

**РЕЗУЛЬТАТИ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ ЩОДО
ВИЯВЛЕННЯ АНТИТІЛ ДО КОРОНАВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ
ПІД ЧАС ПАНДЕМІЇ COVID-19**

Кузьмінов Б.П., Ткач О.А., Лаповець Н.Є., Зарічна О.З., Мажак К.Д., Щурко Г.В.

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, м. Львів, Україна

Анотація. У 2338 пацієнтів проведено виявлення антитіл до коронавірусу SARS-CoV-2 методом імуноферментного аналізу до імуноглобулінів класу IgM та IgG. Серед 2997 досліджень виявлення антитіл до імуноглобуліну класу IgM проведено у 549 (18,3 %), до імуноглобуліну класу IgG - у 1122 (37,4), а у решти 1326 (44,2 %) пацієнтів визначали одночасно наявність антитіл до обох імуноглобулінів. Частота та величина титру зв'язуючих антитіл до імуноглобуліну класу IgG корелювали із маніфестацією клінічних проявів (виражені та безсимптомні - 74,4 % та 25,6 % відповідно) у пацієнтів із COVID-19.

Ключові слов: *коронавірус SARS-CoV-2, ІФА-тести, імуноглобуліни класу IgM та IgG, антитіла, терміни, частота.*

Вступ. Розвиток та поширення вірусних інфекцій обумовлено непрогнозованою антигенною мінливістю, яка обумовлена або спонтонною або цілеспрямованою дією популяційного імунітету на якісні зміни антигенних детермінант. В кінці грудня 2019 року у м.Ухань (Китай) виявлено новий штам коронавірусу (SARS-CoV-2), що спричинив спалах вірусної пневмонії із важким гострим респіраторним синдромом. Цей вірус викликає коронавірусну хворобу (COVID-19), яка швидкими темпами набула статусу світової пандемії. Штам SARS-CoV-2 належить до родини сферичних РНК-вмісних вірусів діаметром 80-160nm. Генوم коронавірусів – одониткова лінійна молекула нефрагментованої РНК, що кодує 4 основних структурних білки вірусу: S-білок глікопротеїн, який формує шипи на поверхні вірусних часток; М-білок-мембранний; N-білок - нуклеокапсидний; Е-білок – оболонковий. Білки N та S є основними імуногенними білками, які є еволюційно високо гомологічним, стабільними на відміну від інших, що дає змогу використовувати їх як вірусні антигени при діагностиці коронавірусної інфекції. Під час циркуляції вірусам властиво змінюватися, і SARS-CoV-2, що спричинив COVID-19, не є виняток, хоча він зазнає мутації повільніше за віруси грипу чи ВІЛ [7-9].

Імунна система мобілізується і відповідає своїм вродженим і набутих імунітетом, намагається захистити організм. Щодо клінічних моментів, то маємо приблизно 4 варіанти імунної відповіді на контакт із збудником: 30 % носіїв - люди з хорошою імунною системою не дають клініки, але успішно переносять збудник, що забезпечує високу його поширеність та епіднебезпеку; 55 % популяції з легкою формою перебігу (скоординована робота імунної

системи), проте після одужання від 10 до 40 днів є подальше виділення вірусу, створюючи підвищену епіднебезпеку, заражаючи контактних та навколишніх; 10 % середньо-тяжкий перебіг (дефіцит імунної системи, гіперактивність імунної системи), 5 % - тяжкий перебіг (значний дефіцит імунної системи, цитокіниний «шторм», розбалансування імунної відповіді). Таким чином приблизно у 85 % людської популяції імунна система має контроль над цим збудником і формує специфічну імунну відповідь та імунну пам'ять, а 15 % створюють дуже серйозні виклики для всіх фахівців [1, 5].

Оскільки останнім часом набуває особливої важливості відстежування змін в геномі вірусу SARS-CoV-2, ВОЗ рекомендує всім країнам по можливості збільшити обсяги секвенування, обмінюватися даними про їхні послідовності на міжнародному рівні та повідомляти про випадки виявлення однакових мутацій, які є предметом особливого занепокоєння [2-9].

