

DOI: <https://doi.org/10.34883/PI.2021.10.2.023>
УДК 582.284.3; 616-093/-098

Анисько Л.А., Рогачева Т.А., Карпов И.А.
Городская клиническая инфекционная больница, Минск, Беларусь
Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

Anisko L., Rogacheva T., Karpov I.
City Clinical Hospital of Infectious Diseases, Minsk, Belarus
Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

Особенности иммуноферментной диагностики коронавирусной инфекции

Features of the Enzyme Immunoassay of Coronavirus Infection

Резюме

Введение. Специфическая лабораторная диагностика методом иммуноферментного анализа (ИФА) играет ключевую роль в расшифровке этиологии инфекционных заболеваний, в том числе коронавирусной инфекции (КВИ). В настоящее время на белорусском рынке представлены несколько тест-систем для определения антител (АТ) классов IgM и IgG к вирусу SARS-CoV-2. Данные диагностические наборы имеют некоторые отличия по составу целевых антигенов (АГ), к которым предусмотрено определение АТ (S-Ag и NP-Ag).

Цель. Проанализировать первичные результаты применения тест-систем для определения антител к различным антигенам в диагностике COVID-19.

Материалы и методы. Исследование проводилось на базе учреждения здравоохранения «Городская клиническая инфекционная больница» г. Минска с использованием наборов реагентов для иммуноферментного исследования на IgM и IgG к различным антигенным детерминантам вируса SARS-CoV-2.

Результаты. Анализ положительных иммуноферментных результатов на антитела к SARS-CoV-2 показал, что антитела к S-Ag возбудителя КВИ определялись чаще, особенно класса М. Уровень средней оптической плотности (ОП) серопозитивных образцов был значительно выше среди антител к шиповидному S-Ag вируса SARS-CoV-2 (выше в 2 и более раз), чем к нуклеокапсидному NP-Ag.

Заключение. Проведенные параллельные исследования показали, что при использовании тест-систем по определению антител к SARS-CoV-2 необходимо учитывать тип антигена, используемый конкретной тест-системой.

Ключевые слова: иммуноферментный анализ, коронавирусная инфекция, антитела, S-антиген, NP-антиген.

Abstract

Introduction. Serological diagnosis plays a key role in the diagnosis of infectious diseases. Currently, there are several commercial test systems on the market for the determination of IgM and IgG antibodies to coronavirus. These test systems have some differences in the composition of target antigens, for which the determination of antibodies is provided (S-Ag and NP-Ag).

Purpose. Analyze the primary results of the use of test systems for the determination of antibodies to various antigens in the diagnosis of COVID-19.

Materials and methods. The study was carried out on the basis of the health care institution "City Clinical Infectious Diseases Hospital" in Minsk using reagent kits for enzyme-linked immunosorbent assay for IgM and IgG antibodies to several antigenic determinants.

Results. Analysis of positive enzyme immunoassays for antibodies to SARS-CoV-2 showed that antibodies to S-Ag of the SARS-CoV-2 were detected more often, especially IgM.

Conclusion. Conducted parallel studies on different test systems for coronavirus have shown the need for their use to solve various problems. The average optical density (OD) of seropositive samples was higher among antibodies to the surface S-Ag SARS-CoV-2 than to the nucleocapsid protein

Keywords: enzyme immunoassay, coronavirus infection, antibodies, S-antigen, NP-antigen.

■ ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время клиническая диагностика инфекционных заболеваний располагает широким спектром методов по установлению этиологии инфекционного процесса, используя различные подходы: выявление маркеров непосредственного присутствия возбудителя в организме человека (антигенов, нуклеиновых кислот), иммунологически опосредованных специфических антител (Ig A, M, G) и других маркеров, характеризующих особенности протекания инфекции в организме человека.

