



Сравнительный анализ уровня IgG в сыворотках крови больных COVID-19, вакцинированных «Гам-КОВИД-Вак», и здоровых доноров до пандемии

Тараканова Ю.Н.[✉], Борисова О.В., Дмитриев Д.А., Личутина М.В., Массино Ю.С., Печелюлько А.А., Сегал О.Л., Яковлева Д.А., Дмитриев А.Д.

Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова, Москва, Россия

Аннотация

Введение. Измерение концентрации сывороточного иммуноглобулина G (IgG) используется в диагностике и мониторинге многих заболеваний. Поэтому важно изучить влияние пандемии COVID-19 на уровень IgG в популяции.

Целью работы был сравнительный анализ среднего уровня сывороточного IgG в образцах крови, полученных от госпитализированных пациентов с COVID-19 ($n = 31$), здоровых доноров до начала пандемии ($n = 30$) и доноров, вакцинированных препаратом «Спутник V» (не болевших COVID-19; $n = 34$).

Материалы и методы. IgG измеряли двумя методами твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА): зарегистрированной российской системой «IgG общий-ИФА-БЕСТ» и сконструированным в лаборатории конкурентным ИФА, основанным на моноклональных биспецифических антителах к IgG человека и пероксидазе хрена.

Результаты и обсуждение. Отличий в среднем уровне сывороточного IgG в трёх группах не обнаружили (независимо от пола); оба метода дали соотносимые результаты. Однако система «IgG общий-ИФА-БЕСТ» выявила статистически значимые различия в концентрации сывороточного IgG в подгруппах пациентов-мужчин с разным уровнем антител к вирусному антигену к рецепторсвязывающему домену (receptor-binding domain, RBD): ниже и выше 400 ВАУ/мл. У 10 мужчин с RBD-антигеном < 400 ВАУ/мл содержание IgG было $14,3 \pm 4,1$ мг/мл, у 6 мужчин с RBD-антигеном > 400 ВАУ/мл — $6,9 \pm 2,7$ мг/мл.

Заключение. Средний уровень IgG в сыворотках крови, полученных до пандемии, не отличался от такового у здоровых доноров, вакцинированных препаратом «Спутник V», или пациентов, госпитализированных в связи с COVID-19. При этом обнаружено сравнительное снижение средней концентрации IgG у пациентов-мужчин с COVID-19 и уровнем анти-RBD антител > 400 ВАУ/мл. В учётом данных литературы об ассоциации снижения сывороточного IgG с тяжестью COVID-19 целесообразно сравнить выборки большего размера.

Ключевые слова: биспецифические антитела, IgG человека, COVID-19, SARS-CoV-2, антитела к RBD, иммуноглобулин G

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом НИИ вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова (протокол № 12 от 04.10.2023).

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования. Работа выполнена с использованием научного оборудования центра коллективного пользования НИИВС им. И.И. Мечникова — при финансовой поддержке проекта Российской Федерацией в лице Минобрнауки России (Соглашение № 075-15-2021-676 от 28.07.2021).

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Тараканова Ю.Н., Борисова О.В., Дмитриев Д.А., Личутина М.В., Массино Ю.С., Печелюлько А.А., Сегал О.Л., Яковлева Д.А., Дмитриев А.Д. Сравнительный анализ уровня IgG в сыворотках крови больных COVID-19, вакцинированных «Гам-КОВИД-Вак», и здоровых доноров до пандемии. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(5):319–327.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-367>

EDN: <https://www.elibrary.ru/tnzpid>

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-367>

Comparative analysis of IgG levels in blood sera from patients with COVID-19, persons vaccinated by «Gam-COVID-Vac» and healthy donors before the pandemic

Yulia N. Tarakanova[✉], Olga V. Borisova, Dmitriy A. Dmitriev, Maria V. Lichutina, Yulia S. Massino, Anastasia A. Pechelyulko, Olga L. Segal, Dinora A. Yakovleva, Alexander D. Dmitriev

I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. Serum IgG measurement is used in the diagnosis and monitoring of many diseases. Therefore, it seems important to study the impact of coronavirus pandemic on IgG levels in population and the role of this parameter in COVID-19.

The **aim** of this study was to compare mean IgG levels in sera obtained from 31 hospitalized COVID-19 patients, 30 healthy donors before pandemic and 34 donors vaccinated with «Sputnik V» (have not had COVID-19).

Materials and methods. Total IgG was quantitated by two enzyme immunoassays (EIAs): «IgG Total-ELISA-BEST» kit certificated in Russia and homemade competitive EIA utilizing bispecific monoclonal antibodies (bsAbs) against human IgG (HlgG) and horseradish peroxidase (HRP).

Results and discussion. The groups did not show differences in IgG levels (regardless of sex) with both methods giving comparable results. However, «IgG Total-ELISA-BEST» kit revealed statistically significant differences in mean serum IgG levels in subgroups of male patients depending on the levels of antibodies to viral RBD-antigen: below and above 400 BAU/ml. In the first subgroup (10 men) the mean serum IgG content was 14.3 ± 4.1 mg/mL, while in the second (6 men) — 6.9 ± 2.7 mg/mL.

Conclusion. Sera obtained before pandemic contained the same mean IgG concentrations as sera from donors vaccinated with «Sputnik V» and COVID-19 patients. The relatively decreased mean IgG concentration was found only in COVID-19 male patients with anti-RBD antibodies levels above 400 BAU/ml. In light of literature data on association of decreased serum IgG with COVID-19 severity, it would be reasonable to further compare larger groups, taking into account clinical differences. The possibility of using bsAbs for human Ig measurements by competitive EIA was demonstrated.

