

Оценка корреляционной связи между результатами исследования образцов плазмы крови доноров-реконвалесцентов, перенесших коронавирусную инфекцию COVID-19, в тест-системе «ДС-ИФА-АНТИ-SARS-COV-2-G» и в реакции нейтрализации

Матвеева Е.М., Макарова И.А., Фисенко Н.С., Обрядина А.П.

ООО «Научно-производственное объединение «Диагностические системы», г. Нижний Новгород

Резюме

Проведена работа по оценке корреляционной связи между результатами исследования образцов плазмы крови доноров, перенесших коронавирусную инфекцию COVID-19, в тест-системе «ДС-ИФА-АНТИ-SARS-COV-2-G», производства ООО «НПО «Диагностические системы» (г. Нижний Новгород), и в реакции нейтрализации (РН). В качестве объектов исследования использовали 49 образцов плазмы крови доноров-реконвалесцентов COVID-19 с установленным титром вируснейтрализующих антител (ВНА) для каждого образца.

По результатам исследования была установлена статистически значимая корреляция между титром антител класса G к SARS-COV-2 в иммуноферментном анализе (ИФА) и титром ВНА, а также значениями оптической плотности (ОП), коэффициента позитивности (КП) в ИФА и титром ВНА в плазме крови доноров. Коэффициент корреляции Спирмена составил 0,948 и 0,837 соответственно, при уровне значимости $p < 0,0001$. Чувствительность и специфичность тест-системы «ДС-ИФА-АНТИ-SARS-COV-2-G» при тестировании образцов от потенциальных доноров гипериммунной плазмы составили 100% и 85,7% соответственно, по критерию титра антител ≥ 1600 , и 100% и 91,4% по критериям ОП $\geq 3,000$ (КП $\geq 9,6$).

Ключевые слова: коронавирус SARS-COV-2, COVID-19, вируснейтрализующие антитела, корреляционная связь

Введение

Информация о кластере случаев пневмонии неясной этиологии в городе Ухань, Китайская Народная Республика, впервые поступила во Всемирную организацию здравоохранения (ВОЗ) 31 декабря 2019 г. Изначально вирусу было присвоено временное название «новый коронавирус 2019 г. (2019-nCoV)». Позднее ВОЗ определила официальное название инфекции, вызванной новым коронавирусом - COVID-19, а Международный комитет по таксономии вирусов (ICTV) присвоил официальное название вирусу - SARS-CoV-2 [1]. В январе 2020 г. ВОЗ объявила вспышку эпидемии, связанной с SARS-CoV-2, чрезвычайной ситуацией в области общественного здравоохранения, а 11 марта 2020 г. объявила принявшее мировой масштаб распространение болезни пандемией.

На сегодняшний день нет средств этиотропной терапии COVID-19 с доказанной эффективностью. Одним из возможных подходов к лечению новой коронавирусной инфекции, является применение плазмы крови выздоровевших от COVID-19 пациентов, которая содержит антитела к SARS-COV-2. В основе этого метода лежит концепция пассивной иммунизации. Плазма выздоровевших и гипериммунный иммуноглобулин успешно применялись для лечения инфекций, вызванных другими респираторными вирусами.

В ряде исследований показано, что антитела к спайк белку (S) коронавируса SARS-COV-2, в особенности к его рецептор-связывающему домену (RBD), обладают

нейтрализующими свойствами [2]. Именно этот белок является мишенью большинства стратегий вакцинации и терапии на основе антител. Однако показано, что нуклеокапсидный (N) протеин вируса также содержит эпитопы, к которым определяются нейтрализующие антитела [3,4,5]. В исследовании Grzelak L. et al. при оценке корреляции титров нейтрализующих антител с титрами ИФА, коэффициент корреляции Спирмена, r составил 0,9 и 0,88 с IgG к S-белку и IgG к N-протеину соответственно [3].

