

ИММУНОЛОГИЯ

© МАРДАНЛЫ С.Г., АВДОНИНА А.С., 2021

Марданлы С. Г.^{1,2,3}, Авдонина А. С.¹

РАЗРАБОТКА ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ КЛАССА М К КОРОНАВИРУСУ SARS-COV-2 МЕТОДОМ ИММУННОГО БЛОТТИНГА В ФОРМАТЕ «LINE BLOT»

¹ЗАО «ЭКОлаб», 142530, г. Электрогорск Московской обл., Россия;

²ГОУ ВО МО ГГТУ, 142600, г. Орехово-Зуево Московская обл., Россия;

³ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), 11992, г. Москва, Россия

Разработана иммуноферментная тест-система для выявления специфических иммуноглобулинов класса М к коронавирусу SARS-CoV-2 методом иммунного блоттинга в формате «Line blot». Предварительное исследование диагностической эффективности новой тест-системы на клинических образцах сыворотки крови пациентов с установленным диагнозом «COVID-19» и здоровых доноров показало её высокую чувствительность и специфичность. Новая тест-система позволяет обнаруживать IgM ко всем четырём структурным антигенам SARS-CoV-2 и может быть использована в качестве подтверждающего теста для верификации сомнительных результатов скринингового исследования в лабораторной этиологической диагностике COVID-19.

Ключевые слова: клиническая лабораторная диагностика; COVID-19; SARS-CoV-2; иммуноферментный анализ (ИФА); иммунный блоттинг (ИБ); иммуноглобулины класса М (IgM).

Для цитирования: Марданлы С. Г., Авдонина А. С. Разработка иммуноферментной тест-системы для выявления специфических иммуноглобулинов класса М к коронавирусу SARS-CoV-2 методом иммунного блоттинга в формате «Line blot». *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (8): 472-479. DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-8-472-479>

Mardanly S. G.^{1,2,3}, Avdonina A. S.¹

DEVELOPMENT OF TEST KIT FOR DETECTION OF SPECIFIC IGM TO SARS-COV-2 BY IMMUNE BLOTTING IN THE «LINE BLOT» FORMAT

¹The closed corporation «EKOlal», Elektrogorsk, 142530, Moscow region, Russia;

²State University of Humanities and Technology, 142600, Orekhovo-Zuyevo, Moscow region, Russia;

³I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 11991, Moscow, Russia

Test kit for detection of specific IgM to SARS-CoV-2 by immune blotting in the «Line blot» format has been developed. A preliminary study of diagnostic effectivity on clinical samples of blood serum from patients with COVID-19 and healthy donors showed its high sensitivity and specificity. The new test kit allows to detect IgM to all four structural antigens of SARS-CoV-2 and can be used as a confirmatory test to verify indeterminant screening results in laboratory etiological diagnosis of COVID-19.

Key words: clinical laboratory diagnostics; COVID-19; SARS-CoV-2; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); immune blotting (IB); class M immunoglobulins (IgM).

For citation: Mardanly S.G., Avdonina A.S. Development of test kit for detection of specific IgM to SARS-CoV-2 by immune blotting in the «Line blot» format. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (8): 472-479. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-8-472-479>

For correspondence: *Mardanly S.G.*, doctor of medical sciences, academician of the Russian academy of medical technical sciences; professor of department of pharmacology and pharmaceutical disciplines of State University of Humanities and Technology; professor of department of Epidemiology and Modern Vaccination Technologies of I. M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University); president and director of science of Closed Joint Stock Company «EKOlal»; e-mail: ekolab-president@mail.ru

Information about authors:

Mardanly S.G., <https://orcid.org/0000-0002-4556-135X>;

Avdonina A.S., <https://orcid.org/0000-0002-2990-4930>.

Acknowledgments. *The study had no sponsor support.*

Conflict of interests. *The authors declare absence of conflict of interests.*

Received 20.06.2021

Accepted 25.06.2021

В конце 2019 г. в Китайской провинции Хубэй зафиксирована вспышка новой коронавирусной инфекции, которая переросла в пандемию, захватившую все регионы

Земли. С 11.02.2020 г. эта инфекция получила название COVID-19 (Coronavirus disease 2019), а её возбудитель назван SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome-

Для корреспонденции: *Марданлы Сейфадин Гашимович*, д-р мед. наук, акад. Российской академии медико-технических наук; проф. каф. фармакологии и фармацевтических дисциплин ГГТУ; проф. каф. эпидемиологии и современных технологий вакцинации ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России»; e-mail: ekolab-president@mail.ru

related coronavirus 2) [1]. Разрушительное воздействие этой пандемии на мировую экономику требует её скорейшей ликвидации, что делает исключительно актуальной проблему своевременной и эффективной диагностики COVID-19 и прогностики течения и исходов её манифестных форм и, соответственно, необходимость разработки тест-систем для этиологической диагностики COVID-19.