Одним из широко используемых направлений лабораторной медицины являются иммуноферментные исследования, которые применяются:

- с целью диагностики этиологии заболеваний путем выявления в сыворотке крови специфических маркеров, определения стадии инфекционного процесса;
- по эпидемиологическим показаниям для оценки напряженности поствакцинального или постинфекционного иммунитета;
- для динамической оценки распространенности того или иного возбудителя в популяции;
- с профилактической целью: скрининговые исследования компонентов крови на биобезопасность, беременных на группу TORCH-инфекций и др.

Специфическая лабораторная диагностика инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2, в настоящее время основана на применении молекулярно-биологического (ПЦР) и иммунологических методов, основным из которых является иммуноферментный анализ (ИФА), с помощью которого определяют антитела классов M и G (на сегодняшний день в Республике Беларусь отсутствуют коммерческие предложения по определению IgA).

Особенностью текущего момента является то, что пришло осознание необходимости применения иммунологической диагностики КВИ в зависимости от природы определяемых антител. Как известно, в структуре SARS-CoV-2 имеются 2 основных антигена (Ag): Spike Protein – S-белок, состоящий из нескольких эпитопов – S1 (RBD), S2, и Nucleocapsid – NP – белок нуклеокапсида. Оба антигена обладают выраженной иммуногенностью: способностью при попадании в организм человека индуцировать

иммунный ответ выработкой специфических к ним антител различных классов. В настоящее время установлено, что антитела к S-белку обладают вируснейтрализующим действием, их наличие и количество характеризует выраженность гуморального иммунитета против SARS-CoV-2 (постинфекционного или поствакцинального); антитела к NP-белку – маркер активации клеточного ответа против возбудителя КВИ (анамнестические, постинфекционные АТ) [1, 2]. Появляются сообщения о значимости определения АТ к М-белку вируса SARS-CoV-2.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проанализировать первичные результаты применения тест-систем для определения антител к различным антигенам в диагностике COVID-19.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось на базе учреждения здравоохранения «Городская клиническая инфекционная больница» г. Минска с июня 2020 г. по январь 2021 г. Для определения антител использовались наборы реагентов для иммуноферментного исследования на IgM и IgG различных производителей: УП ХОПИБОХ НАН РБ (ИФА-SARS-CoV-2-NP-IgM, ИФА-SARS-CoV-2-NP-IgG); ООО «Альгимед Техно» (ИФА- IgM-SARS-CoV-2, ИФА- IgG-SARS-CoV-2); АО «Вектор-Бест» (SARS-CoV-2-IgM-ИФА-БЕСТ, SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ). Постановка иммуноферментной реакции проходила согласно инструкции к набору реагентов. В качестве биологического материала использовались образцы венозной крови (сыворотки) пациентов с диагнозом COVID-19 и сотрудников клиники с различным эпидемиологическим анамнезом по отношению к COVID-19.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В целом лабораторией инфекционной клиники за период с июня по январь 2021 года выполнено 10 941 иммуноферментное исследование по определению антител к SARS-CoV-2, исследовано 4242 пробы сывороток крови.

Как видно из рис. 1, с сентября по декабрь 2020 г. количество позитивных образцов как по IgG, так и суммарным антителам имело тенденцию к росту, что соответствовало эпидемиологической ситуации в стране, связанной с пандемией COVID-19.

Анализ полученных результатов показал, что в среднем серонегативными были 43,5% образцов сывороток крови, причем их количество с августа по январь постепенно снижалось с 59,0 до 31,8% соответственно (рис. 1).

Из серопозитивных проб, имевших положительный результат хотя бы по одному маркеру, значительно преобладали образцы, в которых выявлялись как IgM, так и IgG – 36,9%, реже всего определялись только IgM – 4,3% из общего количества исследованных сывороток.

