

Динамика антител к различным антигенам коронавируса SARS-CoV-2 у
больных с подтвержденной инфекцией Covid-19.

Комбарова¹ С.Ю., Алешкин¹ А.В., Новикова¹ Л.И., Бочкарева¹ С.С., Карпов² О.Э., Пулин² А.А., Орлова² О.А., Дятлов³ И.А., Бикетов³ С.Ф., Панферцев³ Е.А., Горбатов³ А.А., Лебедин⁴ Ю.С.

¹ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора;

²ФГБУ «Национальный медико-хирургический Центр имени Н.И. Пирогова» МЗ РФ;

³ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора;

⁴ООО «ХЕМА».

Антитела IgG- и IgM-класса были исследованы в венозной крови 76 пациентов с подтвержденным по ПЦР и/или КТ наличием вируса SARS-CoV-2 (всего 166 образцов). Из 76 пациентов 61 были обследованы в динамике (от 38 человек по 2 образца в разные сроки болезни, от 18 человек – по 3 образца, от 4 человек – по 4 образца и от 1 человека – 5 образцов, т.е., в целом, от 2 до 5 точек обследования). Образцы сывороток крови были любезно предоставлены ФГБУ «Национальный медико-хирургический Центр имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, где пациенты проходили лечение инфекции Covid-19 в мае 2020 г. Данные о длительности заболевания взяты из анамнеза пациента.

Определение IgG-антител к SARS-CoV-2 проводилось методом ИФА с использованием отечественных диагностических тест-систем с сорбированными в лунках планшета как цельновирионными частицами SARS-CoV-2, так и рекомбинантными белками вируса (таблица 1). Для детекции IgM-антител к SARS-CoV-2 использовали отечественные тест-системы, основанные на непрямом варианте твердофазного ИФА с иммобилизованными в лунках антителами к IgM человека и выявлением специфических антител с помощью конъюгатов, содержащих антигены вируса – N-белок нуклеокапсида («SARS-CoV-2-IgM-ИФА-БЕСТ», АО «Вектор-Бест») или RBDs (receptor binding domen, рецептор-связывающий

домен Spike-белка) («SARS-CoV-2-IgM-ИФА», ООО «ХЕМА»; специальный конъюгат, содержащий RBDs, был любезно предоставлен производителем).

Результаты исследований выражались в виде коэффициента позитивности (КП), представляющего собой отношение оптической плотности образца к критической оптической плотности, высчитываемой в каждом анализе. Интерпретация результатов была следующей: в зависимости от использованной тест-системы положительными считались образцы с КП, превышающем 1,1-1,2; отрицательными – с КП менее 0,8-0,9. Промежуточные значения КП свидетельствовали о сомнительном или неопределенном результате («серая зона»).

Таблица 1.

Иммуноферментные тест-системы, использованные для анализа IgG-антител к SARS-CoV-2.

№№ п/п	Название тест-системы	Антиген в лунке	Производитель
1	«SARS-CoV-2-ИФА-Вектор»	цельновирсионный инактивированный антиген SARS-CoV-2	ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», Новосибирск
2	«ИФА анти- SARS-CoV-2 IgG»	рекомбинантный белок нуклеокапсида (N-белок)	ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск
3	«SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ»	рекомбинантный полноразмерный тримеризованный гликопротеин (Spike-белок)	АО «Вектор-Бест», Новосибирск
4	«SARS-CoV-2-IgG-ИФА»	рекомбинантный белок RBDs (домен Spike-белка)	ФГБУ "НМИЦ гематологии" Минздрава России, ООО «Хема», Москва

Цель исследования заключалась в обнаружении антител к различным антигенам вируса SARS-CoV-2, определении сроков появления и

длительности персистирования антител разного вида у пациентов при подтвержденной инфекции Covid-19.

Были получены следующие результаты.

В ранние сроки наблюдения (до 4-го дня) IgM- и IgG-антитела не обнаруживались, за исключением антител обоих классов к N-белку и IgG-антител к тримеру Spike-белка (таблица 2, рисунки 1, 3). Однако необходимо отметить, что уровень IgM-антител регистрировался в районе «серой зоны» (1,0-1,1), а обнаружение IgG-антител к тримеризованному гликопротеину у 1 пациента (КП 1,7) скорее всего свидетельствует о более раннем инфицировании.