В официальных рекомендациях ВОЗ и национальных органов здравоохранения [1, 2] в качестве основного метода этиологической лабораторной диагностики этой инфекции указано выявление РНК SARS-CoV-2 с применением метода амплификации нуклеиновых кислот, иммунохимические методы, в частности выявление антигена SARS-CoV-2 с применением иммунохроматографических методов и выявление иммуноглобулинов классов IgA, IgM, IgG к SARS-CoV-2 названы только дополнительными к комплексу молекулярно-генетических методов исследования.

Ряд авторов считают, что не менее важное значение для критической оценки тяжести заболевания, для понимания динамики иммунного ответа на инфекцию, его связи с тяжестью и длительностью заболевания, для уточнения связи уровня антител с выработкой невосприимчивости к возбудителю, для диагностики и сортировки пациентов, обращающихся за медицинской помощью на более поздних стадиях заболевания, для отслеживания контактов и сероэпидемиологических исследований, дающих представление о степени распространения COVID-19, имеет выявление специфических антител [3–6].

Исследования такого рода проводятся преимущественно с использованием методов иммуноферментного, иммунохемилюминесцентного анализа (ИФА и ИХЛА). На рынке медицинской продукции представлено большое число соответствующих коммерческих диагностических тестов. В Российской Федерации по состоянию на 25.08.2020 г. зарегистрирован 51 набор реагентов для выявления специфических иммуноглобулинов к SARS-CoV-2 методами ИФА и ИХЛА [1].

Такое число диагностических тестов – прямой ответ на потребность в них для получения надёжных данных о распространении инфекции и обеспечения массового скрининга групп высокого риска [7]. Но при отсутствии международных стандартов, по которым производители могли бы корректировать методики применения своих тестов, правила регистрации, учёта и интерпретации получаемых результатов, такое обилие тестов явилось неизбежной причиной нередких расхождений в оценках одних и тех же образцов, полученных в разных лабораториях и при использовании тестов различных производителей [8, 9]. Последнее обстоятельство требует обязательного использования для диагностических исследований нескольких тест-систем различных производителей, что существенно осложняет практическую работу диагностических лабораторий.

Задача повышения эффективности лабораторной диагностики COVID-19 может быть решена за счёт более широкого использования преимуществ одной из модификаций ИФА – иммунного блоттинга (ИБ), в частности одного из его форматов – «Line blot» (линейный блот, «лайн блот», ЛБ), при котором на нитроцеллюлозные стрипы иммуносорбента в виде поперечных линий наносятся конкретные антигены возбудителя (или их рекомбинантные аналоги), предварительно охарактеризо-

ванные по их антигенной специфичности, что позволяет делать заключение о наличии/отсутствии соответствующих специфических иммуноглобулинов без использования дополнительных диагностических тестов.

Относительная новизна метода является, по-видимому, причиной того, что число тестов для ИБ, разработанных и внедрённых в практику лабораторной диагностики COVID-19, несопоставимо меньше числа соответствующих тестов для ПЦР-диагностики, ИФА в классических форматах и ИХЛА. В России до сих пор не зарегистрирован ни один тест для диагностики COVID-19, работающий на принципе ИБ. Разработка и внедрение в практику новых тест-систем для этиологической диагностики COVID-19 с использованием ИБ представляется актуальной.

Цель исследования – разработка и предварительные испытания диагностической эффективности нового набора реагентов для *in vitro* диагностики – иммуноферментной тест-системы для выявления иммуноглобулинов класса М к возбудителю COVID-19 методом ИБ в формате ЛБ¹. Использован опыт аналогичных исследований, накопленный в ЗАО «ЭКОлаб» при создании и производстве ИФА тест-систем для диагностики ряда бактериальных и вирусных инфекций [11 – 15].

Материал и методы. Иммуносорбент получен с использованием рекомбинантных аналогов антигенов SARS-CoV-2:

- полноразмерный нуклеокапсидный антиген фирм «MyBioSource» (США), «Диапроф» (Украина), «Vitrotest» (Украина);
- RBD-антиген (Receptor-binding domain – рецептор-связывающий домен) S₁-субъединицы spike-антигена фирм «MyBioSource» (США) и «HyTest» (Финляндия);
- оболочечный антиген фирм «MyBioSource» (США) и «Диапроф» (Украина);
- мембранный антиген фирм «ProSpec» (США) и «Диапроф» (Украина).

В качестве твёрдой фазы иммуносорбента использована нитроцеллюлозная мембрана с диаметром пор 0,45 мкм фирмы «GVS» (США).

Контрольные линии на иммуносорбенте нанесены с использованием:

- рекомбинантного антигена 2H-TRX, не содержащего антигенные детерминанты SARS-CoV-2, фирмы ЗАО «ЭКОлаб» (для контроля специфичности реакции),
- козьих антител против IgM человека фирмы «Имтек» (для контроля внесения образца);
- IgM человека фирмы «Имтек» (для контроля внесения конъюгата).