Для успіху подолання поширення вірусу SARS-CoV-2 дуже важливе значення має надійність тестування і гнучкий підхід до даного виду лабораторних досліджень. Під час пандемії COVID-19 важливо досліджувати силу та тривалість імунної відповіді на вірус SARS-CoV-2. Розуміння цих параметрів критично для епідеміологічних прогнозів та оцінки дії вакцини. З'являються все більше даних про те, що Т-клітинна відповідь на вірус грає не меншу роль, ніж утворення специфічних антитіл [1, 5].

Зазвичай для визначення високого рівня захисту від вірусу є визначені граничні показники. Однак у випадку SARS-CoV-2 такі показники лише напруцьовуються. Відкритим залишається також питання, як швидко після хвороби або щеплення знову падає рівень антитіл. Відповідних довготривалих досліджень щодо SARS-CoV-2 ще немає. Однак за першими дослідженнями, ситуація зі стійкістю антитіл цього вірусу схожа на інші віруси.

Встановлення точного діагнозу COVID-19 має важливе значення не тільки для забезпечення належного лікування пацієнтів, а й для вчасного виявлення інфікованих людей коронавірусом, в тому числі безсимптомних носіїв, які підпадають до груп ризику з проведенням протиепідемічних заходів через обов'язкову ізоляцію для обмеження поширення коронавірусної інфекції [1-9].

Метою роботи було динамічне спостереження за характером та рівнем виявлення антитіл до імуноглобулінів класів IgM та IgG щодо коронавірусної інфекції SARS-CoV-2 під час пандемії COVID-19.

Матеріали й методи Одним із найбільш ефективних та точних методологічних підходів до скринінгу патогенних мікроорганізмів є сорологічні дослідження, до яких належить імуноферментний аналіз (ІФА) і використовується для виявлення специфічних антитіл. В лабораторії імунологічних досліджень туберкульозу, інфекційних та паразитарних

захворювань НДІ епідеміології та гігієни ЛНМУ імені Данила Галицького проводиться імуноферментний аналіз (ІФА) щодо якісного визначення антитіл до імуноглобулінів класу IgM та IgG до нуклеокапсидного (NP) та «шиповидного-S1» антигенів вірусу SARS-CoV-2 у сироватці крові людини з використанням набору ELISA kit EGUI SARS-CoV-2 .

Результати та їх обговорення. Проведення скринінгу дозволяє оцінити та спрогнозувати епідемічну ситуацію щодо коронавірусної інфекції, встановити частоту та характер утворення антитіл внаслідок перенесеної коронавірусної хвороби COVID-19. За період пандемії коронавірусу в лабораторії обстежено 2338 пацієнтів методом імуноферментного аналізу на виявлення антитіл до імуноглобулінів класу IgM та IgG, яким проведено 2997 досліджень, із них виявлення антитіл до імуноглобуліну класу IgM проведено у 549 (18,3 %), виявлення антитіл до імуноглобуліну класу IgG- у 1122 (37,4), а у решти пацієнтів 1326 (44,2 %) проведено дослідження щодо одночасного виявлення антитіл до обох імуноглобулінів IgM та IgG .

За результатами проведених досліджень встановлено особливості у характері та частоті виявлення антитіл до коронавірусу SARS-CoV-2 на початку пандемії та в її розпал (2020-2021 рр.). В перший рік пандемії на обстеження звернулися 1051 пацієнт, яким проведено 1452 дослідження, виявлення антитіл до імуноглобуліну класу IgM проведено 445 (30,6 %) пацієнтам, класу IgG 204 особам (14,1 %), в той час, у більшій половині 803 (55,3 %) пацієнтів визначали наявність антитіла до обох класів імуноглобулінів IgM та IgG (табл.1).

