

# ДИАГНОСТИКА КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ ИММУНОФЕРМЕНТНЫМ АНАЛИЗОМ

## DIAGNOSTICS OF CORONAVIRUS INFECTION BY ENZYME IMMUNOASSAY

**П. С. Харитон<sup>1,2</sup>, Е. Е. Тарасова<sup>1,2</sup>, Н. С. Харитон<sup>1,2</sup>**

**P. S. Khariton<sup>1,2</sup>, E. E. Tarasova<sup>1,2</sup>, N. S. Khariton<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Белорусский государственный университет, БГУ, г. Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>Учреждение образования «Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова» Белорусского государственного университета, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ, г. Минск, Республика Беларусь

*pollykharyton@gmail.com, kbb@iseu.by*

<sup>1</sup>Belarusian State University, BSU, Minsk, Republic of Belarus

<sup>2</sup>International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus

COVID-19 – вирусная инфекция, вызываемая коронавирусом SARS-CoV-2 и имеющая тяжёлые долгосрочные последствия для здоровья. Следует отметить, что встречаются формы заболевания, как с ярко выраженными клиническими проявлениями, так и без ярко выраженной симптоматики, но с наличием антител IgG и IgM к SARS-CoV-2, как у переболевших лиц. В качестве объекта исследования использовались сыворотки 141 добровольца, у которых были как подтверждённые ПЦР-тестом случаи COVID-19, так и бессимптомные формы. В сыворотках добровольцев с бессимптомными формами течения заболевания были выявлены пробы, содержащие как IgM, так и IgG.

COVID-19 is a viral infection caused by the SARS-CoV-2 coronavirus with severe long-term health consequences. It should be noted that there are forms of the disease, both with pronounced clinical manifestations and without pronounced symptoms, but with the presence of IgG and IgM antibodies to SARS-CoV-2, as in recovered persons. The object of the study was the sera of 141 volunteers who had both PCR-confirmed cases of COVID-19 and asymptomatic forms. In the sera of volunteers with asymptomatic forms of the course of the disease, samples containing both IgM and IgG were detected.

*Ключевые слова:* SARS-CoV-2, диагностика COVID-19, иммуноферментный анализ.

*Keywords:* SARS-CoV-2, COVID-19 diagnostics, enzyme immunoassay.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2022-2-18-21>

COVID-19 – потенциально тяжёлая острая респираторная инфекция, вызываемая коронавирусом SARS-CoV-2 (2019-nCoV), продолжающая поражать население большей части мира. Генетический материал коронавируса представлен одноцепочечной положительно заряженной РНК и обладает одним из самых больших геномов среди всех РНК-вирусов. Две трети генома коронавируса на 5'-конце кодирует вирусные белки, которые принимают участие в процессе транскрипции вирусной РНК и репликации, а одна треть на 3'-конце кодирует структурные и группоспецифические вспомогательные белки. К основным структурным белкам коронавируса относят:

– S-белок (spike), состоящий из 1300 а.к. и имеющий размер 180–200 кДа.

Белок S образует гомотримерный комплекс, выступающий над поверхностью вируса и состоящий из двух функциональных субъединиц, S1 и S2, которые отвечают за связывание с рецептором клетки-хозяина и слияние вируса с клеточными мембранами хозяина.

Меньшая субъединица S1 состоит из N-концевого домена (NTD) и трех C-концевых доменов (CTD1–3), из которых CTD1 образует рецептор-связывающий домен (RBD) и способствует стабилизации прикрепленной к мембране субъединицы S2. Более крупная субъединица S2 содержит механизм слияния вирусов и включает гидрофобный слитый пептид (FP), гептадный повтор 1 (HR1), центральную спираль (CH), соединительный домен (CD), гептадный повтор 2 (HR2), трансмембранный домен (TM) и цитоплазматический хвост (CT). S белки вирусов MERS-CoV и SARS-CoV вызывают устойчивый иммунный ответ, т.к. S белок SARS-CoV-2 в своей структуре содержит сайт с высоким родством к связыванию β-цепи TCR. Помимо этого, обнаружены аминокислотные последовательности, имеющие антигенные свойства.

– E-белок (envelope), состоящий из 76–109 а.к. молекулярной массой 8,4–12 кДа.

Белок E представляет собой короткий интегральный мембранный белок, состоящий из 76–109 аминокислот и размером от 8,4 до 12 кДа.