В настоящее время имеющиеся диагностические тест-системы по определению IgM и IgG отечественного производства выявляют антитела именно и только к NP-белку SARS-CoV-2. В то время как доступная к практическому применению диагностическая тест-система

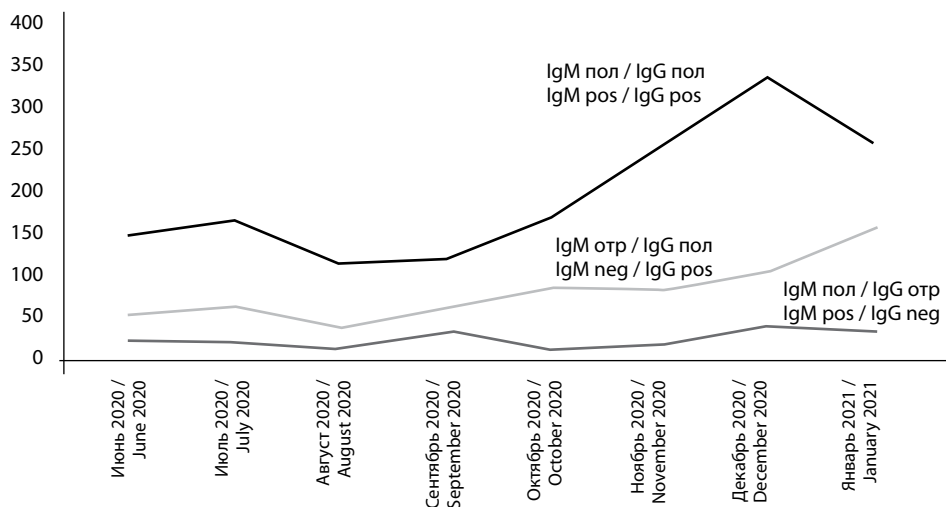


Рис. 1. Динамика положительных результатов серодиагностики COVID-19

Fig. 1. Dynamics of positive results of serodiagnostics of COVID-19

производства Вектор-Бест (Россия) предназначена для определения IgM к NP-Ag и S-Ag (RBD-эпитопу), IgG – к полноразмерному S-белку.

Нами были проведены параллельные исследования одних и тех же образцов сывороток крови на тест-системах, определяющих антитела классов M и G к различным антигенам SARS-CoV-2 (анти-S и анти-NP). Результаты оказались следующими: полное совпадение наблюдалось в 71,4%. Из данных проб 20% были серонегативными (IgM–, IgG–) и 46,7% серопозитивными (IgM+, IgG+) по AT класса M и G, в 33,3% определялись только AT класса G. В 20% случаев наблюдалось частичное совпадение результатов: IgM и IgG были выявлены к S-Ag, к NP – только антитела класса G. Полное расхождение полученных результатов оказалось в 20% проб, причем по анти-S данные сыворотки были положительными (9,5% по IgM, одна по IgG), анти-NP определялись только в 4,25% образцов – IgG, антитела класса M выявлены не были.

Анализ положительных иммуноферментных результатов на антитела к SARS-CoV-2 показал, что антитела к S-Ag возбудителя КВИ определялись чаще, особенно класса M (в 53,8% случаев). Следует отметить, что уровень средней оптической плотности (ОП) серопозитивных образцов был также значительно выше по содержанию вируснейтрализующих антител к поверхностному S-Ag вируса SARS-CoV-2 (выше в 2 и более раз), чем к нуклеокапсидному белку: в среднем ОП составила по IgM 1,7 против 0,64, по IgG – 3,14 против 0,98 соответственно.

Можно предположить, что полученная разница в результатах связана со многими причинами, одной из которых являются разные качественные характеристики диагностических наборов – их чувствительность и специфичность. Кроме того, более ранним появлением антител класса M к шиповидному антигену вируса SARS-CoV-2 и более выраженной иммунной реакцией на S-Ag возбудителя КВИ по сравнению с NP-белком.

