

ВИЗНАЧЕННЯ НАЯВНОСТІ СПЕЦИФІЧНИХ АНТИТІЛ ПРОТИ SARS-COV-2 У ДІТЕЙ ШКІЛЬНОГО ВІКУ М. ХАРКОВА У ВЕРЕСНІ 2020 РОКУ

Волянський А. Ю., Кучма І. Ю., Давидова Т.В.,
Кучма М. В., Юдін І. П.

Інститут мікробіології та імунології імені
І.І. Мечникова

Вступ. У останній час світова спільнота та сучасна медична наука постала перед викликом, пов'язаним з появою нового коронавірусу людини SARS-CoV-2 здатного викликати гострий тяжкий респіраторний синдром (Severe acute respiratory syndrome) [1]. ВООЗ дала назву хворобі, що викликана новим коронавірусом людини, Covid-19 (coronavirus infection disease) [2]. Вперше SARS-CoV-2 було виявлено в грудні 2019 року в м. Ухань, звідки він швидко поширився по Китаю і далі по всьому світі [1,2]. Через високу контагіозність та патогенність SARS-CoV-2 ВООЗ оголосила всесвітню пандемією Covid-19 на початку березня 2020 року [3].

Особливості патогенезу Covid-19 обумовлюють значну частоту випадків цього захворювання з важким перебігом [3,4]. Тяжкість перебігу захворювання та послідовність і повноцінність імунної відповіді взаємопов'язані: надмірна та тривала активація факторів вродженого імунітету з підвищенням цитокінового профілю відмічається у хворих з тяжким перебігом, а перехід до етапу вироблення специфічних антитіл характеризується поліпшенням у стані хворого та одужанням [5,6]. Специфічна гуморальна відповідь є важливою у формуванні колективного постінфекційного та поствакцинального імунітету і є показником подолання епідемічних процесів у популяції [7]. З метою вивчення формування постінфекційного імунітету до SARS-CoV-2 під час пандемії на базі Державної установи «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України» проводиться дослідження, що має одним із завдань визначення специфічних антитіл до SARS-CoV-2 у різних вікових групах та спостереження за формуванням імунного прошарку протягом епідемічного процесу, а також тривалістю виявлення специфічних антитіл.

Матеріали та методи. В межах ініціативної наукової теми «Особливості формування колективного протиінфекційного імунітету в сучасних умовах» було проведено дослідження по визначенню специфічних загальних імуноглобулінів, а також IgA, IgM та IgG до SARS-CoV-2 методом імуноферментного аналізу (ІФА) серед школярів Харківської гімназії №Х на 27-28 тиждень від початку пандемії (21-24.09.2020 р.). Об'єктом дослідження слугували 439 зразків сироваток крові дітей віком від 6 до 16 років. Предметом дослідження був стан специфічного імунітету проти SARS-CoV-2 у різних вікових групах дитячого населення на випадковій

вибірці школярів м. Харкова у певний період розгортання епідемії.

Методи дослідження: імунологічні (ІФА); математико-статистичні (методи дисперсійного аналізу для обробки результатів експериментальних досліджень).

Зразки крові були відібрані в учасників дослідження натщесерце, отримана сироватка зберігалася при температурі -20°C . Тести були виконані на автоматизованому імунологічному аналізаторі LisaScan EM (Erba Lachema, Чехія). Для виявлення імуноглобулінів використовували діагностичні набори «анти-SARS-CoV-2-ІФА», «SARS-CoV-2-IgA-ІФА», «SARS-CoV-2-IgM-ІФА», «SARS-CoV-2-IgG-ІФА» виробництва «Хема» (Україна). Усі дослідження були виконані у дублях задля зменшення можливої помилки. Згідно з рекомендаціями виробника рівень анти-SARS-CoV-2 (далі загальні антитіла), SARS-CoV-2-IgA, SARS-CoV-2-IgM, SARS-CoV-2-IgG за індексом позитивності (ІП) інтерпретується при $\text{ІП} > 1,1$ як позитивний, при $\text{ІП} < 0,9$ як негативний і при значенні ІП в межах від 0,91 до 1,09 результат вважається невизначеним/сумнівним, що можливо інтерпретувати або як початок формування антитіл, або поступове зниження їх рівнів у разі нестійкої імунної відповіді та/або імунну дисфункцію.

