

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2025

Черепович Б.С.¹, Кудряшова А.М.¹, Мануйлов В.А.², Свитич О.А.¹, Борисова О.В.¹

РАЗРАБОТКА И ОЦЕНКА ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ИММУНОФЕРМЕНТНОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ, БЛОКИРУЮЩИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ RBD SARS-COV-2 И ACE₂



https://elibrary.ru/fsetbk

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», 115088, Москва, Россия;

²ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ, 123098, Москва, Россия

Цель: изучение функциональных характеристик иммуноферментного анализа (ИФА) определения антител, блокирующих взаимодействие RBD и ACE₂ (суррогатный вируснейтрализующий анализ, sVNT).

Материал и методы. Исследовали 374 образца сывороток крови, полученных от добровольцев с известным анамнезом в 2017-2020 гг., 97 образцов, полученных в 2021 году от пациентов, переболевших и иммунизированных вакцинным препаратом «Гам-КОВИД-Вак». Образцы сывороток крови анализировали: 1) ИФА определения антител класса IgG к RBD SARS-CoV-2; 2) в реакции биологической нейтрализации вируса SARS-CoV-2 в культуре клеток; 3) в суррогатном вируснейтрализующем тесте.

Результаты Параметры sVNT анализа оптимизированы на двух выборках из 397 (2017-2020 гг.) и 97 (2021 г.) образцов добровольцев. При валидации метода оценка порогового значения, позволяющая дифференцировать образцы, содержащие антитела, блокирующие взаимодействие RBD и ACE₂, от не содержащих антител, определялась двумя статистическими методами. ROC-методом раздельно проанализированы образцы сывороток крови добровольцев с постинфекционным и гибридным иммунитетом. Во всех случаях получены близкие (31,45-31,65%) пороговые значения и высокие диагностические характеристики. Аналитическая чувствительность, определённая путём титрования международного стандартного образца First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin (human) в sVNT, составила 20-22 ВАУ/мл. При изучении корреляционной связи между результатами sVNT и количеством IgG антител к RBD SARS-CoV-2 коэффициент Спирмена составил 0,8979 (ДИ 95%:0,8425-0,9345, $p < 0,001$). При определении процентной согласованности результатов, полученных в sVNT с титром нейтрализующих антител, полученным в вирусологической реакции нейтрализации, коэффициент Спирмена составил 0,8187 (ДИ 95%:0,7641-0,8616, $p < 0,001$).

Заключение. Ключевую роль во взаимодействии вируса с клеткой человека в процессе инфицирования последней играет образование распознающего комплекса между рецептор-связывающим доменом, расположенным на субъединице S1 белка Spike SARS-CoV-2 и трансмембранным белком человека, ангиотензин-превращающим ферментом 2 типа. Поэтому иммунологические средства определения антител, специфически блокирующие взаимодействие между RBD и ACE₂, могут служить адекватной альтернативой РБН для определения протективности приобретённого гуморального иммунитета. Был разработан sVNT метод, позволяющий выявлять антитела, блокирующие взаимодействие RBD и ACE₂, простым, безопасным и быстрым способом с высокой специфичностью и чувствительностью.

Ключевые слова: иммуноферментный анализ; суррогатный вируснейтрализующий анализ; RBD; SARS-CoV-2; ACE₂; реакция биологической нейтрализации; вируснейтрализующие антитела

Для цитирования: Черепович Б.С., Кудряшова А.М., Мануйлов В.А., Свитич О.А., Борисова О.В. Разработка и оценка диагностических характеристик иммуноферментного метода определения антител, блокирующих взаимодействие RBD SARS-CoV-2 и ACE₂. Клиническая лабораторная диагностика. 2025; 70 (2): 119-125.

DOI: https://doi.org/10.51620/0869-2084-2025-70-2-119-125

EDN: FSETBK

Для корреспонденции: Черепович Богдан Сергеевич, мл. науч. сотр. лаборатории генетики РНК-содержащих вирусов; e-mail: bogdancherepovich@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 15.10.2024

Принята к печати 22.10.2024

Опубликовано 25.01.2025

Cherepovich B.S.¹, Kudryashova A.M.¹, Manuilov V.A.², Svitich O.A.¹, Borisova O.V.¹

DEVELOPMENT AND EVALUATION OF DIAGNOSTIC CHARACTERISTICS OF AN ENZYME IMMUNOASSAY FOR THE DETERMINATION OF ANTIBODIES BLOCKING THE INTERACTION OF RBD SARS-COV-2 AND ACE₂

¹I. Mechnikov research institute of vaccines and sera, 115088, Moscow, Russia;

²N. Gamaleya research center of epidemiology and microbiology, 123098, Moscow, Russia

The purpose of this work was to study the functional characteristics of an enzyme immunoassay for the determination of antibodies blocking the interaction of RBD and ACE₂ (surrogate virus neutralizing analysis, sVNT).

