

DOI: <https://doi.org/10.60797/VMED.2025.4.1>

**ПРИМЕНЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ SARS-COV-2 ДЛЯ ОДНОВРЕМЕННОГО ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ КЛАССА G К ОТДЕЛЬНЫМ АНТИГЕНАМ ВОЗБУДИТЕЛЯ ИНФЕКЦИИ COVID-19**

Научная статья

**Полтавченко А.Г.<sup>1</sup>, Ерш А.В.<sup>2</sup>, Филатов П.В.<sup>3,\*</sup>, Ушкаленко Н.Д.<sup>4</sup>, Шаньшин Д.В.<sup>5</sup>, Щербаков Д.Д.<sup>6</sup>**

<sup>1</sup> ORCID : 0000-0003-2408-5611;

<sup>2</sup> ORCID : 0000-0002-9220-1250;

<sup>3</sup> ORCID : 0000-0001-7763-3808;

<sup>4</sup> ORCID : 0000-0002-2171-7444;

<sup>5</sup> ORCID : 0000-0001-9985-1582;

<sup>6</sup> ORCID : 0000-0001-8023-4453;

<sup>1, 2, 3, 4, 5, 6</sup> Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Новосибирск, Российская Федерация

\* Корреспондирующий автор (filatov\_pv[at]vector.nsc.ru)

**Аннотация**

**Цель работы.** Исследование эффективности применения рекомбинантных белков SARS-CoV-2 при разработке экспериментального диагностического теста для одновременного дифференцированного выявления антител класса G к отдельным антигенам возбудителя инфекции COVID-19 у переболевших и вакцинированных.

**Материалы и методы.** Сравнение качества выявления IgG к антигенам SARS-CoV-2 в экспериментальном наборе с результатами коммерческих тестов. Исследования выполняли с использованием массива сывороток крови, предоставленных ООО «ИМБИАН ЛАБ», состоящего из 35 образцов от пациентов, вакцинированных «ЭпиВакКороной» (ЭВК), 17 образцов от пациентов, привитых «Спутником V», 13 образцов людей, переболевших COVID-19, и 15 негативных образцов, полученных от доноров до пандемии коронавируса инфекции.

**Результаты и обсуждение.** На основе полученных ранее рекомбинантных белков коронавируса SARS-CoV-2 и технологии мультипараметрического дот-анализа, разработан диагностический тест для одновременного дифференцированного выявления антител класса G к антигенам RBD, N и белковому комплексу из состава вакцины «ЭВК».

Установлено, что экспериментальный набор «SARS-CoV-2-спектр-IgG» позволяет одновременно избирательно определять антитела класса IgG к антигенам RBD и N вируса SARS-CoV-2.

**Заключение.** Применение разработанного мультипараметрического теста дает возможность дифференцировать случаи иммунитета, приобретенного в результате перенесенного заболевания, а также в ответ на введение вакцин «Спутник V» или «ЭВК».

**Ключевые слова:** антигены SARS-CoV-2, IgG, дифференцированное выявление, вакцинация, дот-иммуноанализ, иммуноферментный анализ.

**APPLICATION OF RECOMBINANT SARS-COV-2 PROTEINS FOR SIMULTANEOUS DETECTION OF CLASS G ANTIBODIES TO INDIVIDUAL ANTIGENS OF THE COVID-19 INFECTIOUS AGENT**

Research article

**Poltavchenko A.G.<sup>1</sup>, Ersh A.<sup>2</sup>, Filatov P.V.<sup>3,\*</sup>, Ushkalenko N.<sup>4</sup>, Shanshin D.V.<sup>5</sup>, Shcherbakov D.D.<sup>6</sup>**

<sup>1</sup> ORCID : 0000-0003-2408-5611;

<sup>2</sup> ORCID : 0000-0002-9220-1250;

<sup>3</sup> ORCID : 0000-0001-7763-3808;

<sup>4</sup> ORCID : 0000-0002-2171-7444;

<sup>5</sup> ORCID : 0000-0001-9985-1582;

<sup>6</sup> ORCID : 0000-0001-8023-4453;

<sup>1, 2, 3, 4, 5, 6</sup> Federal State Research Institution "State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR", Novosibirsk, Russian Federation

\* Corresponding author (filatov\_pv[at]vector.nsc.ru)

**Abstract**

**Objective of the work.** To study the effectiveness of recombinant SARS-CoV-2 proteins in the development of an experimental diagnostic test for simultaneous differential detection of class G antibodies to individual antigens of the causative agent of COVID-19 infection in exposed and vaccinated patients.

**Materials and methods.** Comparison of the quality of IgG detection to SARS-CoV-2 antigens in the experimental kit with the results of commercial tests. Studies were performed using a serum array provided by 'IMBIAN LAB' LLC, consisting of 35 samples from patients vaccinated with 'EpiVacCorona' (EVAC), 17 samples from patients vaccinated with 'Sputnik V', 13 samples from people who had exposure to COVID-19, and 15 negative samples obtained from donors before the coronavirus infection pandemic.

Results and discussion. On the basis of previously obtained recombinant proteins of SARS-CoV-2 coronavirus and multiparametric dot-analysis technology, a diagnostic test for simultaneous differential detection of class G antibodies to RBD, N antigens and protein complex from 'EVK' vaccine was developed.

It was found that the experimental kit 'SARS-CoV-2-spectrum-IgG' allows simultaneous selective detection of IgG class antibodies to RBD and N antigens of SARS-CoV-2 virus.

Conclusion. The application of the developed multiparametric test makes it possible to differentiate cases of immunity acquired as a result of the transferred disease, as well as in response to the introduction of 'Sputnik V' or 'EVC' vaccines.

**Keywords:** SARS-CoV-2 antigens, IgG, differential detection, vaccination, dot-immunoassay, enzyme-linked immunosorbent assay.