Статистична обробка отриманих даних виконувалася з використанням методів непараметричної статистики за допомогою пакету статистичних програм AtteStat 12.0.5, інтегрованої в Microsoft Excel 2013. 95% довірчі інтервали (ДІ) були розраховані біноміальним методом Клопера-Пірсона.

Результати та обговорення. Даний етап дослідження наявності специфічних антитіл до SARS-CoV-2 у певних груп населення проведено у період, коли на території України ще не відмічалася значного росту кількості хворих на Covid-19 у порівнянні з країнами західної Європи, Китаєм, США та іншими [8,9], однак з початку пандемії вже минуло майже 6 місяців. Вбачаючи на жорсткий весняний локдаун і епідемічно відносно «спокійний» літній період Україна не зазнала першої хвилі захворюваності значного розмаху у порівнянні з іншими країнами на час нашого дослідження [10,11].

Більша частина обстежених (432 дитини, 98,4%) за результатами опитування й анкетування не відмічала проявів гострого респіраторного захворювання, надмірної втоми, підйому температури чи інших проявів, характерних для Covid-19, в тому числі порушень нюху і смаку, протягом останніх 6-8 тижнів. Інші обстежені (7 дітей, 1,6%) не змогли чітко відповісти на запитання, проте серйозних відхилень від свого звичайного стану за означений період не відмітили.

У результаті дослідження було виявлено загальні антитіла до SARS-CoV-2 у 20,3% дітей, сумнівний рівень загальних антитіл виявлено майже у 9% обстежених. IgA було виявлено в цілому (позитивні та сумнівні) у 15,2 % дітей, IgM – 7,7 %, а IgG – 14,3 % (табл.1)

Таблиця 1. Визначення специфічних антитіл до SARS-CoV-2

Вікові групи (роки)	Кількість, учнів, n	Загальні антитіла				IgA				IgM				IgG			
		Сумнівні		Позитивні		Сумнівні		Позитивні		Сумнівні		Позитивні		Сумнівні		Позитивні	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
6	21	1	4,8 ± 0,047*	1	4,8 ± 0,047	0	0	2	9,6 ± 0,064	0	0	0	0	0	0	2	9,6 ± 0,064
7	39	2	5,1 ± 0,035	2	5,1 ± 0,035	0	0	4	10,2 ± 0,048	0	0	0	0	0	0	4	10,2 ± 0,048
8	50	2	4 ± 0,028	13	26 ± 0,62	0	0	8	16 ± 0,038	0	0	2	4 ± 0,028	1	2 ± 0,02	7	14 ± 0,049
9	53	5	9,5 ± 0,4	20	37,7 ± 0,67	0	0	7	13,2 ± 0,019	1	1,9 ± 0,019	4	7,5 ± 0,028	3	5,7 ± 0,032	4	7,5 ± 0,036
10	57	8	14 ± 0,046	21	36,8 ± 0,64	2	3,5 ± 0,024	14	24,6 ± 0,44	1	1,8 ± 0,018	8	14 ± 0,045	3	5,3 ± 0,03	14	24,6 ± 0,57
11	52	13	25 ± 0,6	11	21,2 ± 0,57	0	0	6	11,5 ± 0,027	0	0	6	11,5 ± 0,019	4	7,7 ± 0,037	6	11,5 ± 0,44
12	9	3	33,3 ± 0,157	1	11 ± 0,1	1	11 ± 0,1	4	44,4 ± 0,032	0	0	1	11,1 ± 0,02	0	0	1	11,1 ± 0,1
13	37	0	0	2	5,4 ± 0,037	0	0	4	10,8 ± 0,06	0	0	3	8,1 ± 0,03	0	0	3	8,1 ± 0,027
14	47	1	2,1 ± 0,021	7	14,9 ± 0,52	0	0	8	17 ± 0,03	0	0	3	6,4 ± 0,03	0	0	5	10,6 ± 0,45
15	38	1	2,6 ± 0,026	9	23,7 ± 0,069	0	0	4	10,5 ± 0,05	2	5,3 ± 0,036	2	5,3 ± 0,04	0	0	9	23,7 ± 0,69
16	36	3	8,3 ± 0,046	2	5,6 ± 0,038	0	0	3	8,3 ± 0,038	0	0	1	2,8 ± 0,027	0	0	3	8,3 ± 0,046
Загалом	439	39	8,9 ± 0,014	89	20,3 ± 0,19	3	0,7 ± 0,04	64	14,5 ± 0,011	4	0,9 ± 0,5	30	6,8 ± 0,06	11	2,5 ± 0,07	58	11,8 ± 0,15