В настоящее время очевидна актуальность поиска доступного и эффективного метода отбора доноров антиковидной плазмы, содержащей ВНА к SARS-CoV-2. Для ряда серологических тестов зарубежных производителей показана корреляционная связь с титрами ВНА [6,7]. Для тестов «Ortho Vitros anti-SARS-COV-2 IgG» (производства «Ortho Clinical Diagnostic», США) и «SARS-COV-2 IgG II Quant» («Abbott Laboratories», США) проведены исследования по установлению дискриминационных уровней для отбора образцов плазмы, содержащих ВНА [8, 9]. Для тестов отечественного производства, на сегодняшний день, такой информации мало. Временные методические рекомендации министерства здравоохранения Российской Федерации (ВМР МЗ РФ) «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)», версия 10 (08.02.2021) предписывают использовать плазму реконвалесцентов с титром ВНА 1:160, допускается также использование донорской плазмы с титром 1:80 [10].

Нами было проведено исследование образцов плазмы крови доноров-реконвалесцентов, перенесших инфекцию COVID-19, с целью установления корреляционной связи между титрами ВНА и специфических антител, определяемых методом ИФА и определения уровня специфической активности антител в ИФА, который соответствует титру ВНА, рекомендованному ВМР МЗ РФ (версия 10 от 08.02.2021) для клинического применения антиковидной плазмы.

Материалы и методы

При проведении исследования использовали следующие материалы:

- 49 образцов плазмы крови доноров, показавших вируснейтрализующую активность в тесте с использованием перmissive культуры клеток и содержащих вируснейтрализующие антитела в титрах от 1/20 до 1/640. Образцы предоставлены ГБУЗ «Центр крови им. О.К. Гаврилова департамента здравоохранения города Москвы»;
- 24 образца сыворотки крови доноров, содержащих вируснейтрализующие антитела в титре $<1/30$.
- тест-систему «ДС-ИФА-АНТИ-SARS-COV-2-G» производства ООО «НПО «Диагностические системы», кат. №S-2382, с.238002, с.238003;
- автоматическое устройство для промывки микропланшетов - вошер BIORAD PW40 («Био-Рад Лабораториес САС», Франция, ФСЗ 2008/02424 от 07.08.2008), инд. № ВШ-16, поверка до 22.08.20; инд. № ВШ-23, поверка до 11.11.20.
- анализатор иммунологический «Multiskan EX», Thermo Electron Corporation, Финляндия, инв.№РИ-1, поверка до 21.08.20.
- дозаторы пипеточные одноканальные и многоканальные, ЗАО «Термо Фишер Сайентифик», Россия (ФСР 2007/01430 от 23.07.2009; ФСР 2007/01433 от 23.07.2009), инд.№ 1.200.75 (поверка до 21.04.21); 1.1000.135 (поверка до 21.04.21); 1.5000.157 (поверка до 21.04.21); 2.300.170 (поверка до 19.05.21); 1.50.31 (поверка до 21.04.21); 2.50.19 (поверка до 21.04.21); 1.10.130 (поверка до 19.05.21).
- суховоздушный термостат ТС-45, ОАО «Смоленское СКТБ СПУ», Россия, (ФСР 2007/01585 от 27.12.2007), зав. № 21086; инд.№ ТС-45, поверка до 26.09.20.

Выявление антител класса G к SARS-COV-2 проводили методом ИФА с использованием тест-системы «ДС-ИФА-АНТИ-SARS-COV-2-G». Постановку анализа осуществляли согласно инструкции по применению к указанному набору реагентов.

Статистический анализ данных проводили с помощью программы Analyse-it. Для оценки нормальности распределения результатов использовали тесты Шапиро-Уилкса и Андерсона-Дарлинга. Для оценки взаимосвязи между титрами ИФА и РН использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена.

Чувствительность и специфичность тест-системы «ДС-ИФА-АНТИ-SARS-COV-2-G» при тестировании образцов от потенциальных доноров гипериммунной плазмы рассчитывали в соответствии с рекомендациями ГОСТ Р 53022.3-2008 [11].

Результаты и обсуждение

В ходе исследования 49 образцов плазмы крови доноров-реконвалесцентов COVID-19 были охарактеризованы на наличие ВНА к SARS-CoV-2 при проведении РН на культуре клеток с указанием титра нейтрализующих антител. Дополнительно исследовали 24 образца сыворотки крови доноров в наборе COVID-19 ImmunoRank Neutralization MICRO-ELISA (S2500, Leinco Technologies, Китай) для определения титра ВНА. Все они показали титр нейтрализующих антител <30. Обе выборки были протестированы в «ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G». Результаты исследования представлены в табл. 1.

Таблица 1.

