

Оценка корреляционной связи между результатами исследования образцов плазмы крови доноров-реконвалесцентов, перенесших коронавирусную инфекцию COVID-19, в тест-системах «ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G (S)», «ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G-количественный» 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

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 13.1 (09.11.2021) 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 13.1 от 09.11.2021) для клинического применения антиковидной плазмы.

Материалы и методы

При проведении исследования использовали следующие материалы:

- 49 образцов плазмы крови доноров, с установленной вируснейтрализующей активностью в тесте с использованием перmissive культуры клеток (PH) и содержащих вируснейтрализующие антитела (ВНА) в титрах от 1/20 до 1/640;
- 24 образца сыворотки крови доноров, отобранных до ноября 2019.

Использовались следующие тест-системы:

- Тест-система «ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G (S)», производства ООО «НПО «Диагностические системы», кат. № S-2442.
- Тест-система «ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G-количественный», производства ООО «НПО «Диагностические системы», кат. № S-2562.
- Тест-система для определения вируснейтрализующих антител (суррогатный полуколичественный тест нейтрализации) COVID-19 ImmunoRank Neutralization MICRO-ELISA (S2500, Leinco Technologies, Китай). Принцип действия теста – ингибирование связывания рекомбинантного RBD фрагмента спайк белка SARS-CoV-2 с рекомбинантным ангиотензин-превращающим ферментом 2 (ACE2) в присутствии нейтрализующих антител в исследуемой пробе.

Выявление антител класса G к SARS-COV-2 проводили методом ИФА с использованием тест-систем «ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G (S)» и «ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G-количественный». Постановку анализа осуществляли согласно инструкции по применению к указанным наборам реагентов.

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

Чувствительность и специфичность тест-системы «ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G (S)» и 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 и 24 образца сыворотки крови доноров, отобранных до ноября 2019, были охарактеризованы в наборе COVID-19 ImmunoRank Neutralization MICRO-ELISA (S2500, Leinco Technologies, Китай). Результаты исследования представлены в табл. 1.

Таблица 1.

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

№ образца	Результаты определения ВНА		«ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G (S)»,			«ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G количественный»	
	РН, титр	Индекс нейтрализации, %	ОП	КП	титр	ОП	сЕд/мл
1	20	≥20	2,845	9,33	1600	0,464	32,5
2	20	≥20	1,353	4,44	100	0,503	35,8
3	20	≥20	1,419	4,65	100	0,893	74,3
4	40	≥20	2,488	8,16	100	0,594	43,7
5	40	≥20	4,056	13,3	3200	0,515	36,8
6	40	≥20	1,232	4,04	100	1,279	127,6
7	40	≥20	0,234	0,77	<100	0,798	63,8
8	40	≥20	3,621	11,8 7	3200	0,717	55,4
9	40	≥20	2,914	9,55	1600	0,961	82,4
10	40	≥20	3,63	11,9	1600	0,838	68,1
11	40	≥20	2,388	7,83	100	1,364	141,9
12	80	≥20	3,092	10,1 4	1600	1,56	179,3
13	80	≥20	3,759	12,3 2	3200	1,534	173,9
14	80	≥20	3,753	12,3	3200	1,321	134,5
15	80	≥20	3,72	12,2	3200	1,591	185,7
16	80	≥20	3,471	11,3 8	3200	1,401	148,5
17	80	≥20	3,688	12,0 9	3200	0,997	86,9
18	80	≥20	3,99	13,0 8	3200	0,837	68,0
19	80	≥20	3,213	10,5 3	1600	1,273	126,6
20	80	≥20	3,469	11,3 7	3200	0,119	6,6
21	80	≥20	3,171	10,4	1600	1,267	125,6
22	80	≥20	3,176	10,4	1600	1,531	173,3

				1			
23	80	≥20	3,279	10,7 5	1600	0,977	84,4
24	80	≥20	3,721	12,2	1280 0	1,147	107,3
25	80	≥20	3,576	11,7 2	3200	1,084	98,4
26	80	≥20	4,072	13,3 5	6400	1,084	98,4
27	80	≥20	3,199	10,4 9	1600	1,258	124,2
28	160	≥20	3,5	11,4 8	3200	2,298	385,7
29	160	≥20	3,422	11,2 2	6400	2,177	343,6
30	160	≥20	3,599	11,8	1280 0	1,43	153,8
31	160	≥20	4,056	13,3	3200	1,8	234,0
32	160	≥20	3,73	12,2 3	6400	2,753	578,1
33	160	≥20	3,366	11,0 4	3200	1,871	252,4
34	160	≥20	3,653	11,9 8	1280 0	1,697	209,2
35	160	≥20	3,467	11,3 7	1280 0	2,144	332,8
36	160	≥20	3,996	13,1	1280 0	2,292	383,5
37	160	≥20	4,023	13,1 9	1280 0	1,921	265,9
38	160	≥20	4,035	13,2 3	1280 0	2,25	368,6
39	160	≥20	4,003	13,1 2	1280 0	1,503	167,7
40	160	≥20	3,539	11,6	3200	1,796	233,0
41	160	≥20	3,756	12,3 1	3200	1,451	157,7
42	160	≥20	3,578	11,7 3	3200	2,454	445,3
43	320	≥20	3,831	12,5 6	1280 0	1,623	192,6
44	320	≥20	3,452	11,3 2	1280 0	2,273	376,7
45	320	≥20	3,99	13,0 8	1280 0	2,284	380,6
46	320	≥20	3,838	12,5 8	1280 0	1,925	267,0
47	320	≥20	3,724	12,2 1	1280 0	2,289	382,4
48	640	≥20	3,529	11,5	1280	2,163	339,0