Таблиця 1

Частота та характер досліджень щодо виявлення антитіл до коронавірусної інфекції SARS-CoV-2 за період пандемії (2020-2021рр.)

Роки	Всього		Частота та характер досліджень на виявлення антитіл					
			IgM		IgG		IgM IgG	
	абсл.ч.	%	абсл.ч.	%	абсл.ч.	%	абсл.ч.	%
2020	1452	100	445	30,6	204	14,1	803	55,3
2021	1545	100	104	6,7	918	59,4	523	33,9
Разом	2997	100	549	18,3	1122	37,4	1326	44,2

В розпал пандемії характер частоти та обсягу досліджень змінив векторність у бік зростання потреби у визначенні антитіл до імуноглобуліну класу IgG. Так, у 2021 р. констатовано достовірне зростання (у 4,2 рази) частоти визначень антитіл до імуноглобуліну класу IgG (59,4 % проти 14,1 % відповідно). Визначення антитіл до обох класів

імуноглобулінів на початку пандемії мали наміри дещо більше третина пацієнтів 402 із 1051, що становило 38,2 %, у 2021 році констатовано тенденцію до незначного зростання частоти визначення комплексного обстеження на 505 із 1287, що становить 39,2 % і може бути практично порівнюваним. Слід відзначити, що частота проведених досліджень не завжди корелювала із їх доцільністю в період розпаду пандемії. Аналіз характеру та результативності проведених досліджень, зміна частоти виявлення позитивних та негативних результатів на початку та під час розпаду пандемії подано в табл. 2.

Таблиця 2

Частота досліджень щодо виявлення антитіл до імуноглобулінів

Роки	Всього		Частота досліджень щодо виявлення антитіл							
			IgM(-)		IgM(+)		IgG(-)		IgG(+)	
	абсл.ч.	%	абсл.ч.	%	абсл.ч.	%	абсл.ч.	%	абсл.ч.	%
2020	649	100	426	65,6	19	2,9	92	14,2	112	17,3
2021	1026	100	104	10,1	4	0,4	301	29,3	617	60,2

Характер частоти та результативність даних оцінювали в межах кожної групи і приймали обсяг досліджень за 100% для порівняльної характеристики на етапах дослідження. За даними табл. 2 встановлено, що на початку пандемії перевагу віддавали визначенню антитіл до IgM (68,5 %), такий обсяг на початку пандемії обумовлений не лише наявністю клінічних ознак захворювання (2,9 %), а в більшій мірі у 65,6 % епідемічною настороженістю, або як дозвільний варіант перебування в установах та колективах, особливо у літній відпускний період, поряд з епідемічно значимим підтвердженням / запереченням захворювання шляхом проведення ПЛР-тестування. Разом з тим, характер визначення антитіл до імуноглобуліну класу IgG, мав нижчу частоту, проте більшу інформативність щодо перенесеної коронавірусної інфекції, наприклад, у 2020 р. частота його визначення становила 31,5 %, проте більша половина із них – 17,3 % мала позитивний результат, тобто перехворіла, що особливо демонстративно характеризує безсимптомний або малосимптомний перебіг коронавірусної інфекції у 35,3 % пацієнтів. Це демонстративно відтворюють показники 2021 року, де частота визначення антитіл до IgM знизилася у 6,5 раза (10,5 % проти 68,5 %, відповідно), а визначень антитіл до IgG збільшилася у 2,8 раза із зростанням інформативності у 3,5 раза, кількість позитивних результатів ймовірно зростала (60,2 % проти 17,3 %, відповідно), що хоча і

опосередковано, проте вказувало на формування колективного імунітету після перенесеного захворювання.

Аналіз частоти та результативності одночасного визначення обох класів зв'язуючих антитіл показав у більшій половини пацієтів недоцільність такого комплексу досліджень (табл. 3). Встановлено достовірне зниження частоти виявляємості у 2021 році негативних результатів (63,2 % проти 44,5 %, відповідно в комбінації IgM-IgG-) та зростання частоти позитивних результатів (51,3 % проти 32,8 %, відповідно в комбінації IgM-IgG+), що вказує на формування антитіл у перехворівших, незалежно від маніфестації клінічних проявів коронавірусної інфекції (табл.3).