## Введение

Одной из наиболее эффективных мер противодействия пандемии, вызванной новой коронавирусной инфекцией является вакцинация населения [1]. Вакцинация является простым и безопасным и экономичным способом защиты от инфекционных болезней до контакта с их возбудителем, а механизм действия сводится к задействованию естественных защитных механизмов организма – в ответ на введение вакцины вырабатывается клеточный и гуморальный иммунитет [2]. Возбудителем COVID-19 является вирус SARS-CoV-2 – оболочечный одноцепочечный (+)РНК-вирус, относящийся к роду Betacoronavirus. Все коронавирусы кодируют 4 основных структурных белка: spike, envelope, membrane and nucleocapside, а также множество неструктурных и вспомогательных белков [3]. В ряде публикаций сообщается о высокой иммуногенности и экспрессируемости нуклеокапсидного белка (N антигена), играющего важную роль в усилении транскрипции и сборке вируса при течении коронавирусной инфекции [4]. Другие публикации особо выделяют спайковый белок SARS-CoV-2 (S антиген), который также обладает иммуногенными свойствами и вызывает выработку защитных антител у людей, инфицированных этим вирусом [5]. Белок S присутствует на поверхности вируса, формирует его «корону» и отвечает за связывание вируса с клетками человека. Связывание с рецептором и проникновение в клетку хозяина происходит за счет области молекулы антигена S, названной рецептор-связывающим доменом (RBD) [6].

Для профилактики COVID-19 в России наиболее широкое применение нашли вакцины «Гам-КОВИД-Вак» (Спутник V), производства НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи и «ЭпиВакКорона» (ЭВК), производства ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, которые вызывают выработку антител к разным белкам SARS-CoV-2. Спутник V создан на основе вектора аденовируса человека, в геном которого методами генной инженерии вставлен ген S-белка коронавируса, на который в организме привитого вырабатываются нейтрализующие вирус антитела [7]. «ЭпиВакКорона» состоит из искусственно синтезированных коротких фрагментов вирусных белков – пептидов, распознаваемых иммунной системой. В ее состав входит три пептида (фрагменты S-белка коронавируса), закрепленные на белке-носителе, в роли которого выступает рекомбинантный антиген N вируса SARS-CoV-2. Гуморальный защитный иммунитет при такой вакцинации индуцируется за счет выработки антител, как к пептидам, так и к белку N коронавируса [8].

Наиболее просто оценить эффективность вакцинации можно по состоянию гуморального иммунитета – наличию в крови пациента специфических антител к доминантным антигенам вакцины. Наиболее популярным методом в настоящее время является иммуноферментный анализ (ИФА), выполняемый в планшетах для иммунологических реакций. Недостатком ИФА является его моноспецифичность, поэтому для оценки каждой вакцины должен быть создан отдельный диагностический набор. Другим подходом является совместное выявление антител к ряду доминантных антигенов разных вакцин. Ранее мы сообщали о разработке мультиплексного теста для оценки иммунитета к нескольким детским вакциноуправляемым инфекциям [9]. Тест основан на применении дот-иммуноанализа на плоских белковых матрицах, позволяет одновременно выявлять антитела к возбудителям краснухи, кори и эпидемического паротита, а также визуально оценивать наличие защитного иммунитета.

*Целью настоящей работы* являлось исследование эффективности применения рекомбинантных белков коронавируса SARS-CoV-2 при разработке экспериментального диагностического теста для одновременного дифференцированного выявления антител класса G к отдельным антигенам возбудителя инфекции COVID-19 у переболевших и вакцинированных.

## Методы и принципы исследования

**Материалы:** азид натрия, казеин, мышинные моноклональные антитела к Fc фрагменту IgG человека (клон 600), пептон, сахарозу и твин-20 (Sigma-Aldrich, США); химические реактивы отечественного производства с квалификацией не ниже «чда»; иммуноглобулин класса G человека (Имтек, Россия). Для изготовления подложки аналитических матриц применяли синтетическую бумагу на основе поливинилхлорида «Pentaprint» марки PR-M180/09-07/9400 (Klöckner Pentaplast, Германия).

**Иммунореагенты.** Рекомбинантные белки N и RBD были получены в лаборатории иммунохимии ФБУН ГНЦ ВБ Вектор.

Получение рекомбинантного белка RBD.

Нуклеотидную последовательность, кодирующую фрагмент спайкового белка SARS-CoV-2 (участок 308V – 542N), получали путем синтеза (ООО ДНК-синтез, Россия), на основе штамма Wuhan-Hu-1 (GenBank: MN908947). Культуру-продуцент RBD получали в клеточной линии яичников китайского хомячка CHO-K1. Очистку проводили с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии с использованием сорбента Ni-IMAC сефарозы (GE Healthcare, США) [10].

Получение рекомбинантного белка N.

Синтез последовательности, кодирующей капсидный белок N SARS-CoV-2, штамма Wuhan-Hu-1 (GenBank: MN908947), проводился в ООО ДНК-синтез, Россия. Для амплификации фрагмента ДНК из исходной матрицы использовали праймеры CoVN-F (5'-aaaaaggatcctctgataatggaccccaaatcagc-3') и CoVN-R (5'-

aaaaagcggccgscgctgagttgagtcagca-3'). Амплифицированный фрагмент клонировали в вектор экспрессии pET21. Для дальнейшей наработки белка клетки *E. coli* штамм BL21(DE3) трансформировали полученным вектором. Очистку проводили по аналогии с белком RBD [11].

Комплекс антигенов из состава вакцин «ЭВК» предоставлен разработчиками вакцины.

