



КІНЕТИКА IGM, IGA, IGG ДО SARS-COV-2 У ДІТЕЙ ІЗ COVID-19 ЛЬВІВСЬКОЇ ОБЛАСТІ В РІЗНІ ПЕРІОДИ ІНФЕКЦІЙНОГО ПРОЦЕСУ ЗАЛЕЖНО ВІД ТЯЖКОСТІ ПЕРЕБІГУ ТА ВІКУ

Стасів М.В. ORCID: 0000-0002-7110-0557

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького
Кафедра дитячих інфекційних хвороб

Ключові слова: COVID-19, IgM, IgA, IgG, SARS-CoV-2, діти

Для цитування: Стасів М.В. Кінетика IgM, IgA, IgG до SARS-CoV-2 у дітей із COVID-19 Львівської області в різні періоди інфекційного процесу залежно від тяжкості перебігу та віку. Львівський медичний часопис. 2023. Т. 29. № 3-4. С. 41-57. DOI: <https://doi.org/10.25040/aml2023.3-4.041>

Для кореспонденції: Стасів Марія Володимирівна, асистентка кафедри дитячих інфекційних хвороб Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького, e-mail: mariatanchuk@gmail.com

Стаття надійшла: 11.10.2023 **Прийнята до друку:** 22.11.2023

KINETICS OF IGM, IGA, IGG TO SARS-COV-2 IN CHILDREN WITH COVID-19 IN LVIV REGION IN DIFFERENT PERIODS OF THE INFECTIOUS PROCESS DEPENDING ON THE SEVERITY OF THE COURSE AND AGE

Maria Stasiv ORCID: 0000-0002-7110-0557

Danylo Halytsky Lviv National Medical University
Department of Pediatric Infectious Diseases

Keywords: COVID-19, IgM, IgA, IgG, SARS-CoV-2, children

For citation: Stasiv M. Kinetics of IgM, IgA, IgG to SARS-CoV-2 in children with COVID-19 in Lviv region in different periods of the infectious process depending on the severity of the course and age. Acta Medica Leopoliensia. 2023;29(3-4):41-57. DOI: <https://doi.org/10.25040/aml2023.3-4.041>

For correspondence: Stasiv Maria Volodymyrivna, assistant at the Pediatric Infectious Diseases Department, Danylo Halytsky Lviv National Medical University, e-mail: mariatanchuk@gmail.com

Received: October 11, 2023 **Accepted:** November 22, 2023

Реферат

Мета. Проаналізувати кінетику IgA, IgM, IgG до SARS-CoV-2 у дітей залежно від тяжкості перебігу COVID-19 та віку.

Матеріал і методи. У роботі проведено проспективне дослідження за участі 88 дітей (середній вік 9,4 роки), хворих на COVID-19, які лікувалися у КНП ЛОР "ЛОДКЛ "ОХМАТДИТ" з 2020 по 2021 рік. У групі спостереження було 36 хлопців (40,90%), 52 дівчини (59,10%). Верифікація діагнозу базувалася на клінічних ознаках хвороби з виявленням РНК SARS-CoV-2 зі слизу з носа методом ПЛР. Проаналізовано значення IgA, IgM та IgG до S і N білків SARS-CoV-2, визначених методом ІФА у різні терміни інфекційного процесу в 380 зразках сироватки крові.

Результати й обговорення. Результати досліджень IgM до SARS-CoV-2 на першому тижні захворювання показали середнє значення цього показника на рівні 0,24 [0,14; 1,39], на другому тижні - 0,49 [0,30; 2,87]. Найвище середнє значення IgA до SARS-CoV-2 - 0,33 [0,24; 1,00] виявлено з 15 по 30 день, після 30 днів становило 0,24 [0,20; 0,28]. Наростання середнього

Abstract

Aim. The research aims at analyzing the kinetics of IgA, IgM, and IgG to SARS-CoV-2 in children based on the severity of COVID-19 and age.

Materials and Methods. The conducted prospective study involved 88 children (mean age 9.4 years) with COVID-19, admitted to the "Lviv Regional Pediatric Clinical Hospital "OKHMATDYT" from 2020 to 2021. The participants included 36 males (40.90%), and 52 females (59.10%) in the observation group. Diagnosis verification relied on clinical manifestations of the disease, with the detection of SARS-CoV-2 RNA from nasal mucus using the PCR method. The values of IgA, IgM, and IgG to S and N proteins of SARS-CoV-2, determined by the ELISA method at different times of the infectious process in 380 blood serum samples, were analyzed.

Results and Discussion. The research findings of IgM to SARS-CoV-2 in the first week of illness revealed a median value of 0.24 [0.14; 1.39], increasing to 0.49 [0.30; 2.87] in the second week. The highest median value of IgA to SARS-CoV-2 is 0.33 [0.24; 1.00] was found from 15 to 30 days, after 30 days it was 0.24 [0.20; 0.28].

значення IgG-N до SARS-CoV-2 спостерігалось з другого тижня хвороби і склало 1,13 [0,52; 3,17] з піком його значення 5,68 [2,39; 8,86] у період до трьох місяців. Тяжкий перебіг COVID-19 діагностовано у 27 дітей (30,68%): 15 дівчат (55,56%) і 12 хлопців (44,44%). У більшості госпіталізованих дітей значення IgM при різних ступенях тяжкості хвороби виявлялись позитивними з першого до сьомого дня хвороби. У дітей з тяжким перебігом SARS-CoV-2 середнє значення IgM у сироватці крові у цей період становило 1,39 [1,36; 4,07]. Статистично значущою різниця між показниками IgG до N середньої тяжкості та тяжкої форми була на 15-30 день захворювання: 0,54 [0,21; 1,89] проти 5,55 [4,99; 5,80] відповідно, ($p < 0,05$). У пацієнтів як із середньотяжкими, так і з тяжкими формами хвороби, середні значення IgG до N SARS-CoV-2 були позитивними в усі періоди дослідження. Спостерігалось значне зростання середнього значення IgG до N SARS-CoV-2 у дівчат у період з 31 до 90 дня. При тяжких формах хвороби у періоді від трьох до шести місяців середнє значення IgG до S SARS-CoV-2 становило 9,40 [7,80; 10,60] і було вищим, ніж у пацієнтів зі середньотяжким перебігом хвороби - 8,72 [8,64; 8,97] ($p < 0,05$).

Висновки. Серологічні дослідження дозволяють вивчати імунну відповідь на SARS-CoV-2, визначити сероконверсію та характеризувати перебіг COVID-19 і є важливими для епідеміологічних досліджень. IgM, IgA та IgG до SARS-CoV-2 залежать від важкості перебігу хвороби та віку пацієнта.

Вступ

SARS-CoV-2 інфекція у дітей в порівнянні з дорослими має набагато легший перебіг. У більшості випадків протікає безсимптомно або характеризується клінічними ознаками гострої респіраторної інфекції [1,2]. Однією з гіпотез щодо легшого перебігу COVID-19 є захисний ефект перехресної реакції антитіл від інших коронавірусів (HCoV), які частіше трапляються у пацієнтів дитячого віку. Зазвичай у дітей виявляють нижче вірусне навантаження, що пов'язано з низькою експресією ACE2, рецептора коронавірусу [3]. Проте розвиток тяжких форм хвороби, ускладненої пневмонією та ГРДС можливий і у дітей [4]. Варіабельність COVID-19 свідчить про те, що індивідуальна імунна відповідь на SARS-CoV-2 може відігравати вирішальну роль у визначенні клінічного перебігу [5]. COVID-19 діагностовано за допомогою, як ПЛР РНК SARS-CoV-2 з мазків з носа і ротоглотки, так

The increase in the median value of IgG-N to SARS-CoV-2 was observed from the second week of the illness, reaching 1.13 [0.52; 3.17], with its maximum value at 5.68 [2.39; 8.86] within the period up to three months. Severe COVID-19 was diagnosed in 27 children (30.68%), comprising 15 females (55.56%) and 12 males (44.44%). In the majority of hospitalized children, IgM values at different degrees of disease severity were positive from the first to the seventh day of illness. In children with a severe course of SARS-CoV-2, the median value of IgM in blood serum during this period was 1.39 [1.36; 4.07]. There was a statistically significant difference between the IgG levels for moderate and severe forms on days 15-30 of the illness: 0.54 [0.21; 1.89] compared to 5.55 [4.99; 5.80], respectively ($p < 0.05$). In patients with both moderate and severe forms of the disease, median values of IgG to N SARS-CoV-2 were positive throughout the study period. A significant increase in the median value of IgG to N SARS-CoV-2 was observed in females from day 31 to day 90. In severe cases of the disease, the median value of IgG to SARS-CoV-2 from three to six months was 9.40 [7.80; 10.60], which was higher than in patients with a moderate form of the disease - 8.72 [8.64; 8.97] ($p < 0.05$).

