

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 (S)» 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 (S)», 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 (S)» 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, 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;
- тест-систему «ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G (S)», производства ООО «НПО «Диагностические системы», кат. № S-2442.
- тест-систему для определения вируснейтрализующих антител (суррогатный полуколичественный тест нейтрализации) COVID-19 ImmunoRank Neutralization MICRO-ELISA (S2500, Leinco Technologies, Китай).

Выявление антител класса G к SARS-CoV-2 проводили методом ИФА с использованием тест-системы «ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G (S)». 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 PH использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена.

Чувствительность и специфичность тест-системы «ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G (S)» 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 были охарактеризованы в наборе 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. 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)»,		
	РН, титр	Индекс нейтрализации, %	ОП	КП	титр
1	160	≥20	3,500	11,48	3200
2	80	≥20	3,092	10,14	1600
3	40	≥20	2,488	8,16	100
4	80	≥20	3,759	12,32	3200
5	80	≥20	3,753	12,30	3200
6	160	≥20	3,422	11,22	6400
7	160	≥20	3,599	11,80	12800
8	160	≥20	4,056	13,30	3200
9	160	≥20	3,730	12,23	6400
10	320	≥20	3,831	12,56	12800
11	80	≥20	3,720	12,20	3200
12	20	≥20	2,845	9,33	1600
13	20	≥20	1,353	4,44	100
14	80	≥20	3,471	11,38	3200
15	80	≥20	3,688	12,09	3200
16	40	≥20	4,056	13,30	3200
17	40	≥20	1,232	4,04	100
18	160	≥20	3,366	11,04	3200
19	80	≥20	3,990	13,08	3200
20	160	≥20	3,653	11,98	12800
21	80	≥20	3,213	10,53	1600
22	80	≥20	3,469	11,37	3200
23	640	≥20	3,529	11,57	12800
24	80	≥20	3,171	10,40	1600
25	80	≥20	3,176	10,41	1600
26	40	≥20	0,234	0,77	<100
27	320	≥20	3,452	11,32	12800
28	80	≥20	3,279	10,75	1600
29	160	≥20	3,467	11,37	12800
30	640	≥20	3,906	12,81	12800
31	80	≥20	3,721	12,20	12800
32	160	≥20	3,996	13,10	12800
33	40	≥20	3,621	11,87	3200
34	320	≥20	3,990	13,08	12800
35	160	≥20	4,023	13,19	12800
36	80	≥20	3,576	11,72	3200

37	160	≥20	4,035	13,23	12800
38	40	≥20	2,914	9,55	1600
39	80	≥20	4,072	13,35	6400
40	160	≥20	4,003	13,12	12800
41	160	≥20	3,539	11,60	3200
42	40	≥20	3,630	11,90	1600
43	160	≥20	3,756	12,31	3200
44	160	≥20	3,578	11,73	3200
45	80	≥20	3,199	10,49	1600
46	40	≥20	2,388	7,83	100
47	320	≥20	3,838	12,58	12800
48	320	≥20	3,724	12,21	12800
49	20	≥20	1,419	4,65	100
50	<20	<20	0,021	0,07	<100
51	<20	<20	0,011	0,04	<100
52	<20	<20	0,006	0,02	<100
53	<20	<20	0,000	0,00	<100
54	<20	<20	0,005	0,02	<100
55	<20	<20	0,003	0,01	<100
56	<20	<20	0,004	0,01	<100
57	<20	<20	0,009	0,03	<100
58	<20	<20	0,010	0,03	<100
59	<20	<20	0,005	0,02	<100
60	<20	<20	0,006	0,02	<100
61	<20	<20	0,008	0,03	<100
62	<20	<20	0,011	0,04	<100
63	<20	<20	0,003	0,01	<100
64	<20	<20	0,005	0,02	<100
65	<20	<20	0,006	0,02	<100
66	<20	<20	0,006	0,02	<100
67	<20	<20	0,005	0,02	<100
68	<20	<20	0,008	0,03	<100
69	<20	<20	0,008	0,03	<100
70	<20	<20	0,008	0,03	<100
71	<20	<20	0,010	0,03	<100
72	<20	<20	0,011	0,04	<100
73	<20	<20	0,007	0,02	<100

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

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.