*SE, $p \leq 0,05$

Відсоток позитивних загальних антитіл до SARS-CoV-2 був більшим серед дітей 8-11 та 14-15 років і становив від 14,9 до 37,7%, а сумнівних серед дітей 10-12 років (14-33,3%) (рис.1). У інших вікових категоріях частота виявлення загальних антитіл до SARS-CoV-2 була меншою <13,9% (у цілому – сумнівні та позитивні). Сумнівний результат згідно з інструкцією до діагностичних наборів знаходиться в межах за індексом позитивності від 0,91 до 1,09 і розглядається як показник, вироблення специфічних антитіл нижче достовірно позитивного рівня, але вище достовірно негативного результату, що може

бути ознакою як початку формування специфічної гуморальної відповіді у процесі захворювання, так і зменшення продукції антитіл та їх зникнення з плином часу у разі не стійкої імунної відповіді, або, у деяких випадках, на тлі імунної дисфункції вродженої або набутої. У нашому дослідженні ми враховували дітей, у яких було виявлено сумнівний рівень специфічних до SARS-CoV-2 антитіл при двократному підтвердженні результату та/або підтвердженні позитивного результату при визначенні інших класів імуноглобулінів.

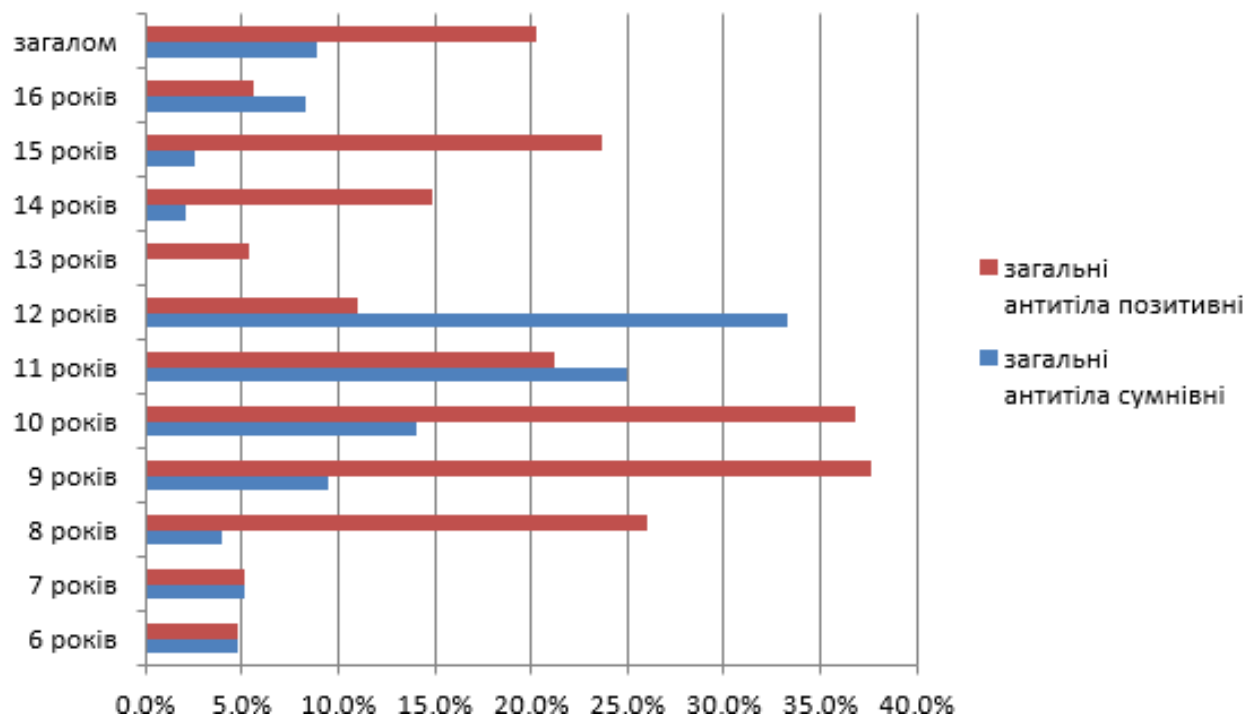


Рис.1. Відсоток виявлення загальних антитіл у школярів за віковими категоріями

Позитивні загальні антитіла до SARS-CoV-2 було виявлено у 89 дітей (20,3%), сумнівні у 39 дітей (8,9%), загалом у 128 дітей. У обстежених з позитивним або сумнівними специфічними загальними імуноглобулінами до SARS-CoV-2 було виявлено також IgA, IgM, IgG специфічні до SARS-CoV-2 у 97,6% випадків (рис.2) і у зразках сироваток трьох дітей (2,4%) були виявлені лише позитивні загальні антитіла до SARS-CoV-2, що, вірогідно, пояснюється ймовірною чуттєвістю даного діагностикуму до виявлення інших класів та субкласів імуноглобулінів. У обстежених з негативними результатами по загальним імуноглобулінам до SARS-CoV-2 IgA, IgM, IgG виявлено не було.

У зразках сироваток позитивних/сумнівних по загальним антитілам до SARS-CoV-2 у 23,6% випадків було виявлено тільки один із класів імуноглобулінів, серед них IgA у 5,6%, IgM – 3,3%, IgG – 14,7%. У більшості зразків одночасно виявлялися два класи антитіл – 67,4% зразків й у 9,02% одночасно було виявлено всі три класи імуноглобулінів (рис.2).

Цікавим є факт переважної одночасної наявності у сироватці крові IgA та IgG у 60 зразках (46,9%) сироваток із загальними антитілами до SARS-CoV-2. Одночасне виявлення IgM та IgG відмічалось значно менше, лише у 29 зразках – 22,7%, комбінація одночасної наявності IgA та IgM без присутності IgG було виявлено у 1 зразку (0,78%).