Таблиця 3

Результативність частоти одночасного визначення антитіл до IgM та IgG

Роки	Всього		Результативність одночасного визначення антитіл обох класів							
			IgM(+)IgG(+)		IgM(-)IgG(-)		IgM(-)IgG(+)		IgM(+)IgG(-)	
	абсл.ч.	%	абсл.ч.	%	абсл.ч.	%	абсл.ч.	%	абсл.ч.	%
2020	402	100	15	3,7	254	63,2	132	32,8	1	0,2
2021	265	100	7	2,6	118	44,5	136	51,3	4	1,5

Більш характерним виявилось порівняння рівня зв'язуючих антитіл до імуноглобуліну класу IgG у пацієнтів, які мали підтверджену ПЛР-дослідженнями коронавірусну хворобу COVID-19 (табл. 4). За маніфестацією клінічних проявів пацієнтів умовно поділили на дві групи, так I-шу групу (479 осіб) формували перехворівші на коронавірусну хворобу пацієнти з різним ступенем важкості процесу, яким призначали комплексне медикаментозне та кисневе лікування на стаціонарному або амбулаторному етапах ведення випадку та II група пацієнтів (165 осіб), які мали практично безсимптомний перебіг або малосимптомний із слабо вираженою маніфестацією клінічних проявів, що не вимагало призначення ні кисневого, ні медикаментозного лікування та динамічного спостереження. За рівнем позитивних значень титру антитіл до імуноглобуліну класу IgG пацієнтів умовно поділили на 2 підгрупи: I –ша підгрупа, до якої увійшли пацієнти із титром антитіл від 1,1 до 5,0 та II–га підгрупа, із титром антитіл від 5,1 до 10, а також з врахуванням терміну їх виявлення. За термінами виявлення зв'язуючих антитіл пацієнти розподілені на 4 кагорти по три місяці в кожній (табл.4).

Порівняльна характеристика частоти, рівня та термінів виявлення антитіл до імуноглобуліну класу IgG у хворих з різним перебігом коронавірусної хвороби COVID-19

Титр антитіл до IgG+	Частота та терміни виявлення антитіл до імуноглобуліну IgG									
	Всього		1 кагорта (1-3 міс.)		2 кагорта (4-6 міс.)		3 кагорта (7-9 міс.)		4 кагорта (10-12 міс.)	
	абсл.ч.	%	абсл.ч.	%	абсл.ч.	%	абсл.ч.	%	абсл.ч.	%
Ліковані хворі з важким перебігом COVID-19										
1 підгрупа (1,1-5,0)	218	45,5	78	16,3	69	14,4	37	7,7	34	7,1
2 підгрупа 5,1-10	261	54,5	52	10,9	103	21,5	51	10,6	55	11,5
Разом	479	100	130	27,1	172	35,9	88	18,4	89	18,6
Неліковані хворі з мало- або безсимптомним перебігом COVID-19										
1 підгрупа (1,1-5,0)	104	63,0	12	7,3	37	22,4	30	18,2	25	15,2
2 підгрупа 5,1-10	61	37,0	1	0,6	25	15,2	24	14,5	11	6,7
Разом	165	100	13	7,9	62	37,5	54	32,7	36	21,8
ВСЬОГО	644	100	143	22,2	234	36,3	142	22,0	125	19,4