Material and methods. 374 blood serum samples obtained from volunteers with a known medical history in 2017-2020, 97 samples obtained in 2021 from patients who had been ill and immunized with the vaccine drug «Gam-COVID-Vac». Blood serum samples were analyzed: 1) enzyme immunoassay for the determination of antibodies of class G to RBD SARS-CoV-2, 2) in the neutralization reaction of the SARS-CoV-2 virus in cell culture 3) in a surrogate virus neutralizing test.

Results. The sVNT analysis parameters were optimized on 2 samples from 397 (2017-2020) and 97 (2021) samples of volunteers. During the validation of the method, the threshold value estimation, which makes it possible to differentiate samples containing antibodies blocking the interaction of RBD and ACE2 from those not containing them, was determined by two statistical methods. Blood serum samples from volunteers with postinfectious and hybrid immunity were analyzed separately using the ROC method. In all cases, close (31.45-31.65%) threshold values and high diagnostic characteristics were obtained. The analytical sensitivity determined by titration of the international standard sample First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin (human) in sVNT was 20-22 BAU/ml. When studying the correlation between sVNT results and the amount of IgG antibodies to RBD SARS-CoV-2, the Spearman coefficient was 0.8979 (95% CI: 0.8425-0.9345, $p < 0.001$). When determining the percentage consistency of the results obtained in sVNT with the titer of neutralizing antibodies obtained in the virological neutralization reaction, the Spearman coefficient was 0.8187 (95% CI: 0.7641-0.8616, $p < 0.001$).

Conclusion. A critical aspect in the interaction between the virus and human cells during infection is the formation of a recognition complex between the receptor-binding domain located on the S1 subunit of the SARS-CoV-2 Spike protein and the human angiotensin-converting enzyme 2 transmembrane protein. Therefore, immunological tools for antibody detection that specifically block the interaction between RBD and ACE2 could serve as an adequate substitute for virus neutralization reaction in determining the protective capacity of acquired humoral immunity.

The sVNT method has been developed, which allows the detection of antibodies blocking the interaction of RBD and ACE2 in a simple, safe and fast way with high specificity and sensitivity.

Key words: enzyme immunoassay; surrogate virus neutralizing analysis; RBD; SARS-CoV-2; ACE 2; virus neutralization reaction; neutralizing antibodies

For citation: Cherepovich B.S., Kudryashova A.M., Manuilov V.A., Svitich O.A., Borisova O.V. Development and evaluation of diagnostic characteristics of an enzyme immunoassay for the determination of antibodies blocking the interaction of RBD SARS-CoV-2 and ACE₂. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2025; 70 (2): 119-125 (in Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2025-70-2-119-125>

EDN: FSETBK

For correspondence: Cherepovich Bogdan Sergeevich, junior researcher at the laboratory of genetics of RNA-containing viruses; e-mail: bogdancherepovich@mail.ru

Information about authors:

Cherepovich B.S., <https://orcid.org/0000-0002-5803-6263>;

Kudryashova A.M., <https://orcid.org/0000-0002-0637-9184>;

Manuilov V.A., <https://orcid.org/0000-0002-2296-6151>;

Svitich O.A., <https://orcid.org/0000-0003-1757-8389>;

Borisova O.V., <https://orcid.org/0000-0002-7664-2945>.

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 15.10.2024

Accepted 22.10.2024

Published 25.01.2025

Введение. Титр вируснейтрализующих антител (nAbs), определённый в реакции биологической нейтрализации (РБН), является основным серологическим параметром, используемым для оценки эффективности иммунизации. РБН проводится на культуре клеток, является трудоёмкой и требует специальных условий биобезопасности [1].

Ключевую роль во взаимодействии вируса с клеткой человека в процессе инфицирования последней играет образование распознающего комплекса между рецептор-связывающим доменом (RBD, receptor-binding domain), расположенным на субъединице S₁ белка Spike SARS-CoV-2 и трансмембранным белком человека, ангиотензин-превращающим ферментом 2 типа (ACE₂, angiotensin-converting enzyme 2) [2,3]. Если такой комплекс не сформировался, клетка не будет инфицирована [4,5]. Поэтому лишь те иммунологические средства определения антител, специфически блокирующие взаимодействие между RBD и ACE₂, служат адекватной альтернативой РБН для определения протективности приобретённого гуморального иммунитета [6,7].