Результаты исследования образцов сыворотки/плазмы крови в ИФА и в РН

№ образца	Результат РН, титр	Результат ИФА, ОП	Результат ИФА, КП	Результат ИФА, титр
1	160	3,500	11,48	3200
2	80	3,092	10,14	1600
3	40	2,488	8,16	100
4	80	3,759	12,32	3200
5	80	3,753	12,30	3200
6	160	3,422	11,22	6400
7	160	3,599	11,80	12800
8	160	4,056	13,30	3200
9	160	3,730	12,23	6400
10	320	3,831	12,56	12800
11	80	3,720	12,20	3200
12	20	2,845	9,33	1600
13	20	1,353	4,44	100
14	80	3,471	11,38	3200
15	80	3,688	12,09	3200
16	40	4,056	13,30	3200
17	40	1,232	4,04	100
18	160	3,366	11,04	3200
19	80	3,990	13,08	3200
20	160	3,653	11,98	12800
21	80	3,213	10,53	1600
22	80	3,469	11,37	3200
23	640	3,529	11,57	12800
24	80	3,171	10,40	1600
25	80	3,176	10,41	1600
26	40	0,234	0,77	<100

27	320	3,452	11,32	12800
28	80	3,279	10,75	1600
29	160	3,467	11,37	12800
30	640	3,906	12,81	12800
31	80	3,721	12,20	12800
32	160	3,996	13,10	12800
33	40	3,621	11,87	3200
34	320	3,990	13,08	12800
35	160	4,023	13,19	12800
36	80	3,576	11,72	3200
37	160	4,035	13,23	12800
38	40	2,914	9,55	1600
39	80	4,072	13,35	6400
40	160	4,003	13,12	12800
41	160	3,539	11,60	3200
42	40	3,630	11,90	1600
43	160	3,756	12,31	3200
44	160	3,578	11,73	3200
45	80	3,199	10,49	1600
46	40	2,388	7,83	100
47	320	3,838	12,58	12800
48	320	3,724	12,21	12800
49	20	1,419	4,65	100
50	<30	0,021	0,07	<100
51	<30	0,011	0,04	<100
52	<30	0,006	0,02	<100
53	<30	0,000	0,00	<100
54	<30	0,005	0,02	<100
55	<30	0,003	0,01	<100
56	<30	0,004	0,01	<100
57	<30	0,009	0,03	<100
58	<30	0,010	0,03	<100
59	<30	0,005	0,02	<100
60	<30	0,006	0,02	<100
61	<30	0,008	0,03	<100
62	<30	0,011	0,04	<100
63	<30	0,003	0,01	<100
64	<30	0,005	0,02	<100
65	<30	0,006	0,02	<100
66	<30	0,006	0,02	<100
67	<30	0,005	0,02	<100
68	<30	0,008	0,03	<100
69	<30	0,008	0,03	<100
70	<30	0,008	0,03	<100
71	<30	0,010	0,03	<100
72	<30	0,011	0,04	<100
73	<30	0,007	0,02	<100

Для исследования корреляционной связи между титром антител в образцах крови доноров, полученных в ИФА и в РН, использовали программу Analyse-it. Сначала проводили исследование выборки на нормальность распределения. Для этих целей

использовали тесты Шапиро-Уилка и Андерсона-Дарлинга. Результаты представлены в табл. 2.

Таблица 2.

Результаты исследования нормальности распределения данных в выборках по данным ИФА и РН

	ИФА	РН
Тест Шапиро-Уилка		
W	0,75	0,70
Уровень значимости (p)	<0,0001	<0,0001
Пройден ли тест на нормальность ($\alpha=0,05$)?	нет	нет
Тест Андерсон-Дарлинга		
A ²	7,93	5,89
Уровень значимости (p)	<0,0001	<0,0001
Пройден ли тест на нормальность ($\alpha=0,05$)?	нет	нет
Численность выборки	73	73

Так как распределение данных не является нормальным, для оценки связи между титрами в ИФА и РН использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Результаты представлены в табл. 3. Корреляция показателей ОП (КП) и титра антител в ИФА с титрами ВНА проиллюстрирована на рис. 1, 2.