За даними табл. 4 встановлено, що серед всіх захворілих без врахування ступеня важкості перебігу коронавірусу коливання частоти виявлення антитіл до IgG мали хвилеподібний характер із темпами зростання, так, у 1 та 2 кагорті пацієнтів констатовано зростання частоти виявлення позитивних результатів (22,2 % → 36,3 % відповідно) у перші шість місяців поспіль, досягнувши найвищої частки через півроку, а потім спостерігалось повільне зниження частоти виявляємості позитивних значень у 3 і 4 кагортах (22,2 % → 19,4 % відповідно). Така закономірність утримувалася в обох групах пацієнтів, з різним ступенем важкості хвороби та безсимптомним перебігом, проте в I групі пацієнтів з вираженими клінічними симптомами спостерігалось стрімке наростання частоти виявлення антитіл, особливо в перші три місяці після COVID-19 (27,1 % проти 7,9 % відповідно), з наступним наростанням (35,9 % проти 37,5 % відповідно) частоти виявлення до півроку.

Слід відзначити, що зниження частоти виявлення антитіл більш стрімко спостерігалось у I групі пацієнтів із тяжким перебігом коронавірусної інфекції уже в 3-4 кагортах (18,4 % та 18,6 % проти 32,7% та 21,8 % відповідно) в порівнянні до II групи пацієнтів із безсимптомним перебігом.

Пацієнти кожної групи розподілені на 2 підгрупи за рівнем титру антитіл до імуноглобуліну класу IgG від 1,1 до 5,0- перша підгрупа, вище 5,1- друга підгрупа. У пацієнтів, які тяжко перенесли захворювання і лікувалися, частота виявлення осіб із титром антитіл >5,1 була у другій підгрупі, в той час, у пацієнтів із безсимптомним перебігом коронавірусної інфекції, навпаки, вищою частота виявлення антитіл спостерігалась у першій підгрупі осіб із низькими титрами антитіл на протязі 12 місяців.

Висновки. Проведений скринінг частоти, термінів виявлення зв'язуючих антитіл до імуноглобулінів класу IgG в період пандемії COVID-19 вказує на хвилеподібний характер зміни титру антитіл, залежність його від клінічного перебігу коронавірусної інфекції, маніфестації клінічних проявів, а також термінів утворення та збереження титру антитіл.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. В.Чопяк Пандемія COVID- 2019: імунологічні аспекти / *Медичні науки*// Львів.-2020.-Т.59, №1.-С.63-68.
2. Amanat F, Stadlbauer D, Strohmeier S et al. A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. *Nat Med*, 2020, 26(7):1033-1036. doi:10.1038/s41591-020-0913-5
3. Shu-Yuan Xiao, Yingjie Wu, Huan Liu. Evolving status of the 2019 novel coronavirus infection: Proposal of conventional serologic assays for disease diagnosis and infection monitoring. *Journal of medical virology*. First published: 07 February 2020. <https://doi.org/10.1002/jmv.25702>.
4. Gang Li, M.D., Ph D., Xuejuan Chen, Anlong Xu, Ph D. Profile of Specific Antibodies to the SARS-Associated Coronavirus. *The New England Journal of Medicine*.
5. Juanjuan Zhao, Quan Yuan, Haiyan Wang, Wei Liu, Xuejiao Liao et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. *Clinical Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa344>. Published: 28 March 2020.
6. Nisreen M.A., Okba Marcel A. Muller, et al. SARS-CoV-2 specific antibody responses in COVID-19 patients. *Articles from Emerging Infectious Diseases*. 2020. Vol. 26(7). doi: 10 3201/eid2607 200841.
7. Zhao J, Yuan Q, Wang H, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2in patients of novel coronavirus disease. *Clinical Infectious Diseases*. 2019. P. 1-22. doi: 10 1093/cid/ciaa344.
8. Li Ping, Li Zhiyong, Zhao Silin et al. Preliminary study of serum 2019-nCov Ig M and IgG antibodies in the diagnosis of Novel Coronavirus Pneumonia. *Chinese Journal of Laboratory Medicine*. 2020. Vol. 43. P. 43-51. doi: 10 3760/cma.j.cn114452-20200302-00155.
9. Ria Lassauniere, Anders Frische, Zitta B Harboe, et al. Evaluation of nine commercial SARS-CoV-2 immunoassays // <https://doi.org/10 1101/2020 04 09 20056325>.
10. WHO,2019. Health Emergency and Disaater Risk Management Framework, WHO: Geneva.