**Образцы.** Исследования выполняли с использованием массива сывороток крови включающих: 35 образцов от пациентов вакцинированных «ЭВК»; 17 образцов пациентов привитых вакциной «Спутник V»; 13 образцов от людей, переболевших COVID-19, и 15 негативных образцов, полученных от доноров и пациентов с разной патологией в период до 2019 г. Массив предоставлен ООО «ИМБИАН» и содержит образцы сывороток (плазмы) крови человека, полученные у пациентов в медицинских учреждениях г. Новосибирска с соблюдением всех этических норм. Все переданные образцы обезличены, а информация о них анонимна.

**Тесты сравнения.** В качестве тестов сравнения использовали коммерческие наборы для ИФА: «SARS-CoV-2-IgG-Вектор» (РЗН 2020/12952), производства ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», Россия и «SARS-CoV-2 IgG RBD-ИМБИАН-ИФА» (РЗН 2021/13925), производства ООО «ИМБИАН», Россия.

**Экспериментальный набор.** Набор «SARS-CoV-2-спектр-IgG» включает в себя четыре аналитические ванны, четыре блока белковых матриц, флакон 1 с очищенной водой и флакон 2 с жидким компонентом проявляющей системы (0,4% раствор азотнокислого серебра в очищенной воде), объемом по 4,2 мл. Набор полностью автономен и может быть использован для тестирования 20 образцов. Общий вид набора приведен на рисунке 1с. Аналитические матрицы представлены в виде блоков (гребней) с 5 зубцами, каждый из которых рассчитан на одно исследование. На каждую матрицу аликвотами по 2,0 мкл наносили реагенты захвата и два положительного контроля – IgG Hum (Control<sub>1+</sub>) и коллоидное золото (Au-Control<sub>+</sub>), разведенные в 0,005 М боратном буферном растворе (pH 6,0) до концентрации 10 мкг/мл. Схема расположения реагентов захвата приведена на рисунке 1б. Блоки высушивали в течение 10 ч при 25 °С, блокировали 1 ч в 0,2%-м растворе казеина, тщательно просушивали, упаковывали в фольгированные пакеты и хранили до использования при 4 °С.

Полипропиленовые аналитические ванны, рассчитаны на проведение 5 анализов и состоят из 12 рядов по 5 ячеек в каждом. Ванны заполняли готовыми к применению рабочими растворами по схеме: ряд 1 – раствор для разведения образца (ФСБ-Т с 0.02% казеина, pH 9,5); ряды 2, 3, 5 и 6 – отмывочный раствор - ФСБ-Т (0.02 М натрий-фосфатный буферный раствор с 0.8% NaCl, 0.1% твин-20 и 0.1% азида натрия, pH 7.2); ряд 4 – рабочее разведение конъюгата в ФСБ-Т; ряды 7, 8, 10 и 12 – очищенная вода; ряд 11 стабилизатор окраски – 1% тиомочевины в 1% растворе NaOH на очищенной воде. В ячейки девятого ряда помещали таблетки (5 мг) сухого компонента физического проявителя (смесь метола и лимонной кислоты в соотношении 2:5).

В качестве конъюгата в дот-иммуноанализе использовали золь золота (20 нм), адсорбционно связанный с мышиными моноклональными антителами против IgG человека (Au-a/IgG-Hum). Изготовление конъюгатов на основе коллоидного золота выполняли по ранее описанной методике [12]. Заполненные ванны герметизировали комбинированным материалом на основе алюминиевой фольги «Coflex» (ЗАО «Фирма Сигма», Россия) и хранили в холодильной камере при 4°C.

**Дот-иммуноанализ.** Исследование проводили при комнатной температуре (23°C) в аналитических ваннах с объемом рабочих растворов в ячейках 0,3 мл. На подготовительном этапе анализа перфоратором производили вскрытие фольги над ячейками первого ряда и вносили по 15 мкл исследуемых препаратов крови. Для растворения сухого компонента физического проявителя в ячейки девятого ряда добавляли по 200 мкл очищенной воды из флакона 1. После этого аналитические матрицы погружали в первый ряд ячеек и инкубировали 25 мин. Далее матрицы инкубировались в следующих рядах ячеек в соответствии со схемой проведения анализа, описанной ранее [13]. Перед внесением белковых матриц в ячейки девятого ряда, в них добавляли по 200 мкл жидкого компонента физического проявителя из флакона 2. Общее время исследования составляло 60 мин. После завершения процесса, белковые матрицы высушивали на воздухе и визуально учитывали результаты анализа по наличию или отсутствию окрашенных пятен в местах нанесения соответствующих антигенов. Примеры результатов анализа приведены на рисунке 1а.

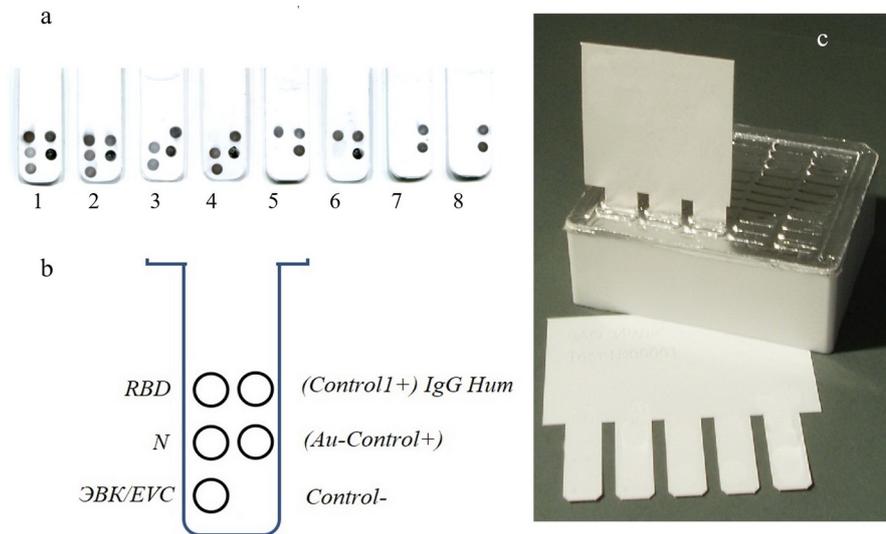


Рисунок 1 - Примеры результатов дот-анализа образцов и основные элементы экспериментального набора «SARS-CoV-2-спектр-IgG»:

*a* – примеры результатов дот-анализа образцов пациентов: *1* и *2* – переболевших COVID-19; *3* и *4* – привитых вакциной «ЭпиВакКорона»; *5* и *6* – привитых вакциной «Спутник – V»; *7* и *8* – не имевших контакта с вирусом SARS-CoV-2; *b* – схема размещения реагентов захвата на подложке; *c* – основные элементы экспериментального набора «SARS-CoV-2-спектр-IgG»

DOI: <https://doi.org/10.60797/BMED.2025.4.1.1>

### Основные результаты

Результаты параллельного исследования образцов с использованием экспериментального набора и тестов сравнения приведены в таблице 1. Положительные результаты анализа выделены в таблице жирным шрифтом. Приведенные в таблице 1 положительные образцы массива (№ 1-65) включают: панель сывороток крови, полученных от пациентов, привитых вакциной «ЭВК» (№ 1-35); панель проб, полученных от пациентов, привитых вакциной «Спутник V» (№ 36-52); а также панель образцов, полученных от пациентов, ранее перенесших клинически подтвержденную инфекцию вирусом SARS-CoV-2 (№ 53-65). Отрицательные образцы массива (№ 66-80) включают панель донорских сывороток крови и проб от пациентов с различной инфекционной патологией, отобранных в период до 2019 г.

Таблица 1 - Результаты сравнительного анализа массива сывороток с использованием экспериментального набора «SARS-CoV-2-спектр-IgG» и тестов сравнения

DOI: <https://doi.org/10.60797/BMED.2025.4.1.2>

Образцы	№ образца	SARS-CoV-2-IgG- Вектор	SARS-CoV-2 IgG RBD-ИМБИАН- ИФА	SARS-CoV-2-спектр-IgG		
				RBD	N	ЭВК
Вакцинированные «ЭпиВакКорона»	1	<b>1,008</b>	0,122	-	+	+
	2	<b>2,029</b>	0,223	-	+	+
	3	<b>3,530</b>	<b>0,728</b>	+	+	+

Образцы	№ образца	SARS-CoV-2-IgG- Вектор	SARS-CoV-2 IgG RBD-ИМБИАН- ИФА	SARS-CoV-2-спектр-IgG		
				RBD	N	ЭБК
	4	<b>0,568</b>	0,190	-	+	+
	5	<b>2,679</b>	0,087	-	+	+
	6	<b>2,783</b>	0,090	-	+	+
	7	<b>2,754</b>	0,152	-	+	+

Образцы	№ образца	SARS-CoV-2-IgG- Вектор	SARS-CoV-2 IgG RBD-ИМБИАН- ИФА	SARS-CoV-2-спектр-IgG		
				RBD	N	ЭВК
	8	2,686	1,950	+	+	+
	9	3,372	0,220	-	+	+
	10	2,568	0,223	-	+	+
	11	1,554	0,065	-	+	+

Образцы	№ образца	SARS-CoV-2-IgG- Вектор	SARS-CoV-2 IgG RBD-ИМБИАН- ИФА	SARS-CoV-2-спектр-IgG		
				RBD	N	ЭБК
	12	2,352	0,785	+	+	+
	13	2,702	2,207	+	+	+
	14	3,060	0,150	-	+	+
	15	2,287	0,240	-	+	+

Образцы	№ образца	SARS-CoV-2-IgG- Вектор	SARS-CoV-2 IgG RBD-ИМБИАН- ИФА	SARS-CoV-2-спектр-IgG		
				RBD	N	ЭВК
	16	<b>3,411</b>	0,023	-	+	+
	17	<b>1,243</b>	0,050	-	+	+
	18	<b>1,911</b>	0,036	-	+	+
	19	<b>2,418</b>	0,065	-	+	+

Образцы	№ образца	SARS-CoV-2-IgG- Вектор	SARS-CoV-2 IgG RBD-ИМБИАН- ИФА	SARS-CoV-2-спектр-IgG		
				RBD	N	ЭБК
	20	<b>2,124</b>	0,122	-	+	+
	21	<b>3,245</b>	0,211	-	+	+
	22	<b>1,868</b>	0,012	-	+	+
	23	<b>1,834</b>	<b>1,102</b>	+	+	+

Образцы	№ образца	SARS-CoV-2-IgG-Вектор	SARS-CoV-2 IgG RBD-ИМБИАН-ИФА	SARS-CoV-2-спектр-IgG		
				RBD	N	ЭВК
	24	<b>2,987</b>	0,025	-	+	+
	25	<b>3,214</b>	0,065	-	+	+
	26	<b>3,162</b>	0,098	-	+	+
	27	<b>1,868</b>	0,102	-	+	+

Образцы	№ образца	SARS-CoV-2-IgG- Вектор	SARS-CoV-2 IgG RBD-ИМБИАН- ИФА	SARS-CoV-2-спектр-IgG		
				RBD	N	ЭБК
	28	<b>1,824</b>	0,105	-	+	+
	29	<b>2,897</b>	0,202	-	+	+
	30	<b>0,659</b>	0,102	-	+	+
	31	<b>1,256</b>	0,122	-	+	+

Образцы	№ образца	SARS-CoV-2-IgG- Вектор	SARS-CoV-2 IgG RBD-ИМБИАН- ИФА	SARS-CoV-2-спектр-IgG		
				RBD	N	ЭВК
	32	<b>3,521</b>	<b>1,543</b>	+	+	+
	33	<b>2,988</b>	0,056	-	+	+
	34	<b>2,101</b>	0,077	-	+	+
	35	<b>0,845</b>	0,122	-	+	+