Не все антитела к RBD обладают вируснейтрализующей способностью. Не все сыворотки, содержащие IgG антитела к RBD, обладают вируснейтрализующим действием [8-10]. Показано, что из 109 моноклональных антител, сконструированных к уникальным эпитопам субъ-

единицы S₁ белка Spike (включает RBD), только три обладали вируснейтрализующим воздействием *in vitro* [11]. Это совершенно закономерный результат, если учесть, что область RBD, ответственная за связывание с ACE₂, невелика относительно всего домена, поэтому антитело к эпитопу вне этой области неспособно препятствовать образованию распознающего инфекционного комплекса.

Имуноферментный анализ (ИФА), определяющий только антитела, блокирующие взаимодействие RBD и ACE₂, может служить альтернативной РБН при оценке эффективности вакцинации.

Цель работы: изучение функциональных характеристик метода ИФА определения антител, блокирующих взаимодействие RBD и ACE₂ (суррогатный вируснейтрализующий тест, sVNT).

Материал и методы. В работе применялись реактивы: ТМБ, компоненты буферных растворов (Sigma, Fluka, Helicon). Для приготовления растворов использована деионизованная вода (Milli-Q System, Millipore, США). Для ИФА использовали 96-луночные планшеты (Costar, США). Для валидации результатов, полученных с использованием разработанного sVNT метода, использовали РБН в культуре клеток, и коммерческие наборы реагентов:

Набор реагентов для качественного ИФА определения антител класса IgG к коронавирусу «SARS-CoV-

2-ИФА-IgG» по ТУ 21.20.23-004-28597318-2020, РЗН 2020/12585. («МедипалТех», Россия).

Набор реагентов для качественного и количественного определения антител класса IgG к вирусу SARS-CoV-2 иммунохемилюминесцентным методом в сыворотке и плазме крови человека на иммунохимических анализаторах ARCHITECT «SARS-CoV-2 IgG II Количественный Реагенты для ARCHITECT (SARS-CoV-2 IgG II Quant Reagent Kit)», РУ РЗН 2021/13866, («Abbott», Ирландия).

В работе использовали следующие иммунореагенты: рекомбинантные антигены Spike Protein(mFc Tag) HPR, («Vazyme», Китай), рекомбинантный ангиотензин-превращающий фермент 2 («Cusabio», США), в качестве стандартного образца, охарактеризованного по титру nAbs, использован международный стандарт ВОЗ – First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin (human) (NIBSC code: 20/136, Dated 17/12/2020) [12].

Исследовали выборки сывороток крови пациентов: 374 образцов сывороток крови, полученных от добровольцев с известным анамнезом в 2017-2020 годах и 97 образцов, полученных в 2021 году от пациентов, переболевших и иммунизированных вакцинным препаратом «Гам-КОВИД-Вак».

Методика постановки РБН и оценка результатов производилась аналогичным способом, описанным в работе Б.С. Череповича и соавторов [7].

ИФА метод определения антител, блокирующих взаимодействие RBD и ACE₂. При проведении ИФА в лунки планшета вносили по 50 мкл образцов исследуемой сыворотки в разведении 1:10 в 0,02 М фосфатном буферном растворе pH 7,2, содержащем 0,2% бычьего сывороточного альбумина, 0,05% Tween 20, и 50 мкл рекомбинантного Spike, конъюгированного с пероксидазой хрена в том же буферном растворе в разведении 1:150. После инкубирования в течение 30 мин при 37 °С смесь переносили в лунки планшета с иммобилизованным рекомбинантным ACE₂ и инкубировали 30 мин при 37 °С. После инкубирования и отмывки вносили по 100 мкл 33 мМ цитратного буферного раствора pH 4,0, содержащего 0,01% перекиси водорода и 0,5 мМ 3,3',5,5'-тетраметилбензидина. Через 15 минут реакцию останавливали добавлением 100 мкл 2 N серной кислоты, измеряли оптическую плотность (ОП) в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения 680 нм.

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

$$КП = \frac{ОП_{ср.(К-)} - ОП_{обр.}}{ОП_{ср.(К-)}} \cdot 100\%$$

где: ОП_{ср.(К-)} – среднее арифметическое значение ОП для группы неиммунных лиц;

ОП_{обр.} – значение ОП для тестируемого образца.

Образец считается содержащим антитела, блокирующие взаимодействие RBD и ACE₂, если КП ≥ 30%.

Для более точной интерпретации образцов с одинаково высокими показателями КП, введён количественный параметр – титр sVNT, соответствующий последнему разведению исследуемого образца при КП > 30%.

Статистическая обработка. Образцы анализировали в двух повторях, и для расчётов использованы средние арифметические значения. Оценка граничного значения КП, позволяющая дифференцировать образ-

цы, содержащие антитела, блокирующие взаимодействие RBD и ACE₂ от не содержащих, определена двумя методами.