Conclusions. Serological studies enable the investigation of the immune response to SARS-CoV-2, determination of seroconversion, and characterization of the course of COVID-19, being crucial for epidemiological research. The levels of IgM, IgA, and IgG to SARS-CoV-2 depend on the disease's severity and the patient's age.

і виявленням IgM, IgA до S-антигену і N-білка у сироватці крові.

Результати досліджень IgM, IgA, IgG до SARS-CoV-2 у науковців є суперечливими. Дослідниками з Барселонського університету виявлено вищі рівні анти-SIgG та IgM у сироватці крові та слині пацієнтів дитячого віку з легким та малосимптомним перебігом хвороби, ніж у дітей з тяжким її варіантом, що може бути пов'язано з кращим локальним імунітетом [3]. Проте науковцями з Румунії встановлено, що IgM, IgG до SARS-CoV-2 у сироватці крові були вищими при тяжких формах хвороби [6]. Тому для глибокого розуміння імунної відповіді при COVID-19 потрібні подальші наукові дослідження з урахуванням клініко-епідеміологічного значення серологічних досліджень, які залежать від антигенів SARS-CoV-2.

Ці серологічні аналізи необхідні для перевірки сприйнятливості або резистентності до наступного повторного зараження, а та-

кож використовуються для скринінгу донорської крові у дорослих. Дані результати досліджень можуть бути використаними для розробки пасивної терапії антитілами. Терміни проведення досліджень відповідних імуноглобулінів мають вирішальне значення для їх інтерпретації та раціонального використання.

Вивчення кінетики IgM, IgA, IgG має велике значення для діагностики, захворювання, його тривалості, лікування, формування постінфекційного імунітету та профілактики хвороби [7-9].

Природа імунної відповіді на SARS-CoV-2 у дітей з різними клінічними проявами, починаючи від безсимптомних до критично тяжких форм COVID-19 потребує подальших досліджень. Генерація вірус-специфічних антитіл, які нейтралізують або блокують інфекційність, має велике значення у формуванні захисного імунітету проти багатьох інфекцій та розробки вакцин [10].

Мета роботи - проаналізувати кінетику IgM, IgA, IgG до SARS-CoV-2 у дітей залежно від віку та тяжкості перебігу COVID-19.

Матеріал і методи

У роботі проведено проспективне дослідження за участі 88 дітей, хворих на COVID-19 (SARS-CoV-2), які лікувалися у КНП ЛОР "ЛОДКЛ "ОХМАТДИТ" від 2020 до 2021 рік. Їх середній вік становив 9,4 роки (min - 1 рік, max - 17,8 років). У групі спостереження було 36 хлопців (40,91%), 52 дівчини (59,10%). Зпоміж досліджуваних 27 осіб (30,68%) мешкали у сільській місцевості, 61 дитина (69,32%) - у місті. За віком було виокремлено три вікові групи: від одного до п'яти років (включно 1-4 роки), від п'яти до десяти (включно 5-9 років), від десяти до вісімнадцяти років (включно 10-17 років). За тяжкістю перебігу COVID-19 сформовано 2 групи: середньотяжка форма (61 дитина (69,31%), з них 37 дівчат (60,66%) та 24 хлопці (39,34%) та тяжкий перебіг (27 дітей (30,68%), з них 15 дівчат (55,56%) і 12 хлопців (44,44%).

Усі пацієнти підписали інформовану згоду на участь у дослідженні.

Верифікація діагнозу базувалася на клінічних ознаках гострої респіраторної інфекції з виявленням РНК SARS-CoV-2 та її фрагментів зі слизу з носа і ротоглотки методом ПЛР з використанням ампліфікатора CFX 96 Bio-Rad. Для вивчення гуморальної ланки імунної відповіді дитячого організму на SARS-CoV-2 проводилося дослідження антитіл різних класів. Всього проаналізовано рівні IgM, IgA та IgG до S і N білків SARS-CoV-2 у 380 зразках сироватки крові, визначених якісним методом ІФА за допомогою системи Вітротест (індекс позитивності 1,1).

IgA, IgM та IgG до S і N білків SARS-CoV-2 сироватки крові вивчалися у різні терміни інфекційного та постінфекційного процесу: з 1-7 день, з 8-14 день, з 15-30 день, з 31-90 день та з 91- 180 день.

Значення IgM до SARS-CoV-2 вивчали у різні періоди інфекційного процесу у 102 зразках сироватки крові 79 пацієнтів. Повторні дослідження IgM до SARS-CoV-2 проводились 21 дитині. Третє дослідження було проведено двом пацієнтам.

Рівні IgA до SARS-CoV-2 досліджували у 78 зразках крові, з яких цей показник вперше вивчався у 70 пацієнтів, повторно - у семи пацієнтів, в третій раз цей показник в динаміці було оцінено тільки в одного пацієнта.

Показник IgG-N (нуклеокапсид) до SARS-CoV-2 впродовж дослідження вивчався у 101 зразку крові. Перше визначення цього імуноглобуліну було виконано 50 пацієнтам, повторно - 44, а третє дослідження - 7 дітям.

Статистичне опрацювання одержаних результатів проводили за методами варіаційної статистики з визначенням медіани та кuartилів (Me [25%; 75% процентиля]), мінімального (min) та максимального (max) значень отриманих показників. Якісні ознаки представлені у вигляді абсолютних та відносних чисел (%). Міжгрупове порівняння проводили з використанням критерію Пірсона (для відносних показників) та критерію Манна-Уїтні (для медіанних значень). Мінімальний рівень значущості при перевірці статистичних даних $p < 0,05$.

Результати й обговорення

Результати досліджень IgM до SARS-CoV-2 на першому тижні захворювання показали середнє значення цього показника на рівні 0,24 [0,14; 1,39] (min-0,03, max-14,63). На другому тижні (8-14 дні) рівень IgM до SARS-CoV-2 зріс вдвічі до 0,49 [0,30; 2,87] (min-0,07, max-14,63).

Найвищий рівень IgM до SARS-CoV-2 спостерігався у терміні з 15 до 30 дня після перших проявів хвороби та був вищим у 2,5 рази ніж у попередньому проміжку часу і становив 2,50 [0,56; 6,21] (min-0,07, max-12,66). Наступне визначення IgM до SARS-CoV-2, проведене у термін з 31 по 90 день, показало чітке зниження середнього значення IgM до SARS-CoV-2 0,52 [0,19; 0,76] до порогового референтного значення. В обстежених дітей після 3 місяця середнє значення IgM до SARS-CoV-2 становило 0,05 [0,02; 0,09] (min-0,01, max-0,37), що є свідченням завершення гострого процесу захворювання.