Образцы	№ образца	SARS-CoV-2-IgG- Вектор	SARS-CoV-2 IgG RBD-ИМБИАН- ИФА	SARS-CoV-2-спектр-IgG		
				RBD	N	ЭБК
Вакцинированные «Спутник V»	36	2,522	2,602	+	-	-
	37	1,356	1,702	+	-	-
	38	1,901	2,101	+	+	+
	39	1,722	2,011	+	-	-

Образцы	№ образца	SARS-CoV-2-IgG-Вектор	SARS-CoV-2 IgG RBD-ИМБИАН-ИФА	SARS-CoV-2-спектр-IgG		
				RBD	N	ЭВК
	40	1,911	2,402	+	-	-
	41	2,945	3,200	+	-	-
	42	1,222	1,721	+	-	-
	43	2,325	2,723	+	-	-

Образцы	№ образца	SARS-CoV-2-IgG- Вектор	SARS-CoV-2 IgG RBD-ИМБИАН- ИФА	SARS-CoV-2-спектр-IgG		
				RBD	N	ЭБК
	44	<b>0,996</b>	<b>1,211</b>	+	-	-
	45	<b>1,883</b>	<b>2,122</b>	+	-	-
	46	<b>0,910</b>	<b>1,201</b>	+	-	-
	47	<b>1,085</b>	<b>0,987</b>	+	-	-

Образцы	№ образца	SARS-CoV-2-IgG- Вектор	SARS-CoV-2 IgG RBD-ИМБИАН- ИФА	SARS-CoV-2-спектр-IgG		
				RBD	N	ЭВК
	48	2,077	2,521	+	-	-
	49	2,211	2,801	+	-	-
	50	2,201	2,302	+	-	-
	51	1,077	0,954	+	-	-

Образцы	№ образца	SARS-CoV-2-IgG- Вектор	SARS-CoV-2 IgG RBD-ИМБИАН- ИФА	SARS-CoV-2-спектр-IgG		
				RBD	N	ЭБК
	52	<b>2,031</b>	<b>1,801</b>	+	-	-
Переболевшие COVID-19	53	<b>2,245</b>	<b>1,253</b>	+	+	+
	54	<b>2,365</b>	<b>2,976</b>	+	+	+
	55	<b>1,562</b>	<b>0,859</b>	+	+	+

Образцы	№ образца	SARS-CoV-2-IgG- Вектор	SARS-CoV-2 IgG RBD-ИМБИАН- ИФА	SARS-CoV-2-спектр-IgG		
				RBD	N	ЭВК
	56	<b>2,351</b>	<b>2,325</b>	+	+	+
	56	<b>0,985</b>	<b>0,722</b>	+	+	+
	57	<b>2,652</b>	<b>1,362</b>	+	+	+
	58	<b>3,251</b>	<b>3,251</b>	+	+	+

Образцы	№ образца	SARS-CoV-2-IgG- Вектор	SARS-CoV-2 IgG RBD-ИМБИАН- ИФА	SARS-CoV-2-спектр-IgG		
				RBD	N	ЭБК
	59	<b>1,054</b>	<b>0,645</b>	+	+	+
	60	<b>1,568</b>	<b>1,254</b>	+	+	+
	61	<b>0,984</b>	<b>0,546</b>	+	+	+
	62	<b>1,698</b>	<b>1,452</b>	+	+	+

Образцы	№ образца	SARS-CoV-2-IgG-Вектор	SARS-CoV-2 IgG RBD-ИМБИАН-ИФА	SARS-CoV-2-спектр-IgG		
				RBD	N	ЭВК
	63	<b>3,021</b>	<b>2,548</b>	+	+	+
	64	<b>2,154</b>	<b>1,587</b>	+	+	+
	65	<b>1,854</b>	<b>0,654</b>	+	+	+
Негативные образцы	66	0,225	0,201	-	-	-

Образцы	№ образца	SARS-CoV-2-IgG- Вектор	SARS-CoV-2 IgG RBD-ИМБИАН- ИФА	SARS-CoV-2-спектр-IgG		
				RBD	N	ЭВК
	67	0,225	0,124	-	-	-
	68	0,206	0,047	-	-	-
	69	<b>0,507</b>	0,120	-	-	-
	70	<b>0,725</b>	0,105	-	-	-

Образцы	№ образца	SARS-CoV-2-IgG-Вектор	SARS-CoV-2 IgG RBD-ИМБИАН-ИФА	SARS-CoV-2-спектр-IgG		
				RBD	N	ЭВК
	71	0,222	0,093	-	-	-
	72	<b>0,456</b>	0,024	-	-	-
	73	0,298	0,055	-	-	-
	74	0,213	0,066	-	-	-

Образцы	№ образца	SARS-CoV-2-IgG- Вектор	SARS-CoV-2 IgG RBD-ИМБИАН- ИФА	SARS-CoV-2-спектр-IgG		
				RBD	N	ЭБК
	75	0,225	0,119	-	-	-
	76	<b>0,401</b>	0,122	-	-	-
	77	0,210	0,097	-	-	-
	78	<b>0,625</b>	0,108	-	-	-

Образцы	№ образца	SARS-CoV-2-IgG- Вектор	SARS-CoV-2 IgG RBD-ИМБИАН- ИФА	SARS-CoV-2-спектр-IgG		
				RBD	N	ЭВК
	79	<b>0,570</b>	0,093	-	-	-
	80	0,102	0,106	-	-	-
ОПкрит. CUToff		0,250	0,240			

Примечание: таблица составлена авторами по собственным данным; позитивные результаты анализа выделены жирным шрифтом

## Обсуждение

Принцип обнаружения специфических антител в исследуемых образцах заключается в образовании комплексов между антителами из исследуемого образца и известными антигенами возбудителя (реагентами захвата), иммобилизованными на плотной подложке, с последующим выявлением этих комплексов с применением конъюгата – антителами против иммуноглобулинов человека (реагентами детекции), связанных с легко выявляемой меткой. При инфицировании вирусом SARS-CoV-2 гуморальная иммунная система человека вырабатывает специфические нейтрализующие антитела против различных элементов вируса, обладающих антигенными свойствами [14], [15], а в ответ на введение вакцины происходит индукция антител к ее белковому компоненту [16]. В отношении SARS-CoV-2 в диагностических серологических тестах и вакцинах-кандидатах наибольшее внимание уделяется анти-S и анти-N антителам [17], [18].