Для проведения анализа методом ИБ использованы:

- конъюгат козьих антител к IgM человека с щелочной фосфатазой фирмы «Jackson ImmunoResearch» (США);
- субстратный раствор BCIP/NBT (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phos-phate/Nitro Blue Tetrazolium) фирмы «Kem-En-Tec» (Дания).

В качестве клинического материала использованы 108 сывороток крови пациентов, проходивших лечение в Первой Градской больнице имени Н.И. Пирогова (г.

¹Работа является очередной в цикле исследований, посвящённых серологической диагностике COVID-19 и начатым разработкой ИФТС для выявления специфических IgG к возбудителю этой инфекции [10].

Москва) с подозрением на COVID-19 (у 104 пациентов диагноз верифицирован путём обнаружения РНК SARS-CoV-2 методом ПЦР в назофарингеальных мазках).

В качестве контрольного клинического материала использованы 100 сывороток крови здоровых доноров, отобранных в 2018 г. и хранившихся при температуре -70°C .

Результаты и обсуждение. В ходе исследования решены следующие задачи:

– на основе анализа литературы для приготовления иммуносорбента выбраны наиболее иммуногенные антигены SARS-CoV-2;

– отработаны оптимальные условия нанесения антигенных и контрольных линий на нитроцеллюлозную мембрану;

– подобран состав реагентов для проведения анализа методом ИБ;

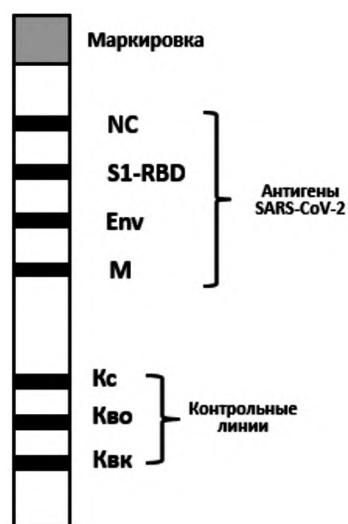
– оптимизирован протокол проведения анализа (время инкубаций, разведение образца).

Наиболее важным этапом разработки явился, очевидно, выбор антигенов.

Геном SARS-CoV-2 кодирует четыре основных структурных белка (антигена): белок нуклеокапсида (nucleocapsid, N), белок шипа (spike, S), белок мембраны (membrane, M), белок оболочки (envelope, E). N-антиген является структурным компонентом спирального нуклеокапсида. S-антиген состоит из субъединиц S_1 и S_2 ; S_1 содержит N-концевой домен (N-terminal domain, NTD) и рецептор-связывающий домен (receptor-binding domain, RBD), S_2 содержит гептадные повторы 1 и 2 (heptad repeats HR₁, HR₂). M-антиген представляет собой интегрированный в мембрану белок, который в процессе размножения вируса взаимодействует с нуклеокапсидным и S-белком. E-антиген – самый маленький из основных структурных белков – участвует в сборке и высвобождении вирионов [16 – 25].

Поскольку в процессе взаимодействия SARS-CoV-2 с клетками хозяина участвуют все указанные антигены и на них вырабатываются специфические антитела, все они выбраны для конструирования тест-системы.

Отработка условий получения иммуносорбента выполнена с использованием сорбционной машины фир-



Стандартная схема нанесения антигенов SARS-CoV-2 и контрольных линий на стрип.

мы «BioDot» (США), позволяющей в автоматическом режиме наносить отдельные линии на нитроцеллюлозную мембрану. Установлено, что оптимальная продолжительность сорбции антигенов и контрольных линий на мембрану составила 22 ч; оптимальными условиями внешней среды для процесса сорбции явились температура воздуха $2-8^{\circ}\text{C}$ и влажность не более 60%. Специфичность иммуносорбента существенно повышается при 60-минутной экспозиции сорбированных мембран в фосфатно-солевом буферном растворе, содержащем бычий сывороточный альбумин (БСА).

В таких условиях оценена чувствительность и специфичность иммуносорбента с использованием перечисленных выше антигенов, полученных от различных производителей.

Установлено, что N-антигены фирм «MyBioSource» (США), «Диапроф» (Украина), «Vitrotest» (Украина), RBD-антигены фирм «MyBio-Source» (США), «HyTest» (Финляндия) обеспечивают высокую чувствительность и специфичность иммуносорбента, тогда как E-антиген фирмы «MyBioSource» (США) превосходит по соотношению чувствительность/специфичность аналогичный антиген фирмы «Диапроф» (Украина), M-антиген фирмы «Диапроф» (Украина) превосходит по соотношению чувствительность/специфичность аналогичный антиген фирмы «ProSpec» (США).

Оценка различных разводящих и промывающих растворов позволила выбрать в качестве оптимальных трис-солевой буферный раствор (ТСБР) с добавлением в качестве блокирующих агентов сухого молока и ультразвукового лизата клеток *E. coli*.