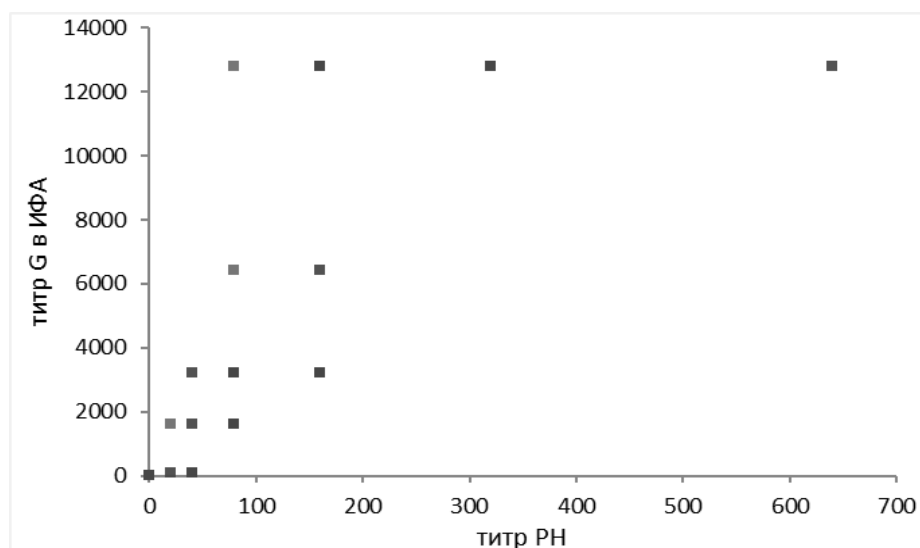


Рис. 1. Корреляция между титрами IgG и ВНА к SARS-CoV-2.

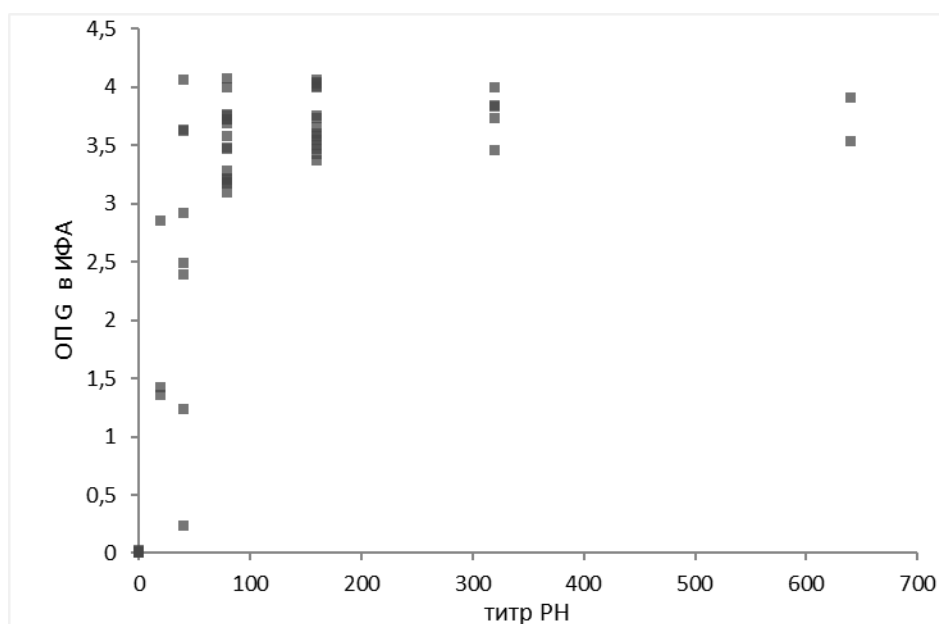


Рис. 2. Корреляция между ОП (КП) образцов, содержащих IgG и титрами ВНА к SARS-CoV-2.

Таблица 3.

Результаты корреляционного анализа методом Спирмена
данных, полученных в ИФА и РН

Тест Спирмена	Титр в ИФА – титр в РН	ОП (КП) в ИФА – титр в РН
Коэффициент корреляции (r)	0,948	0,837
95% доверительный интервал	0,916-0,967	0,748-0,896
Уровень значимости (p)	< 0,0001	< 0,0001
Количество пар сравнения	73	73

Коэффициент корреляции Спирмена составил 0,948 и 0,837 при уровне значимости $p < 0,0001$, что свидетельствует о статистически достоверной корреляционной связи между титром IgG в ИФА и титром нейтрализующих антител, а также ОП (КП) в ИФА и титром нейтрализующих антител в плазме крови доноров.