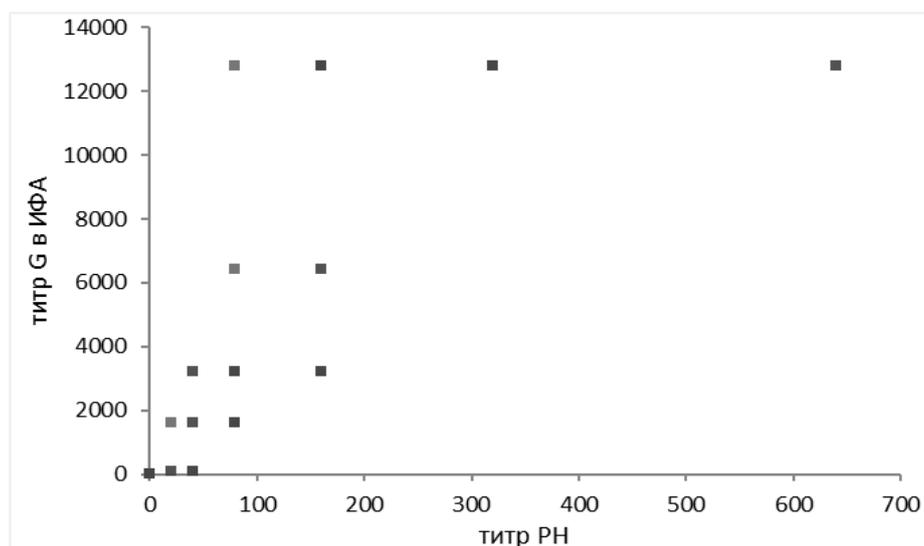


Рис. 1. Корреляция между титрами IgG и ВНА к SARS-CoV-2.

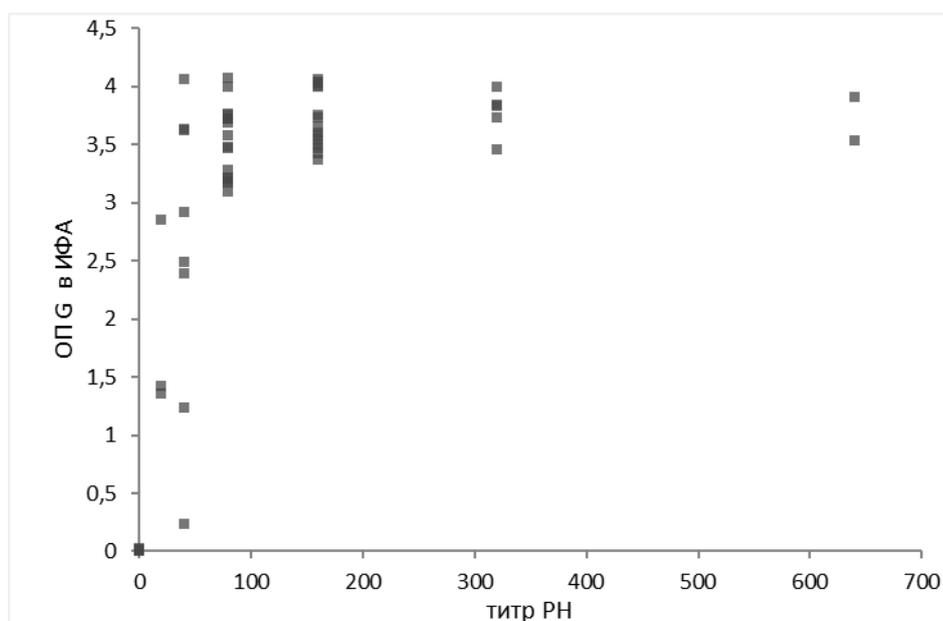


Рис. 2. Корреляция между ОП (КП) образцов, содержащих IgG и титрами ВНА к SARS-CoV-2.

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 (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 положительного результата, %			88,4
Прогностическая ценность отрицательного 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 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 (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 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 (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 положительного результата, %			62,9
Прогностическая ценность отрицательного результата, %			79,7

Концентрация антител класса G к вирусу SARS-CoV-2 в тест-системе «ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G (S)» также может быть 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»).

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.

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 (S)», 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-системы «ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G (S)» 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	Концентрация IgG, ЕдС/мл
$\geq 1/80$	$\geq 3,000$	$\geq 9,6$	$\geq 1/1600$	360
$\geq 1/160$	$\geq 3,300$	$\geq 10,6$	$\geq 1/3200$	400

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.

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>