При отработке протокола постановки ИБ оптимальным временем инкубации стрипов иммуносорбента с исследуемым образцом признан 1 ч 30 мин, с конъюгатом – 1 ч, с субстратным раствором – 10 мин.

Итогом разработки явилась тест-система «Лайн-Блот-SARS-CoV-2-АТ-М» следующего состава:

Иммуносорбент – Полоски (стрипы) из нитроцеллюлозной мембраны белого цвета, с нанесёнными на них в виде отдельных поперечных полос рекомбинантными антигенами SARS-CoV-2 (см. рисунок):

- NC (nucleocapsid antigen – ядерный антиген),
- S_1 -RBD (S_1 субъединица spike-антигена шипов оболочки, несущая рецептор-связывающий домен),
- Env (envelope antigen – оболочечный антиген),
- M (membrane antigen – мембранный антиген);

и контрольными линиями:

- рекомбинантным антигеном, не содержащим антигенные детерминанты SARS-CoV-2 для контроля специфичности реакции (Kc);

- козьими антителами против IgM человека для контроля внесения образца (Kво);

- IgM человека для контроля внесения конъюгата (Kвк).

Контрольный отрицательный образец (K-) – сыворотка крови человека, не содержащая антитела к SARS-CoV-2, инактивированная.

Контрольный положительный образец (K+) – сыворотка крови человека, содержащая антитела IgM к SARS-CoV-2, инактивированная.

Раствор для разведения образцов (РРО).

5-кратный концентрат промывочного раствора [ППР(x5)].

Конъюгат – козы антитела против IgM человека, конъюгированные со щелочной фосфатазой.

Окрашивающий раствор – раствор 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфата и нитроголубого тетразолия.

Результаты анализа учитываются только при выполнении требования по окраске линий иммуносорбента при исследовании контрольных образцов (табл. 1).

Результаты исследования образца интерпретируются следующим образом:

- положительный результат (+) – выявлены антитела к NC-антигену и/или к S₁-RBD-антигену, независимо от наличия или отсутствия антител к антигенам E_{nv} и M;
- неопределённый результат (+/-) – выявлены антитела к антигенам E_{nv} и/или M;
- отрицательный результат (-) – не выявлены антитела ни к одному из антигенов.

Эффективность разработанной тест-системы оценена при исследовании с её использованием 108 образцов сывороток крови пациентов, проходивших обследование и лечение по поводу COVID-19 и 100 образцов сывороток здоровых доноров крови. Все образцы исследованы также в ИФА с использованием тест-систем «ИФА-SARS-CoV-2-AT-M» фирмы ЗАО «ЭКОлаб» (выявляет антитела к N- и RBD-антигенам SARS-CoV-2) и «SARS-CoV-2-IgM-ИФА-Бест» фирмы АО «Вектор Бест» (выявляет антитела к N- и RBD-антигенам SARS-CoV-2).

Результаты выявления IgM к SARS-CoV-2 в ИФА и ИБ. приведены в табл. 2

Результаты, приведённые в табл. 2, показали отсутствие какой-либо связи между оценками образцов в ПЦР

Таблица 1

Требования к окрашиванию линий иммуносорбента при исследовании контрольных образцов

Контрольный образец	Линии иммуносорбента						
	NC	S	E _{nv}	M	Kc	Kvo	Kvk
K-	-	-	-	-	-	+	+
K ⁺	+	+	+	+	-	+	+

Таблица 2

Результаты исследования образцов сыворотки крови на наличие IgM к SARS-CoV-2 в ИФА и ЛБ

№ пп	SARS-CoV-2 ОТ-ПЦР	Результаты исследования								
		ИФА				ЛБ				Итоговый результат ЛБ
		«ИФА-SARS-CoV-2-AT-M» ОПкр=0,251		«SARS-CoV-2-IgM-ИФА-Бест» ОПкр=0,227		NC	RBD	E _{nv}	Mem	
		ОПобр	Σ	ОПобр	Σ					
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1.	+	3,213	+	1,468	+	+	+	-	-	+
2.	+	1,202	+	0,353	+	+	+	+	-	+
3.	+	0,002	-	0,017	-	-	-	-	-	-
4.	+	0,278	+	0,199	+/-	-	+	-	+	+
5.	+	0,742	+	0,604	+	-	+	-	-	+
6.	+	1,337	+	0,363	+	+	+	-	-	+
7.	+	0,06	-	0,159	-	-	-	-	-	-
8.	+	0,433	+	0,537	+	+	+	-	-	+
9.	+	1,865	+	0,685	+	+	+	-	-	+
10.	+	1,357	+	1,411	+	-	+	-	-	+
11.	+	0,401	+	0,302	+	+	+	-	+	+
12.	-	0,015	-	0,061	-	-	-	-	-	-
13.	-	0,023	-	0,058	-	-	-	-	-	-
14.	+	3,593	+	2,727	+	-	+	+	+	+
15.	+	3,417	+	2,561	+	-	+	+	+	+
16.	+	2,026	+	0,541	+	+	+	-	+	+
17.	+	0,017	-	0,092	-	-	-	-	-	-
18.	+	0,272	+/-	0,098	-	+	+	-	+	+
19.	+	0,031	-	0,044	-	-	-	-	-	-
20.	+	0,001	-	0,016	-	-	-	-	-	-
21.	-	0,001	-	0,009	-	-	-	-	-	-
22.	+	0,025	-	0,058	-	+	-	-	+	+
23.	+	0,012	-	0,027	-	-	-	-	-	-
24.	+	0,136	-	0,111	-	-	-	-	-	-
25.	+	0,39	+	0,299	+	-	+	-	+	+
26.	+	0,025	-	0,064	-	-	-	-	-	-
27.	+	0,008	-	0,035	-	-	-	-	-	-

