

С. І. ДУБРОВСЬКИЙ¹, Б. В. ДОНСЬКОЇ² (Київ)

ДИНАМІКА ТА ОСОБЛИВОСТІ ГУМОРАЛЬНОЇ ВІДПОВІДІ НА COVID-19

¹Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України; ²Інститут педіатрії, акушерства і гінекології ім. О. М. Лук'янової НАМН України <Udjin1785@gmail.com>

*Ця робота є продовженням дослідження з визначення рівня специфічних антитіл у пацієнтів, які перехворіли на COVID-19, у віддалені терміни. **Матеріали та методи.** Для цього етапу дослідження було обстежено групу пацієнтів, які перехворіли на COVID-19 8 міс тому (240 днів). У групу увійшли 42 особи. Всі пацієнти на початку захворювання мали позитивний результат на COVID-19 методом ПЛР. Частина хворих перебувала на лікуванні в КМКЛ № 4 в інфекційному відділенні, інші лікувались амбулаторно. Всіх хворих умовно можна розділити на дві вікові групи: від 18 до 39 років (13 осіб) та від 40 до 65 років (28 осіб). Серед обстежених хворих у 29 осіб перебіг хвороби був безсимптомний або легкий. Середньотяжкий перебіг відзначався в 11 пацієнтів, тяжкий – в 1 пацієнта. Контроль рівня антитіл було проведено на 60-, 90-, 150- та 240-й день від початку захворювання. Всім пацієнтам було проведено дослідження на специфічні антитіла на COVID-19 методом імуноферментного аналізу (ІФА), виконаному на обладнанні: імуноферментний аналізатор Теспа (Австрія); PW 40 Microplate Washer (Франція). Набір ELISA для серології COVID-19 тест-системами на IgG SARS-CoV-2 VitroTest (Україна). **Результати.** Згідно з першим етапом дослідження було зафіксовано, що імунна гуморальна відповідь на COVID-19 сформувалась у 82 % обстежених – у 54 із 66 осіб. У наступному етапі взяли участь 42 особи із 54, що мали позитивні рівні антитіл. Аналізуючи групу тих, у кого виробились антитіла, на 240-й день від початку захворювання, ми отримали такі результати: рівень IgG залишався вище порогового рівня у 80 % (n = 35). Цікаво зауважити, що у 56 % (n = 23) рівень антитіл тримався на дуже високому рівні без тенденції до зниження. У 20 % (n = 8) обстежуваних рівень антитіл помітно знижувався протягом усього періоду дослідження та став нижче від порогового до 240-го дня. **Висновок.** Аналізуючи отримані дані протягом 8 міс (240 днів), можна зробити певні висновки. Максимальний рівень антитіл зафіксовано на 40-й день від початку захворювання. Було показано, що серед хворих, які мали позитивний рівень специфічних антитіл до SARS-CoV-2 вище порогового, ні в кого (100 %) IgG не зникли в проміжку між 40-м та 150-м днями. Проте тенденція до зниження простежувалась у 20 % обстежуваних. Саме у цієї когорти і зникли антитіла до 240-го дня. У більшості пацієнтів (80 %), які перехворіли на SARS-CoV-2, рівень IgG залишався достатньо високим щонайменше 240 днів.*

Ключові слова: COVID-19; імуноглобулін G; SARS-CoV-2; антитіла; гуморальний імунітет.

Вступ. Питання тривалості та ефективності постковідного імунітету для можливості формування колективного імунітету є дуже актуальними. Ситуація з COVID-19 ще далека від завершення та потребує відповідей на питання стосовно тривалості захисту після імунізації населення природним та штучним шляхами.

Наші висновки узгоджуються з гіпотезою про те, що більшість інфікованих успішно одужують завдяки формуванню специфічної та ефективної імунної відповіді [11].

Ми та багато інших дослідників підтвердили, що після перенесеного COVID-19 у більшості пацієнтів формується специфічна клітинна та гуморальна імунна відповідь. Беззаперечно, що перевага надається Т-клітинному імунітету, але його визначення для масового скринінгу є складним і дорогим на сьогодні [3, 6].