В первом методе пороговое значение определялось как КП_{порог}, рассчитываемое для ОП = ОП_{срКП} - 3σ, где:

ОП_{срКП} – среднее значение оптической плотности «отрицательных» образцов;

σ – среднее квадратическое отклонение.

Оценку доверительных интервалов для частот осуществляли методом Уилсона (Wilson E.B.) [13].

Пороговое значение и диагностические характеристики метода определены с помощью ROC-анализа путём построения ROC-зависимости (Receiver Operator Characteristic) для результатов анализа крови выборки, иммунных и неиммунных в отношении SARS-CoV-2 пациентов и выбора значения КП%, для которого сумма чувствительности и специфичности была максимальной.

Все данные анализировали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism и программного обеспечения Microsoft Office Excel.

Результаты. Оптимизация и оценка диагностических характеристик метода выявления антител, блокирующих взаимодействие между RBD и ACE₂ (sVNT) проведены на 374 образцах сывороток крови, полученных от добровольцев с известным анамнезом в 2017-2020 годах, 97 образцах, полученных в 2021 г. от пациентов, переболевших и иммунизированных вакцинным препаратом «Гам-КОВИД-Вак». Все образцы охарактеризованы на наличие антител к RBD Spike SARS-CoV-2. В качестве критерия наличия антител, в sVNT, блокирующих взаимодействие RBD коронавируса SARS-CoV-2 и ACE₂ человека, в сыворотке или плазме крови использован коэффициент подавления (КП%). В соответствии с полученными результатами, образцы с КП ≥ 30% рассматривались как содержащие антитела, блокирующие взаимодействие RBD и ACE₂.

Рассчитаны показатели чувствительности (Se) и специфичности (Sp) разработанного sVNT метода по отношению к коммерческому тесту («SARS-CoV-2-ИФА-IgG», «МедипалТех») [14,15].

Чувствительность и специфичность рассчитаны по формулам и составили:

$$Se = TP / (TP + FN) = 96\% (ДИ \pm 3,35\%, p < 0,05);$$

$$Sp = TN / (TN + FP) = 100\% (ДИ \pm 0,65\%, p < 0,05),$$

где: TP – образцы, определённые как содержащие антитела, блокирующие взаимодействие RBD и ACE₂, и к RBD Spike SARS-CoV-2;

FP – образцы, определённые как содержащие антитела, блокирующие взаимодействие RBD и ACE₂, в разрабатываемом тесте, но не содержащие антител к RBD Spike SARS-CoV-2;

TN – образцы, определённые как не содержащие антитела, блокирующие взаимодействие RBD и ACE₂, и к RBD Spike SARS-CoV-2;

FN – образцы, определённые как не содержащие антитела, блокирующие взаимодействие RBD и ACE₂, но содержащие антитела к RBD Spike SARS-CoV-2

Пороговое значение и диагностические характеристики метода определены с помощью ROC-анализа. Результаты ROC-анализа для выборки образцов, полученных в 2017-2021 гг., и отдельно для двух выборок, полученных на разных этапах пандемии, представлены на рис. 1, А, Б, В и в таблице.