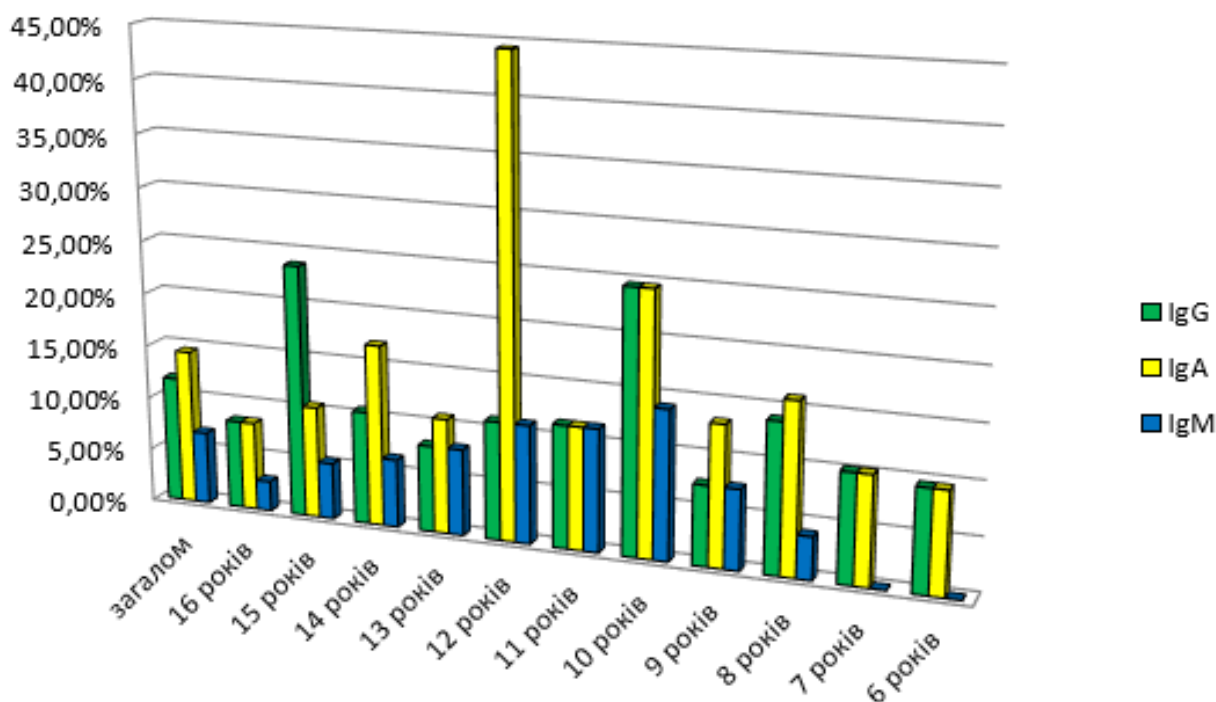


Рис.2. Виявлення різних класів імуноглобулінів у сироватці крові дітей шкільного віку

Висновки. Імунна відповідь на SARS-CoV-2 залежить від багатьох факторів, включаючи вірусне навантаження, особливості інфікованої людини (вік, супутні захворювання та імунний статус), а також особливості збудника, шляхи зараження та патогенез захворювання [2-6].

Отримані дані вказують, що більше ніж у 20% дітей шкільного віку рандомізованої вибірки були виявлені антитіла до SARS-CoV-2 на 27-28 тиждень від початку пандемії (21-24.09.2020 р.), не дивлячись на те, що на час даного дослідження наша країна ще не зіткнулась з лавиноподібною хвилею підйому захворюваності, яка у цей період відмічалась, наприклад, в Індії, США та Бразилії [12]. Нами не було знайдено достовірних даних про довготривалість імунної відповіді та захисних рівнів антитіл при Covid-19 і це постає як одне з найважливіших питань при прогнозуванні подальшого розвитку епідемічного процесу та вакцинопрофілактики цього захворювання. Тому завдання наших досліджень є вивчення особливостей формування постінфекційної та, у подальшому, поствакцинальної імунної відповіді на SARS-CoV-2 для формування стратегій щодо подолання пандемії і подальшого контролю за епідемічними підйомами цього захворювання.