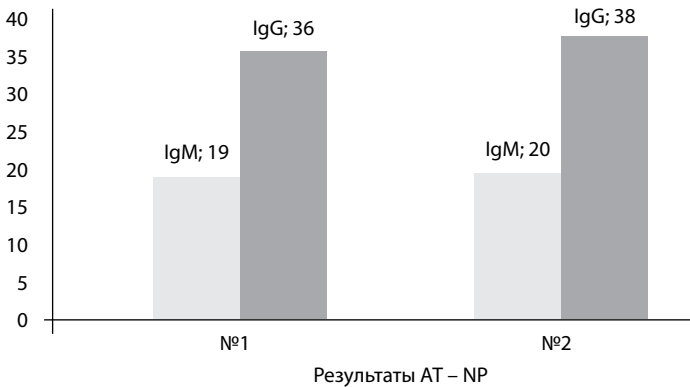


Рис. 2. Сравнительный анализ положительных результатов по двум наборам отечественного производства (на антитела к NP-Ag)

Fig. 2. Comparative analysis of positive results for two kits of domestic production (antibodies by NP-Ag)

Нами также был проведен сравнительный анализ результатов параллельного исследования сывороток крови по определению IgM и IgG к возбудителю КВИ с помощью двух тест-систем отечественного производства – № 1 и № 2.

Как видно из рис. 2, результаты получены сопоставимые, однако на тест-системе № 2 серопозитивных результатов было несколько больше. Уровень позитивности сывороток крови в среднем как по антителам класса М, так и IgG оказался несколько выше на тест наборах № 2 (ОП по IgM – 0,77 единицы против 0,57, по IgG – 1,44 против 1,31 соответственно).

Анализ сопоставимости результатов ИФА на КВИ данных образцов на двух тест-системах показал, что полное совпадение наблюдалось по 30 сывороткам, частичное (по IgM пол/отр) – по 4 пробам, расхождение результатов наблюдалось по 3 образцам (IgM и IgG – пол/отр, отр/пол).

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы считаем, что подходить к интерпретации результатов определения антител к SARS-CoV-2 следует дифференцированно:

- для оценки эффективности поствакцинального иммунитета нужно использовать тест-системы, выявляющие антитела к поверхностному шиповидному S-Ag;
- для диагностики КВИ допустимо использовать тест-наборы, выявляющие антитела как S-Ag, так NP-Ag;
- в отдельных случаях, при сомнительных, слабopоложительных результатах исследования: при коэффициенте позитивности (КП) – отношении ОП исследуемого образца к критической ОП – в пределах 1,01–2,0 либо несовпадении данных инструментальных исследований, клинических проявлений, лабораторных результатов, ИФА анализ следует повторить через некоторое время – 5–10 дней (в случае наличия КВИ, КП повторного образца должен возрасти по отношению к первой пробе, а при неспецифической иммуноферментной реакции КП должен снизиться или стать меньше 1,0);

- в случае отсутствия тест-систем, позволяющих определять анти-тела количественно, считаем возможным оценивать коэффициент позитивности (полуколичественный тест) антител в биологическом образце, однако следует отметить, что динамику уровня антител необходимо оценивать на тест-системах одного производителя, предпочтительно в одной постановке ИФА;
- для скрининга наличия антител к возбудителю КВИ достаточно использовать тест-систему по определению суммарных антител к SARS-CoV-2, которые более чувствительные и требуют меньших финансовых затрат на проведение исследования.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Вклад авторов: концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, написание текста – Анисько Л.А., Рогачева Т.А.; рисунки – Анисько Л.А.; редактирование – Карпов И.А.

Authors' contribution: research concept and design, collecting and processing material, writing text – Anisko L., Rogacheva T.; figures – Anisko L.; editing – Karpov I.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Ramanathan K. (2020) *Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study*, January, pp. 19–21.
2. Fang X. (2020) Profile of specific antibodies to SARS-CoV-2: The first report. *J. Infect.*, vol. 81, no 1, pp. 173–178. doi: 10.1016/j.jinf.2020.03.039.

Подана/Submitted: 28.04.2021

Принята/Accepted: 22.06.2021

Контакты/Contacts: luidok@mail.ru