Середнє значення IgA до SARS-CoV-2 впродовж першого та другого тижнів становило 0,13 [0,10; 0,33] (min-0,05, max-3,93); 0,22 [0,14; 0,40] (min-0,08, max-2,22) відповідно. Найвище середнє значення IgA до SARS-CoV-2 - 0,33 [0,24; 1,00] (min-0,13, max-6,35) виявлено з 15 по 30 день. Після 30 дня захворювання середнє значення IgA до SARS-CoV-2 становило 0,24 [0,20; 0,28] (min-0,11, max-0,35). У ранній специфічній гуморальній відповіді SARS-CoV-2 домінують реакції антитіл IgA, які значною мірою сприяють нейтралізації вірусу [10]. Поява IgA у сироватці крові може з'являтися рано, зростаючи досягає піку на третьому тижні захворювання [7] та знижуватися на 28 день [5].

Рівень IgG до N SARS-CoV-2 на перший тиждень хвороби становив 0,24 [0,13; 3,58] (min-0,03, max-13,17). Наростання середнього значення IgG до N SARS-CoV-2 спостерігалось з другого тижня хвороби і становило 1,13 [0,52; 3,17] (min-0,18, max-7,31) з піком його значення 5,68 [2,39; 8,86] (min-0,88, max-10,11) у період до трьох місяців. Впродовж шести місяців цей показник зменшився більше ніж у два рази до рівня 1,46 [0,57;

4,51] (min-0,12, max-12,21) у 35 пацієнтів.

Найважливішу роль у захисті від можливих наступних заражень відіграє IgG до S-білка SARS-CoV-2 [10]. У всі періоди дослідження середнє значення антитіл до Spike-білку наростали і в період до трьох місяців після перенесеної хвороби були найвищими і становили 8,85 [8,03; 9,34] (min-0,18, max-11,80). Після третього місяця спостерігається незначна тенденція до зниження - 7,9 [6,54; 8,62] (min-0,88, max-9,88). Результати досліджень усіх специфічних імуноглобулінів до SARS-CoV-2 у сироватці крові пацієнтів представлені на Рис. 1.

На відміну від середнього значення IgG-S, показник IgG-N виявився втричі нижчим, що дає змогу припустити, що в інфекційному процесі та його імунній відповіді S-білок SARS-CoV-2 відіграє важливішу роль ніж N-білок, а антитіла до S-білку виявляються триваліше, забезпечуючи надійніший специфічний захист. За даними Weisberg SP та ін., спостерігалася значна негативна кореляція титрів анти-N IgG залежно від віку, причому молоді люди мали нижчі титри анти-N, ніж старші дорослі, водночас у пацієнтів педіатричної групи визначались низькі титри анти-N у всіх вікових групах. IgG до S білку SARS-CoV-2 зростали з часом після появи клінічних ознак хвороби як у дітей, так і в дорослих [10]. Імунна відповідь у дітей зберігається протягом шести місяців, але динамічно змінюється, посилюючи нейтралізацію вірусу та впливає на тривалість імунної пам'яті [11].

Результати дослідження значень IgM до SARS-CoV-2 залежно від тяжкості перебігу показали, що у більшості госпіталізованих дітей значення IgM при різних ступенях тяжкості хвороби виявлялись позитивними з першого до сьомого дня хвороби. У дітей з тяжким перебігом SARS-CoV-2 середнє значення IgM у сироватці крові у цей період становило 1,39 [1,36; 4,07] (min-0,11, max-14,63). Водночас цей показник у дітей з середньо-тяжким перебігом був нижчим референтних значень і суттєво нижчим за показник при тяжкій формі хвороби ($p < 0,05$) та ста-

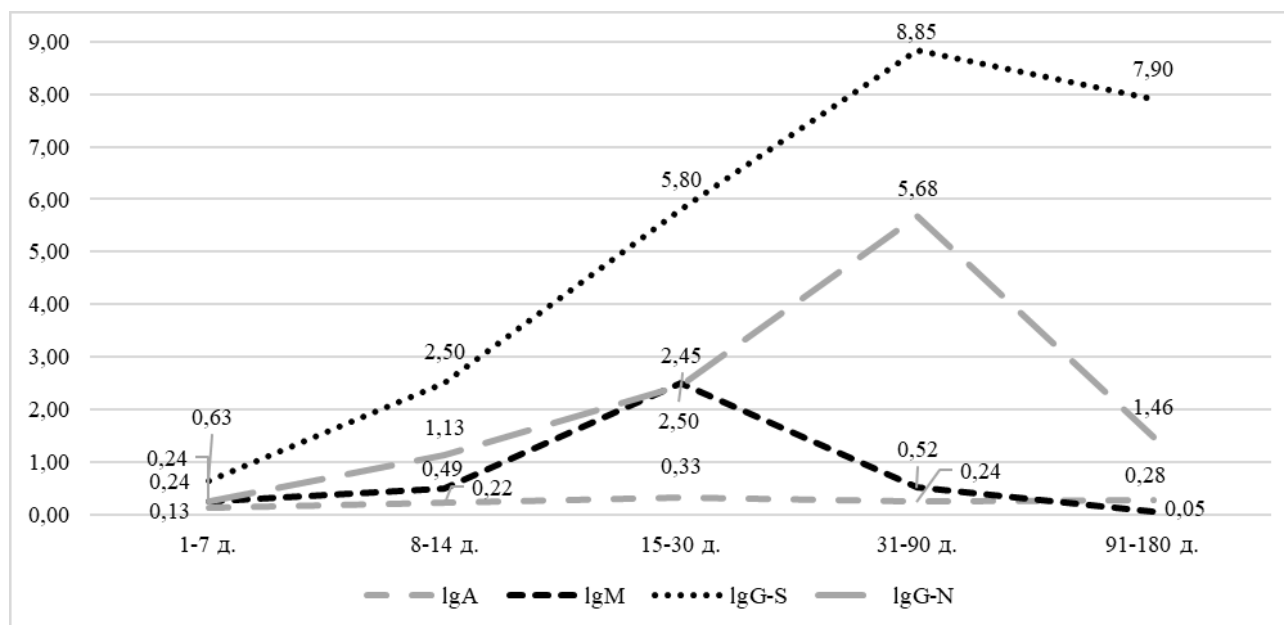


Рис. 1

Серединні значення IgM, IgA, IgG-N та IgG-S у різні періоди інфекційного процесу

новив 0,22 [0,14; 0,58] (min-0,03, max-8,49).

Аналізуючи результати досліджень IgM до SARS-CoV-2 у дітей з середньо-тяжким і тяжким перебігом COVID-19 виявлено, що з 8 по 14 день хвороби у дітей нарастають серединні значення IgM до SARS-CoV-2 і становлять 0,41 [0,27; 2,73] (min-0,073, max-12,66); 2,77 [0,36; 3,23] (min-0,073, max-6,79) відповідно ($p>0,05$).

Andrea Padoan та ін. у когортному дослідженні встановили, що збільшення IgM і IgG проти SARS-CoV-2 виявлено майже у всіх пацієнтів через 5 днів після появи симптомів та у 88% пацієнтів IgM і в 100% осіб IgG були найвищим на 12 день хвороби [12]. Подібні результати отримали дослідник з Італії та Німеччини, виявивши, що анти-SARS-CoV-2 IgG і NAb були низькими протягом 7 днів після початку, але через 14-28 днів після початку появи симптомів вони зросли у 100% пацієнтів. Рівень IgM досяг піку на 10-12 день і значно знизився на 18 день [7]. Така ж тенденція спостерігається в період з третього по четвертий тиждень від початку стаціонарного лікування в учасників нашого дослідження з тяжкою формою захворювання: серединне значення IgM до SARS-CoV-2 становить 4,42 [2,08; 6,38] (min-0,18, max-12,66).

У пацієнтів обох груп (за тяжкістю) через 3 місяці після перенесеного COVID-19 серединне значення IgM до SARS-CoV-2 становило 0,09 [0,05; 0,09] (min-0,01, max-0,16) при середній тяжкості перебігу та 0,02 [0,02; 0,04] (min-0,02, max-0,37) при тяжкій формі хвороби ($p>0,05$).