На 5-9 день наблюдения (в среднем, 1-ая неделя) уже у примерно половины пациентов обнаруживались антитела как IgM, так и IgG классов на всех использованных тест-системах, за исключением IgM-антител к RBD, которые выявлялись у трети пациентов. При этом средний уровень КП IgM-антител к N-белку составил 3,8, в то время как IgM к RBD только начинали вырабатываться (среднее значение КП чуть выше 1,2). Самый высокий уровень IgG-антител регистрировался к тримеризованному гликопротеину (5,1), а самый низкий к N-белку (1,4).

Начиная с 10-19 дня наблюдения (в среднем, 2-ая неделя) вплоть до 30-39 дня (в среднем, 5-ая неделя) практически у всех пациентов регистрировались IgM-антитела к N-белку, средний уровень которых достигал 8,0. В то же время IgM-антитела к RBD обнаруживались не у всех (на 10-19 день в 73,2%, на 20-29 день – в 79,5%, на 30-39 – в 55,6 % случаев), а КП не превышал 2,4. Все исследованные антитела IgG класса регистрировались в 92,3-100% случаев в те же сроки наблюдения, причем если КП антител к N-белку оставался на уровне 3,6-3,9, то антитела к цельному вириону и белкам шипа достигали гораздо более высоких значений (КП 9,6-14,8).

В более поздние сроки наблюдения – 40-49 и 50-53 дни (7-8-ая неделя) IgG-антитела по-прежнему обнаруживались ко всем исследованным антигенам. При этом уровень специфических IgG к N-белку оставался в пределах тех же значений (КП 3,1-3,4), к цельновирионному антигену и RBD снизился до 6,6-6,1 и 7,6-6,9, соответственно, а к тримеризованному гликопротеину продолжал оставаться высоким (КП 9,6-11,1). К 7-8 неделе наблюдения IgM-антитела начинают исчезать из кровотока. Так, IgM-антитела к RBD выявлялись только у 25% пациентов, а к N-белку – у 50%. Необходимо отметить, что из 76 обследованных у 2 пациентов антитела вообще не вырабатывались или вырабатывались слабо. Из них у одного (пробы сыворотки крови взяты на 15-й и 22-й дни заболевания) регистрировались только специфические IgM к N-белку, а IgG-антитела ни к N-белку, ни к белкам шипа, ни к цельному вириону в эти сроки не выявлялись, а у другого пациента, от которого имелись образцы сыворотки крови, взятые только на 43 и 53 дни болезни, не были выявлены никакие IgM-антитела (неизвестно, были ли они в более ранние сроки болезни), а IgG-антитела обнаруживались только на 53-й день – к цельновирионному антигену с КП 2,9, к тримеризованному гликопротеину шипа с КП 5,5 и к RBD с КП 1,1 (но не к N-белку).

Была отмечена различная динамика выработки IgG- и IgM-антител к N-белку нуклеокапсида и к RBD – основному домену гликопротеина шипа вируса (рисунок 2). И те, и другие IgM-антитела начинают обнаруживаться на 1-ой неделе заболевания, однако, если уровень IgM-антител к RBD не достигает высоких значений (КП оставался на уровне 1,2-3,2 со снижением к 8-ой неделе до 1,6), то уровень IgM-антител к N-белку нуклеокапсида резко увеличивается за короткий промежуток времени от нулевых значений до КП 8,0 (3-я неделя заболевания). За весь срок наблюдения концентрация этих специфических IgM оставалась высокой и снизилась только к 8-ой неделе до среднего значения КП 3,3. Динамика выработки специфических IgG была противоположной. Концентрация IgG-антител к RBD резко увеличивалась

начиная с 1-ой недели заболевания от КП 2,4 до КП 11,1 к 5-ой неделе, в то время как уровень IgG-антител к N-белку нарастал более плавно и не превышал КП 4,0. Динамика выработки IgM- и IgG-антител к N-белку нуклеокапсида согласуется с [1, 2].

Степень увеличения концентрации IgG-антител, измеренная с помощью тест-систем с сорбированными цельным вирионом или рекомбинатными белками шипа, позволяет с точностью до недели предположить продолжительность заболевания, подтверждая важность диагностического серологического тестирования пациентов с Covid-19 [3]. В случае IgG-антител к N-белку, концентрация которых держится на одном невысоком уровне в течение всего заболевания, маловероятно извлечение какой-либо информации о его продолжительности.