Доведено, що серологічне тестування достатньо корисне та ефективне для виявлення безсимптомних або субклінічних інфекцій SARS-CoV-2 серед тих, хто перебуває в тісному контакті з хворими на COVID-19 [4]. Дослідження Лонга також демонструє, що серологічне тестування на антитіла допомагає діагностувати пацієнтів з негативними результатами RT-PCR з підозрою та безсимптомними інфекціями і має важливе значення для точного оцінювання поширеності COVID-19 [5].

У контексті підтвердження раціональності використання плазми реконвалесцентів для тяжко хворих на COVID-19 пацієнтів є багато робіт, присвячених дослідженню тривалості та вірусонейтралізуючої здатності специфічних імуноглобулінів донорів, які перехворіли на SARS-CoV-2 [2, 9].

Важливо звернути увагу на те, що рівень специфічних нейтралізуючих антитіл чітко корелює з рівнем сумарних специфічних антитіл загалом [8].

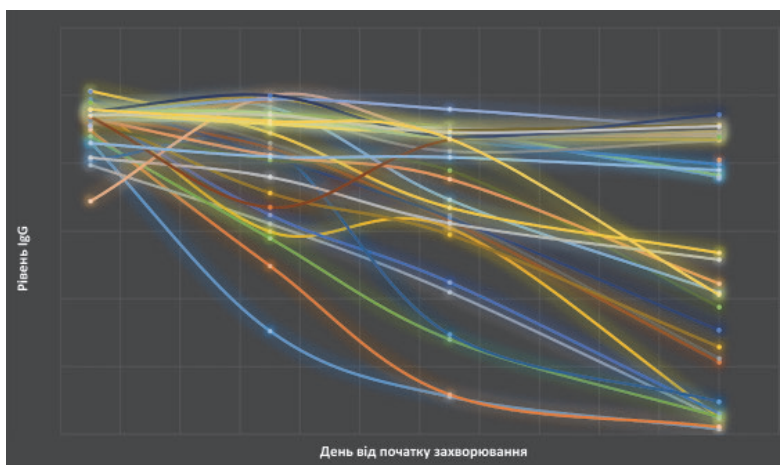
Отримані нами дані не суперечать іншим дослідженням щодо тривалості збереження рівня IgG. Так, у роботі Жозе Перро й Тоні Трамбле було показано, що рівень антитіл на COVID-19 у групі досліджуваних тримається високим без коливань до 10 тижнів. Лише незначні коливання спостерігаються в проміжку 54–84 дні. Починаючи з 84-го та до 114-го дня дослідники зафіксували зниження рівня імуноглобулінів у 36,8 % [10].

Цікавим є порівняння динаміки антитіл SARS-CoV-2 із SARS-CoV. Так, у роботі Цинцин Лінь та Лі Чжу «Duration of serum neutralizing antibodies for SARS-CoV-2: Lessons from SARS-CoV infection» показано, що позитивний рівень антитіл до SARS-CoV поступово збільшувався, досягав 100 % на 90-й день і залишався незмінним до 200-го дня. Близько 93,9 % і 89,6 % цих пацієнтів, відповідно, були виявлені через 1 і 2 роки. Примітно, що через 3 роки 50 % пацієнтів, які одужали, все ще мали специфічний для SARS-CoV IgG [7].

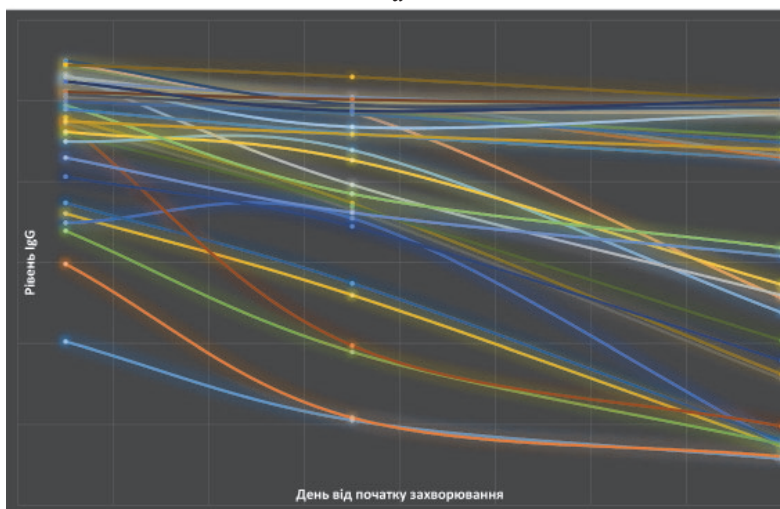
Матеріали і методи. У дослідженні брала участь група із 42 пацієнтів, які перехворіли на COVID-19, мали підтверджений задокументований ПЛР аналіз та після 18–40-го дня від початку хвороби були обстежені на специфічні антитіла класу G до SARS-CoV-2. Отримавши позитивні результати на рівень специфічних антитіл до SARS-CoV-2, через певні проміжки, а саме на 60-, 90-, 150- та 240-й день, було перевірено всіх у групі на рівень IgG SARS-CoV-2.