				7	0		
49	640	≥ 20	3,906	12,8 1	1280 0	2,625	518,2
50	<20	<20	0,021	0,07	<100	0,016	<5
51	<20	<20	0,011	0,04	<100	0,023	<5
52	<20	<20	0,006	0,02	<100	0,013	<5
53	<20	<20	0	0	<100	0,018	<5
54	<20	<20	0,005	0,02	<100	0,016	<5
55	<20	<20	0,003	0,01	<100	0,022	<5
56	<20	<20	0,004	0,01	<100	0,022	<5
57	<20	<20	0,009	0,03	<100	0,015	<5
58	<20	<20	0,01	0,03	<100	0,022	<5
59	<20	<20	0,005	0,02	<100	0,014	<5
60	<20	<20	0,006	0,02	<100	0,021	<5
61	<20	<20	0,008	0,03	<100	0,016	<5
62	<20	<20	0,011	0,04	<100	0,018	<5
63	<20	<20	0,003	0,01	<100	0,018	<5
64	<20	<20	0,005	0,02	<100	0,018	<5
65	<20	<20	0,006	0,02	<100	0,021	<5
66	<20	<20	0,006	0,02	<100	0,01	<5
67	<20	<20	0,005	0,02	<100	0,016	<5
68	<20	<20	0,008	0,03	<100	0,015	<5
69	<20	<20	0,008	0,03	<100	0,013	<5
70	<20	<20	0,008	0,03	<100	0,021	<5
71	<20	<20	0,01	0,03	<100	0,017	<5
72	<20	<20	0,011	0,04	<100	0,021	<5
73	<20	<20	0,007	0,02	<100	0,018	<5

Все образцы, содержащие ВНА были определены как положительные в «ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G (S)» и «ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G количественный», и как содержащие нейтрализующие антитела в тесте ингибирования COVID-19 ImmunoRank Neutralization MICRO-ELISA.

Для исследования корреляционной связи между титрами/концентрацией 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. Затем оценивалась корреляционная связь между исследуемыми показателями.

Результаты для тест-системы «ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G (S)» представлены в таблицах 2-7.

Таблица 2.

Результаты исследования нормальности распределения значений 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.

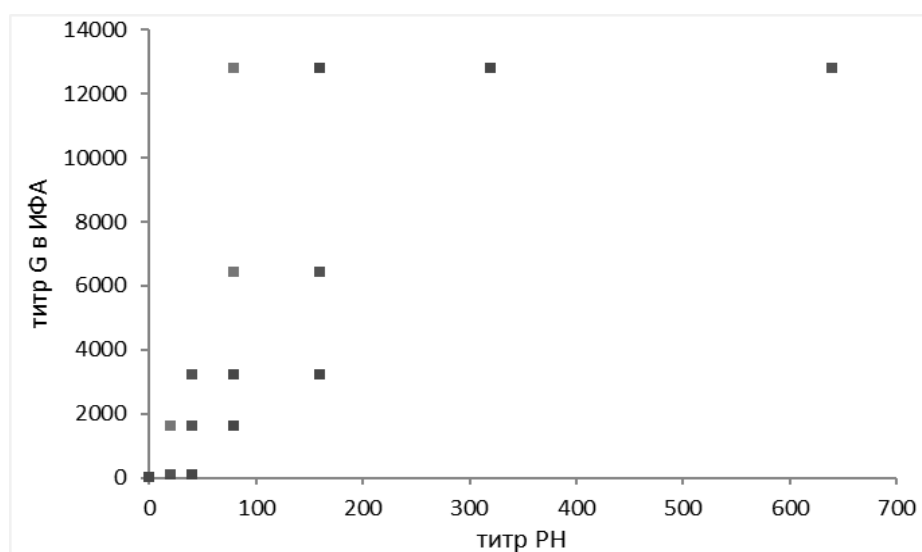


Рис. 1. Корреляция между титрами IgG и ВНА к SARS-CoV-2.