Відомо, що у дітей захворювання Covid-19 перебігає легше, малосимптомно або безсимптомно [13], що збігається з нашими даними по відсутності помітних проявів захворювання у більшості дітей впродовж 6-8 тижнів перед дослідженням. Хоча можливо припустити, що інфікування відбулося раніше вказаного періоду, однак одночасна наявність у сироватці крові IgA та IgG у 60 зразках (46,9%) сироваток із загальними антитілами до SARS-CoV-2 та IgM і IgG у 29 зразках – у 22,7%, що становить

приблизно три чверті від усіх дітей, які мали позитивні антитіла до SARS-CoV-2, згідно з традиційними уявленнями про періодичність формування гуморальної відповіді [14] передбачає більшу вірогідність інфікування саме впродовж вказаного періоду до моменту визначення антитіл у сироватці крові. Факт присутності IgA одночасно з IgG і з відсутністю IgM у зразках сироватки крові 46,9% обстежених відображає довготривалу відповідь саме класу захисних імуноглобулінів пов'язаних із запаленням на слизових при відсутності або спаданні гостроти запалення, що характеризується продукцією IgM [14,15]. Ця особливість імунної відповіді до SARS-CoV-2 потребує подальшого дослідження.

У вікових групах обстежених дітей 8-15 років було відмічено найбільший відсоток специфічних антитіл до SARS-CoV-2, це може бути пояснено з одного боку невеликою вибіркою, що не дозволяє повністю екстраполювати висновки стосовно результатів дослідження на всю популяцію, з іншого боку отримані дані відповідають етапам розвитку та становлення імунної системи у дітей особливо її гуморальної ланки [16].