Продолжение табл. 2 см. на стр. 476.

№ пп	SARS- CoV-2 ОТ-ПЦР	Результаты исследования									
		ИФА				ЛБ				Итоговый результат ЛБ	
		«ИФА-SARS-CoV-2- АТ-М» ОПкр=0,251		«SARS-CoV-2-IgM- ИФА-Бест» ОПкр=0,227		NC	RBD	Env	Mem		
		ОПобр	Σ	ОПобр	Σ						
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
28.	+	0,003	-	0,013	-	-	-	-	-	-	-
29.	+	0,003	-	0,01	-	-	-	-	-	-	-
30.	+	0,002	-	0,018	-	-	-	-	-	-	-
31.	+	0,032	-	0,038	-	-	-	-	-	-	-
32.	+	0,001	-	0,017	-	-	-	-	-	-	-
33.	+	1,274	+	0,465	+	+	+	-	+	+	+
34.	+	0,347	+	0,349	+	+	+	-	+	+	+
35.	+	2,224	+	1,25	+	+	+	-	+	+	+
36.	+	0,044	-	0,041	-	-	-	-	-	-	-
37.	+	0,095	-	0,088	-	-	-	-	-	-	-
38.	+	0,005	-	0,021	-	-	-	-	-	-	-
39.	+	0,003	-	0,028	-	-	-	-	-	-	-
40.	+	1,088	+	0,24	+/-	+	+	-	+	+	+
41.	+	0,484	+	0,122	-	+	-	-	+	+	+
42.	+	0,004	-	0,053	-	-	-	-	-	-	-
43.	+	0,405	+	0,415	+	+	+	-	+	+	+
44.	+	0,004	-	0,017	-	-	-	-	-	-	-
45.	+	0,011	-	0,046	-	-	-	-	-	-	-
46.	+	0,421	+	0,232	+/-	+	+	-	+	+	+
47.	+	0,665	+	0,379	+	+	+	-	-	-	+
48.	+	0,001	-	0,034	-	-	-	-	-	-	-
49.	+	0,042	-	0,049	-	-	-	-	-	-	-
50.	-	0,005	-	0,033	-	-	-	-	-	-	-
51.	+	0,004	-	0,018	-	-	-	-	-	-	-
52.	+	0,455	+	0,475	+	+	+	-	-	-	+
53.	+	0,161	-	0,043	-	-	-	-	-	-	-
54.	+	0,015	-	0,051	-	-	-	-	-	-	-
55.	+	0,005	-	0,038	-	-	-	-	-	-	-
56.	+	0,047	-	0,014	-	-	-	-	-	-	-
57.	+	0,002	-	0,018	-	-	-	-	-	-	-
58.	+	0,004	-	0,022	-	-	-	-	-	-	-
59.	+	0,215	+/-	0,036	-	-	-	-	-	-	-
60.	+	0,047	-	0,063	-	-	-	-	-	-	-
61.	+	0,054	-	0,031	-	-	-	-	-	-	-
62.	+	2,383	+	2,636	+	+	+	-	-	-	+
63.	+	3,706	+	3,924	+	+	+	-	-	-	+
64.	+	0,038	-	0,06	-	-	-	-	-	-	-
65.	+	1,775	+	1,687	+	+	+	-	-	-	+
66.	+	3,473	+	3,148	+	+	+	-	-	-	+
67.	+	3,264	+	3,387	+	+	+	-	+	+	+
68.	+	3,675	+	3,324	+	+	+	-	-	-	+
69.	+	3,615	+	3,814	+	+	+	-	-	-	+
70.	+	3,759	+	3,956	+	+	+	+	-	-	+
71.	+	3,679	+	3,241	+	+	+	-	-	-	+
72.	+	2,151	+	2,193	+	+	+	-	-	-	+
73.	+	3,694	+	3,919	+	+	+	-	-	-	+
74.	+	0,539	+	0,52	+	+	+	+	-	-	+
75.	+	3,826	+	3,913	+	+	+	-	-	-	+
76.	+	2,121	+	1,953	+	+	+	-	-	-	+

Продолжение табл. 2.

