonny T.S., Clarke W., Caturegli P., Sullivan D., Shoham S., Quinn T.C., Bloch E.M., Casadevall A., Tobian A.A.R., Redd A.D. SARS-CoV-2 antibody avidity responses in COVID-19 patients and convalescent plasma donors. *J. Infect. Dis*, 2020, Vol. 222, pp. 1974-1984.
4. Gushchin V.A., Dolzhikova I.V., Shchetinin A.M., Odintsova A.S., Siniavin A.E., Nikiforova M.A., Pochtovyi A.A., Shidlovskaya E.V., Kuznetsova N.A., Burgasova O.A., Kolobukhina L.V., Pliukhina A.A., Kovyreshina A.V., Botikov A.G., Kuzina A.V., Grousova D.M., Tukhvatulin A.I., Shcheblyakov D.V., Zubkova O.V., Karpova O.V., Voronina O.L., Ryzhova N.N., Aksenova E.I., Kunda M.S., Lioznov D.A., Danilenko D.M., Komissarov A.B., Tkachuk A.P., Logunov D.Y., Gintsburg A.L. Neutralizing activity of sera from Sputnik V-vaccinated people against variants of concern (VOC: B.1.1.7, B.1.351, P.1, B.1.617.2, B.1.617.3) and Moscow Endemic SARS-CoV-2 Variants. *Vaccines (Basel)*, 2021, Vol. 9, no. 7, 779. doi: 10.3390/vaccines9070779.
5. Kolesov D.E., Sinogubova M.V., Dayanova L.K., Dolzhikova I.V., Vorobiev I.I., Orlova N.A. Fast and accurate surrogate virus neutralization test based on antibody-mediated blocking of the interaction of ACE2 and SARS-CoV-2 spike protein RBD. *Diagnostics (Basel)*, 2022, Vol. 12, no. 2, 393. doi: 10.3390/diagnostics12020393.
6. Logunov D.Y., Dolzhikova I.V., Shcheblyakov D.V., Tukhvatulin A.I., Zubkova O.V., Dzharullaeva A.S., Kovyreshina A.V., Lubenets N.L., Grousova D.M., Erokhova A.S., Botikov A.G., Izhaeva F.M., Popova O., Ozharovskaya T.A., Esmagambetov I.B., Favorskaya I.A., Zrelkin D.I., Voronina D.V., Shcherbinin D.N., Semikhin A.S., Simakova Y.V., Tokarskaya E.A., Egorova D.A., Shmarov M.M., Nikitenko N.A., Gushchin V.A., Smolyarchuk E.A., Zyryanov S.K., Borisevich S.V., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L.; Gam-COVID-Vac Vaccine Trial

Group. Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. *Lancet*, 2021, Vol. 397, no. 10275, pp. 671-681.

7. Manuylov V., Dolzhikova I., Kudryashova A., Cherepovich B., Kovyrshina A., Iliukhina A., Kharchenko O., Semashko M., Tkachuk A., Gushchin V., Borisova O. Simple ELISA methods to estimate neutralizing antibody Titers to SARS-CoV-2: IgG quantification, the avidity index, and the surrogate virus neutralization test. *Arch. Microbiol. Immunol.*, 2022, Vol. 6, pp. 213-220.

8. Taylor S.C., Hurst B., Martiszus I., Hausman M.S., Sarwat S., Schapiro J.M., Rowell S., Lituev A. Semi-quantitative, high throughput analysis of SARS-CoV-2 neutralizing antibodies: Measuring the level and duration of immune response antibodies post infection/vaccination. *Vaccine*, 2021, Vol. 39, no. 39, pp. 5688-5698.

9. Wajnberg A., Amanat F., Firpo A., Altman D.R., Bailey M.J., Mansour M., McMahon M., Meade P., Mendu D.R., Muellers K., Stadlbauer D., Stone K., Strohmeier S., Simon V., Aberg J., Reich D.L., Krammer F., Cordon-Cardo C. Robust neutralizing antibodies to SARS-CoV-2 infection persist for months. *Science*, 2020, Vol. 370, no. 6521, pp. 1227-1230.

Авторы:

Черепович Б.С. — младший научный сотрудник лаборатории генетики РНК-содержащих вирусов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Кудряшова А.М. — научный сотрудник лаборатории медицинской биотехнологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Карташова Н.П. — научный сотрудник лаборатории экспериментальной вирусологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Грачева А.В. — научный сотрудник лаборатории молекулярной вирусологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Мануйлов В.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории трансляционной медицины ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Ленева И.А. — д.б.н., заведующая лабораторией экспериментальной вирусологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Борисова О.В. — к.х.н., заведующая лабораторией медицинской биотехнологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Свитич О.А. — д.м.н., член-корр. РАН, заведующая лабораторией молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Authors:

Cherepovich B.S., Junior Research Associate, Laboratory of Genetics of RNA-containing Viruses, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Kudryashova A.M., Research Associate, Laboratory of Medical Biotechnology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Kartashova N.P., Research Associate, Laboratory of Experimental Virology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Gracheva A.V., Research Associate, Laboratory of Molecular Virology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Manuilov V.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Translational Medicine, N. Gamaleya Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Leneva I.A., PhD, MD (Biology), Head, Laboratory of Experimental Virology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Borisova O.V., PhD (Chemistry), Head, Laboratory of Medical Biotechnology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Svitich O.A., PhD, MD (Medicine), Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Molecular Immunology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Поступила 23.08.2023

Отправлена на доработку 14.09.2023

Принята к печати 04.10.2023

Received 23.08.2023

Revision received 14.09.2023

Accepted 04.10.2023