Первичная вторичная структура показывает, что E имеет короткий гидрофильный amino-конец, состоящий из 7–12 аминокислот, за которым следует большой гидрофобный трансмембранный домен (TMD) из 25 аминокислот, и заканчивается длинным гидрофильным карбоксильным концом, который включает большую часть белка. Гидрофобная область TMD содержит по крайней мере одну амфипатическую α-спираль, которая олигомеризуется с образованием ионопроводящей поры в мембранах.

TMD состоит из двух неполярных нейтральных аминокислот, валина и лейцина, придающих белку гидрофобность. Согласно исследованиям вторичной структуры E предполагается, что С-конец  $\beta$ - и  $\gamma$ -CoV также содержит консервативный остаток пролина, сосредоточенный в мотиве  $\beta$ -coil- $\beta$ .

PDZ-связывающий мотив (PBM) также является важным белковым мотивом в СТ области и играет решающую роль в патогенности, разобщая передачу сигналов в клетке.

– М-белок (membrane), содержащий 230 аминокислот и имеющий молекулярную массу 25–35 кДа и является наименьшим структурным белком SARS-CoV-2.

Взаимодействие белка М с S и E формирует оболочку вириона. Белок М представляет собой многозвенный мембранный белок, который характеризуется тремя трансмембранными доменами, имеющими С-конец внутри и N-конец снаружи. Третий трансмембранный домен содержит на конце амфипатическую область. Обнаружено, что этот регион высоко консервативен у представителей коронавируса. Помимо этой области, другие области белка М демонстрируют вариативность белковых последовательностей, но интересно, что эти вариации не влияют на SS М-белка CoV.

Хотя антигенные сайты на М белке не определены, предполагается, что его N-концевой гидрофильный экто-домен содержит основные антигенные детерминанты, ответственные за иммунологические реакции.

– N-белок (nucleocapsid) с молекулярной массой 43–50 кДа.

Нуклеокапсидный белок имеет три домена: N-концевой домен (NTD) размером почти 200 остатков, который является доминирующим РНК-связывающим доменом, центральный домен с гибким линкером Ser/Arg-rich с поперечно-полосатым блоком примерно из 50 остатков и С-концевой домен (CTD), который, как и NTD, имеет длину примерно 200 остатков, но функционирует при образовании димеров/олигомеров. Белок N выполняет первичные функции самодимеризации/олигомеризации и связывания РНК, хотя NTD выполняет первичную функцию связывания РНК, все три домена обладают сродством к нуклеиновым кислотам. Кроме того, вблизи N- и С-концов этих N-белков имеются внутренне неупорядоченные области, каждая длиной около 50 остатков.

N-белки выполняют множество функций, включая, помимо прочего: формирование стабильных, но динамичных комплексов с геномной РНК для уплотнения нуклеиновой кислоты в вирусной частице, взаимодействие со структурным мембранным (М) белком, способствующее складыванию оболочки мембраны и сборке вириона, взаимодействие через две различные области N с неструктурным белком, nsр3, чтобы обеспечить надлежащее рекрутирование N в комплекс репликации/транскрипции, играя важную роль в усилении транскрипции геномной РНК и вирусной мРНК, повышая эффективность репликации РНК, частично за счет облегчая разделение двух цепей РНК, нарушая клеточную защиту хозяина процессы, такие как продукция интерферона.

N белки коронавирусов содержат несколько иммунодоминантных эпитопов и антигенных сайтов; однако они содержат общий эпитоп, расположенный в С-концевой области, который вызывает сильный иммунный ответ.

Таким образом, описанные выше белки являются важными биомаркерами коронавирусной инфекции. Так, для диагностики инфекции кровь пациента при помощи иммуноферментного анализа проверяется на наличие иммуноглобулинов класса G и класса M к S-белку, М-белку или N-белку, которые и определяют патогенность вируса и принимают непосредственное участие в патогенезе заболевания.

На наличие свободных иммуноглобулинов класса G и M к N-белку исследовались сыворотки крови 141 добровольца, среди которых были лица с установленной перенесённой коронавирусной инфекцией (79 ПЦР-подтверждённых случаев наличия коронавирусной инфекции) и лица, предположительно не болевшие или перенесшие заболевание без симптомов (62 человека). Срок после перенесенного заболевания от 1 до 2 месяцев.