Keywords: COVID 19, SARS-CoV-2, anti RBD antibodies, IgG, immunoglobulin G, bispecific antibodies, enzyme immunoassay.

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera (protocol No. 12, October 4, 2023).

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding. The study was carried out on the scientific equipment of the Collective Usage Center «I.I. Mechnikov NIIVS», Moscow, Russia, with the financial support of the project by the Russian Federation represented by the Ministry of Science of Russia, Agreement No. 075-15-2021-676 dated 28.07.2021.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Tarakanova Yu.N., Borisova O.V., Dmitriev D.A., Lichutina M.V., Massino Yu.S., Pechelyulko A.A., Segal O.L., Yakovleva D.A., Dmitriev A.D. Comparative analysis of IgG levels in blood sera from patients with COVID-19, persons vaccinated by «Gam-COVID-Vac» and healthy donors before the pandemic. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2023;100(5):319–327.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-367>

EDN: <https://www.elibrary.ru/tnzpid>

Введение

Иммуноглобулин G (IgG) является доминирующим классом антител у млекопитающих, составляя около 75% общего количества этих белков в сыворотке крови. У человека обнаружены 4 подкласса IgG, отличающиеся строением тяжёлых цепей. IgG играет важную роль в гуморальном иммунитете, выполняя разнообразные биологические

функции: опсонизация микробов для их поглощения фагоцитами; антибактериальная защита через комплементзависимый лизис микробных клеток и разрушение их токсинов; индукция антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности; обеспечение иммунитета новорождённых (материнский IgG транспортируется через плаценту в кровотоки плода); ингибирование В-клеток по типу

обратной связи при завершении гуморального иммунного ответа.

Измерение иммуноглобулинов, включая IgG, используется в диагностике и мониторинге многих заболеваний, включая иммунодефициты и аутоиммунные болезни. Вместе с тем популяционный уровень IgG подвержен влиянию разных факторов. В ряде работ изучали влияние таких переменных, как пол, возраст, этническая принадлежность, географическое расположение района или страны (возможны различия, обусловленные экологическими факторами), некоторые особенности образа жизни и привычек (например, распространённость курения, потребления алкоголя и др.), на уровень IgG в соответствующих популяциях. При этом в разных исследованиях получены неоднозначные результаты. В недавнем метаобзоре была сделана попытка систематизировать данные этих исследований [1]. В частности, получено подтверждение влияния на уровень IgG курения, употребления алкоголя, приёма кортикостероидов, гипертонии и психологического стресса [1].

На протяжении последних 3 лет население всего мира, включая Россию, подвергалось влиянию неблагоприятных факторов, связанных с пандемией коронавируса SARS-CoV-2. Причём наряду с прямым патогенным действием вируса, на людей оказывали влияние и многочисленные стрессовые ситуации, сопряжённые с пандемией (вынужденная изоляция, потеря работы, страх за жизнь и здоровье близких, переутомление у медицинских работников и др.). По данным ВОЗ, в совокупности влияние указанных факторов привело к повышению распространённости тревожных расстройств и депрессии в мире на 25%¹.

В этой связи встаёт вопрос: как это могло отразиться на уровне IgG в популяциях конкретных стран? Важно также выяснить биологическое и клиническое значение такого параметра, как количество IgG в сыворотке крови, при COVID-19. Обнаруженные различия в тяжести протекания болезни (от бессимптомного до летального) и наличие постковидного синдрома побудили исследователей к поиску иммунологических маркеров, которые могли бы иметь прогностическое значение при COVID-19. Закономерно, что наряду с другими факторами обратили внимание и на такой параметр, как уровень IgG в сыворотке крови. Ранее была показана ассоциация дефицита IgG с рядом других лёгочных заболеваний [2], что создало предпосылки для предположений о наличии подобных связей и при

COVID-19. Действительно, в недавних исследованиях, независимо проведённых в нескольких странах (Германии, Турции, Греции, Иране, России), были получены результаты, указывающие на ассоциацию между сниженным уровнем IgG в сыворотке крови и тяжёлым течением COVID-19 [3–7]. Выдвинуто предположение, что этот показатель может иметь важное прогностическое значение для оценки риска тяжёлого течения болезни и летального исхода [3–6]. Какие конкретные изменения и нарушения в функционировании системы В-клеточного иммунитета и метаболизма IgG стоят за наблюдаемыми эффектами, остаётся неясным.

Целью настоящей работы было изучение уровня IgG в сыворотках крови, полученных от пациентов, госпитализированных по поводу COVID-19, и в двух разных группах сравнения, одна из которых включала здоровых доноров до начала пандемии, а вторая — доноров, прошедших полный курс вакцинации «Спутником V» и не болевших COVID-19.

Материалы и методы

Исследование проводили на 95 образцах двумя независимыми методами иммуноферментного анализа (ИФА).