Отмечена корреляция уровней IgG-антител к цельновирионному антигену и рекомбинатным антигенам шипа (тримеризованному гликопротеину и RBD), что указывает на возможность использования всех трех вариантов иммуноферментных тест-систем для оценки противовирусного гуморального иммунитета. Однако, тест-система, основанная на цельновирионном антигене, может выявлять также антитела к сезонным коронавирусам (информация получена от разработчиков), что может приводить к появлению ложноположительных результатов при анализе образцов на антитела к SARS-CoV-2. В связи с этим мы полагаем, что при низких значениях КП, зарегистрированных при использовании цельновирионной системы, необходимо рекомендовать дополнительно проанализировать образцы в системах с рекомбинатными антигенами.

Возможность обнаружения IgG-антител к S-белку (Spike-белок, рецепторный белок (гликопротеин), находится в оболочке суперкапсида в виде тримера, образует так называемые «шипы» коронавируса) имеет большое значение в свете данных литературы о том, что именно эти антитела обеспечивают защиту при инфицировании SARS-CoV-2 путем

нейтрализации вируса [4], а сам S-белок рассматривается как кандидат при конструировании вакцин против Covid-19 [5,6,7].

Выводы.

1. В срок наблюдения до 5 дней в сыворотке крови пациентов с подтвержденной инфекцией Covid-19 не выявляются IgM- и IgG-антитела ни к одному из исследованных антигенов вируса SARS-CoV-2.
2. Сероконверсия как IgM- так и IgG-антител наблюдалась к первой неделе заболевания, что было зафиксировано при использовании всех 6 иммуноферментных тест-систем.
3. Динамика антител М класса к N-белку и RBD была схожей, но уровень антител отличался. Начиная обнаруживаться к 1-ой неделе заболевания IgM-антитела к RBD не достигали высоких значений, в то время как уровень IgM-антител к N-белку резко увеличивался за короткий промежуток времени от нулевых до высоких значений КП к 3-ей неделе заболевания. За весь срок наблюдения концентрация этих специфических IgM оставалась высокой и снизилась только к 8-ой неделе.
4. Динамика IgG-антител к цельновирионному антигену и рекомбинатным антигенам была схожей с максимальными значениями показателей на 4-5 неделе наблюдения.
5. Динамика IgG-антител к N-белку отличалась от динамики IgG-антител к цельновирионному антигену и рекомбинатным антигенам (S-белок и его домен RBD) (незначительный рост концентрации к 1-ой неделе и невысокий уровень в течение 8 недель наблюдения).

6. Была отмечена различная динамика выработки IgG- и IgM-антител к N-белку нуклеокапсида и к RBD – основному домену S-белка. Для антител к N-белку характерно резкое увеличение и высокий уровень IgM-антител, в то время как уровень IgG-антител нарастал более плавно и не достигал высоких значений. Для антител к RBD наблюдалась обратная картина – резкое увеличение и высокий уровень IgG-антител, сохраняющийся даже к 8-ой неделе наблюдения, и более плавный рост до невысоких концентраций IgM-антител.
7. Характерная динамика уровня IgG-антител, измеренная с помощью тест-системы с сорбированными цельным вирионом или рекомбинантными S-белком или RBD (но не с N-белком), позволяет судить о продолжительности заболевания (т.е. сроке от момента инфицирования), что может иметь диагностическое значение.

Таблица 2.

Частота обнаружения IgG- и IgM-антител у пациентов в различные сроки наблюдения.

Срок наблюдения; кол-во пациентов	IgG-антитела к различным антигенам SARS-CoV-2							IgM-антитела к различным антигенам SARS-CoV-2				
	N-белок		инактивированный цельный вирион		тримеризованный гликопротеин (Spike)		RBDs		N-белок		RBDs	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
3-4 дня; n=6	1	16,7	0	0	1	16,7	0	0	1	16,7	0	0
5-9 дней; n=29	15	51,8	14	48,3	16	55,2	15	51,8	14	48,3	10	34,5
10-19 дней; n=56	56	100,0	55	98,2	56	100,0	52	92,9	56	100,0	41	73,2
20-29 дней; n=39	38	97,4	36	92,3	38	97,4	37	94,9	38	97,4	31	79,5
30-39 дней; n=9	9	100,0	9	100,0	9	100,0	9	100,0	9	100,0	5	55,6
40-49 дней; n=5	4	80,0	4	80,0	4	80,0	4	80,0	3	60,0	2	40,0
50-53 дня; n=4	3	75,0	4	100,0	4	100,0	4	100,0	2	50,0	1	25,0