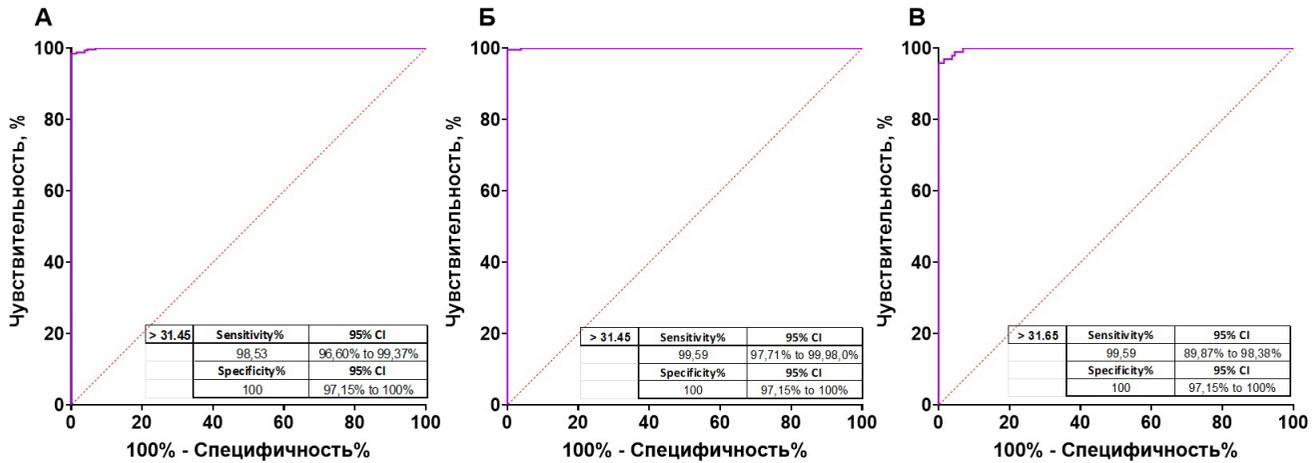


Рис. 1. ROC-кривые результатов sVNT. А - для 340 положительных образцов, полученных в 2020-2021 гг. в сравнении с 131 отрицательным образцом, полученным с 2017 по 2019 год; Б - для 243 положительных образцов, полученных в 2020 г. в сравнении с 131 отрицательным образцом, полученным с 2017 по 2019 г.; В - для 97 положительных образцов, полученных в 2021 году в сравнении с 131 отрицательным образцом, полученным с 2017 по 2019 год.

Определение порогового значения и диагностических характеристик двумя методами

Метод	Год, тип иммунитета	КП _{порог.} , %	Чувствительность, %	Специфичность, %
Уилсона (Wilson)	2020-2021 (n=340), инфекция + вакцинация «Гам-КОВИД-Вак»	30	96 (ДИ: ±3,35%, p<0,05)	100(ДИ±0,65%, p<0,05)
ROC (рис. 1, А)	2020-2021 (n=340), инфекция + вакцинация «Гам-КОВИД-Вак»	31,45	98,53 (ДИ: 96,60-99,37%)	100 (ДИ:97, 15-100,0%)
ROC (рис. 1, Б)	2020 (n=243), инфекция	31,45	99,59 (ДИ: 97,71-98,0%)	100 (ДИ 97, 15-100%)
ROC (рис. 1, В)	2021 (n=97), инфекция + вакцинация «Гам-КОВИД-Вак»	31,65	95,88 (ДИ: 89,87-98,38%)	100 (ДИ: 97, 15-100%)

Коэффициент вариации (CV%), определённый для 30 образцов, не содержащих и содержащих антитела, блокирующих взаимодействие RBD и ACE₂, находился в диапазоне 5,5-17,1%.

Аналитическая чувствительность sVNT. Оценка аналитической чувствительности sVNT осуществлена по международному стандартному образцу First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin, human (NIBSC code: 20/136). Опре-

делена концентрация антител к коронавирусу SARS-CoV-2, блокирующая взаимодействие RBD и ACE₂, соответствующая КП=30%. На основании трёх независимых экспериментов диапазон чувствительности находился в пределах 20-22 ВАУ/мл (рис. 2, А).

Аналитическая чувствительность, определённая по стандартному образцу ВОЗ, не противоречила экспериментальным данным, полученных при исследовании образцов сывороток крови в наборах двух производи-

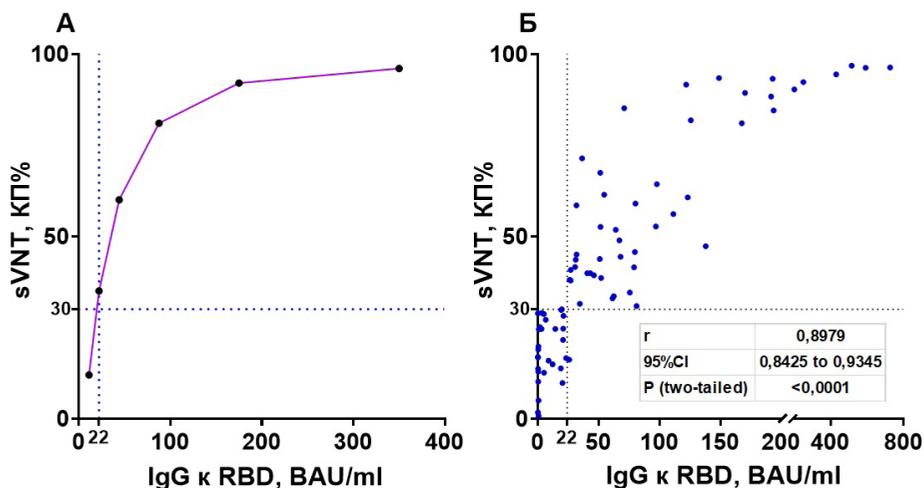


Рис. 2. Аналитическая и диагностическая чувствительность sVNT. А - кривая титрования стандарта ВОЗ в sVNT; Б - результаты зависимости %КП (sVNT) от количества антител, полученные в наборах «МедипалТех» и «Abbot». По оси абсцисс - граница чувствительности (BAU/ml= 22), по оси ординат - граница уровня отсеечения (КП=30).