REFERENCES

1. V. Chopyak Pandemic COVID-2019: immunological aspects / *Medical Sciences* // Lviv.-2020.- Vol.59, №1.-P.63-68.
2. Amanat F, Stadlbauer D, Strohmeier S et al. A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. *Nat Med*, 2020, 26(7):1033-1036. doi:10.1038/s41591-020-0913-5
3. Shu-Yuan Xiao, Yingjie Wu, Huan Liu. Evolving status of the 2019 novel coronavirus infection: Proposal of conventional serologic assays for disease diagnosis and infection monitoring. *Journal of medical virology*. First published: 07 February 2020. <https://doi.org/10.1002/jmv.25702>.
4. Gang Li, M.D., Ph D., Xuejuan Chen, Anlong Xu, Ph D. Profile of Specific Antibodies to the SARS-Associated Coronavirus. *The New England Journal of Medicine*.
5. Juanjuan Zhao, Quan Yuan, Haiyan Wang, Wei Liu, Xuejiao Liao et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. *Clinical Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa344>. Published: 28 March 2020.
6. Nisreen M.A., Okba Marcel A. Muller, et al. SARS-CoV-2 specific antibody responses in COVID-19 patients. *Articles from Emerging Infectious Diseases*. 2020. Vol. 26(7). doi: 10.3201/eid2607.200841.
7. Zhao J, Yuan Q, Wang H, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease. *Clinical Infectious Diseases*. 2019. P. 1-22. doi: 10.1093/cid/ciaa344.
8. Li Ping, Li Zhiyong, Zhao Silin et al. Preliminary study of serum 2019-nCov Ig M and IgG antibodies in the diagnosis of Novel Coronavirus Pneumonia. *Chinese Journal of Laboratory Medicine*. 2020. Vol. 43. P. 43-51. doi: 10.3760/cma.j.cn114452-20200302-00155.
9. Ria Lassauniere, Anders Frische, Zitta B Harboe, et al. Evaluation of nine commercial SARS-CoV-2 immunoassays // <https://doi.org/10.1101/2020.04.09.20056325>.
10. WHO, 2019. Health Emergency and Disaster Risk Management Framework, WHO: Geneva

RESULTS OF IMMUNO-ENZYME RESEARCH FOR THE DETECTION OF ANTIBODIES TO CORONAVIRUS INFECTION DURING THE COVID-19 PANDEMIC

Kuzminov B.P., Tkach O.A., Lapovets N.E., Zarichna O.Z., Mazhak K.D., Shchurko G.V.

Abstract. Antibodies to SARS-CoV-2 coronavirus were detected in 2338 patients by enzyme-linked immunosorbent assay of immunoglobulins of the IgM and IgG class. Among 2997 studies, the detection of antibodies to immunoglobulin class IgM was performed in 549 (18.3%), to IgG immunoglobulin - in 1122 (37.4), and in the remaining 1326 (44.2%) patients studied the presence of antibodies to both immunoglobulins. The incidence and titer of binding antibodies to IgG immunoglobulin correlated with the manifestation of clinical manifestations (severe and asymptomatic - 74.4% and 25.6%, respectively) in patients with COVID-19.

Key words: SARS-CoV-2 coronavirus, ELISA tests, immunoglobulins of IgM and IgG class, antibodies, timing, frequency.

Кузьмінов Б. ORSID ID 0000-0002-8693-1046;

Ткач Олена ORSID ID 0000-0002-2856-7338, +380967706306, Olenatkach54@ukr.net;

Лаповець Н. ORSID ID 0000-0001-7671-8279;

Зарічна О. ORSID ID 0000-0003-2856-5890;

Мажак К. ORSID ID 0000-0001-7776-8892;

Щурко Г. ORSID ID 0000-0002-0942-9554.