Аналіз розподілу за статтю рівнів IgM показав, що серединні значення IgM до SARS-CoV-2 як в хлопців, так і в дівчат були позитивними впродовж першого місяця обстеження і становили на першому тижні в дівчат - 0,26 [0,14; 0,95] (min-0,03, max-14,63), у хлопців - 0,24 [0,15; 1,78] (min-0,07, max-4,31) ($p>0,05$).

До другого тижня у хлопців серединне значення IgM до SARS-CoV-2 зросло удвічі і становило 0,55 [0,35; 3,87] (min-0,087, max-14,63). Тенденція до зростання цього показника у хлопців спостерігається до 30 дня обстеження, коли цей показник становить 4,52 [2,08; 6,38] (min-0,21, max-6,48). Після 30 дня захворювання у хлопців серединні значення IgM до SARS-CoV-2 були нижчі референтних значень і становили 0,67 [0,59; 0,75] (min-0,51, max-0,83).

У дівчат серединне значення IgM до SARS-CoV-2 у різні періоди дослідження були незначно нижчі ніж у хлопців ($p>0,05$),

проте, визначалися позитивними в період з 30 по 90 день і були в межах від 0,49 [0,20; 2,81] (8-14 день) до 2,02 [0,53; 5,11] (15-30 день). Вироблення специфічних для коронавірусу IgM є тимчасовим і призводить до зміни ізотипу на IgA та IgG (13). За даними науковців гендерних відмінностей у значеннях IgM до SARS-CoV-2 як у дітей, так і у дорослих не спостерігалось [10,14].

Дослідження рівнів IgA до SARS-CoV-2 у групах різної тяжкості перебігу захворювання у дітей показало, що серединні значення цього імуноглобуліну на першому тижні хвороби у пацієнтів як із середньо-тяжким, так і з тяжким перебігом хвороби були нижчі референтних значень і становили 0,11 [0,09; 0,17] (min-0,05, max-3,93); 0,33 [0,28; 0,36] (min-0,09, max-0,52) відповідно. Серединне значення імуноглобулінів цього класу з 15 по 30 день після появи перших клінічних ознак у пацієнтів з тяжкою формою становило 1,48 [0,52; 1,82] (min-0,38, max-6,35), а серединне значення його значення в цей же період у пацієнтів зі середньотяжкою формою захворювання було в 6,17 разів нижче від показника у дітей з тяжкою формою ($p < 0,05$) та нижче референтних значень і становило 0,24 [0,16; 0,30] (min-0,13, max-0,33). У наукових дослідженнях, проведених у Цюріху, пацієнти з тяжким перебігом COVID-19 продемонстрували дуже значне підвищення титрів специфічних для SARS-CoV-2 сироваткових IgA та IgG після появи симптомів на 12-14 день. Системне вироблення антитіл проти SARS-CoV-2 розвивається в основному у пацієнтів з тяжким перебігом COVID-19, з дуже високими титрами IgA, які спостерігаються у пацієнтів з гострим респіраторним дистрес-синдромом, тоді як легке захворювання може бути пов'язане з тимчасовим виробленням SARS-CoV-2-специфічних антитіл, що можуть стимулювати слизову секрецію SARS-CoV-2-специфічного IgA (13). З другого місяця та до 90 дня хвороби у пацієнтів обох груп рівень IgA до SARS-CoV-2 теж був негативним.

Численні дослідження у вивченні вироблення специфічних антитіл до SARS-CoV-

2, вказали на появу IgA через 10 днів від появи перших симптомів з наростанням цього показника через три тижні, що співпадає з результатами наших досліджень. В осіб із тяжкою формою COVID-19 Cervia C. та ін. виявили, що сироваткові титри IgA та IgG, специфічних для сироваткового білка SARS-CoV-2 S, стають позитивними в зразках, отриманих у середньому через 3-5 днів після появи симптомів. Ці відповіді антитіл показали сильну кореляцію з тривалістю захворювання, але вони не залежали від віку та статі пацієнта. Дуже високі сироваткові титри S-протеїну-специфічного IgA, але не IgG, корелювали з тяжким SARS-CoV-2 [6,13].

У наших дослідженнях виявлено, що у дітей старшої вікової групи (10-17 років) серединне значення IgA до SARS-CoV-2 в терміні 15-30 дні становило 0,93 [0,33; 1,74] (min-0,26, max-6,35). Водночас у дітей віком 5-9 років серединне значення IgA до SARS-CoV-2 склало 0,22 [0,14; 0,33] (min-0,13, max-0,52) ($p > 0,05$). В інших вікових групах у різні періоди дослідження серединні значення IgA до SARS-CoV-2 були нижчими референтних значень.

Розподіл за статтю показав, що у дівчат та хлопців діагностичними виявились титри IgA до SARS-CoV-2 за період з 15 по 30 день і становили 0,26 [0,18; 0,32] (min-0,13, max-6,35) і 1,00 [0,49; 1,57] (min-0,38, max-1,82) відповідно, ($p > 0,05$). Наші результати досліджень IgA до SARS-CoV-2 показали відсутність гендерної залежності, що співпадає з даними науковців зі Швейцарії.

Цікавими є результати досліджень IgG до N SARS-CoV-2 відповідно до тяжкості перебігу COVID-19. Серединні значення IgG до N SARS-CoV-2 у пацієнтів з тяжкою формою COVID-19 наростали з другого тижня (8-14 днів) і становили 2,34 [0,33; 3,41] (min-0,11, max-4,92) і до трьох місяців 5,50 [3,51; 7,40] (min-1,52, max-9,30).

У пацієнтів з середньотяжким перебігом хвороби серединні значення IgG до N SARS-CoV-2 не були високими: 1-7 день - 0,24 [0,12; 2,90] (min-0,03, max-8,37), 8-14 - 1,11 [0,65; 1,82] (min-0,08, max-5,53), 15-30 -

0,54 [0,21; 1,89] (min-0,18, max-3,90). Водночас з 31 до 90 дня середнє значення було найвищим і становило 5,85 [3,19; 8,59] (min-0,88, max-10,11). Значущою різниця між показниками IgG до N середньої тяжкості та тяжкої форми була лише на 15-30 день захворювання: 0,54 [0,21; 1,89] проти 5,55 [4,99; 5,80] відповідно, ($p < 0,05$).

У пацієнтів як із середньотяжкими, так і з тяжкими формами хвороби, середні значення IgG до N SARS-CoV-2 були позитивними в усі періоди дослідження, і, навіть, після видужання через три місяці: 1,51 [0,59; 3,44] (min-0,12, max-6,06) та 1,46 [0,47; 5,04] (min-0,19, max-12,21) відповідно ($p > 0,05$) (Рис. 2).

При вивченні IgG до N SARS-CoV-2 спостерігались певні гендерні особливості. Практично у всі (окрім одного) періоди досліджень рівень IgG до N був несуттєво ($p > 0,05$) вищим у хлопців, ніж у дівчат. Зокрема: середнє значення IgG до N SARS-CoV-2 на першому тижні - 0,20 [0,14; 5,19] (min-0,08, max-13,17) у дівчат проти 0,38 [0,14; 1,92] (min-0,03, max-6,44) у хлопців; на другому тижні дослідження у дівчат - 0,76 [0,29; 1,59] (min-0,11, max-4,90), а у хлопців -

3,05 [1,15; 4,07] (min-0,08, max-5,53); у період 15-30 днів - 2,45 [0,54; 5,50] (min-0,18, max-5,86) та 3,06 [1,02; 5,44] (min-0,18, max-7,31) відповідно. Проте у період з 31 до 90 дня спостерігалось значне зростання середнього значення IgG до N SARS-CoV-2 у дівчат, яке становило 7,52 [5,68; 9,48] (min-4,98, max-10,11), на відміну від хлопців, у яких відбулось зниження цього показника до рівня 1,40 [1,14; 1,46] (min-0,88, max-1,52), ($p < 0,05$) (Рис. 3). У доступних літературних даних описано позитивні результати IgG до трьох місяців постінфекційного процесу [15].