В тесте сравнения «SARS-CoV-2-ИФА-Вектор» использованы полноразмерные рекомбинантные антигены S и N вируса. Результаты, приведенные в табл. 1, показывают, что такое сочетание антигенов позволяет выявлять весь спектр положительных образцов, но формирует положительные сигналы с 6 (40%) отрицательными сыворотками.

Тест-система «SARS-CoV-2 IgG RBD-ИМБИАН-ИФА», основанная на использовании рекомбинантного фрагмента RBD антигена S, надежно выявляет образцы от пациентов, привитых вакциной «Спутник V» и переболевших COVID-19, но не реагирует с образцами в отрицательной части массива (что согласуется с мнением о высокой специфичности RBD антигена [6], [19]), а также в образцах от пациентов, вакцинированных «ЭВК» (что свидетельствует об отсутствии фрагмента RBD среди пептидов в составе вакцины «ЭВК»). Наличие 6 (17%) положительных по RBD образцов среди привитых вакциной «ЭВК» с высокой вероятностью можно объяснить перенесенной до или после вакцинации инфекцией COVID-19.

В экспериментальном наборе «SARS-CoV-2-спектр-IgG» использованы рекомбинантные антигены RBD, N и белковый комплекс из состава вакцины «ЭВК», отдельно иммобилизованные на подложке из синтетической бумаги. Дополнительно на подложку нанесены: IgG из крови человека (контроль работоспособности конъюгата) и коллоидное золото (контроль работоспособности проявляющей системы). Свободная от компонентов зона подложки используется для контроля фоновых явлений. Данные таблице 1 показывают, что набор избирательно выявляет антитела ко всем использованным антигенам коронавируса, что позволяет дифференцировать случаи иммунитета, приобретенного в результате перенесенного заболевания (выявляются антитела ко всем антигенам), а также в ответ на введение вакцин «Спутник V» (выявляются только антитела к антигену RBD) и «ЭВК» (выявляются антитела к белку N и пептидам «ЭВК»). Случаи положительной реакции со всеми антигенами среди образцов от вакцинированных пациентов (образцы 3, 8, 12, 13, 23, 31 и 38), могут быть следствием ранее перенесенного в легкой или бессимптомной форме заболевания COVID-19. Определение RBD антител в дот-анализе хорошо согласуется с результатами ИФА в наборе ООО «ИМБИАН». В отличие от набора «SARS-CoV-2-ИФА-Вектор» набор производства ООО «ИМБИАН» и набор «SARS-CoV-2-спектр-IgG» не выявляют ложноположительных сигналов в отрицательной панели образцов, что позволяет предполагать происхождение таких сигналов при анализе набором для ИФА производства ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» за счет использования в нем полноразмерного S белка и согласуется с мнением о более высокой специфичности фрагмента RBD по сравнению с полноразмерным S антигеном [6].

## Заключение

Таким образом, экспериментальный набор «SARS-CoV-2-спектр-IgG» позволяет одновременно избирательно определять антитела класса IgG к антигенам RBD и N вируса SARS-CoV-2, а также к пептидам из состава вакцины «ЭВК», что позволяет дифференцировать случаи иммунитета, приобретенного в результате перенесенного заболевания, а также в ответ на введение вакцин «Спутник V» или «ЭВК». Дот-анализ с использованием этого набора выполняется в течение 1 ч при комнатной температуре, не требует энергообеспечения и особой квалификации оператора и может быть реализован в амбулаторных условиях.

## Конфликт интересов

Не указан.

## Рецензия

Все статьи проходят рецензирование. Но рецензент или автор статьи предпочли не публиковать рецензию к этой статье в открытом доступе. Рецензия может быть предоставлена компетентным органам по запросу.

## Conflict of Interest

None declared.

## Review

All articles are peer-reviewed. But the reviewer or the author of the article chose not to publish a review of this article in the public domain. The review can be provided to the competent authorities upon request.

## Список литературы / References

1. Khuroo M.S. A Race Against Time in the Middle of Death and Devastation! / M.S. Khuroo, M. Khuroo, M.S. Khuroo [et al.] // Journal of Clinical and Experimental Hepatology. — 2020. — № 6. — P. 610–621. — DOI: 10.1016/j.jceh.2020.06.003.
2. Lahariya C. Vaccine epidemiology: A review / C. Lahariya // Journal of Family Medicine and Primary Care. — 2016. — № 1. — P. 7–15. — DOI: 10.4103/2249-4863.184616.
3. Maier H.J. Coronaviruses: methods and protocols / H.J. Maier, E. Bickerton. — New-York : Humana Press, 2015. — 285 p. — DOI: 10.1007/978-1-4939-2438-7.