В первом методе использовали зарегистрированный диагностический набор (устроенный по принципу сэндвич-метода) «IgG общий-ИФА-БЕСТ». Второй метод предполагал испытание сконструированного в лаборатории варианта конкурентного ИФА, в котором для определения IgG человека (HIgG) использовали полученные нами ранее [8–10] моноклональные антитела (МКА) с двойной специфичностью к HIgG и ферменту пероксидаза хрена (*horseradish peroxidase*, HRP). Считается, что биспецифические антитела (БИАТ) могут иметь ряд преимуществ перед обычными МКА при применении в ИФА и иммуногистохимии [11]. Например, БИАТ освобождают от необходимости использовать детектирующие (меченые) антитела, конъюгированные с HRP или другими ферментами, что может давать меньший фон [11]. Ранее мы показали эффективность указанных БИАТ для выявления специфических антител в твердофазном ИФА на примере определения антител к вирусу иммунодефицита человека [10], а в настоящей работе была испытана возможность использования этих реагентов в формате конкурентного ИФА.

Материалы и реактивы

В работе использовали разборные 96-луночные планшеты из полистирола «MaxiSorp» («Nunc»), BrCN-сефарозу («Farmacia»), раствор тетраметилбензидина (ТМБ) («Диагностические системы»), диагностический набор «IgG общий-ИФА-БЕСТ» («Вектор-Бест»), IgG из сыворотки крови человека («Sigma-Aldrich»), HRP и прочие реактивы («Sigma»).

¹ ВОЗ. На фоне пандемии COVID-19 во всём мире распространённость тревожных расстройств и депрессии выросла на 25%. 02.03.2022. <https://www.who.int/ru/news/item/02-03-2022-covid-19-pandemic-triggers-25-increase-in-prevalence-of-anxiety-and-depression-worldwide>

Образцы сывороток крови

Сыворотки здоровых доноров и пациентов, госпитализированных с COVID-19 (с известной концентрацией вирусспецифических антител (IgG) к рецепторсвязывающему домену (receptor-binding domain, RBD) S-белка SARS-CoV-2, определённой с помощью тест-системы «ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G-количественный»), были предоставлены из коллекции НПО «Диагностические системы». Все обследованные подписывали информированное согласие на участие в исследовании. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом НИИ вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова (протокол № 12 от 04.10.2023).

Получение моноклональных БИАТ

В работе использовали полученные нами ранее мышинные моноклональные БИАТ 75/36 (БИАТ 75/36), способные одновременно связываться с двумя антигенами: HRP и HlgG. БИАТ 75/36 являются продуктами гибридной гибридомы (тетрадомы), образованной путём слияния двух родительских клеточных линий: гибридомы, продуцирующей анти-HRP МКА 36F9, и гибридомы, секретирующей анти-HlgG МКА 75G5. Конструирование указанной тетрадомы описано нами ранее [9–11]. БИАТ 75/36 относились к подклассу IgG1 мыши, как и оба родительских МКА.

Очистка антител

БИАТ 75/36 выделяли из асцитов, полученных после инокуляции мышей тетрадомными клетками. Поскольку клетки тетрадомы продуцируют 3 вида иммунологически активных антител (анти-HlgG, анти-HRP и БИАТ), образованных в результате комбинации лёгких и тяжёлых цепей родительских МКА, для очистки БИАТ использовали две последовательные аффинные хроматографии: на HlgG-сефарозе и HRP-сефарозе [8–10]. Чистоту препарата БИАТ контролировали с помощью SDS-электрофореза в 12,5% акриламидном геле [12].

Определение антигенсвязывающей активности моноклональных БИАТ

Способность аффинно-очищенных БИАТ одновременно связывать два антигена подтверждали с помощью ИФА [8]. Для этого поверхность 96-луночных полистироловых планшетов насыщали HlgG и инкубировали с разведениями БИАТ в присутствии HRP. Иммунные комплексы выявляли с помощью ТМБ.

Определение концентрации белков

Концентрацию белка определяли по методу Лоури с использованием в качестве стандарта бычьего сывороточного альбумина. Стандарт готовили исходя из того, что для 1% раствора альбу-

мина $A_{280\text{ нм}}^{1\text{ см}} = 7,6$ [13]. Концентрацию очищенных белков определяли, полагая, что для 1% раствора мышинных антител $A_{280\text{ нм}}^{1\text{ см}} = 14$ [13]; для 1% раствора очищенной пероксидазы $A_{403\text{ нм}}^{1\text{ см}} = 22,75$ и $A_{280\text{ нм}}^{1\text{ см}} = 7,3$ [12].

Определение HlgG в сыворотке крови

Содержание HlgG в сыворотке крови определяли двумя методами. В первом использовали набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации IgG в сыворотке крови «IgG общий-ИФА-БЕСТ». Метод основан на двустадийном «сэндвич»-варианте ИФА с применением МКА к HlgG.

Кроме того, в тех же сыворотках содержание HlgG определяли с помощью разработанного нами конкурентного метода, основанного на использовании БИАТ к HlgG и HRP.

Лунки полистироловых планшетов насыщали раствором HlgG (по 100 мкл на лунку) в 50 мМ Na-карбонатном буфере pH 9,5 в течение ночи при комнатной температуре. После насыщения антигеном лунки несколько раз отмывали 25 мМ Na-фосфатным буфером pH 7,5, содержащим 150 мМ NaCl, 0,05% Твина-20. Затем в каждую лунку вносили по 20 мкл сыворотки человека, предварительно разведённой в 1000 раз в 25 мМ Na-фосфатном буфере pH 7,5, содержащем 15 мМ NaCl, 0,05% Твина-20 и 0,2% бычьего сывороточного альбумина (ИФА-буфер), а также 100 мкл раствора, содержащего 600 нг/мл БИАТ и 2 мкг/мл HRP в указанном ИФА-буфере. Планшеты инкубировали 1 ч при 37°C, отмывали и окрашивали раствором ТМБ в течение 15 мин при комнатной температуре, реакцию останавливали 1 М раствором H₂SO₄ (50 мкл на лунку). Оптическую плотность определяли с помощью спектрофотометра при 450 нм. Концентрацию IgG рассчитывали с помощью калибровочной кривой, для построения которой использовали стандарты HlgG в концентрациях 0; 1,4; 2,8; 6; 12; 24 мг/мл.