Отримані у даному дослідженні дані дають розуміння про деякі особливості формування постінфекційного імунітету до SARS-CoV-2 у дітей шкільного віку та акцентують увагу на важливих питаннях, що потребують подальших досліджень.

Ключові слова: Covid-19, діти шкільного віку, антитіла до SARS-CoV-2

Determination of the presence of specific antibodies against SARS-CoV-2 school-age children in Kharkiv in September 2020

Volyansky A. Yu., Kuchma I. Yu., Davydova T. V., Kuchma M.V., Yudin I.P.

Introduction. Recently, the world community and modern medical science have faced the challenge of the emergence new human coronavirus SARS-CoV-2 capable of causing severe acute respiratory syndrome. WHO has named the disease caused by this virus Covid-19 (coronavirus infection disease). SARS-CoV-2 was first detected in December 2019 in Wuhan, from where it quickly spread to China and further around the world. Due to the high contagiousness and pathogenicity of SARS-CoV-2, WHO declared the global pandemic Covid-19 in early March 2020. The features of the pathogenesis of Covid-19 determine the significant frequency cases of this disease with a severe course. The severity course of the disease and the consistency and completeness of the immune response are interrelated: excessive and continued activation of innate immunity factors with an increase in the cytokine profile is observed in patients with severe course, and the transition to the stage of production the specific antibodies is characterized by an improvement in the patient's condition and recovery. The specific humoral response is important in the formation of collective post-infection and post-vaccination immunity and is an indicator of overcoming epidemic processes in the population. The study is conducted in the Mechnikov institute of microbiology and immunology National Academy of Medical Sciences of Ukraine has one of the tasks of determining specific antibodies to SARS-CoV-2 in different age groups and monitoring the formation of the immune layer during the epidemic process, as well as the duration of detection of specific antibodies.

Material & methods. A study was conducted to determine specific total immunoglobulins, IgA, IgM and IgG to SARS-CoV-2 by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) among schoolchildren Kharkiv gymnasium №X for 27-28 weeks of the pandemic (21-24/09/2020). The object of the study were 439 samples of serum from children aged 6 to 16 years. **Results & discussion.** This phase of the study the presence of specific SARS-CoV-2 antibodies in certain groups held at a time when the territory of Ukraine still it was not observed a significant increase in the number of patients with Covid-19 compared to Western Europe, China, the USA and others, but with almost 6 months have passed since the beginning of the pandemic. Most of the patients (98.4 %) in a survey questionnaire and not noted the manifestations of acute respiratory illness, excessive fatigue, temperature rise or other manifestations characteristic of Covid-19. The study revealed total SARS-CoV-2 antibodies in 20.3% of children, questionable levels total antibodies were found in almost 9 %. IgA was detected (positive and questionable) in 15.2 % of children, IgM – 7.7 %, and IgG – 14.3 %. In serum samples total SARS-CoV-2 antibody positive/questionable in 23.6% of cases were identified only one of the classes of immunoglobulins: IgA at 5,6 %, IgM – 3,3 %, IgG – 14,7 %. In most samples two classes of antibodies were detected simultaneously – 67.4 % of samples and in 9.02% all three classes of immunoglobulins were detected simultaneously. An interesting fact is predominantly simultaneous presence in serum IgA and IgG in 60 samples (46.9%) with total serum antibodies to SARS-CoV-2. Simultaneous detection IgM and IgG was noted much less, only in 29

DOI: 10.5281/zenodo.4382196

samples – 22.7%, the combination of simultaneous presence IgA and IgM without presence IgG was detected in one sample (0.78%). **Conclusion.** The data obtained indicate that more than 20% of school-age children in the randomized sample had antibodies to SARS-CoV-2 at 27-28 weeks of the pandemic (21-24/09/2020), despite the fact that at the time of this study, our country has not yet faced an avalanche of rising morbidity, which was observed in this period. Covid-19 is known to be milder, asymptomatic or asymptomatic in children, which is consistent with our lack of evidence in most children for 6-8 weeks prior to the study, although it is possible to assume that the infection occurred earlier. However, the simultaneous presence in the serum SARS-CoV-2 IgA and IgG in 60 samples (46.9%) and IgM and IgG in 29 samples – in 22.7%, which is approximately three quarters of all children, which had positive antibodies to SARS-CoV-2, according to traditional notions about the frequency of the formation humoral response suggests a higher probability of infection during this period to the coin determination of antibodies in blood serum. Obtained in this study data provide an understanding certain features of the formation SARS-CoV-2 post infectious immunity in school-age children and delivered important issues that require further research.