№ пп	SARS- CoV-2 ОТ-ПЦР	Результаты исследования									Итоговый результат ЛБ
		ИФА				ЛБ					
		«ИФА-SARS-CoV-2- АТ-М» ОП _{кр} =0,251		«SARS-CoV-2-IgM- ИФА-Бест» ОП _{кр} =0,227		NC	RBD	Env	Mem		
		ОПобр	Σ	ОПобр	Σ						
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
77.	+	1,445	+	1,399	+	+	+	-	-	+	
78.	+	2,159	+	1,919	+	+	+	-	-	+	
79.	+	3,665	+	3,832	+	+	+	-	-	+	
80.	+	3,625	+	3,34	+	+	+	-	+	+	
81.	+	3,673	+	4,093	+	+	+	-	+	+	
82.	+	1,21	+	1,382	+	-	+	-	-	+	
83.	+	3,557	+	3,682	+	+	+	-	-	+	
84.	+	3,633	+	2,508	+	+	+	-	-	+	
85.	+	3,581	+	4,03	+	+	+	-	-	+	
86.	+	3,647	+	4,056	+	+	+	-	+	+	
87.	+	0,657	+	0,648	+	-	+	-	-	+	
88.	+	3,405	+	2,389	+	+	+	-	-	+	
89.	+	1,182	+	1,73	+	+	+	+	+	+	
90.	+	2,039	+	1,652	+	+	+	-	+	+	
91.	+	3,566	+	3,086	+	+	+	+	+	+	
92.	+	3,716	+	4,061	+	+	+	+	+	+	
93.	+	2,657	+	3,602	+	+	+	-	-	+	
94.	+	3,71	+	4,024	+	+	+	+	-	+	
95.	+	1,633	+	1,711	+	+	+	+	-	+	
96.	+	1,938	+	2,148	+	+	+	-	-	+	
97.	+	1,146	+	1,021	+	+	+	-	-	+	
98.	+	3,625	+	3,909	+	+	+	-	-	+	
99.	+	3,24	+	2,128	+	+	+	-	+	+	
100.	+	3,32	+	3,669	+	+	+	-	+	+	
101.	+	0,111	-	0,099	-	-	-	-	-		
102.	+	3,691	+	3,686	+	+	+	-	-	+	
103.	+	3,67	+	2,887	+	+	+	-	-	+	
104.	+	0,777	+	0,754	+	+	+	-	-	+	
105.	+	3,662	+	3,558	+	+	+	-	-	+	
106.	+	1,759	+	1,312	+	+	+	-	+	+	
107.	+	2,373	+	2,285	+	+	+	-	-	+	
108.	+	3,676	+	3,962	+	+	+	-	-	+	

Примечание. Σ – итоговый результат исследования образца в ИФА; ОП_{обр} – оптическая плотность исследуемого образца; ОП_{кр} – критическая оптическая плотность; «+» – соотношение ОП_{обр}/ОП_{кр} ≥ 1,1 – положительный результат; «+/-» – соотношение ОП_{обр}/ОП_{кр} ≥ 0,8, но < 1,1 – сомнительный результат; «-» – соотношение ОП_{обр}/ОП_{кр} < 0,8 – отрицательный результат.

и наличием специфических антител к возбудителю при исследовании в ИФА и ЛБ. Подтверждена высокая степень связи оценок с использованием обеих тест-систем в ИФА (коэффициент корреляции итоговых оценок образцов в ИФА составил 0,96), тесная корреляция итоговых оценок в ЛБ с использованием разработанной тест-системы с итоговыми оценками в ИФА – коэффициенты корреляции итоговых оценок в ЛБ с результатами исследования в ИФА составили 0,95 и 0,92.

Стоит обратить внимание на сомнительные по наличию IgM в ИФА образцы (№№ 4, 18, 40, 46, 59). Благодаря исследованию в ЛБ, данные образцы получили окончательное подтверждение о наличии или отсутствии антител IgM, что позволяет позиционировать разработанную тест-систему как подтверждающий тест, который можно использовать для верификации неопределённых результатов.

Все 100 образцов сыворотки крови здоровых доноров, отобранных в 2018 г., при исследовании в разработанной тест-системе показали отрицательный результат (отсутствие окрашивания антигенных линий), что свидетельствует о высокой специфичности тест-системы.

Помимо положительной оценки диагностической эффективности новой тест-системы результаты исследования дают основания для объективного выбора антигенов SARS-CoV-2, обеспечивающих максимальную чувствительность и специфичность иммуносорбентов скрининговых тест-систем. Такие основания даёт анализ распределения спектров антител в исследованных образцах, результаты которого представлены в табл. 3.