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета программ «Statistica for Windows 12.0». Количественные переменные представляли в виде среднего арифметического (\bar{X}) со среднеквадратическим отклонением (SD). Полученные данные проверяли на соответствие закону нормального распределения (W-критерий Шапиро–Уилка). Значимость различий между группами определяли с помощью U-критерия Манна–Уитни для независимых групп. Различия считали достоверными при $p < 0,05$. Корреляцию рассчитывали по методу Пирсона.

Результаты

В настоящее исследование были включены 30 здоровых доноров крови (образцы крови были

получены до пандемии; 1-я группа), 34 здоровых донора, вакцинированных препаратом «Спутник V» (не болевших COVID-19; 2-я группа), и 31 пациент, имевший выписку с установленным клиническим диагнозом COVID-19 и подтверждением диагноза методом ПЦР (пациенты были госпитализированы в период с марта по ноябрь 2021 г., с преобладанием геноварианта Delta вируса SARS-CoV-2; 3-я группа). Возраст здоровых доноров и пациентов варьировал от 18 до 85 лет. Процедуру измерения IgG в сыворотке крови с помощью диагностического набора «IgG общий-ИФА-БЕСТ» проводили согласно инструкции производителя. Кроме того, в тех же сыворотках содержание IgG определяли с помощью разработанного нами конкурентного метода, основанного на использовании БИАТ 75/36, специфичных к HIgG и HRP. БИАТ, представляющие собой один из продуктов секреции гибридной гибридомы (тетрадомы), ранее были нами детально охарактеризованы в отношении их антигенсвязывающих свойств с помощью ИФА, радиоиммунного анализа и биосенсора [8, 9].

БИАТ 75/36 обладают высокой аффинностью по отношению к обоим антигенам: равновесная константа ассоциации (K_a) для связывания БИАТ с иммобилизованным на твердой фазе hIgG составила $\sim 2,6 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ [9], а с HRP в растворе $\sim 7 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ [15]. Специфичность БИАТ (отсутствие реакции с другими классами иммуноглобулинов) была подтверждена с помощью ИФА. Для этого поверхность 96-луночных полистироловых планшетов насыщали иммуноглобулинами человека классов А, М, Е и G и инкубировали с разведениями БИАТ в присутствии HRP. Иммунные комплексы выявляли с помощью ТМБ. В результате иммунные комплексы образовались только в лунках с иммобилизованным HIgG, а с IgA, IgM и IgE человека БИАТ 75/36 не реагировали (данные не представлены). При использовании конкурентного метода в качестве от-

Таблица 1. Концентрация IgG в сыворотке крови госпитализированных с COVID-19 пациентов и в группах сравнения, $\bar{X} \pm \text{SD}$

Table 1. The mean concentrations of serum IgG in COVID-19 patients and in control groups, $\bar{X} \pm \text{SD}$

Группа Group	IgG, мг/мл mg/ml	
	«IgG общий-ИФА-БЕСТ» «IgG Total-ELISA-BEST»	конкурентный ИФА (БИАТ) bsAbs based EIA
1 (n = 30)	10,1 ± 6,6	10,4 ± 3,3
2 (n = 31)	11,5 ± 6,8	10,8 ± 5,8
3 (n = 34)	11,7 ± 5,6	9,8 ± 4,2

Примечание. Все сыворотки пациентов содержали вирусспецифические анти-RBD-антитела.

Note. All patient sera contained virus-specific anti-RBD antibodies.

рицательного контроля использовали вытеснение IgA, IgM и IgE. В качестве положительного контроля служили измерения, полученные с помощью тест-системы «IgG общий-ИФА-БЕСТ».

В табл. 1 представлены результаты определения уровня IgG двумя описанными выше методами в образцах сывороток доноров 3 групп (у больных кровь была взята не ранее 10 дней и не позднее 30 дней после постановки диагноза). Статистически достоверных различий между группами не выявлено. Корреляционная связь с результатами, полученными с помощью конкурентного ИФА, использующего БИАТ, была определена как средняя ($r = 0,52$). При этом концентрация IgG в образцах сыворотки крови пациентов и доноров из групп сравнения варьировала в широком диапазоне: приблизительно от 2,5 до 20 мг/мл (данные не приведены). Дальнейшее разделение здоровых доноров и пациентов на три возрастные группы (18–44, 45–64, 65 лет и старше) также не выявило статистически достоверных различий в концентрации IgG.