Усі пацієнти були поділені на дві групи за віком: перша група від 18 до 39 років – 13 осіб (32 %) та друга група від 40 до 65 років – 28 осіб (68 %).

Частина пацієнтів перебувала на лікуванні в Києві в КНП КМКЛ № 4 в інфекційному відділенні, інші пацієнти лікувались амбулаторно. Також є певна група пацієнтів, які перенесли захворювання безсимптомно, не звертались до лікаря, але були протестовані як контактні особи та ідентифіковані як перехворілі (отримано позитивний ПЛР на COVID-19 та на 18–40-й день виявлено антитіла G до SARS-CoV-2). Всі пацієнти, без виключень, мали обов'язково позитивний результат на COVID-19 методом ПЛР. Результат було видано Київським міським лабораторним центром МОЗ України та приватною лабораторією ДІЛА. Для виконання лабораторного дослідження на специфічні імуноглобуліни була залучена сертифікована приватна лабораторія в Києві – «ДНК-Лабораторія», яка має всі дозволи та оснащення для роботи такого рівня. Всім пацієнтам було проведено дослідження на виявлення антитіл на COVID-19 методом імуноферментного аналізу (ІФА), виконаному на обладнанні: імуноферментний аналізатор Tecan (Австрія); PW 40 Microplate Washer (Франція). Набір ELISA для серології COVID-19 тест-системами на IgG SARS-CoV-2 VitroTest (Україна). В рамках міжлабораторного контролю якості сироватки паралельно досліджувались в імунологічній лабораторії Інституту педіатрії, акушерства і гінекології ім. О. М. Лук'янової НАМН України. Результати дослідження співпали.



а



б

Рис. 1. Динаміка рівня IgG на SARS-CoV-2:
 а – із 40-го по 240-й день; б – із 150-го по 240-й день

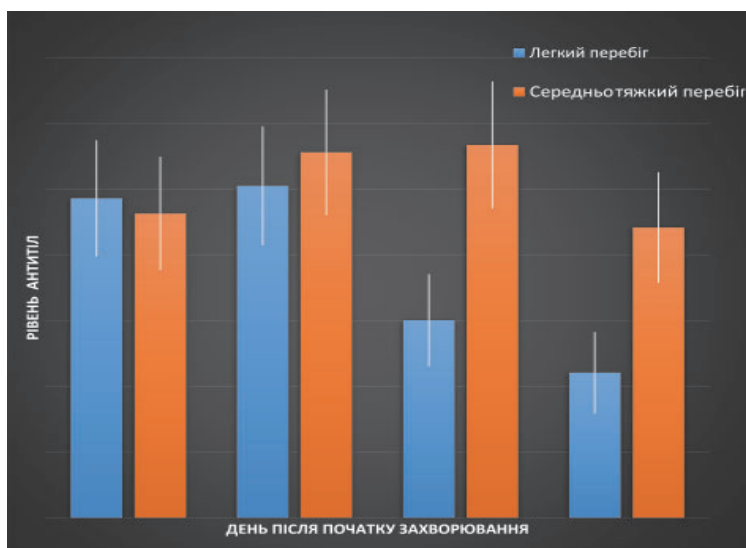


Рис. 2. Залежність динаміки рівня антитіл від тяжкості перебігу SARS-CoV-2

Результати та їх обговорення. Після перенесеного захворювання із 42 осіб у досліджуваній групі протягом 240 днів від початку захворювання рівень антитіл залишався вищим позитивним у 80 % ($n = 35$). У 20 % ($n = 7$) рівень специфічних антитіл став нижче порогового значення. Якщо звернути увагу на проміжні точки, коли проводилися контрольні дослідження рівня антитіл, то можна побачити, що в період із 40-го по 150-й день в усіх 42 пацієнтів (100 %) антитіла не зникали (рис. 1, *а*). Хоча слід звернути увагу, що в 2 пацієнтів рівень IgG фіксувався на 150-й день майже на пороговому значенні [6].