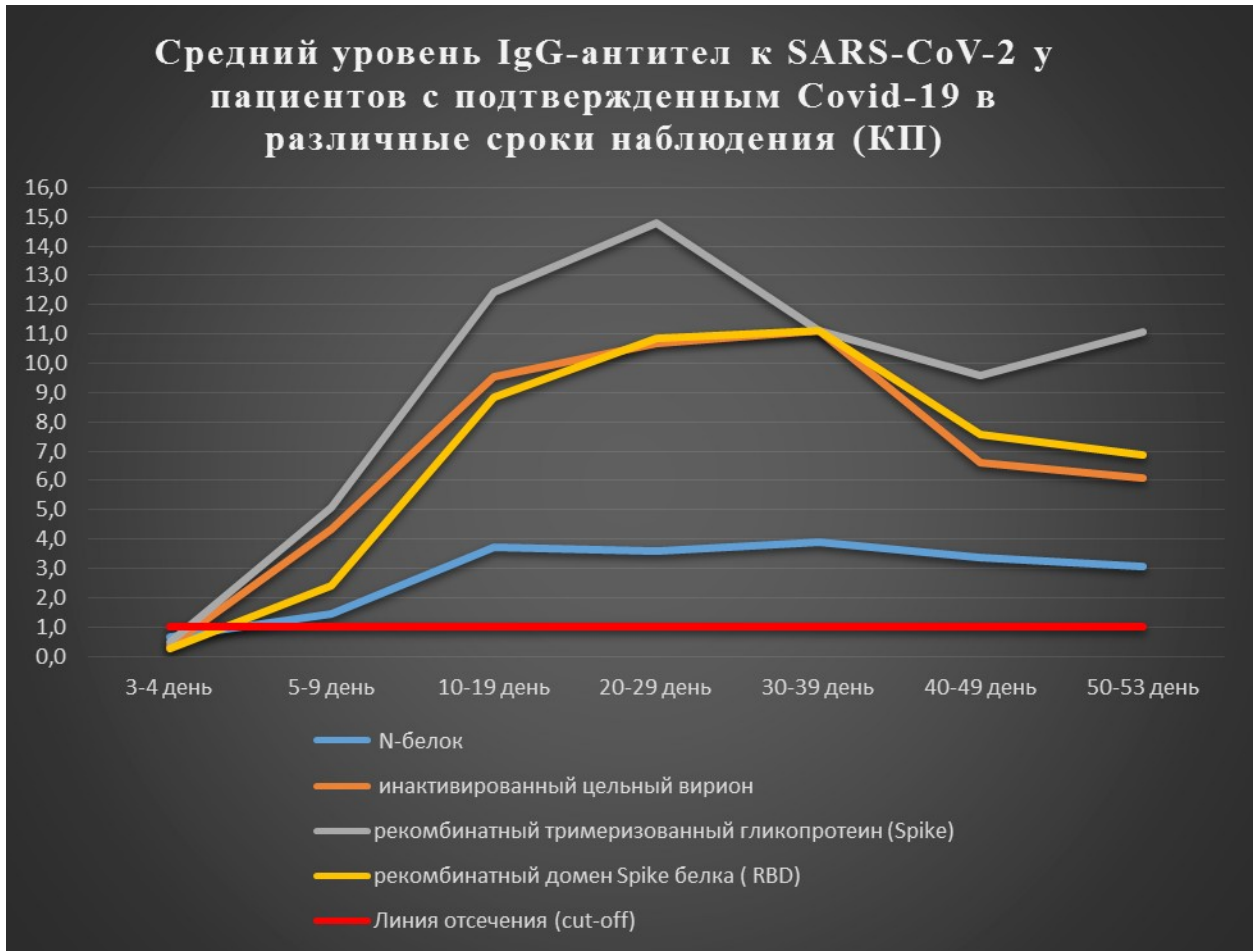


Рисунок 1. Средний уровень IgG-антител к SARS-CoV-2 у пациентов с подтвержденным Covid-19 в различные сроки наблюдения (КП).