Исследования проводились иммуноферментным анализом, принцип которого основан на методе твёрдофазного непрямого ИФА и является двухстадийной процедурой. Реакцию останавливают стоп-реагентом и измеряют оптическую плотность (ОП) смеси в лунках при длине волны 450/620 нм, которая пропорциональна концентрации IgM и IgG к SARS-CoV-2 в образцах. В работе были использованы наборы DIA®-SARS-CoV-2-NP-IgG и DIA®-SARS-CoV-2-NP-IgM (НПК «ДИАПРОФ-МЕД», Украина).

Результаты ИФА регистрировались с помощью спектрофотометра. Измерение оптической плотности проводилось в двухслойном режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620–650 нм. Результаты исследований учитывались только если значение ОП (оптическая плотность) для лунок с K<sup>+</sup> составляло 0,8 и выше, для лунок с K<sup>-</sup> – не более 0,2.

На основании результатов статистической обработки данных все сыворотки были разделены на четыре группы по наличию в них антител классов M и G к N-белку (таблица 1).

Таблица 1 – Группы сывороток пациентов по наличию в них антител классов M и G к N-белку

Группа по наличию антител	Расшифровка
IgM-отрицательный и IgG-отрицательный;	Нет данных, указывающих на контакт организма с вирусом SARS-CoV-2 с выработкой специфического антительного иммунного ответа.
IgM-положительный и IgG-отрицательный;	Может свидетельствовать о подострой фазе инфекции COVID-19, в том числе при возможности отсутствия у пациента клинических проявлений инфекции.
IgM-положительный и IgG-положительный;	Данное сочетание может свидетельствовать о факте инфицирования в течение месяца вирусом SARS-CoV-2 с формированием специфического иммунного ответа. Сочетание количества IgM и IgG может говорить о давности инфекции.
IgM-отрицательный и IgG-положительный;	Положительный тест на IgG свидетельствует о факте контакта в определённый период с вирусом SARS-CoV-2 с формированием специфического иммунного ответа.

*Таблица 2 – Количество проб сывороток пациентов  
с подтверждённой и не подтверждённой коронавирусной инфекцией*

	Количество проб пациентов с подтверждённой инфекцией (ПЦР)	Количество проб пациентов с не подтверждённым COVID-19/ пациенты, не знавшие о своей болезни
IgM-отрицательный и IgG-отрицательный	5 (6,6%)	30 (46,1%)
IgM-положительный и IgG-отрицательный	23 (30,3%)	8 (12,3%)
IgM-положительный и IgG-положительный	19 (25%)	8 (12,3%)
IgM-отрицательный и IgG-положительный	29 (38,1%)	9 (13,8%)

Таким образом, среди пациентов с подтверждённой инфекцией в 5 пробах не было обнаружено антител, 23 пробы оказались положительными по IgM, 19 – по IgM и IgG и 29 проб – только по IgG (таблица 2).

Был обследован 21 пациент после вакцинации Спутником V, а также 78 человек, не прошедших вакцинацию. Определялся титр антител спустя 2 месяца после вакцинации или предполагаемой болезни (таблица 3).

*Таблица 3 – Показатели антител вакцинированных пациентов  
с симптоматикой и без после вакцинации и не вакцинированных пациентов*

Вакцинация, отсутствие симптоматики	
Срок после вакцинации 2 месяца	
	Количество пациентов
от 0,2 до 0,8	1
от 0,8 до 1,3	2
>1,3	1
Без антител	11
Вакцинация, выраженная симптоматика	
2 месяца	
	Количество пациентов
от 0,2 до 0,8	1
от 0,8 до 1,3	1
>1,3	2
Без антител	0
Не вакцинированные, без выраженной симптоматики	
	Количество пациентов
от 0,2 до 0,8	3
от 0,8 до 1,3	8
>1,3	1
Без антител	16
Без вакцины с выраженной симптоматикой	
2 месяца после заболевания	
	Количество пациентов
от 0,2 до 0,8	15
от 0,8 до 1,3	13
>1,3	4
Без антител	18

*\*Расшифровка результатов:*

- от 0 до 0,2 – результат приравнивается к отрицательному, антител нет;
- при 0,2 до 0,8 – антитела присутствуют, однако вируснейтрализующий эффект сохраняется только в 50 % образцах проб;
- при 0,8 до 1,3 – титр антител высокий, образцы обладают высоким вируснейтрализующим эффектом;
- 1,3 и выше – выработан максимальный уровень антител, вируснейтрализующий эффект ярко выражен.