При аналізі отриманих даних чітко видно, коли саме «зникають» IgG у певної кількості перехворілих. Це відбувається в проміжку між 150-м та 240-м днями (рис. 1, *б*). Саме в цей час із 42 обстежених у 20 % ($n = 7$) зафіксовано зниження специфічних антитіл нижче порогового значення.

Динаміка рівня антитіл була різною у пацієнтів, що мали легкий і безсимптомний перебіг та у пацієнтів із середньотяжким перебігом (рис. 2). Обидві групи мали однаково високі рівні антитіл на 40-й та 60-й день. Проте у пацієнтів із легким перебігом рівні антитіл почали падати достовірно швидше. На 90-й та 150-й день їх рівень був достовірно нижчим порівняно із пацієнтами з тяжким перебігом ($P < 0,05$) [6]. Пацієнти, що втратили позитивний рівень антитіл на 240-й день також були з групи з легким перебігом.

Початкова досліджувана група складалась із 66 осіб, але після перенесеного захворювання у 21 % антитіла не виробились на самому початку дослідження (18–40-й день) [1, 4]. Подальші спостереження проводили з групою пацієнтів, які були серопозитивні з першого етапу обстеження. Жодної залежності між віком і рівнем антитіл виявлено не було [6].

Висновки. Аналізуючи отримані дані протягом 8 міс (240 днів) можна зробити певні висновки. Із самого початку серед обстежуваної групи перехворілих на SARS-CoV-2 у 79 % ($n = 54$) сформувалася гуморальна відповідь та зафіксовано високий рівень специфічних антитіл класу G вже на 16–18-й день. Максимальний рівень антитіл зафіксовано на 40-й день від початку захворювання. Питання, чому у 21 % ($n = 12$) пацієнтів із SARS-CoV-2, підтверджених методом ПЛР, не виробилась гуморальна відповідь, залишаються дискусабельними. Є думка про можливі хибнопозитивні результати ПЛР на первинному етапі обстеження, що призвело до спотворення статистичних даних під час аналізу відсотка серопозитивних пацієнтів. Не виключається припущення, що імунітет може формуватися до інших антигенів коронавірусу, які наявні тест-системи не здатні виявити. Продовжуючи дослідження, було показано, що серед групи пацієнтів, які мали рівень специфічних антитіл до SARS-CoV-2 вище порогового, ні в кого не зникли IgG у проміжку між 40-м та 150-м днями. Проте тенденція до зниження у певної частини групи вже спостерігалася протягом цього періоду. Так, у 20 % обстежуваних рівень антитіл помітно знижувався протягом усього періоду дослідження та став нижче порогового на межі 240-го дня. Близько 80 % пацієнтів з досліджуваної групи продовжують демонструвати наявність специфічних імуноглобулінів до SARS-CoV-2 на 240-й день.

Конфлікт інтересів немає.

Список літератури

1. Дуда О. К., Дубровський Є. І., Вега А. Р. та ін. Визначення титру специфічних імуноглобулінів класу G на ранньому етапі після перенесеного COVID-19 // Здоров'я суспільства. – 2020. – Т. 9, № 3–4. – С. 138–144. – Режим доступу: http://nbuv.gov.ua/UJRN/zdc_2020_9_3-4_8
1. Duda O. K., Dubrovskij E. I., Vega A. P. та ін. Vznachennya titru specifichnih imunoglobuliniv klasu G na rann'omu etapi pisl'ya perenesenogo COVID-19 // Zdorov'ya suspil'stva. – 2020. – Т. 9, № 3–4. – S. 138–144. – Rezhim dostupu: http://nbuv.gov.ua/UJRN/zdc_2020_9_3-4_8