Разделение образцов сыворотки на группы в зависимости от пола здоровых доноров и пациен-

Таблица 2. Концентрация IgG в сыворотке крови госпитализированных с COVID-19 пациентов и в группах сравнения при разделении по полу, $\bar{X} \pm \text{SD}$

Table 2. The mean concentrations of serum IgG in COVID-19 patients and in control groups depending on sex, $\bar{X} \pm \text{SD}$

Группа Group	Пол Sex	n	IgG, мг/мл mg/ml	
			«IgG общий-ИФА-Вектор-БЕСТ» «IgG Total-ELISA-BEST»	конкурентный ИФА (БИАТ) bsAbs-based EIA
1	Мужчины Men	16	11,3 ± 5,2	10,8 ± 2,2
	Женщины Women	14	8,8 ± 4,2	9,8 ± 2,7
2	Мужчины Men	16	11,2 ± 4,4	10,2 ± 2,9
	Женщины Women	15	8,7 ± 3,6	8,3 ± 4,4
3	Мужчины Men	13	10,0 ± 3,2	8,8 ± 3,5
	Женщины Women	21	11,8 ± 3,5	10,4 ± 2,5

Примечание. Все сыворотки пациентов содержали вирусспецифические анти-RBD-антитела.

Note. All patient sera contained virus-specific anti-RBD antibodies.

тов (табл. 2) не выявило различий в среднем уровне IgG между группами. Уровень IgG у вакцинированных доноров не зависел и от времени, прошедшего от момента вакцинации до забора крови, в исследованный период от 1 до 2 мес (табл. 3).

Пациентов (3-я группа) дополнительно разделили на две подгруппы в зависимости от уровня специфических антител к RBD-антигену SARS-CoV-2. В одну подгруппу отнесли пациентов с уровнем анти-RBD-антител < 400 BAU/мл (значения варьировали у разных пациентов от 18 до 365 BAU/мл, возраст 27–85 лет), а в другую — с уровнем анти-RBD > 400 BAU/мл (возраст 36–70 лет). Кроме того, каждую группу делили по полу. Обнаружено, что в подгруппе из 10 пациентов-мужчин (средний возраст 59,5 года), имевших более низкий уровень специфических антител к RBD-антигену, концентрация IgG при измерении системой «IgG общий-ИФА-БЕСТ» в среднем составляла $14,3 \pm 4,1$ мг/мл, тогда как у 6 мужчин (средний возраст 54 года) с уровнем анти-RBD-антител > 400 BAU/мл концентрация IgG составляла в среднем всего $6,9 \pm 2,7$ мг/мл (табл. 4). Эти различия были статистически значимы. Достоверных различий у пациентов-женщин, разделённых на подгруппы по этому показателю, не выявлено. Сходная тенденция наблюдалась и при измерениях в тех же подгруп-

пах с помощью конкурентного ИФА: среднее значение концентрации IgG для пациентов-мужчин с уровнем анти-RBD-антител > 400 BAU составляло $6,9 \pm 3,4$ мг/мл, в то время как у мужчин с меньшим уровнем специфических антител — $11,2 \pm 3,9$ мг/мл (табл. 4), однако наблюдаемые различия между группами пациентов-мужчин в этом случае не достигли статистически значимого уровня.

Обсуждение

Результаты проведённых нами измерений показали, что средний уровень IgG в сыворотках крови доноров (1-я и 2-я группы) и пациентов (3-я группа) не различался. Отсутствие различий сохранялось и при разделении выборок на подгруппы по возрасту, полу и времени, прошедшему от начала вакцинации (для здоровых доноров) и взятия крови. Однако статистически значимое снижение среднего значения количества IgG в сыворотке крови обнаружили (при измерении тест-системой «IgG общий-ИФА-БЕСТ») в небольшой группе, которую составляли мужчины, болевшие COVID-19 и имевшие высокий уровень специфических антител к вирусному RBD-антигену в крови (> 400 BAU/мл). Средний уровень IgG в этой группе был примерно в 2 раза ниже такового у пациентов-мужчин с меньшим уровнем анти-RBD-антител. Можно предполо-

Таблица 3. Концентрация IgG в сыворотке крови доноров в разные сроки после вакцинации препаратом «Спутник V», $\bar{X} \pm SD$

Table 3. The mean concentrations of serum IgG in vaccinated donors, which gave blood at different time points after the last immunization with «Sputnik V», $\bar{X} \pm SD$

Время забора крови после вакцинации Time from vaccination to blood donation	n	IgG, мг/мл mg/ml	
		«IgG общий-ИФА-Вектор-БЕСТ» «IgG Total-ELISA-BEST»	конкурентный ИФА (БИАТ) bsAbs-based EIA
В течение 1 мес Within first month	6	$9,3 \pm 3,7$	$8,1 \pm 5,6$
Через 1 мес 1 month after	19	$11,7 \pm 4,8$	$10,5 \pm 3,4$
Через 2 мес 2 months after	9	$10,3 \pm 5,8$	$9,2 \pm 4,7$

Таблица 4. Концентрация IgG в сыворотке крови госпитализированных с COVID-19 пациентов с различным уровнем антител к RBD-антигену SARS-CoV-2, $\bar{X} \pm SD$

Table 4. The mean concentrations of serum IgG in hospitalized COVID-19 patients with different levels of anti-RBD antigen antibodies, depending on sex, $\bar{X} \pm SD$

Уровень анти-RBD-антител в сыворотке крови пациентов, BAU/мл Anti-RBD Abs serum level in hospitalized COVID-19 patients, BAU/ml	Пол Sex	n	IgG, мг/мл mg/ml	
			«IgG общий-ИФА-Вектор-БЕСТ» «IgG Total-ELISA-BEST»	конкурентный ИФА (БИАТ) bsAbs-based EIA
18–350 (< 400)	Мужчины Men	10	$14,3 \pm 4,1$	$11,2 \pm 3,9$
	Женщины Women	11	$8,4 \pm 3,7$	$8,1 \pm 3,4$
	Всего Total	21	$11,2 \pm 4,8$	$9,6 \pm 3,9$
≥ 400	Мужчины Men	6	$6,9 \pm 2,7$	$6,9 \pm 3,4$
	Женщины Women	4	$9,4 \pm 3,8$	$8,8 \pm 2,3$
	Всего Total	10	$7,9 \pm 3,2$	$7,7 \pm 3,1$

жить, что высокий уровень антивирусных антител у мужчин данной подгруппы обеспечивался специфическим клоном (или клонами) В-лимфоцитов, несмотря на сопутствующее снижение общего уровня IgG.