Из полученных результатов можно сделать следующий вывод: антитела выявляются как у пациентов с подтвержденной коронавирусной инфекцией, так и у пациентов с неподтвержденной инфекцией или асимптоматическим течением. Также разный уровень антител определяется и у пациентов с вакцинацией. Следовательно, и IgM, и IgG к COVID-19 вырабатываются исключительно индивидуально и зависят от иммунного статуса человека.

Таким образом, ИФА-диагностика коронавирусной инфекции играет важную роль не только в случаях, когда вирус подтвержден, но и при бессимптомной форме заболевания, так как разное соотношение антител встречается как в группе лиц с подтвержденным, так и в группе лиц с неподтвержденным COVID-19.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Nandini Sethuraman, MD, Sundararaj Stanleyraj Jeremiah, MD et al. Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. *AMA*. 2020;323(22):2249-2251. doi:10.1001/jama.2020.8259
2. Nalla AK, Casto AM, Huang MW, et al. Comparative performance of SARS-CoV-2 detection assays using seven different primer/probe sets and one assay kit. *J Clin Microbiol*. 2020; JCM.00557-20. Published online April 8, 2020. doi:10.1128/JCM.00557-20
3. Xiao AT, Gao C, Zhang S. Profile of specific antibodies to SARS-CoV-2: the first report. *J Infect*. 2020;S0163-4453(20)30138-9. Published online March 21, 2020. doi:10.1016/j.jinf.2020.03.012

## ВРОЖДЕННЫЕ ПОРОКИ СТРОГО УЧЕТА У ДЕТЕЙ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ CONGENITAL DEFECTS IN CHILDREN IN THE REPUBLIC OF BELARUS

**Н. В. Кокорина<sup>1,2</sup>, А. А. Ершова-Павлова<sup>3</sup>, А. Г. Яцков<sup>1,2</sup>**  
**N. V. Kokorina<sup>1,2</sup>, A. A. Ershova-Pavlova<sup>3</sup>, A. G. Yatskov<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Белорусский государственный университет, БГУ

<sup>2</sup>Учреждение образования «Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова» Белорусского государственного университета, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ

<sup>3</sup>Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя»

г. Минск, Республика Беларусь

gebeg@iseu.by

artyomyatskov@gmail.com

<sup>1</sup>Belarusian State University, BSU

<sup>2</sup>International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, ISEU BSU

<sup>3</sup>Republican Scientific and Practical Center «Mother and Child»

Minsk, Republic of Belarus

Проблема врожденной и наследственной патологии продолжает оставаться актуальной в настоящее время. За последнее десятилетие она приобрела серьезную социально-медицинскую значимость. В системе здравоохранения многих стран мира, в том числе и Беларуси, профилактика этой патологии, базирующаяся на современных достижениях медицинской генетики, акушерства и перинатологии, стала принимать приоритетное направление. Врожденные пороки развития (ВПР) относятся к группе экоассоциированных заболеваний, которые являются индикаторами состояния окружающей среды. Одной из причин появления тератогенного воздействия являются экологические факторы антропогенного происхождения: загрязнения окружающей среды веществами мутагенного действия. [1]

The problem of congenital and hereditary pathology continues to be relevant at the present time. Over the past decade, it has acquired serious social and medical significance. In the healthcare system of many countries of the world, including Belarus, the prevention of this pathology, based on modern achievements in medical genetics, obstetrics and perinatology, has become a priority. Congenital malformations belong to the group of eco-associated diseases, which are indicators of the state of the environment. One of the reasons for the emergence of teratogenic effects are environmental factors of anthropogenic origin: environmental pollution with mutagenic substances.

**Ключевые слова:** мониторинг, врожденные пороки строго учета, новорожденные.

**Keywords:** monitoring, congenital defects of strict accounting, newborns.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2022-2-21-24>

Средством контроля учета, регистрации и предупреждения врожденных пороков развития (ВПР) является мониторинг, который представляет собой систему длительного слежения за частотой ВПР в популяции. На сегодняшний день действуют две международные организации, объединяющие и координирующие деятельность