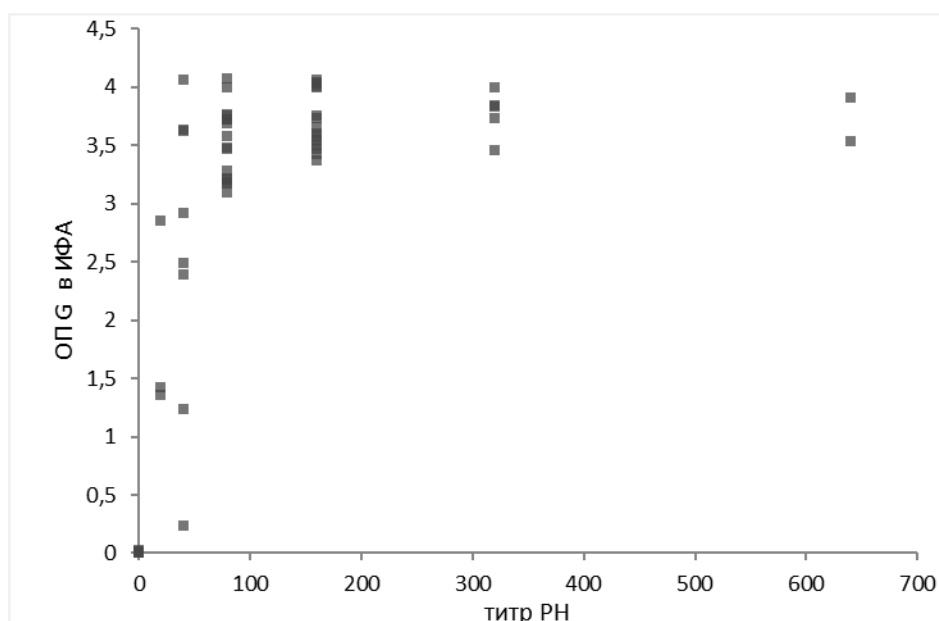


Рис. 2. Корреляция между ОП (КП) образцов, содержащих IgG и титрами ВНА к SARS-CoV-2.

Таблица 3.
Результаты корреляционного анализа методом Спирмена значений, 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 значимой 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 (S)» 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 (S)» приведены в табл. 4 и 5.

Таблица 4.
Аналитические характеристики «ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G (S)» 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 позитивного результата, %	88,4
Прогностическая ценность негативного результата, %	87,5

Таблица 5.

Аналитические характеристики «ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G (S)» 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 позитивного результата, %			92,7
Прогностическая ценность негативного результата, %			92,1

При расчете чувствительности и специфичности ИФА тест-системы «ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G (S)» 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 (S)».

Таблица 6.

Аналитические характеристики «ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G (S)» 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, < 160	
Позитивный, титр антител ≥ 3200	22	12	34
Негативный, титр	0	39	39

антител <3200			
Всего	22	51	73
Чувствительность, %	100,0		
Специфичность, %	76,5		
Прогностическая ценность позитивного результата, %	64,7		
Прогностическая ценность негативного результата, %	81,0		

Таблица 7.

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

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

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

В тест-системе «ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G-количественный» концентрация антител класса G к вирусу SARS-CoV-2 выражена в единицах связывания (BAU/ml)/(ЕдС/мл) относительно Первого международного стандарта ВОЗ по иммуноглобулину, содержащему антитела к SARS-CoV-2, код NIBSC: 20/136 («WHO International Standard First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin (human) NIBSC code: 20/136»). Для этой тест-системы была установлена концентрация антител к RBD-домену Spike-белка, соответствующая ВНА в титре $\geq 1/160$.

Результаты для тест-системы «ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G количественный» представлены в таблицах 8-9.

Таблица 8.

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

Тест Шапиро-Уилка	ИФА	РН
W	0,92	0,70

Уровень значимости (p)	<0,0001	<0,0001
Пройден ли тест на нормальность ($\alpha=0,05$)?	нет	нет

Так как распределение данных не является нормальным, для оценки связи между концентрацией антител (сЕд/мл) в ИФА и РН использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Результаты представлены в табл. 9. Корреляция показателей концентрации IgG, сЕд/мл в ИФА с титрами ВНА проиллюстрирована на рис. 3.