При тяжких формах хвороби IgG до N SARS-CoV-2 з'являються швидко та на першому тижні хвороби є вищими, ніж IgG до S SARS-CoV-2. Обидва імуноглобуліни виявляються позитивними в терміні дослідження до шести місяців, при виключенні можливості вторинного інфікування. Результати наших досліджень співпадають з даними Jacobsen EM та ін. та Maniu I та ін., демонструючи те, що імунна відповідь у дітей зберігається протягом 6-12 місяців, але динамічно змінюється в якості з прогресуючою нейтралізацією, широтою та дозріванням пам'яті [6,11]. У ді-

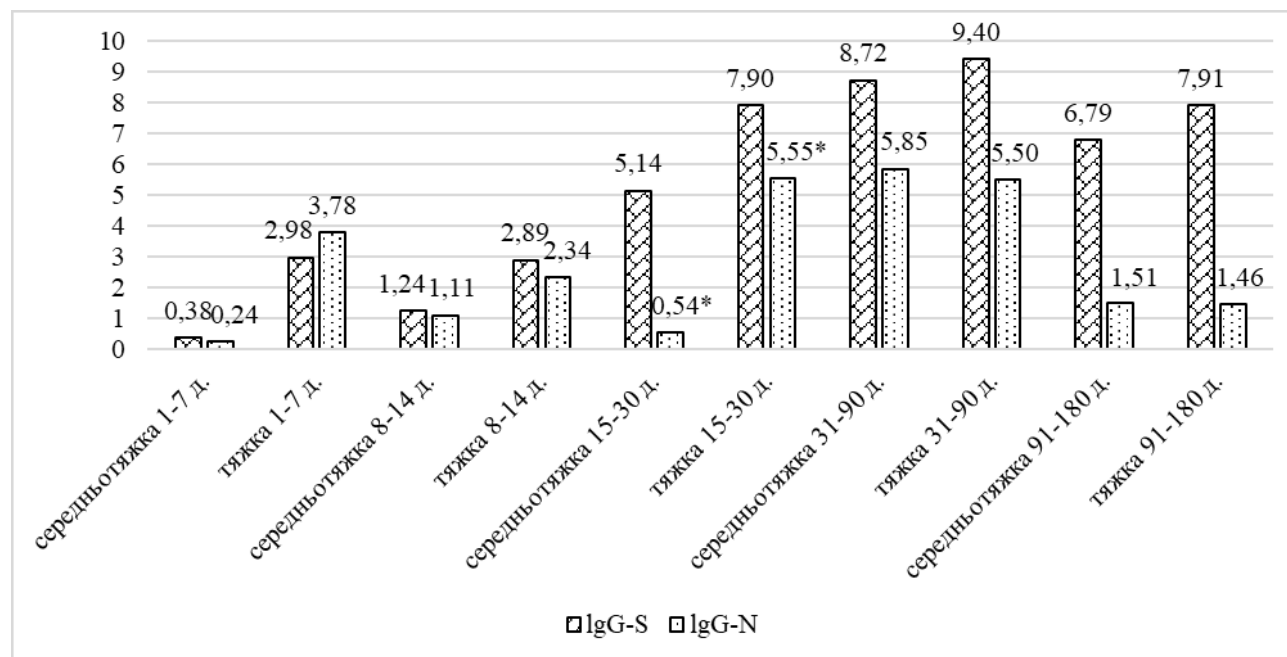


Рис. 2

Середні значення IgG-S та IgG-N до SARS-CoV-2 у різні періоди інфекційного процесу залежно від тяжкості перебігу хвороби

* - різниця достовірна між середньотяжким та тяжким перебігом хвороби щодо IgG-N ($p < 0,05$)

тей виявлено менший спектр анти-SARS-CoV-2-специфічні антитіла, переважно генеруючі IgG, специфічні для S-білка, але не для N-білка [10].

За результатами наших досліджень IgG до S SARS-CoV-2 відповідно до тяжкості перебігу COVID-19 виявлено, що у дітей з цією недугою, як при тяжких, так і при середньо-тяжких її формах, спостерігалось постійне зростання його серединного значення до трьох місяців дослідного періоду. Однак, найвище серединне значення 9,40 [7,80; 10,60] (min-6,20, max-11,80) IgG до S SARS-CoV-2 виявлено у пацієнтів з тяжкою формою хвороби в період з 31 до 90 дня дослідження, тоді як у дітей із середньотяжкою формою цей показник був на рівні 8,72 [8,64; 8,97] (min-0,18, max-9,32). При тяжких формах хвороби у період дослідження від трьох місяців до шести місяців серединне значення IgG до S SARS-CoV-2 становило 7,91 [7,90; 8,97] (min-6,98, max-9,88) і було незначно вищим ($p>0,05$), ніж у пацієнтів зі середньо-тяжким перебігом хвороби - 6,79 [6,11; 8,49] (min-0,88, max-9,15) у цей же період (Рис. 2).

Провівши порівняння IgG до S SARS-CoV-2 за статтю, нами виявлено, що середин-

ні значення IgG до S SARS-CoV-2 були позитивними впродовж дослідного періоду як в хлопців, так і в дівчат, причому у більшості періодів (окрім останнього) із незначно вищими значеннями у дівчат, ніж у хлопців ($p>0,05$). При його постійному зростанні в усіх пацієнтів виявлено, що найвищим цей показник був у терміні з 31 по 90 день у дівчат - 9,32 [8,72; 9,40] (min-8,64, max-11,80), проти 6,20 [3,19; 7,59] (min-0,18, max-8,97) - у хлопців в цей же період. Проте у хлопців він утримувався достатньо високим до кінця періоду спостереження (більше 3 місяців) у значенні 8,25 [7,95; 8,57] (min-1,70, max-9,88) (Рис. 3). Аналіз розподілу за віком рівнів IgG N та IgG S до S SARS-CoV-2 показав, що найвищі показники серединного значення обох імуноглобулінів були виявлені у віковій групі дітей 10-17 років з 31 по 90 день: 9,32 [7,76; 10,56] (min-6,20, max-11,80) IgG S та 5,85 [4,98; 9,30] (min-1,52, max-10,11) IgG-N до SARS-CoV-2. Дослідження рівнів IgG N та IgG S показали тривалу наявність їх у пацієнтів різних вікових груп з різним перебігом хвороби. Так, у терміні з 91 по 180 день у дітей віком від одного до п'яти років серединне значення IgG-S становило 8,53 [7,81; 9,01] (min-6,98, max-