Как следует из данных, представленных в табл. 3, в 33 образцах (из 68) выявлены IgM к N- и S-антигенам, в 18 – к N-, S- и M-антигенам, из остальных 17 образцов

Распределение спектров антител к SARS-CoV-2, выявленное в ИБ

Наличие (+) – отсутствие (-) антител к антигенам SARS-CoV-2				Число образцов	% от общего числа
N	S	Env-	M		
+	+	-	-	33	0,49
+	+	-	+	18	0,26
+	+	+	-	5	0,07
+	+	+	+	4	0,06
-	+	-	+	2	0,03
-	+	-	-	2	0,03
+		-	+	2	0,03
-	+	+	+	2	0,03
ИТОГО				68	100

в 5 выявлены антитела к N-, S- и M-антигенам, в 4 – ко всем использованным антигенам SARS-CoV-2. В подавляющем большинстве образцов, оценённых как положительные по наличию IgM к SARS-CoV-2, выявлены антитела этого класса одновременно к N- и S-антигенам возбудителя. Очевидно, что именно они могут представлять наибольший интерес как специфические компоненты соответствующих иммуносорбентов.

Выводы:

1. Разработанная иммуноферментная тест-система «Лайн-Блот-SARS-CoV-2-AT-M» для выявления специфических иммуноглобулинов IgM к коронавирусу SARS-COV-2 методом иммунного блоттинга в формате «Лайн блот» показала хорошую чувствительность при исследовании образцов пациентов с COVID-19 и хорошую специфичность при исследовании образцов здоровых доноров.

2. Новая тест-система после прохождения процедуры государственной регистрации медицинского изделия может быть рекомендована в качестве подтверждающего теста при этиологической лабораторной диагностике COVID-19.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 3–9, 16–25 см. REFERENCES)

1. Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)». Версия 11 (07.05.2021) (утв. Министерством здравоохранения РФ 07 мая 2021 г.) URL: https://xn--80aesfpebagmfb-0a.xn--p1ai/ai/doc/872/attach/Bmr_COVID-19_compressed.pdf.
2. Временное руководство ВОЗ «Выявление антигена в диагностике инфекции SARS-CoV-2 с помощью экспресс-иммуноанализа» (11.09.2020) URL: <https://www.white-product.com/pdf/BO3> Выявление антигена в диагностике инфекции SARS-CoV-2 с.pdf.
10. Марданлы С.Г., Авдонина А.С. Мамедова С.Г. Разработка иммуноферментной тест-системы для выявления антител класса IgG к возбудителю COVID-19 в сыворотке (плазме) крови человека. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65 (11): 683-7.
11. Марданлы С.Г. Разработка и испытания новых иммуноферментных тест систем для диагностики токсоплазмоза. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2009; 2: 35-7.
12. Марданлы С.Г. Эпидемиологический надзор за инфекциями TORCH-группы на основе современных технологий лабораторной диагностики. Дис. ... д-ра мед. наук. М.; 2016.

13. Марданлы С.Г., Симонов В.В., Авдонина А.С. *Производство наборов реагентов для клинической лабораторной диагностики иммунохимическими методами*. Орехово-Зуево: ГГТУ; 2017.
14. Марданлы С.Г., Симонова Е.Г., Симонов В.В. *Инфекции TORCH-группы: клиническая лабораторная диагностика, эпидемиологический надзор и контроль*. М.: Транзит-ИКС; 2018.
15. Марданлы С.Г., Симонова Е.Г., Симонов В.В. *Герпесвирусные инфекции: этиология и патогенез, клиника и лабораторная диагностика, эпидемиология и профилактика*. Орехово-Зуево: ГГТУ; 2020.

REFERENCES

1. Temporary guidelines “Prevention, diagnosis and treatment of new coronavirus infection (COVID-19)”. Version 11 (05/07/2021) (approved by the Ministry of Health of the Russian Federation on May 07, 2021) [Vremennye metodicheskie rekomendacii «Prevention, diagnosis and treatment of new coronavirus infection (COVID-19)». Versija 11 (07.05.2021) (utv. Ministerstvom zdравоохranenija RF) 07 maya 2021] URL: https://xn--80aesfpebagmfb-0a.xn--p1ai/ai/doc/872/attach/Bmr_COVID-19_compressed.pdf. (in Russian)
2. WHO temporary guidance «Antigen detection in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection using rapid immunoassay» (09/11/2020) [Vremennoye rukovodstvo VOZ «Vyyavleniye antigena v diagnostike infektsii SARS-CoV-2 s pomoshch'yu ekspress-immunoanaliza» (11.09.2020)] URL: <https://www.white-product.com/pdf/BO3>. Vyyavleniye antigena v diagnostike infektsii SARS-CoV-2 с.pdf. (in Russian)
3. Ozcurumez M., Ambrosch A., Frey O., Haselmann V., Holdenrieder S., Kiehnopf M. et al. SARS-CoV-2 antibody testing — questions to be asked. *J. allergy clin. Immunol.* 2020; 146 (1): 35-43.
4. Sethuraman N., Stanleyraj S., Ryo A. Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. *JAMA*. 2020; 323 (22): 2249-51.
5. Watson J., Richter A., Deeks J. Testing for SARS-CoV-2 antibodies. *BMJ*. 2020; 370: m3325.
6. Du Z., Zhu F., Guo F., Yang B., Wang T. Detection of antibodies against SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *J. Med. Virol.* 2020; 92 (10): 1735-8.
7. La Marca A., Capuzzo M., Paglia T., Roli L., Trenti T., Nelson S.M. Testing for SARS-CoV-2 (COVID-19): a systematic review and clinical guide to molecular and serological in-vitro diagnostic assays. *Reprod Biomed Online*. 2020; 41 (3): 483-99.
8. McAndrews K.M., Dowlatshahi D.P., Dai J., Becker L.M., Hensel J., Snowden L.M. et al. Heterogeneous antibodies against SARS-CoV-2 spike receptor binding domain and nucleocapsid with implications for COVID-19 immunity. *JCI Insight*. 2020; 5 (18): e142386. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.142386>.
9. Haselmann V., Özçürümez M.K., Klawonn F., Ast V., Gerhards C., Eichner R. et al. Results of the first pilot external quality assessment (EQA) scheme for anti-SARS-CoV2-antibody testing. *Clin Chem Lab Med*. 2020; 58 (12): 2121–30.