При расчете чувствительности и специфичности тест-системы «ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G» для отбора доноров антиковидной плазмы с высокой активностью антител к SARS-CoV-2 (по критериям соответствующих титров антител, ОП (КП) и титров нейтрализующих антител) рассматривали следующие параметры:

- Позитивный результат в ИФА – значение титра антител ≥ 1600 , ОП $\geq 3,000$ (КП $\geq 9,6$)
- Негативный результат в ИФА – значение титра антител < 1600 и ОП $< 3,000$ (КП $< 9,6$)
- Позитивный результат в РН – значение титра нейтрализующих антител ≥ 80
- Негативный результат в РН – значение титра нейтрализующих антител < 80 .

Полученные аналитические характеристики «ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G» приведены в табл. 4 и 5.

Таблица 4.

Аналитические характеристики «ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G» для отбора доноров антиковидной плазмы, содержащей ВНА к SARS-CoV-2 по критерию титра антител ≥ 1600

Статус по ИФА	Статус по РН		Всего
	Позитивный, ≥ 80	Негативный, < 80	
Позитивный, титр антител ≥ 1600	38	5	43
Негативный, титр антител < 1600	0	30	30
Всего	38	35	73
Чувствительность, %			100,0
Специфичность, %			85,7
Прогностическая ценность положительного результата, %			88,4
Прогностическая ценность отрицательного результата, %			87,5

Таблица 5.

Аналитические характеристики «ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G» для отбора доноров антиковидной плазмы, содержащей ВНА к SARS-CoV-2 по критерию ОП $\geq 3,000$ (КП $\geq 9,6$)

Статус по ИФА	Статус по РН		Всего
	Позитивный, ≥ 80	Негативный, < 80	
Позитивный, ОП $\geq 3,000$ (КП $\geq 9,6$)	38	3	41
Негативный, ОП $< 3,000$ (КП $< 9,6$)	0	32	32
Всего	38	35	73
Чувствительность, %			100
Специфичность, %			91,4
Прогностическая ценность положительного результата, %			92,7
Прогностическая ценность отрицательного результата, %			92,1

При расчете чувствительности и специфичности ИФА тест-системы «ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G» для отбора доноров антиковидной плазмы с высокой активностью антител к SARS-CoV-2, по приведенным ниже критериям соответствующих титров антител, ОП (КП) и титров нейтрализующих антител, рассматривали следующие параметры:

Позитивный результат в ИФА – значение титра антител ≥ 3200 и ОП $\geq 3,300$ (КП $\geq 10,6$)

Негативный результат в ИФА - значение титра антител < 3200 и ОП $< 3,300$ (КП $< 10,6$)

Позитивный результат в РН – значение титра нейтрализующих антител ≥ 160

Негативный результат в РН – значение титра нейтрализующих антител < 160 .

В табл. 6 и 7 приведены полученные аналитические характеристики «ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G».

Таблица 6.

Аналитические характеристики «ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G» для отбора плазм крови с высокой активностью антител к SARS-CoV-2 по критерию титра антител ≥ 3200

Статус по ИФА	Статус по РН		Всего
	Позитивный, ≥ 160	Негативный, < 16	
Позитивный, титр антител	22	12	34

≥3200			
Негативный, титр антител <3200	0	39	39
Всего	22	51	73
Чувствительность, %			100,0
Специфичность, %			76,5
Прогностическая ценность положительного результата, %			64,7
Прогностическая ценность отрицательного результата, %			81,0

Таблица 7.

Аналитические характеристики «ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G» для отбора плазм крови с высокой активностью антител к SARS-CoV-2 по критерию ОП ≥3,300 (КП ≥ 10,6)

Статус по ИФА	Статус по РН		Всего
	Позитивный, ≥160	Негативный, <160	
Позитивный, ОП ≥3,300 (КП ≥ 10,6)	22	13	35
Негативный, ОП <3,300 (КП <10,6)	0	38	38
Всего	22	51	73
Чувствительность, %			100
Специфичность, %			74,5
Прогностическая ценность положительного результата, %			62,9
Прогностическая ценность отрицательного результата, %			79,7

В ходе исследования продемонстрированы высокие показатели чувствительности и специфичности тест-системы «ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G», что позволяет эффективно выявлять высокие уровни ВНА к SARS-CoV-2 в сыворотке/плазме крови человека.