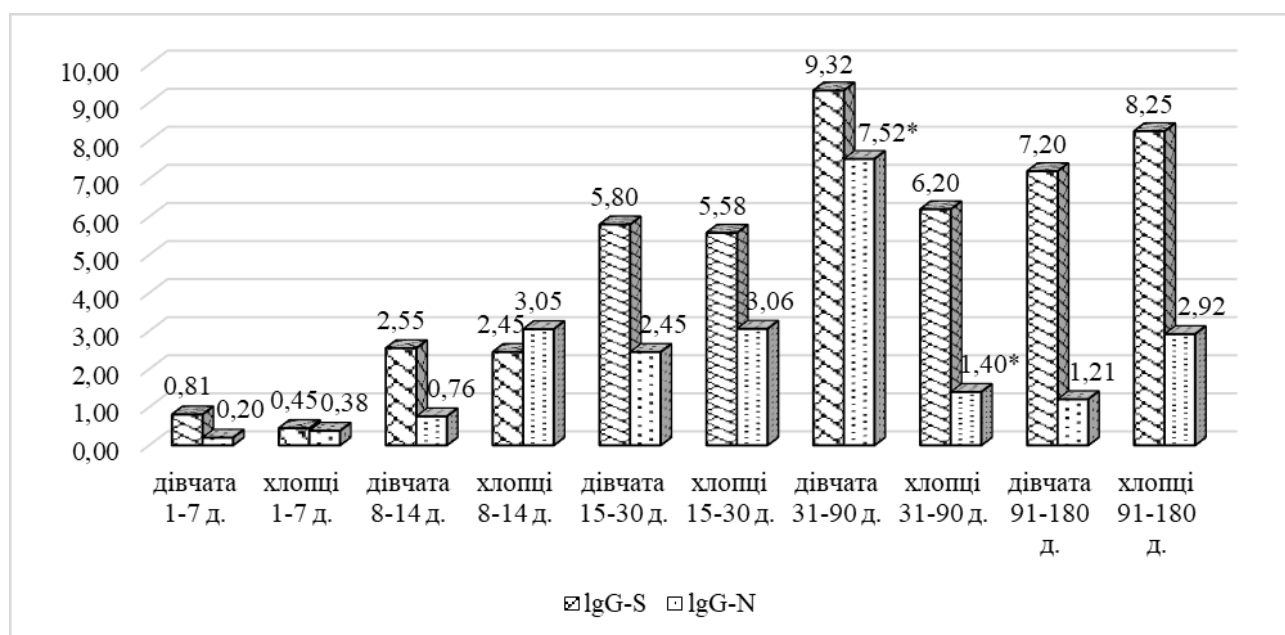


Рис. 3

Серединні значення IgG-S та IgG-N до SARS-CoV-2 у різні періоди інфекційного процесу залежно від статі

* - різниця достовірна між показниками IgG-N з 31 по 90 день у дівчат та хлопців ($p<0,05$)

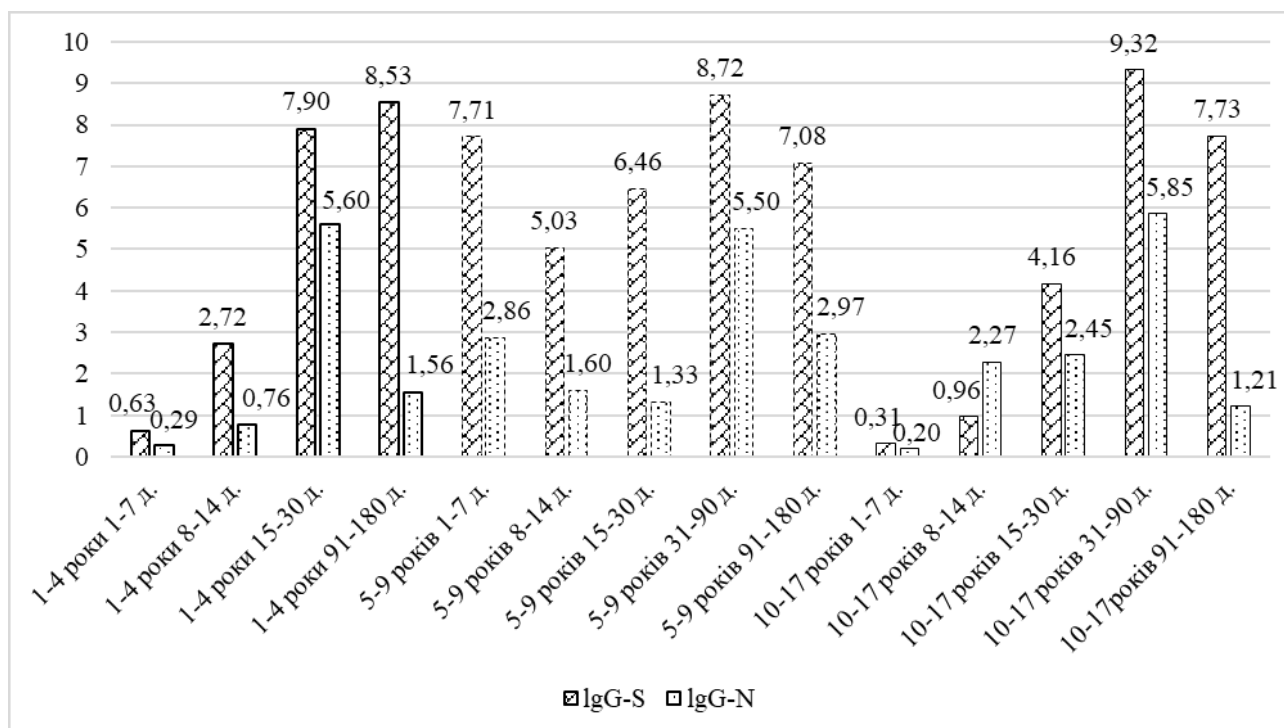


Рис. 4

Серединні значення IgG-S та IgG-N до SARS-CoV-2 у різні періоди інфекційного процесу у дітей трьох вікових груп

9,14), IgG N - 1,56 [1,01; 4,32] (min-0,20, max-6,06); у дітей 5-9 років відповідно 7,08 [6,20; 8,31] (min-5,91, max-9,14) та 2,97 [1,24; 4,29] (min-0,59, max-6,06); у дітей 10-17 років 7,73 [6,57; 8,51] (min-0,88, max-9,88) та 1,21 [0,47; 4,51] (min-0,12, max-12,21) відповідно (Рис. 4).

Іноземними науковцями досліджено, що при легких формах SARS-CoV-2 IgA та IgM з'являються з другого тижня захворювання і їхня наявність є нетривалою. На противагу у пацієнтів з тяжким перебігом хвороби як IgA, так IgM з'являються швидше, проте триваліше виявляються IgG [12].

Ретельне попереднє вивчення кінетики різних ізотипів антитіл до SARS-CoV-2 стане запорукою доцільного використання результатів для діагностики, лікування та профілактики хвороби [7].

Висновки

1. Серологічні дослідження дозволяють вивчати імунну відповідь на SARS-CoV-2, визначити сероконверсію та характеризувати перебіг COVID-19 і є важливими для епідеміологічних досліджень.
2. Найвищий рівень IgM до SARS-CoV-2 ді-

агностовано у пацієнтів з тяжким перебігом з 15 до 30 дня хвороби із серединним значенням 4,42 [2,08; 6,38], який значно знижується після 90 дня від початку захворювання.

3. IgA до SARS-CoV-2 вищі референтних значень з'являються з другого тижня хвороби у пацієнтів з тяжкою формою хвороби, тоді як у пацієнтів з середньотяжкою формою захворювання рівень цих імуноглобулінів не перевищує норми. На першому тижні хвороби IgA до SARS-CoV-2 негативний у пацієнтів як з середньотяжким, так і з тяжким перебігом хвороби ($p < 0,05$). Серединне значення IgA до SARS-CoV-2 у віковій групі 10-17 років на 15-30 день хвороби було діагностичним на противагу негативному результату у дітей віком 5-9 років ($p > 0,05$).

4. Рання поява та тривала наявність IgG до N- та IgG до S-білка SARS-CoV-2 у крові спостерігається в усіх пацієнтів. Проте серединне значення IgG-S є вищим у всі періоди дослідження, з найвищим його показником 8,85 [8,03; 9,34] до трьох місяців постінфекційного процесу. Також серединне значення IgG-S є найвищим при тяжких формах у дівчат в період з 31 по 90 день.

KINETICS OF IGM, IGA, IGG TO SARS-COV-2 IN CHILDREN WITH COVID-19 IN LVIV REGION IN DIFFERENT PERIODS OF THE INFECTIOUS PROCESS DEPENDING ON THE SEVERITY OF THE COURSE AND AGE

Introduction

SARS-CoV-2 infection in children is characterized by a much milder course compared to adults. In the majority of cases, it is asymptomatic or characterized by clinical signs of acute respiratory infection [1,2]. One hypothesis for the milder course of COVID-19 in children is the protective effect of cross-reactive antibodies from other coronaviruses (HCoV), more commonly encountered in pediatric patients. Typically, children demonstrate lower viral loads associated with the low expression of ACE2, the coronavirus receptor [3]. However, the development of severe disease, complicated by pneumonia and ARDS, can occur in children as well [4]. The variability of COVID-19 indicates that individual immune response to SARS-CoV-2 may play a crucial role in determining the clinical course [5]. COVID-19 is diagnosed using both PCR for SARS-CoV-2 RNA from nasal and oropharyngeal swabs and the detection of IgM and IgA against S antigen and N protein in serum.