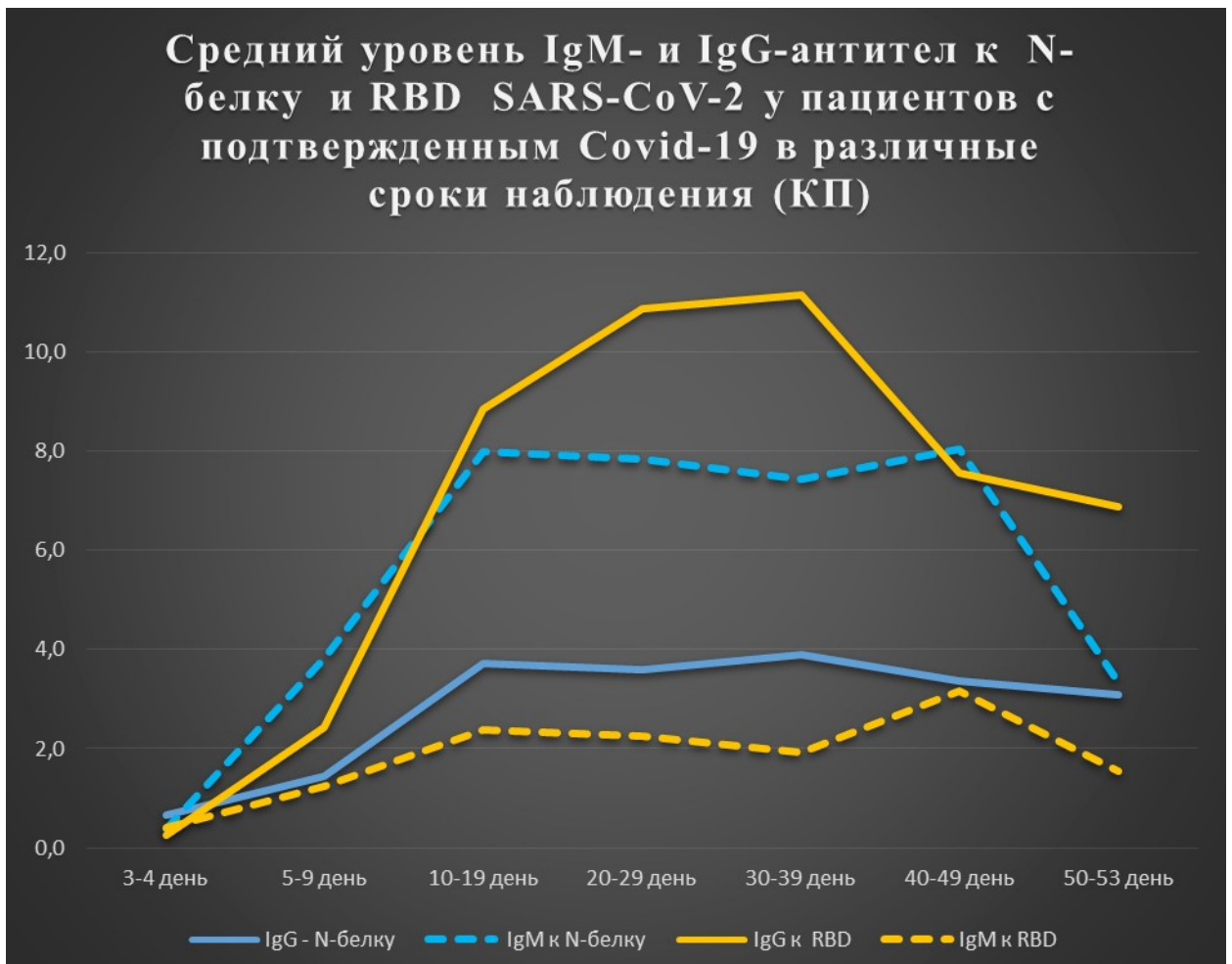


Рисунок 2. Средний уровень IgM- и IgG-антител к N-белку и RBD SARS-CoV-2 у пациентов с подтвержденным Covid-19 в различные сроки наблюдения (КП).