телей (рис. 2, Б). Все образцы с содержанием IgG антител к RBD SARS-CoV-2 <22 BAU/ml по результатам анализа в наборах «МедипалТех» и «Abbot», определены как не содержащие антител, блокирующих взаимодействие RBD и ACE₂ в методе sVNT. Все образцы с содержанием IgG антител к RBD SARS-CoV-2 >22 BAU/ml определены как содержащие антитела, блокирующие взаимодействие RBD и ACE₂ в методе sVNT.

Коэффициент корреляции Спирмена 0,8979 (ДИ 95%:0,8425-0,9345, $p<0,001$) свидетельствует о выраженной, статистически значимой корреляции между

КП% sVNT и количеством антител, выявленных в наборах сравнения (см. рис. 2, Б).

Определение процентной согласованности результатов, полученных в разработанном методе с титром вируснейтрализующих антител, полученном в РБН. 182 образца, охарактеризованные на наличие антител, блокирующие образование комплекса между RBD и ACE₂, и антител к RBD Spike SARS-CoV-2, исследованы в РБН в культуре клеток для определения титров nAbs. Полученные значения КП сопоставлены с титрами nAbs в РБН (рис. 3).

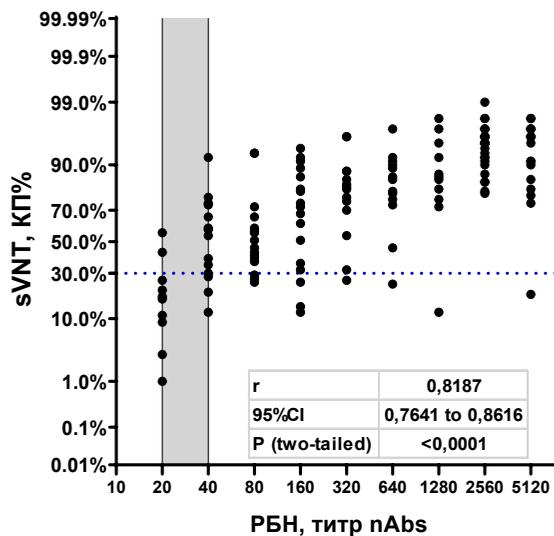


Рис. 3. Зависимость коэффициента подавления КП% от титра nAbs. Выделен интервал значений титра nAbs (1:20-1:40) при котором антитела начинают обнаруживаться в sVNT.

Коэффициент корреляции Спирмена для этих данных составил 0,8187 (ДИ 95%:0,7641-0,8616, $p<0,001$). Полученные данные свидетельствуют о выраженной, статистически значимой корреляции КП% sVNT с титрами nAbs, определенными в РБН.

В процессе анализа данных дополнительно использо-

ван уточнённый параметр, характеризующий содержание антител – $sVNT_{титр}$, соответствующий последнему разведению исследуемого образца при КП>30%. $sVNT_{титр}$ определён по кривым титрования образцов, анализируемых в ряде последовательных разведений. Пример таких кривых титрования представлен на рис. 4, А.

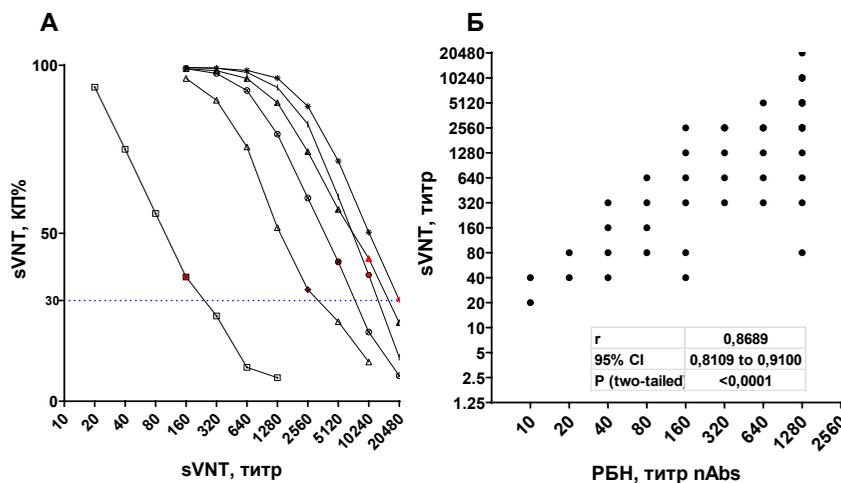


Рис. 4. Определение параметра $sVNT_{титр}$ и его корреляция с результатами РБН. А - кривые титрования образцов; Б – зависимость титра sVNT от титра nAbs в РБН.

При сравнении титров pAbs РБН с титрами sVNT (рис. 4, Б), установлена корреляция высокой степени, коэффициент Спирмена составил 0,8689 (ДИ 95%: 0,8109-0,9100, $p < 0,001$).