4. Heffron A.S. The landscape of antibody binding in SARS-CoV-2 infection / A.S. Heffron, S.J. McIlwain, M.F. Amjadi [et al.] // *PLoS biology*. — 2021. — № 6. — DOI: 10.1371/journal.pbio.3001265.
5. Amanat F. A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans / F. Amanat, D. Stadlbauer, S. Strohmeier // *Nature Medicine*. — 2020. — № 26. — P. 1033–1036. — DOI: 10.1038/s41591-020-0913-5.
6. Walls A.C. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein / A.C. Walls, Y.J. Park, M.A. Tortorici [et al.] // *Cell*. — 2020. — № 181. — P. 281–292. — DOI: 10.1016/j.cell.2020.02.058.
7. Logunov D.Y. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia / D.Y. Logunov, I.V. Dolzhikova, O.V. Zubkova [et al.] // *Lancet*. — 2020. — № 396. — P. 887–897. — DOI: 10.1016/S0140-6736(20)31866-3.
8. Рыжиков А.Б. Простое слепое плацебо-контролируемое рандомизированное исследование безопасности, реактогенности и иммуногенности вакцины «ЭпиВакКорона» для профилактики COVID-19 на добровольцах в возрасте 18–60 лет (фаза I–II) / А.Б. Рыжиков, Е.А. Рыжиков, М.П. Богрянцева [и др.] // *Инфекция и иммунитет*. — 2021. — № 2. — С. 283–296. — DOI: 10.15789/2220-7619-ASB-1699.
9. Ерш А.В. Метод комплексной оценки гуморального иммунитета к детским вакциноуправляемым вирусным инфекциям / А.В. Ерш, А.Г. Полтавченко, С.А. Пьянков [и др.] // *Вопросы вирусологии*. — 2015. — № 60. — С. 41–45.
10. Merkuleva I.A. Comparative Immunogenicity of the Recombinant Receptor-Binding Domain of Protein S SARS-CoV-2 Obtained in Prokaryotic and Mammalian Expression Systems / I.A. Merkuleva, D.N. Shcherbakov, M.B. Borgoyakova [et al.] // *Vaccines*. — 2022. — 10. — 96 p. — DOI: 10.3390/vaccines10010096.
11. Shaprova O.N. Pre-Pandemic Cross-Reactive Immunity against SARS-CoV-2 among Siberian Populations / O.N. Shaprova, D.K. Shanshin, E.A. Kolosova [et al.] // *Antibodies*. — 2023. — 12. — 82 p. — DOI: 10.3390/antib12040082.
12. Poltavchenko A.G. The selection and optimization of the detection system for self-contained multiplexed dot-immunoassay / A.G. Poltavchenko, B.N. Zaitsev, A.V. Ersh [et al.] // *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*. — 2016. — 37. — P. 540–554. — DOI: 10.1080/15321819.2016.1174134.
13. Пат. 2686490 РФ, МПК G01N 33/543 (2006.01); G01N 2800/26 (2019.02). Набор для мультиплексного иммунохимического анализа антител и антигенов в препаратах крови / А.Г. Полтавченко, О.В. Нечитайло, П.В. Филатов [и др.]; заявитель и патентообладатель Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. — № 2018120404/С1; заявл. 2018-06-01; опубл. 2019-04-29, Бюл. № 13. — 15 с.
14. Vanshylla K. Kinetics and correlates of the neutralizing antibody response to SARS-CoV-2 infection in humans / K. Vanshylla, V. Di Cristanziano, F. Kleipass [et al.] // *Cell Host & Microbe*. — 2021. — № 29. — P. 917–929. — DOI: 10.1016/j.chom.2021.04.015.
15. Liu W. Evaluation of Nucleocapsid and Spike Protein-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Detecting Antibodies against SARS-CoV-2 / W. Liu, L. Liu, G Kou [et al.] // *Journal of Clinical Microbiology*. — 2020. — № 58. — P. e00461-20. — DOI: 10.1128/JCM.00461-20.
16. Tré-Hardy M. Analytical and clinical validation of an ELISA for specific SARS-CoV-2 IgG, IgA, and IgM antibodies / M. Tré-Hardy, A. Wilmet, I. Beukinga [et al.] // *Journal of Medical Virology*. — 2021. — № 93. — P. 803–811. — DOI: 10.1002/jmv.26303.
17. Liu L. A preliminary study on serological assay for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in 238 admitted hospital patients / L. Liu, W. Liu, Y. Zheng [et al.] // *Microbes and infection*. — 2020. — № 22. — P. 206–211. — DOI: 10.1016/j.micinf.2020.05.008.
18. Chen W. Promise and challenges in the development of COVID-19 vaccines / W. Chen // *Human vaccines & immunotherapeutics*. — 2020. — № 16. — P. 2604–2608. — DOI: 10.1080/21645515.2020.1787067.
19. Колосова Е.А. Антитела к рецептор-связывающему домену спайкового белка SARS-COV-2: связь с возрастом, пневмонией, длительностью периода после COVID-19 / Е.А. Колосова, О.Н. Шапрова, Ю.А. Никулина и др. // *Журнал инфектологии*. — 2022. — № 14. — С. 69–77. — DOI: 10.22625/2072-6732-2022-14-1-69-77.