Средний уровень IgM-антител к N-белку и RBD SARS-CoV-2 у пациентов с подтвержденным Covid-19 в различные сроки наблюдения(КП)

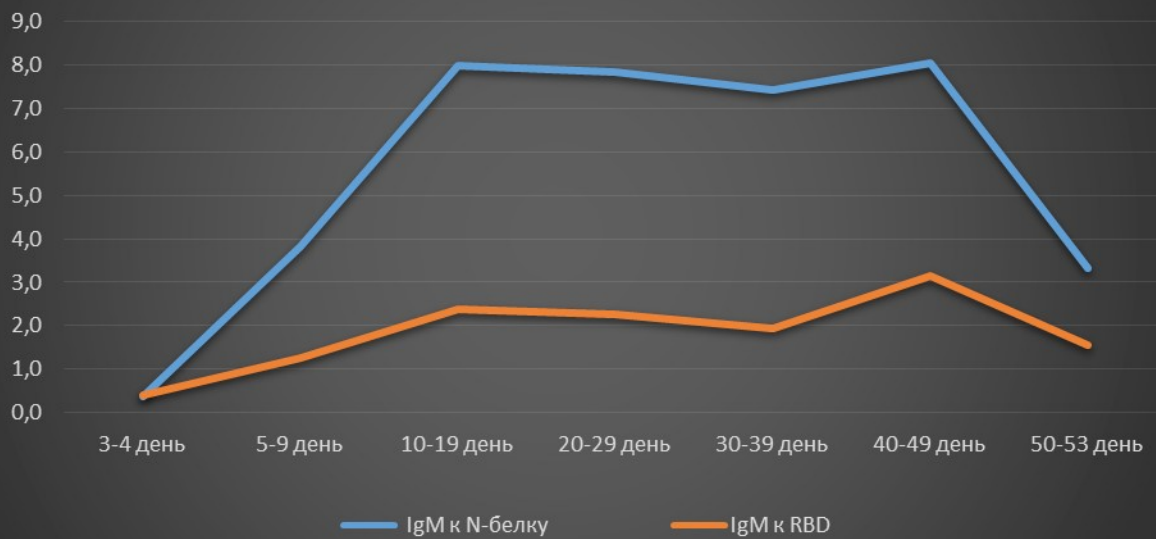


Рисунок 3. Средний уровень IgM-антител к N-белку и RBD SARS-CoV-2 у пациентов с подтвержденным Covid-19 в различные сроки наблюдения (КП).

Список литературы

1. Amanat F, Krammer F. SARS-CoV-2 Vaccines: Status report. [Immunity](#). 2020 Apr 14; 52(4): 583–589. doi: [10.1016/j.immuni.2020.03.007](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.03.007).
2. Wanbo Tai, Lei He, Xiujuan Zhang et al. Characterization of the Receptor Characterization of the receptor-binding domain (RBD) of 2019 novel coronavirus: implication for development of RBD protein as a viral attachment inhibitor and vaccine. *Cell Mol Immunol* 2020 Jun;17(6):613-620. Epub 2020 Mar 19. doi: [10.1038/s41423-020-0400-4](https://doi.org/10.1038/s41423-020-0400-4).
3. [Christian Bundschuh](#), [Margot Egger](#), [Kurt Wiesinger](#) et al. Evaluation of the EDI enzyme linked immunosorbent assays for the detection of SARS-CoV-2 IgM and IgG antibodies in human plasma. [Clinica Chimica Acta Vol. 509](#), October 2020, Pages 79-82. doi.org/10.1016/j.cca.2020.05.047.
4. Juanjuan Zhao, Quan Yuan, Haiyan Wang et al. Antibody response to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.02.20030189>.
5. Alexandra C. Walls, Young-Jun Park, M. Alejandra Tortorici et al. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike glycoprotein. doi: [10.1101/2020.02.19.956581](https://doi.org/10.1101/2020.02.19.956581).
6. Fei Xiang, Xiaorong Wang, Xinliang He et al. Antibody detection and dynamic characteristics in Patients with COVID-19. [Clin Infect Dis](#). 2020 Apr 19: ciaa461. doi: [10.1093/cid/ciaa461](https://doi.org/10.1093/cid/ciaa461).

7. [Giovanni Salvatori](#), [Laura Luberto](#), [Mariano Maffei](#) SARS-CoV-2 Spike protein: an optimal immunological target for vaccines. [Journal of Translational Medicine](#) volume 18, Article number: 222 (2020).