Заключение

В настоящем исследовании по оценке корреляционной зависимости между результатами исследований образцов плазмы крови доноров-реконвалесцентов, перенесших инфекцию COVID-19, проведенных методом ИФА и в РН, была выявлена достоверная корреляция между титрами антител в тест-системе «ДС-ИФА-АНТИ-SARS-COV-2-G» и ВНА. Титры антител в ИФА положительно коррелируют с титрами ВНА и ОП образца. Для эффективного отбора образцов антиковидной плазмы, содержащей ВНА в титрах ≥1/80 и ≥1/160 с использованием тест-системы «ДС-ИФА-АНТИ-SARS-COV-2-G» установлены критерии значений ОП (КП) и титров специфических IgG (табл.8).

Таблица 8.

Соответствие значений ОП (КП) и титров антител в ИФА титрам ВНА

Титр ВНА в РН	Значение ОП в ИФА	Значение КП в ИФА	Титр антител в ИФА
≥1/80	≥3,000	≥9,6	≥1/1600
≥1/160	≥ 3,300	≥10,6	≥1/3200

Продемонстрированы высокие показатели чувствительности и специфичности тест-системы «ДС-ИФА-АНТИ-SARS-COV-2-G» производства ООО «НПО «Диагностические системы» при тестировании образцов биологического материала от потенциальных доноров гипериммунной плазмы.

Литература

1. Диагностическое тестирование для определения вируса SARS-CoV-2. Временные рекомендации ВОЗ от 11 сентября 2020 г. <https://www.euro.who.int/ru/health-topics/health-emergencies/coronavirus-covid-19/publications-and-technical-guidance/2020/diagnostic-testing-for-sars-cov-2-interim-guidance,-11-september-2020>
2. Grigoryan L., Pulendran B. The immunology of SARS-CoV-2 infections and vaccines. *Semin Immunol.* 2020 Aug; 50:101422
3. Sholukh A.M., Fiore-Gartland A., Ford E.S., Hou Y., Tse L.V., Lempp F.A. et al. Evaluation of SARS-CoV-2 neutralization assays for antibody monitoring in natural infection and vaccine trials. *medRxiv* .2020 Dec 8; 2020. 12.07.20245431. doi: 10.1101/2020.12.07.20245431.Preprint
4. Flehmig B., Schindler M., Ruetalo N., Businger R., Bayer M., Haage A. et al. Persisting neutralizing activity to SARS-CoV-2 over months in sera of COVID-19 patients. *Viruses.* 2020 Nov 27;12(12):1357. doi: 10.3390/v12121357
5. Grzelak L., Temmam S., Planchais C., Demeret C., Tondeur L., Huon C. et al., A comparison of four serological assays for detecting anti-SARS-CoV-2 antibodies in human serum samples from different populations. *Sci Transl Med.* 2020 Sep 2; 12(559):eabc3103. doi: 10.1126/scitranslmed.abc3103. Epub 2020 Aug 17.
6. Luchsinger L.L. Ransegnola B., Jin D., Muecksch F., Weisblum Y., Bao W., et al. Serological analysis of New York City COVID19 convalescent plasma donors. *medRxiv* 2020 Jun 9:2020.06.08.20124792. doi: 10.1101/2020.06.08.20124792. Preprint.
7. Padoan A., Bonfante F., Pagliari M., Bortolami A., Negrini D., Zuin S, et al. Analytical and clinical performances of five immunoassays for the detection of SARS-CoV-2 antibodies in comparison with neutralization activity. *EBioMedicine.* 2020 Dec;62:103101. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.103101. Epub 2020 Nov 4.
8. Emergency Use Authorization (EUA) for the emergency use of COVID-19 convalescent plasma for the treatment of hospitalized patients with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), pursuant to Section 564 of the Act.3, August 23, 2020, the Food and Drug Administration (FDA) <https://www.clinicaltrials.gov/>
9. Материалы 36-го Конгресса Международного общества переливания крови (ISBT) от 16.12.2020.
10. Временные методические рекомендации министерства здравоохранения РФ «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19), версия 9 от 26.10.2020 г. – 235 с.
11. ГОСТ Р 53022.3-2008. Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов. <http://docs.cntd.ru/document/120007256>