Keywords: Covid-19 school-age children; antibodies to SARS-CoV-2

References:

1. Singhal T. A Review of Coronavirus Disease-2019 (COVID-19). *Ind J Pediatr.* 2020. Vol. 87. N. 4. P. 281–6.
2. Wu F, Zhao S, Yu B. et al. A new Coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature.* 2020. Vol. 579. P. 265–269.
3. Weekly epidemiological update - 27 October 2020/Data as received by WHO from national authorities, as of 10am CEST 25/October/2020. <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update---27-october-2020>
4. Huang C, Wang Y, Li X. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet.* 2020. Vol. 395. P. 497–506.
5. Chen Y, Liu Q, Guo D. Emerging coronaviruses: genome structure, replication, and pathogenesis. *J. Med. Virol.* 2020. Vol. 92. P. 418–423.
6. Ahmad Abu Turab Naqvi, Kisa Fatima, Taj Mohammad. et al. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2020. Oct 1. Vol. 1866. N. 10. P. 165878. doi: 10.1016/j.bbadis.2020.165878
7. Kuznetsova L.V., Babajan V.D., Kharchenko N.V. et al. Immunology. Vinnytsia Mercury-Podillya LLC. 2013. <https://nmapo.edu.ua/images/FakTer/KafKlimAle/Imunologiy.pdf>
8. Stawicki S.P., Jeanmonod R., Miller A.C. et al. The 2019–2020 Novel Coronavirus (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2) Pandemic: A Joint American College of Academic International Medicine-World Academic Council of Emergency Medicine Multidisciplinary COVID-19 Working Group Consensus Paper. *J Glob Infect Dis.* 2020. 12(2). 47–93.

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7384689/>
9. Ortiz-Prado E., Simbaña-Rivera K., Gómez-Barreno L. et al. Clinical, molecular, and epidemiological characterization of the SARS-CoV-2 virus and the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), a comprehensive literature review. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2020. 98(1). 115094.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7260568/>
10. Kyrychko Y.N., Blyuss K.B., Brovchenko I. Mathematical modelling of the dynamics and containment of COVID-19 in Ukraine. *Sci Rep.* 2020. 10. 19662.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7665000/>
11. Ioannidis J.P. Global perspective of COVID-19 epidemiology for a full-cycle pandemic. *Eur J Clin Invest.* 2020. 25. e13423.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7646031/>
12. Saha J., Barman B., Chouhan P. Lockdown for COVID-19 and its impact on community mobility in India: An analysis of the COVID-19 Community Mobility Reports, 2020. *Child Youth Serv Rev.* 2020. 116. 105160.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7289746/>
13. Hoang A., Chorath K., Moreira A. et al. COVID-19 in 7780 pediatric patients: A systematic review. *EClinicalMedicine.* 2020. 24.100433.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7318942/>
14. Bouteau A., Kervecan J., Su Q. et al. DC Subsets Regulate Humoral Immune Responses by Supporting the Differentiation of Distinct Tfh Cells. *Front Immunol.* 2019. 10. 1134.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6545976/>
15. Vabret N., Britton G.J., Gruber C. et al. Immunology of COVID-19: Current State of the Science. *Immunity.* 2020.52(6). 910–941.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7200337/>
16. Altman D. Abstracts of the Annual Congress of the British Society for Immunology 5–8 December 2011 Liverpool, UK. *Immunology The Journal of cells, molecules, systems and technologies.* 2011. Volume 135. Suppl. 1.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3246641/pdf/imm0135-0001.pdf>