#### Список литературы на английском языке / References in English

1. Khuroo M.S. A Race Against Time in the Middle of Death and Devastation! / M.S. Khuroo, M. Khuroo, M.S. Khuroo [et al.] // *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*. — 2020. — № 6. — P. 610–621. — DOI: 10.1016/j.jceh.2020.06.003.
2. Lahariya C. Vaccine epidemiology: A review / C. Lahariya // *Journal of Family Medicine and Primary Care*. — 2016. — № 1. — P. 7–15. — DOI: 10.4103/2249-4863.184616.
3. Maier H.J. Coronaviruses: methods and protocols / H.J. Maier, E. Bickerton. — New-York : Humana Press, 2015. — 285 p. — DOI: 10.1007/978-1-4939-2438-7.
4. Heffron A.S. The landscape of antibody binding in SARS-CoV-2 infection / A.S. Heffron, S.J. McIlwain, M.F. Amjadi [et al.] // *PLoS biology*. — 2021. — № 6. — DOI: 10.1371/journal.pbio.3001265.
5. Amanat F. A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans / F. Amanat, D. Stadlbauer, S. Strohmeier // *Nature Medicine*. — 2020. — № 26. — P. 1033–1036. — DOI: 10.1038/s41591-020-0913-5.
6. Walls A.C. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein / A.C. Walls, Y.J. Park, M.A. Tortorici [et al.] // *Cell*. — 2020. — № 181. — P. 281–292. — DOI: 10.1016/j.cell.2020.02.058.
7. Logunov D.Y. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia / D.Y. Logunov, I.V. Dolzhikova, O.V. Zubkova [et al.] // *Lancet*. — 2020. — № 396. — P. 887–897. — DOI: 10.1016/S0140-6736(20)31866-3.
8. Rizhikov A.B. Prostoje slepoe platsebo-kontroliruemoe randomizirovanoe issledovanie bezopasnosti, reaktogenosti i immunogenosti vaksini «EpiVakKorona» dlya profilaktiki COVID-19 na dobrovoltsakh v vozraste 18–60 let (faza I–II) [A

single blind, placebo-controlled randomized study of the safety, reactogenicity and immunogenicity of the “EpiVacCorona” Vaccine for the prevention of COVID-19, in volunteers aged 18–60 years (phase I–II) / A.B. Rizhikov, Ye.A. Rizhikov, M.P. Bogryantseva [et al.] // *Infektsiya i immunitet [Russian Journal of Infection and Immunity]*. — 2021. — № 2. — P. 283–296. — DOI: 10.15789/2220-7619-ASB-1699. [in Russian]

9. Yersh A.V. Metod kompleksnoi otsenki gumoralnogo immuniteta k detskim vaktzinoupravlyaemim virusnim infektsiyam [The multiplex method of estimation of humoral immunity to vaccine regulated childhood infections] / A.V. Yersh, A.G. Poltavchenko, S.A. Pyankov [et al.] // *Voprosi virusologii [Problems of Virology]*. — 2015. — № 60. — P. 41–45. [in Russian]

10. Merkuleva I.A. Comparative Immunogenicity of the Recombinant Receptor-Binding Domain of Protein S SARS-CoV-2 Obtained in Prokaryotic and Mammalian Expression Systems / I.A. Merkuleva, D.N. Shcherbakov, M.B. Borgoyakova [et al.] // *Vaccines*. — 2022. — 10. — 96 p. — DOI: 10.3390/vaccines10010096.

11. Shaprova O.N. Pre-Pandemic Cross-Reactive Immunity against SARS-CoV-2 among Siberian Populations / O.N. Shaprova, D.K. Shanshin, E.A. Kolosova [et al.] // *Antibodies*. — 2023. — 12. — 82 p. — DOI: 10.3390/antib12040082.

12. Poltavchenko A.G. The selection and optimization of the detection system for self-contained multiplexed dot-immunoassay / A.G. Poltavchenko, B.N. Zaitsev, A.V. Ersh [et al.] // *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*. — 2016. — 37. — P. 540–554. — DOI: 10.1080/15321819.2016.1174134.

13. Pat. 2686490 Russian Federation, IPC G01N 33/543 (2006.01); G01N 2800/26 (2019.02). Nabor dlya multipleksnogo immunokhimicheskogo analiza antitel i antigenov v preparatakh krovi [Kit for multiplex immunochemical analysis of antibodies and antigens in blood preparations] / A.G. Poltavchenko, O.V. Nechitailo, P.V. Filatov [et al.]; the applicant and the patentee State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Federal Inspection Agency for Consumer and Human Welfare Protection. — № 2018120404/C1; appl. 2018-06-01; publ. 2019-04-29, Bulletin № 13. — 15 p. [in Russian]

14. Vanshylla K. Kinetics and correlates of the neutralizing antibody response to SARS-CoV-2 infection in humans / K. Vanshylla, V. Di Cristanziano, F. Kleipass [et al.] // *Cell Host & Microbe*. — 2021. — № 29. — P. 917–929. — DOI: 10.1016/j.chom.2021.04.015.

15. Liu W. Evaluation of Nucleocapsid and Spike Protein-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Detecting Antibodies against SARS-CoV-2 / W. Liu, L. Liu, G. Kou [et al.] // *Journal of Clinical Microbiology*. — 2020. — № 58. — P. e00461-20. — DOI: 10.1128/JCM.00461-20.

16. Tré-Hardy M. Analytical and clinical validation of an ELISA for specific SARS-CoV-2 IgG, IgA, and IgM antibodies / M. Tré-Hardy, A. Wilmet, I. Beukinga [et al.] // *Journal of Medical Virology*. — 2021. — № 93. — P. 803–811. — DOI: 10.1002/jmv.26303.

17. Liu L. A preliminary study on serological assay for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in 238 admitted hospital patients / L. Liu, W. Liu, Y. Zheng [et al.] // *Microbes and Infection*. — 2020. — № 22. — P. 206–211. — DOI: 10.1016/j.micinf.2020.05.008.

18. Chen W. Promise and challenges in the development of COVID-19 vaccines / W. Chen // *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. — 2020. — № 16. — P. 2604–2608. — DOI: 10.1080/21645515.2020.1787067.

19. Kolosova Ye.A. Antitela k retseptor-svyazivayushchemu domenu spaikovogo belka SARS-COV-2: svyaz s vozrastom, pnevmoniei, dlitelnostyu perioda posle COVID-19 [Antibodies to the receptor-binding domain of the SARS-Cov-2 spike protein: association with age, pneumonia, duration of the period after COVID-19] / Ye.A. Kolosova, O.N. Shaprova, Yu.A. Nikulina et al. // *Zhurnal infektologii [Journal of Infectology]*. — 2022. — № 14. — P. 69–77. — DOI: 10.22625/2072-6732-2022-14-1-69-77. [in Russian]