В связи с имеющимися данными о возможном прогностическом значении понижения уровня IgG в отношении более тяжёлого протекания COVID-19 [3–6, 16] это наблюдение (имеющее сейчас только предварительный характер в силу маленьких размеров выборок) заслуживает, на наш взгляд, дальнейшего исследования на большем числе пациентов и при сопоставлении с клиническими данными. В частности, из-за их отсутствия невозможно судить о том, насколько выявленная нами подгруппа пациентов-мужчин с высоким уровнем антител к вирусному RBD-антигену и пониженным уровнем IgG соответствует по своим клиническим особенностям группам со сниженным уровнем IgG, описанным в работах других авторов, где проводили сравнение пациентов с разной тяжестью COVID-19 (причём без дифференциации по тяжести заболевания по клиническим критериям, только при общем сравнении IgG у «больных» и «здоровых», различия не выявлялись, как и в нашей работе) [3, 7]. Опираясь на данные литературы, можно только отметить, что при тяжёлом течении COVID-19 часто наблюдаются высокий уровень антител к вирусным антигенам [17] и лимфоцитопения со снижением числа CD4⁺-Т-хелперов, цитотоксических CD8⁺-Т-клеток и естественных киллеров [7, 18]. В отношении В-клеток картина сложнее: с одной стороны, сообщалось об уменьшении количества В-клеток при тяжёлом течении COVID-19 [3, 4, 18], в том числе при одновременном снижении уровня IgG [3, 4]. Однако в другом исследовании таких изменений в количестве В-клеток не регистрировали, несмотря на снижение уровня IgG и IgM (по сравнению с группами пациентов с заболеванием лёгкой и средней тяжести и контрольной группой) [7]; а в некоторых работах, наоборот, обнаруживали некоторое возрастание количества В-лимфоцитов при тяжёлом течении заболевания [19]. Важно, что при тяжёлом протекании COVID-19 неоднократно обнаруживали изменения состава популяции В-лимфоцитов с возрастанием числа аномальных В-клеток памяти и плазмочитов, образованных в результате дифференцировки по экстрафолликулярному пути [17, 20, 21]. Предполагается, что аномальные В-клетки, В-клеточные рецепторы которых не подвергались гипермутагенезу и селекции на аффинность в фолликулярных зародышевых центрах, могут быть источником антител с уменьшенной аффинностью к вирусным антигенам и с пониженной нейтрализующей способностью, обуславливая более тяжёлое протекание болезни; кроме того, они могут усиливать процессы воспаления [17, 20, 21].

Следует также добавить, что мы не обнаружи-

ли аналогичного снижения уровня IgG в подгруппе женщин с высоким (> 400 ВАУ/мл) уровнем антивирусных антител. Небольшие размеры выборок, как и отсутствие у нас дополнительных клинических данных, не позволяет делать предположений о причинах указанных различий по полу, хотя в ряде исследований показано, что у мужчин чаще, чем у женщин, наблюдается тяжёлое течение COVID-19, причём для них характерен и более высокий уровень антител к коронавирусным антигенам, по-видимому сопряжённый с нарушением регуляции иммунного ответа со сдвигом в сторону экстрафолликулярной (т.е. вне зародышевых центров) дифференцировки В-клеток [21]. Важное значение может иметь и анализ изменений уровня разных подтипов IgG и других классов иммуноглобулинов при COVID-19. Так, наблюдали определённые корреляции между изменениями в соотношениях некоторых подклассов IgG и характером протекания COVID-19 [16, 22, 23]. Например, обнаружена связь между увеличением уровня IgG3 (при отсутствии изменения суммарного содержания всех подклассов сывороточного IgG) и повышенным риском развития постковидного синдрома [23]. Показана корреляция между тяжёлым протеканием COVID-19, пониженным уровнем IgG2 и лимфоцитопенией [22]. Предполагается, что из-за нарушения регуляции продукции цитокинов переключение классов антител при COVID-19 может происходить с преимущественным образованием IgG1 и IgG3 при дефиците IgG2 [22]. В некоторых работах наблюдали связь между пониженным уровнем сывороточного IgA и более тяжёлым протеканием болезни [6], в то время как по другим наблюдениям, наоборот, тяжёлое течение COVID-19 сопровождалось повышением уровня IgA [24]. Вместе с тем в недавно проведённом исследовании не было получено подтверждения, что уровни IgG и IgA могут служить прогностическими критериями в отношении неблагоприятного протекания COVID-19 [25]. Однако авторы указанной работы, как и другие исследователи [3, 17], подчёркивают, что на результаты могут влиять различия в изученных выборках, в частности, особенности терапии больных (например, назначение кортикостероидных препаратов, способных снижать число лимфоцитов и уровень иммуноглобулинов, и др.).