10. Mardanly S.G., Avdonina A.S., Mamedova S.G. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of IgG-antibodies to the causative agent of COVID-19 in human serum (plasma). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2020; 65 (11): 683-7. (in Russian)
11. Mardanly S.G. Development and testing of new enzyme-linked immunosorbent assay systems for the diagnosis of toxoplasmosis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2009; 2: 35-7. (in Russian)
12. Mardanly S.G. Epidemiological surveillance of TORCH-group infections based on modern technologies of laboratory diagnostics. Diss. Moscow; 2016. (in Russian)
13. Mardanly S.G., Simonov V.V., Avdonina A.S. Production of reagent kits for clinical laboratory diagnostics by immunochemical methods. Orekhovo-Zuevo: GGTU; 2017. (in Russian)
14. Mardanly S.G., Simonova E.G., Simonov V.V. Torch-group infections: clinical laboratory diagnostics, epidemiological surveillance and control. Moscow: Tranzit-IKS; 2018. (in Russian)
15. Mardanly S.G., Simonova E.G., Simonov V.V. Herpesvirus infections: etiology and pathogenesis, clinical picture and laboratory diagnostics, epidemiology and prevention. Orekhovo-Zuevo: GGTU; 2020. (in Russian)
16. Brouwer P.J., Caniels T.G., Straten K., Snitselaar J.L., Aldon Y., Bangaru S. et al. Potent neutralizing antibodies from COVID-19 patients define multiple targets of vulnerability. *Science*. 2020; 369: 643-50.
17. Shi R., Shan C., Duan X., Chen Z., Liu P., Song J. et al. A human neutralizing antibody targets the receptor-binding site of SARS-CoV-2. *Nature*. 2020; 584: 120-4.
18. Narayanan K., Maeda A., Maeda J., Makino S. Characterization of the coronavirus M protein and nucleocapsid interaction in infected cells. *J. Virol*. 2000; 74 (17): 8127-34.
19. Opstelten D.J., Raamsman M.J., Wolfs K., Horzinek M.C., Rottier P.J. Envelope glycoprotein interactions in coronavirus assembly. *J. Cell Biol*. 1995; 131 (2): 339-49.
20. Liu J., Sun Y., Qi J., Chu F., Wu H., Gao F. et al. The membrane protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus acts as a dominant immunogen revealed by a clustering region of novel functionally and structurally defined cytotoxic T-lymphocyte epitopes. *J. Infect. Dis*. 2010; 202 (8): 1171-80.
21. Schoeman D., Fielding B.C. Coronavirus envelope protein: current knowledge. *Virol. J*. 2019; 16 (1): 69.
22. Peng H., Yang L., Wang L., Li J., Huang J., Lu Z. et al. Long-lived memory T-lymphocyte responses against SARS coronavirus nucleocapsid protein in SARS-recovered patients. *Virology*. 2006; 351: 466-75.
23. Hiscox J.A., Wurm T., Wilson L., Britton P., Cavanagh D., Brooks G. The coronavirus infectious bronchitis virus nucleoprotein localizes to the nucleolus. *J. Virol*. 2001; 201: 506-12.
24. Narayanan K., Chen C.J., Maeda J., Makino S. Nucleocapsid independent specific viral RNA packaging via viral envelope protein and viral RNA signal. *J. Virol*. 2003; 77: 2922-7.
25. Wang N., Shang J., Jiang S., Du L. Subunit vaccines against emerging pathogenic human coronaviruses. *Front. Microbiol*. 2020; 11: 298.

Поступила 20.06.21

Принята к печати 25.06.21