The results of studies on IgM, IgA, and IgG responses to SARS-CoV-2 in researchers are contradictory. Researchers from the University of Barcelona found higher levels of anti-S IgG and IgM in the serum and saliva of pediatric patients with mild or asymptomatic courses of the disease compared to children with a severe variant, suggesting a potentially better local immunity [3]. However, scientists from Romania found that IgM and IgG to SARS-CoV-2 in serum were higher in severe cases of the disease [6]. Therefore, for a comprehensive understanding of the immune response to COVID-19, further scientific research is needed, taking into account the clinical and epidemiological significance of serological studies, which depend on the antigens of SARS-CoV-2.

These serological analyses are essential for assessing susceptibility or resistance to subsequent reinfection and are also used for

screening donor blood in adults. The results of these studies can be utilized in the development of passive antibody therapy. The timing of investigations of relevant immunoglobulins is crucial for their interpretation and rational use. The study of the kinetics of IgM, IgA, and IgG is crucial for the diagnosis, understanding of the disease, its duration, treatment, the development of post-infection immunity, and disease prevention [7-9].

The nature of the immune response to SARS-CoV-2 in children with various clinical manifestations, ranging from asymptomatic to critically severe forms of COVID-19, requires further investigation. The generation of virus-specific antibodies that neutralize or block infectivity plays a crucial role in the development of protective immunity against various infections and the design of vaccines [10].

The study aims to analyze the kinetics of IgM, IgA, and IgG to SARS-CoV-2 in children based on age and the severity of COVID-19.

Materials and Methods

A prospective study was conducted involving 88 children with COVID-19 (SARS-CoV-2), treated at the "Lviv City Pediatric Clinical Hospital "OKHMATDYT" from 2020 to 2021. Their average age was 9.4 years (min - 1 year, max - 17.8 years). Within the study cohort, there were 36 individuals identified as male, constituting 40.91%, and 52 individuals identified as female, constituting 59.10%. Among the investigated individuals, 27 individuals (30.68%) resided in rural areas, while 61 children (69.32%) lived in urban settings. Three age groups were distinguished: the first group - aged one to five years (inclusive, 1-4 years); the second group - from five to ten years (inclusive, 5-9 years); the third group - from ten to eighteen years (inclusive, 10-17 years). Based on the severity of COVID-19, two groups were formed: moderate-severity group (61 children, 69.31%,

including 37 females (60.66%) and 24 males (39.34%) and severe-severity group (27 children, 30.68%, including 15 females (55.56%) and 12 males (44.44%).

All patients signed informed consent to participate in the study.

The diagnosis verification was based on clinical signs of acute respiratory infection with the detection of RNA SARS-CoV-2 and its fragments from nasal and oropharyngeal swabs using PCR with the CFX 96 Bio-Rad amplifier. To explore the humoral aspect of the immune response in children with SARS-CoV-2, antibodies of various classes were investigated. The levels of IgM, IgA, and IgG to S and N proteins of SARS-CoV-2 were analyzed in 380 serum samples using a qualitative method of indirect immunofluorescence assay (IFA) with the VITROTEST system (positivity index 1.1). IgA, IgM, and IgG to S and N proteins of SARS-CoV-2 in serum were studied at different periods of the infectious and post-infectious process: from days 1-7, 8-14, 15-30, 31-90, and 91-180. Levels of IgM to SARS-CoV-2 were studied at various stages of the infectious process in 102 serum samples from 79 patients. Repeat investigations of IgM to SARS-CoV-2 were conducted for 21 children. A third study was carried out for two patients.

IgA levels to SARS-CoV-2 were examined in 78 blood samples, with this indicator initially studied in 70 patients and repeated in seven patients, and the dynamic assessment of this indicator was conducted only for one patient.

The IgG-N (nucleocapsid) index to SARS-CoV-2 was studied in 101 blood samples throughout the research. The first determination of this immunoglobulin was performed for 50 patients, repeated for 44, and the third investigation was conducted for 7 children.

Statistical analysis of the obtained results was carried out using methods of variation statistics with the determination of medians and quartiles (Me [25%; 75% percentile], minimum (min), and maximum (max) values of the obtained indicators. Qualitative characteristics are presented as absolute and relative numbers

(%). Intergroup comparisons were made using the Pearson criterion (for relative indicators) and the Mann-Whitney criterion (for median values). The minimum level of significance in statistical data testing was set at $p < 0.05$.

Results and Discussion

The IgM to SARS-CoV-2 findings during the initial week of the illness showed a median value of this parameter at 0.24 [0.14; 1.39] (min-0.03, max-14.63). By the second week (8-14 days), there was a twofold increase in the IgM to SARS-CoV-2 level, reaching 0.49 [0.30; 2.87] (min-0.07, max-14.63).

The highest level of IgM for SARS-CoV-2 was observed in the period from 15 to 30 days after the onset of the disease, and it was 2.5 times higher than in the previous time interval, reaching 2.50 [0.56; 6.21] (min-0.07, max-12.66). The subsequent determination of IgM for SARS-CoV-2, conducted from day 31 to 90, showed a significant decrease in the median value of IgM for SARS-CoV-2 to 0.52 [0.19; 0.76], approaching the threshold reference value. In examined children after 3 months, the median value of IgM for SARS-CoV-2 was 0.05 [0.02; 0.09] (min-0.01, max-0.37), indicating the completion of the acute disease process.

The median IgA values for SARS-CoV-2 were 0.13 [0.10; 0.33] (min-0.05, max-3.93) during the initial week and 0.22 [0.14; 0.40] (min-0.08, max-2.22) in the second week. The highest median value of IgA for SARS-CoV-2, 0.33 [0.24; 1.00] (min-0.13, max-6.35), was detected from day 15 to 30. After 30 days of illness, the median value of IgA for SARS-CoV-2 was 0.24 [0.20; 0.28] (min-0.11, max-0.35). In the early specific humoral response to SARS-CoV-2, IgA antibody reactions dominate, significantly contributing to virus neutralization [10]. The presentation of IgA in serum can occur early, reaching its peak in the third week of illness [7] and decreasing by day 28 [5].

The level of IgG to N SARS-CoV-2 in the first week of illness was 0.24 [0.13; 3.58] (min-0.03, max-13.17). An increase in the median value of IgG to N SARS-CoV-2 was

observed from the second week of illness, reaching 1.13 [0.52; 3.17] (min-0.18, max-7.31) with its peak value of 5.68 [2.39; 8.86] (min-0.88, max-10.11) within the three months. Over six months, this indicator decreased by more than two times to the level of 1.46 [0.57; 4.51] (min-0.12, max-12.21) in 35 patients.

IgG to the S protein of SARS-CoV-2 plays a crucial role in protecting against potential reinfections (10). Throughout the study periods, median values of antibodies to the Spike protein increased, reaching their highest levels in the three months following the illness at 8.85 [8.03; 9.34] (min-0.18, max-11.80). After the third month, a slight tendency towards decrease was observed at 7.9 [6.54; 8.62] (min-0.88, max-9.88). The results of the study on all specific immunoglobulins to SARS-CoV-2 in patients' serum are presented in Figure 1.

In contrast to the median value of IgG-S, the IgG-N index was found to be three times lower, suggesting that in the infection process and its immune response, the S protein of SARS-CoV-2 plays a more critical role than the N protein, and antibodies to the S protein persist longer, providing more reliable specific protection. According to Weisberg SP et al., a significant negative correlation of anti-N IgG titers depending on age was observed, with

younger individuals having lower anti-N titers than older adults, and pediatric patients showing low anti-N titers across all age groups. IgG to the S protein of SARS-CoV-2 increased over time after the appearance of clinical symptoms in both children and adults [10]. Immune response in children persists for six months but dynamically changes, enhancing virus neutralization and influencing the duration of immune memory [11].