Обсуждение. Эталонном для определения вируснейтрализующих антител pAbs является РБН в культуре клеток. Для проведения РБН требуется лаборатория 3 уровня биологической безопасности (BSL 3) из-за обращения с живым вирусом SARS-CoV-2, помимо этого, анализ трудоёмок, на его выполнение уходит 2-4 дня.

Альтернативной РБН является реакция нейтрализации на основе псевдовирусов (pVNT), подразумевающая использование генно-модифицированного вируса, на поверхности которого экспонирован S-белок SARS-CoV-2, позволяющего проводить анализ в лаборатории уровня BSL 2. Тот факт, что pVNT по-прежнему требует использования живых вирусов и клеток делает его малоприменимым для масштабирования. [3,16] Другая альтернатива РБН – ИФА, определяющий только антитела, блокирующие взаимодействие RBD и ACE₂, sVNT [1,6,7,17].

При валидации метода ИФА оценка порогового значения КП, позволяющая дифференцировать образцы, содержащие антитела, блокирующие взаимодействие RBD и ACE₂, от не содержащих, определялась двумя статистическими методами (см. таблицу). ROC-анализом различно проанализированы образцы с постинфекционным и гибридным иммунитетом. Во всех случаях получены близкие (31,45- 1,65%) пороговые значения КП и высокие диагностические характеристики.

При сравнении данных, полученных в разработанном sVNT методе с данными, полученными в РБН в культуре клеток, установлена статистически значимая корреляция (коэффициент корреляции Спирмена 0,8187; ДИ 95%:0,7641-0,8616, $p < 0,001$), что согласуется с результатами других авторов [1,6,17].

Разработанный метод определения антител, блокирующих взаимодействие RBD-ACE₂, апробирован на образцах доноров с поствакцинальным и с постинфекционным иммунитетом.

Аналитическая чувствительность наборов «МедипалТех» и «Abbott» для определения антител к RBD SARS-CoV-2 имеет более высокую чувствительность, 10 BAU/ml и 7 BAU/ml, соответственно, анализируемые образцы, содержащие антитела к SARS-CoV-2 в количестве, ниже предела чувствительности sVNT, имеют КП < 30%. Чувствительность РБН в культуре клеток, определённая путём титрования международного стандартного образца First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin, human, составила 25 IU/ml (разведение стандартного образца 1:40). Схожесть результатов, полученных для чувствительности двух методов, позволяет утверждать, что разработанный метод является адекватной альтернативой РБН в культуре клеток.

Заключение. Разработан метод, позволяющий выявлять антитела, блокирующие взаимодействие RBD-ACE₂, простым, безопасным и быстрым способом с высокой специфичностью и чувствительностью. Преимуществом разработанного метода является универсальность, исключая необходимость использования антивидовых конъюгатов для выявления антител в сыворотках крови разных видов животных, при про-

ведении доклинического тестирования вакцин против SARS-CoV-2. В работе по изучению иммуногенности кандидатной вакцины при оценке нейтрализующих антител у трёх видов животных, установлена корреляция высокой степени между титрами РБН и sVNT [7].

Разработанный метод может найти применение в клинической лабораторной диагностике для мониторинга титров антител у вакцинированных и реконвалесцентов при подборе донорской плазмы, для оценки эффективности вакцин-кандидатов во время доклинических и клинических испытаний, при разработке лекарственных средств [18], в том числе моноклональных антител, с соответствующим механизмом действия.

ЛИТЕРАТУРА (П. П. 1 - 6, 8 - 13, 16 - 19 С. М. REFERENCES)

7. Черепович Б.С., Кудряшова А.М., Карташова Н.П., Грачева А.В., Мануйлов В.А., Ленева И.А. и др. Псевдонейтрализующий тест для доклинических исследований вакцин против SARS-CoV-2. *Медицинская иммунология*. 2024; 26(3):569-76. DOI: 10.15789/1563-0625-PTF-2905.
14. Флетчер Р., Флетчер С., Вагнер Э. Клиническая эпидемиология: Основы доказательной медицины. М.: Медиа-Сфера; 1998.
15. Гланц С. Медико-биологическая статистика. Пер. с англ. М.: Практика; 1998.