2. Agarwal A., Mukherjee A., Kumar G. Convalescent plasma in the management of moderate covid-19 in adults in India: open label phase II multicentre randomised controlled trial (PLACID Trial) // *BMJ*. – 2020. – Vol. 22. – P. 371. – <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33093056/>
3. Bilich T., Nelde A., Heitmann J. S., Maringer Y. T cell and antibody kinetics delineate SARS-CoV-2 peptides mediating long-term immune responses in COVID-19 convalescent individuals // *Sci. Transl. Med.* – 2021. – Vol. 15. – P. 7517. – <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33723016/>
4. Chen Y., Tong X., Wang J., Huang W. High SARS-CoV-2 antibody prevalence among health-care workers exposed to COVID-19 patients // *J. Infect.* – 2020. – [https://www.journalofinfection.com/article/S0163-4453\(20\)30344-3/fulltext](https://www.journalofinfection.com/article/S0163-4453(20)30344-3/fulltext)
5. Chen H., Zhang X., Liu W., Xue M. The role of serum specific-SARS-CoV-2 antibody in COVID-19 patients // *Int. Immunopharmacol.* – 2021. – Vol. 91. – P. 107325. – doi: 10.1016/j.intimp.2020.107325. Epub 2020 Dec 24. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33401205/>
6. Dubrovskiy E. I., Dons'koi B. V. Dynamics of COVID-19 specific G-class immunoglobulins levels in patients after the recovery // *Лік. справа=Врачеб. дело.* – 2020. № 3–4. – С. 3–8. – [https://doi.org/10.31640/JVD.3-4.2020\(1\)](https://doi.org/10.31640/JVD.3-4.2020(1))
7. Lin Q., Zhu L., Ni Z., Meng H., You L. Duration of serum neutralizing antibodies for SARS-CoV-2: Lessons from SARS-CoV infection // *J. Microbiol. Immunol. Infect.* – 2020. – Vol. 53, N 5. – P. 821–822. – <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32249185/>
8. Luchsinger L. L., Ransegnola B. P., Jin D. K. Serological Assays Estimate Highly Variable SARS-CoV-2 Neutralizing Antibody Activity in Recovered COVID-19 Patients // *J. Clin. Microbiol.* – 2020. – Vol. 58, N 12. – P. 02005–02020. – <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32917729/>
9. Shaz B. H., Cohn C. S. Catch those antibodies before they fall // *Blood.* – 2020. – Vol. 136, N 22. – P. 2489–2490. – <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33242330/>
10. Perreault J., Tremblay T., Fournier M. J. Waning of SARS-CoV-2 RBD antibodies in longitudinal convalescent plasma samples within 4 months after symptom onset // *Blood.* – 2020. – Vol. 136, N 22. – P. 2588–2591. – <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33001206/>
11. Weinreich D. M., Sivapalasingam S., Norton T., Ali S. REGN-CoV2, a Neutralizing Antibody Cocktail, in Outpatients with COVID-19 // *N. Engl. J. Med.* – 2021. – Vol. 384, N 3. – P. 238–251. – <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33332778/>

ДИНАМИКА И ОСОБЕННОСТИ ГУМОРАЛЬНОГО ОТВЕТА НА COVID-19

Е. И. Дубровский, Б. В. Донской (Киев)