В настоящей работе уровень IgG в образцах сыворотки крови человека измеряли с помощью двух различных методов твёрдофазного ИФА: «IgG общий-ИФА-БЕСТ» (устроен по принципу сэндвич-метода) и внутрилабораторной тест-системой на основе БИАТ. Оба метода дали в целом сопоставимые результаты, хотя, например, различия в среднем уровне сывороточного IgG между группами пациентов-мужчин с меньшим и большим уровнями анти-RBD-антител достигали статистической значимости только при измерении с помощью систе-

мы «IgG общий-ИФА-БЕСТ» (табл. 4). Ранее нами было показано, что БИАТ 75/36 с двойной специфичностью к НIgG и HRP можно использовать в твердофазном неконкурентном ИФА для определения специфических антител к вирусу иммунодефицита человека [10]. Полученные в настоящей работе данные показывают, что БИАТ 75/36 можно также применять для определения НIgG в формате конкурентного твердофазного ИФА. При этом, в отличие от сэндвич-метода, описанный конкурентный метод позволяет проводить измерение IgG в сыворотке крови с использованием всего одного антитела (БИАТ 75/36) и без применения конъюгатов вторых (детектирующих) антител с HRP.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- Khan S.R., van der Burgh A.C., Peeters R.P., et al. Determinants of serum immunoglobulin levels: a systematic review and meta-analysis. *Front. Immunol.* 2021;12:664526. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.664526>
- Чучалин А.Г. Болезни, ассоциированные с иммуноглобулином G. *Терапевтический архив.* 2018;90(3):4–9. Chuchalin A.G. Disease associated with immunoglobulin G. *Therapeutic Archive.* 2018;90(3):4–9. DOI: <https://doi.org/10.26442/terarkh20189034-9> EDN: <https://elibrary.ru/ytvpaq>
- Husain-Syed F., Vadász I., Wilhelm J., et al. Immunoglobulin deficiency as an indicator of disease severity in patients with COVID-19. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2021;320(4):L590–9. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajplung.00359.2020>
- Çölkesen F., Kepenek K.E., Vatansav H., et al. Memory B cells and serum immunoglobulins are associated with disease severity and mortality in patients with COVID-19. *Postgrad. Med. J.* 2022;98(1164):765–71. DOI: <https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2021-140540>
- Vrettou C.S., Vassiliou A.G., Kakkas I., et al. Low admission immunoglobulin G levels predict poor outcome in patients with mild-to-critical COVID-19: A prospective, single-center study. *J. Epidemiol. Glob. Health.* 2021;11(4):338–43. DOI: <https://doi.org/10.1007/s44197-021-00002-8>
- Barzegar-Amini M., Mahmoudi M., Dadgarmoghaddam M., et al. Comparison of serum total IgA levels in severe and mild COVID-19 patients and control group. *J. Clin. Immunol.* 2022;42(1):10–8. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10875-021-01149-6>
- Фролова Е.В., Филиппова Л.В., Учеваткина А.В. и др. Иммунологические особенности пациентов с COVID-19 в зависимости от степени тяжести заболевания. *Проблемы медицинской микологии.* 2021;23(1):3–13. Frolova E.V., Filipova L.V., Uchevatkina A.V., et al. Immunological features of patients with COVID-19 depending on the severity of the disease. *Problems in Medical Mycology.* 2021;23(1):3–13. DOI: <https://doi.org/10.24412/1999-6780-2021-1-3-13> EDN: <https://elibrary.ru/jlyvvnq>
- Dmitriev D.A., Massino Y.S., Segal O.L., et al. The comparison of the ability of monoclonal antibodies directed to different proteins (human IgG, human myoglobin and HRP) and bispecific antibodies derived thereof to bind antigens immobilized on a surface of a solid phase. *Clin. Chim. Acta.* 2001;309(1):57–71. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(01\)00531-9](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(01)00531-9)
- Dmitriev D.A., Massino Y.S., Segal O.L., et al. Analysis of the binding of bispecific monoclonal antibodies with immobilized antigens (human IgG and horseradish peroxidase) using a resonant mirror biosensor. *J. Immunol. Methods.* 2002;261(1-2):103–18. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(01\)00558-0](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(01)00558-0)
- Массино Ю.С., Суханова Л.Л., Кизим Е.А. и др. Получение бифункциональных антител к IgG человека и пероксидазе хрена и их использование для тестирования антител к ВИЧ. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 1994;117(3):291–3. Massino Y.S., Sukhanova L.L., Kizim E.A., et al. Production of bifunctional monoclonal antibodies to human IgG and horseradish peroxidase and their utilization for testing anti-HIV antibodies. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 1994;117(3): 294–6. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02444168>
- Parashar A., Sarkar S., Ganguly A., et al. Bispecific antibodies for diagnostic applications. In: Kontermann R., ed. *Bispecific Antibodies.* Berlin, Heidelberg;2011:349–67. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-642-20910-9_19
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680–5. DOI: <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Fasman G.D., ed. *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology. Section A: Proteins. Volume 2.* Cleveland;1976:383.
- Ishikawa E., Imagawa M., Hashida S., et al. Enzyme-labeling of antibodies and their fragments for enzyme immunoassay and immunohistochemical staining. *J. Immunoassay.* 1983;4(3):209–327. DOI: <https://doi.org/10.1080/15321818308057011>
- Смирнова М.Б., Дергунова Н.Н., Кизим Е.А. и др. Изучение антигенсвязывающих свойств биспецифических моноклональных антител. *Биохимия.* 1997;62(1):51–9. Smirnova M.B., Dergunova N.N., Kizim E.A., et al. Study of antigen-binding properties of bispecific antibodies. *Biochemistry.* 1997;62(1):41–51.
- Wasiluk T., Sredzinska M., Rogowska A., et al. Analysis of the IgG subclass profile and IgG sum-total discrepancy in COVID-19 convalescent plasma donors: A single-centre prospective cohort study. *Transfus. Apher. Sci.* 2022;62(1):103527. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.transci.2022.103527>
- Garcia-Beltran W.F., Lam E.C., Astudillo M.G., et al. COVID-19-neutralizing antibodies predict disease severity and survival. *Cell.* 2021;184(2):476–88.e11. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.12.015>
- Lagadinou M., Zareifopoulos N., Gkentzi D., et al. Alterations in lymphocyte subsets and monocytes in patients diagnosed with SARS-CoV-2 pneumonia: a mini review of the literature. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2021;25(15):5057–62. DOI: https://doi.org/10.26355/eurrev_202108_26463
- Sosa-Hernández V.A., Torres-Ruiz J., Cervantes-Díaz R., et al. B cell subsets as severity-associated signatures in COVID-19 patients. *Front. Immunol.* 2020;11:611004. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.611004>
- Wildner N.H., Ahmadi P., Schulte S., et al. B cell analysis in SARS-CoV-2 versus malaria: Increased frequencies of plasmablasts and atypical memory B cells in COVID-19. *J. Leukoc. Biol.* 2021;109(1):77–90. DOI: <https://doi.org/10.1002/JLB.5COVA0620-370RR>
- Søndergaard J.N., Tulyeu J., Edahiro R., et al. A sex-biased imbalance between Tfr, Tph, and atypical B cells determines antibody responses in COVID-19 patients. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2023;120(4):e2217902120. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.2217902120>
- Taban E.M., Tintinger G.R., Joseph D., et al. Lymphopenia and IgG2 subclass deficiency in patients with severe COVID-19 pneumonia. *Afr. J. Thorac Crit. Care Med.* 2021;27(2):41–6. DOI: <https://doi.org/10.7196/AJTCCM.2021.v27i2.134>
- Cervia C., Zurbuchen Y., Taeschler P., et al. Immunoglobulin signature predicts risk of post-acute COVID-19 syndrome. *Nat.*