REFERENCES

1. Meyer B., Reimerink J., Torriani G., Brouwer F., Godeke G.J., Yerly S. et al. Validation and clinical evaluation of a SARS-CoV-2 surrogate virus neutralisation test (sVNT). *Emerging microbes & infections*. 2020; 9:2394-2403. DOI:10.1080/22221751.2020.1835448.
2. Walls A.C., Park Y.J., Tortorici M.A., Wall A., McGuire A.T., Veers D. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike. *Cell*. 2020; 181:281-92.e6. DOI:10.1016/J.CELL.2020.02.058.
3. Hoffmann M., Kleine-Weber H., Schroeder S., Krüger N., Herrler T., Erichsen S. et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*. 2020; 181(2):271-80.e8. DOI: 10.1016/J.CELL.2020.02.052.
4. Xiaojie S., Yu L., lei Y., Guang Y., Min Q. Neutralizing antibodies targeting SARS-CoV-2 spike protein. *Stem. cell research*. 2021; 50:102125. DOI:10.1016/J.SCR.2020.102125.
5. Yang Y., Du L., Carver R.J., Yang D. SARS-CoV-2 spike protein: a key target for eliciting persistent neutralizing antibodies. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2021; 6(1):95. DOI: 10.1038/s41392-021-00523-5.
6. Tan C.W., Chia W.N., Qin X., Liu P., Chen M.I., Tiu C. et al. A SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test based on antibody-mediated blockage of ACE₂-spike protein-protein interaction. *Nature Biotechnology*. 2020; 38(9):1073-8. DOI: 10.1038/s41587-020-0631-z.
7. Черепович Б.С., Кудряшова А.М., Карташова Н.П., Грачева А.В., Мануйлов В.А., Ленева И.А. et al. Псевдонейтрализующий тест для доклинических исследований вакцин против SARS-CoV-2. *Медицинская иммунология*. 2024; 26(3):569-76. DOI: 10.15789/1563-0625-PTF-2905. (in Russian)
8. Garcia-Beltran W.F., Lam E.C., Astudillo M.G., Yang D., Miller T.E., Feldman J. et al. COVID-19-neutralizing antibodies predict disease severity and survival. *Cell*. 2021; 184(2):476-88.e11. DOI:10.1016/2020.10.15.20213512.
9. Bauer G. The variability of the serological response to SARS-coronavirus-2: Potential resolution of ambiguity through determination of avidity (functional affinity). *Journal of medical virology*. 2021; 93(1):311-22. DOI:10.1002/JMV.26262.
10. Wajnberg A., Amanat F., Firpo A., Altman D.R., Bailey M.J., Mansour M. et al. Robust neutralizing antibodies to SARS-CoV-2 infection persist for months. *Science*. 2020; 370(6521):1227-30. DOI:10.1126/SCIENCE.ABD7728.
11. Bertoglio F., Meier D., Langreder N., Steinke S., Rand U., Simonelli L. et al. SARS-CoV-2 neutralizing human recombinant antibodies selected from pre-pandemic healthy donors binding at RBD-ACE2 interface. *Nature com-*

- munications*. 2021; 12(1):1577. DOI: 10.1038/s41467-021-21609-2.
12. Mattiuzzo G., Bentley E.M., Hassall M., Routley S., Richardson S., Bernasconi V. et al. Establishment of the WHO International Standard and Reference Panel for anti-SARS-CoV-2 antibody. 2020. Available at: https://www.who.int/docs/default-source/biologicals/ecbs/bs-2020-2403-sars-cov-2-ab-ik-17-nov-2020.pdf?sfvrsn=662b46ae_2.
 13. Wilson E.B. Probable Inference, the Law of Succession, and Statistical Inference. *Journal of the American Statistical Association*. 1927; 22(158): 209-12. DOI:10.1080/01621459.1927.10502953.
 14. Fletcher R., Fletcher S., Wagner E. Clinical epidemiology. Fundamentals of evidence-based medicine [Klinicheskaya epidemiologiya]. Moscow: Media-Sfera; 1998. (in Russian)
 15. Glantz S. Biomedical Statistics [Biomeditsinskaya statistika]. Trans. from Engl. Moscow: Praktika; 1998. (in Russian)
 16. Nie J., Li Q., Wu J., Zhao C., Hao H., Liu H. et al. Establishment and validation of a pseudovirus neutralization assay for SARS-CoV-2. *Emerging microbes & infections*. 2020; 9(1):680-6. DOI:10.1080/22221751.2020.1743767.
 17. Mariën J., Michiels J., Heyndrickx L., Nkuba-Ndaye A., Ceulemans A., Bartholomeeusen K. et al. Evaluation of a surrogate virus neutralization test for high-throughput serosurveillance of SARS-CoV-2. *Journal of virological methods*. 2021; 297:114228. DOI:10.1016/J.JVIROMET.2021.114228.
 18. Wang G., Yang M.L., Duan Z.L., Liu F.L., Jin L., Long C.B. et al. Dalbavancin binds ACE2 to block its interaction with SARS-CoV-2 spike protein and is effective in inhibiting SARS-CoV-2 infection in animal models. *Cell Research*. 2021; 31(1):17-24. DOI: 10.1038/s41422-020-00450-0.