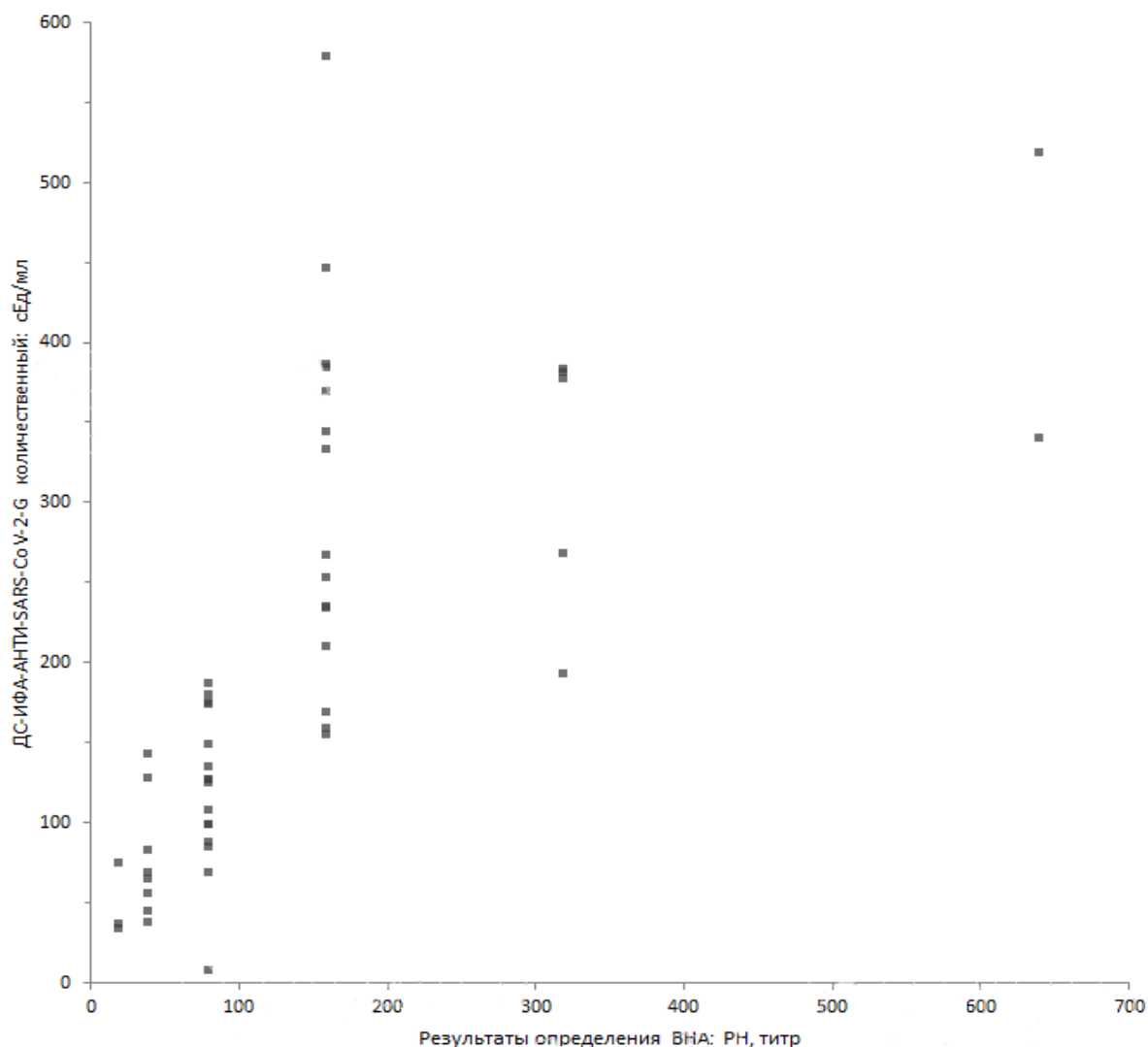


Рис.3. Корреляция между концентрацией IgG, сЕд/мл в ИФА и титрами ВНА к SARS-CoV-2.

Таблица 9.

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

Тест Спирмена	Концентрации IgG, сЕд/мл в ИФА – титр в РН
Коэффициент корреляции (r)	0,854
95% доверительный интервал	0,751-0,917
Уровень значимости (p)	< 0,0001
Количество пар сравнения	73

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 значимая корреляция между титрами/концентрацией антител в тест-системах «ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G (S)», «ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G-количественный» и ВНА. Титры антител в ИФА положительно коррелируют с титрами ВНА и ОП образца. Для эффективного отбора образцов антиковидной плазмы, содержащей ВНА в титрах $\geq 1/80$ и $\geq 1/160$ с использованием тест-систем «ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G (S)» «ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G-количественный» установлены критерии значений ОП (КП), титров и концентрации специфических IgG (табл.10).

Таблица 10.

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

Титр ВНА в РН	Значение ОП в ИФА	Значение КП в ИФА	Титр антител в ИФА	Концентрация антител в ИФА, сЕд/мл
$\geq 1/80$	$\geq 3,000$	$\geq 9,6$	$\geq 1/1600$	
$\geq 1/160$	$\geq 3,300$	$\geq 10,6$	$\geq 1/3200$	≥ 150

Для тест-системы «ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G-количественный» концентрация антител класса G, соответствующая ВНА в титре $\geq 1/160$ составляет ≥ 150 ЕдС/мл.

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