- Commun.* 2022;13(1):446.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27797-1>
24. Hasan A.O., Bomze D., Risch L., et al. Severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) is associated with elevated serum immunoglobulin (Ig) A and antiphospholipid IgA antibodies. *Clin. Infect. Dis.* 2021;73(9):e2869–74.
DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1496>

Информация об авторах

Тараканова Юлия Николаевна[✉] — к.б.н., зав. лаб. диагностики вирусных инфекций отдела вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, ytarakanova@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3226-5989>

Борисова Ольга Васильевна — к.х.н., зав. лаб. медицинской биотехнологии отдела вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7664-2945>

Дмитриев Дмитрий Александрович — к.б.н., с.н.с. лаб. диагностики вирусных инфекций отдела вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7397-6499>

Личутина Мария Владимировна — м.н.с. лаб. диагностики вирусных инфекций отдела вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9579-7865>

Массино Юлия Сергеевна — к.б.н., с.н.с. лаб. диагностики вирусных инфекций отдела вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1165-2712>

Печелюшко Анастасия Александровна — н.с. лаб. диагностики вирусных инфекций отдела вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6628-1576>

Сегал Ольга Леонидовна — к.б.н., с.н.с. лаб. диагностики вирусных инфекций отдела вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6621-236X>

Яковлева Динора Абдуллаевна — к.м.н., с.н.с. лаб. диагностики вирусных инфекций отдела вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8771-4177>

Дмитриев Александр Дмитриевич — д.б.н., в.н.с. лаб. диагностики вирусных инфекций отдела вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1132-3708>

Участие авторов. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 20.07.2023;
принята к публикации 11.10.2023;
опубликована 28.10.2023

25. Montrucchio G., Sales G., Balzani E., et al. Effectiveness of mid-regional pro-adrenomedullin, compared to other biomarkers (including lymphocyte subpopulations and immunoglobulins), as a prognostic biomarker in COVID-19 critically ill patients: New evidence from a 15-month observational prospective study. *Front. Med. (Lausanne)*. 2023;10:1122367.
DOI: <https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1122367>

Information about the authors

Yulia N. Tarakanova[✉] — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of diagnostics of viral infections, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, ytarakanova@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3226-5989>

Olga V. Borisova — Cand. Sci. (Chem.), Head, Laboratory of medical biotechnology, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7664-2945>

Dmitriy A. Dmitriev — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of diagnostics of viral infections, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7397-6499>

Maria V. Lichutina — junior researcher, Laboratory of diagnostics of viral infections, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9579-7865>

Yulia S. Massino — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of diagnostics of viral infections, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1165-2712>

Anastasia A. Pechelyulko — researcher, Laboratory of diagnostics of viral infections, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6628-1576>

Olga L. Segal — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of diagnostics of viral infections, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6621-236X>

Dinora A. Yakovleva — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Laboratory of diagnostics of viral infections, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8771-4177>

Alexander D. Dmitriev — D. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of diagnostics of viral infections, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1132-3708>

Author contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

The article was submitted 20.07.2023;
accepted for publication 11.10.2023;
published 28.10.2023