Введение. Данная работа является продолжением исследования по определению уровня специфических антител на отдалённых сроках у пациентов, переболевших COVID-19. **Материалы и методы.** Для этого этапа исследования было обследовано группу пациентов ($n = 42$), переболевших COVID-19 8 мес назад (240 дней). Все пациенты имели положительный результат на COVID-19, подтверждённый методом ПЦР. Часть пациентов находилась на лечении в инфекционном отделении Киевской городской больницы № 4, другая часть лечилась амбулаторно. Всех пациентов условно разделить на две возрастные группы: I – от 18 до 39 лет ($n = 13$); II – от 40 до 65 лет ($n = 28$). У 29 больных заболевание протекало бессимптомно или легко; у 11 – отмечалось состояние средней тяжести, у 1 больного – тяжёлое. Контроль уровня антител был проведён на 60-, 90-, 150- и 240-й день от начала заболевания. Исследование на специфические антитела к COVID-19 проведено методом иммуноферментного анализа (ИФА) на оборудовании: иммуноферментный анализатор Тесан (Австрия) PW 40 Microplate Washer (Франция). Набор ELISA для серологии COVID-19 тест системами на IgG SARS-CoV-2 VitroTest (Украина). **Результаты.** На первом этапе исследования было зафиксировано, что иммунный гуморальный ответ на COVID-19 сформировался у 82 % обследованных – у 54 из 66 переболевших. Во II этапе приняло участие 42 человека из 54, имевших положительный уровень антител. Исследование показало, что на 240-й день от начала заболевания уровень IgG остаётся выше порогового уровня у 80 % ($n = 35$) обследованных, у 56 % ($n = 23$) уровень антител держится на очень высоком уровне; у 20 % ($n = 8$) обследуемых уровень антител заметно снижался в течение всего периода исследования и регистрируется ниже порогового значения к 240 дню. **Выводы.** Анализируя полученные данные в течение 8 мес (240 дней), можно сделать следующую

щие выводы. Максимальный уровень антител зафиксировано на 40-й день после начала заболевания. У пациентов, имевших положительный уровень специфических антител к SARS-CoV-2 выше порогового, IgG определялись до 150-го дня, однако у 20 % обследуемых стала отмечаться тенденция к его снижению, а к 240-му дню именно в этой когорте антитела исчезли. У большинства пациентов (80 %), переболевших SARS-CoV-2, уровень IgG остаётся достаточно высоким не менее 240 дней.

Ключевые слова: COVID-19; иммуноглобулин класса G; SARS-CoV-2; антитела; гуморальный иммунитет.

DYNAMICS AND FEATURES OF THE HUMORAL RESPONSE TO COVID-19

E. I. Dubrovskiy¹, B. V. Dons'koi² (Kyiv, Ukraine)

¹Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine; ²Institute of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology, National Academy of Medical Sciences of Ukraine

Introduction. This publication describes the continuation of a research to determine the level of specific antibodies in patients in the long term after being suffered from COVID-19. **Materials and methods.** For this phase of the research, a group of patients who relapsed into a COVID-19 eight months ago (240 days) was examined. The group consists of 42 people. All patients, with no exception, had positive PCR results on COVID-19. Some patients were treated in Hospital № 4 in the infectious department, the other part was treated on an outpatient basis. All patients were relatively divided into two age groups: from 18 to 39 ($n = 13$) and from 40 to 65 ($n = 28$). The light form of disease was detected in 29 patients, the moderate form – in 11 and the severe one – in 1 patient. Afterwards the level of the antibodies was controlled on the 60th, 90th, 150th and 240th day after the onset. All patients were tested for antibodies to COVID-19 by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) performed on the equipment: enzyme-linked immunosorbent assay Tecan (Austria); PW 40 Microplate Washer (France). ELISA set for serology COVID-19 test system IgG SARS-CoV-2 VitroTest (Ukraine). **Results.** According to the first stage of the research, it was recorded that the immune humoral response to Covid-19 was formed in 82 % into the group – in 54 of 66 people. Subsequently, 42 out of 54 individuals with positive antibody levels participated. Analyzing the group of those who have antibodies, we obtained the following results on day 240 from the onset of the disease: IgG levels remain above the threshold level of 80 % ($n = 35$). It is interesting to note that in 56 % ($n = 23$) the level of antibodies remains at a very high level. In 20 % ($n = 8$) into the group, the level of antibodies significantly decreased throughout the research period and became below the threshold by 240 days. **Conclusion.** Analyzing the data obtained over 8 months (240 days), certain conclusions can be drawn. The maximum level of antibodies was recorded on day 40 from the onset of the disease. It was shown that in the group of patients who had a positive level of specific antibodies to SARS-CoV-2 above the threshold, IgG did not disappear in any patient between 40 and 150 days. However, the downward trend was observed in 20 % of respondents. In this cohort of patients, the antibodies disappeared by day 240. In most patients (80 %) who recover into SARS-CoV-2, IgG levels remain high for at least 240 days.

Key words: COVID-19; immunoglobulin G-class; SARS-CoV-2; antibody; humoral Immunity.