The results of the study on IgM values for SARS-CoV-2 based on the severity of the course showed that in the majority of hospitalized children, IgM values were positive from the first to the seventh day of illness. In children with severe SARS-CoV-2, the median value of IgM in serum during this period was 1.39 [1.36; 4.07] (min-0.11, max-14.63). Meanwhile, this indicator in children with a moderate course was lower than reference values and significantly lower than the severe form ($p < 0.05$), amounting to 0.22 [0.14; 0.58] (min-0.03, max-8.49).

Analyzing the results of IgM research on SARS-CoV-2 in children with moderate and severe COVID-19, it was found that from the 8th to the 14th day of illness, median IgM values to SARS-CoV-2 increase in children, amounting to 0.41 [0.27; 2.73] (min-0.073, max-12.66) and 2.77 [0.36; 3.23] (min-0.073, max-6.79), respectively ($p > 0.05$).

In a cohort study, Andrea Padoan et al.

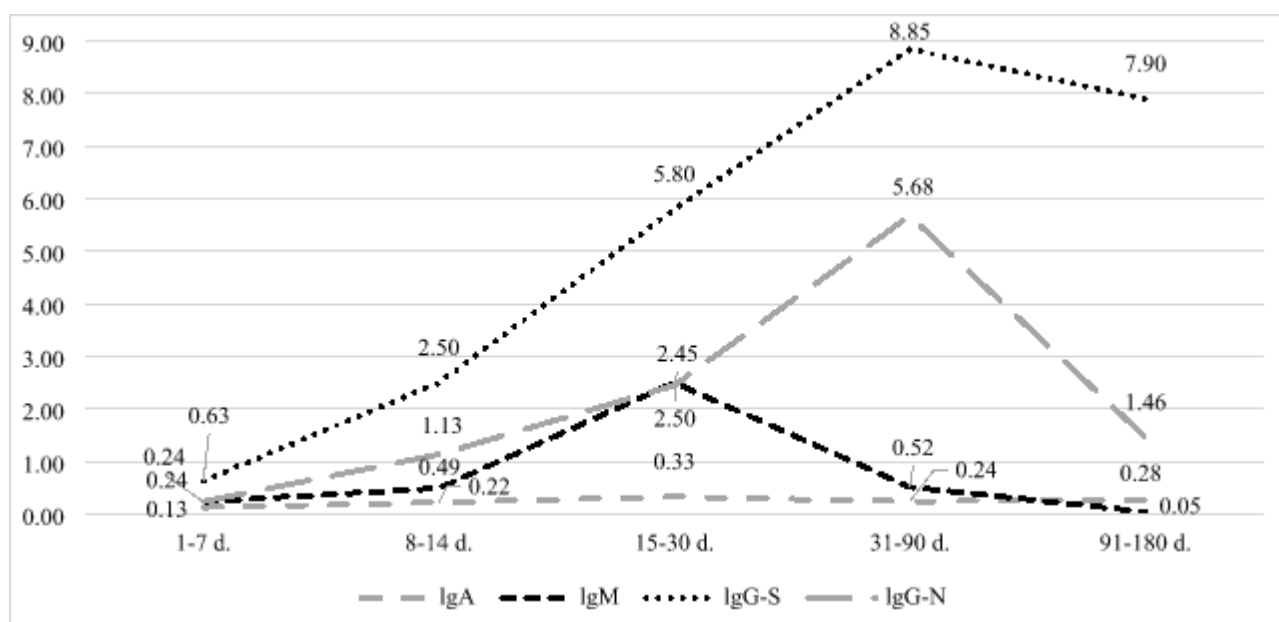


Fig. 1
 Median values of IgM, IgA, IgG-N, and IgG-S at different stages of the infection process

found that an increase in IgM and IgG against SARS-CoV-2 was detected in almost all patients by day 5 after symptom onset, with 88% of patients having the highest IgM levels and 100% having the highest IgG levels on day 12 of illness [12]. Similar results were obtained by researchers from Italy and Germany, revealing that anti-SARS-CoV-2 IgG and NAb were low within 7 days of onset but increased in 100% of patients by days 14-28 after symptom onset. IgM levels peaked on days 10-12 and significantly decreased by day 18 [7]. This pattern becomes evident during the third to fourth weeks following the initiation of hospitalization in participants of our study experiencing a severe form of the disease, with the median IgM value for SARS-CoV-2 recorded at 4.42 [2.08; 6.38] (min-0.18, max-12.66).

In patients from both cohorts (differing in disease severity), three months post-COVID-19, the median IgM value for SARS-CoV-2 was 0.09 [0.05; 0.09] (min-0.01, max-0.16) for the moderate group and 0.02 [0.02; 0.04] (min-0.02, max-0.37) for the severe form ($p>0.05$).

Analysis of the distribution of IgM levels by gender revealed that median IgM values for SARS-CoV-2, both in males and females, were positive during the first month of examination. Specifically, during the first week, the values were 0.26 [0.14; 0.95] (min-0.03, max-14.63) in females and 0.24 [0.15; 1.78] (min-0.07, max-4.31) in males ($p>0.05$).

By the second week, median IgM values to SARS-CoV-2 in males doubled, reaching 0.55 [0.35; 3.87] (min-0.087, max-14.63). The pattern of elevation in this parameter among males is noticeable until the 30th day of examination, peaking at 4.52 [2.08; 6.38] (min-0.21, max-6.48). Beyond the 30-day mark of the illness, the median IgM values for SARS-CoV-2 in males dropped below the reference values, registering at 0.67 [0.59; 0.75] (min-0.51, max-0.83).

In females, median IgM values to SARS-CoV-2 during different study periods were slightly lower than in males ($p>0.05$). However, they were positive from day 30 to 90 and ranged from 0.49 [0.20; 2.81] (8-14 days) to 2.02 [0.53; 5.11] (15-30

days). The generation of coronavirus-specific IgM is transient and results in a shift to IgA and IgG isotypes [13]. According to scientists, there were no gender differences in IgM levels to SARS-CoV-2 in both children and adults [10,14].

The study of IgA levels to SARS-CoV-2 in groups with different severity of disease in children showed that median values of this immunoglobulin in the first week of illness in patients with moderate and severe disease were lower than reference values, amounting to 0.11 [0.09; 0.17] (min-0.05, max-3.93) and 0.33 [0.28; 0.36] (min-0.09, max-0.52), respectively. The median value of this immunoglobulin from 15 to 30 days after the first clinical symptoms appeared in patients with a severe form was 1.48 [0.52; 1.82] (min-0.38, max-6.35), and its value in this period in patients with a moderate form was 6.17 times lower than in children with a severe form ($p<0.05$) and lower than reference values, amounting to 0.24 [0.16; 0.30] (min-0.13, max-0.33). In studies conducted in Zurich, patients with a severe course of COVID-19 demonstrated a significant increase in titers of SARS-CoV-2-specific serum IgA and IgG on days 12-14 after symptom onset. Systemic production of antibodies against SARS-CoV-2 mainly occurs in patients with a severe course of COVID-19, with very high titers of IgA observed in patients with acute respiratory distress syndrome, while mild illness may be associated with temporary production of SARS-CoV-2-specific antibodies, which can stimulate mucosal secretion of SARS-CoV-2-specific IgA [13]. From the second month to 90 days after the onset of the illness in patients of both groups, the level of IgA to SARS-CoV-2 remained negative.

Various investigations on the development of specific antibodies to SARS-CoV-2 have indicated the appearance of IgA around 10 days from the onset of initial symptoms, with an increase observed over three weeks, aligning with the outcomes of our research. In individuals with severe COVID-19, such as those studied by Cervia C. et al., serum titers of IgA and IgG specific to the SARS-CoV-2 S protein became positive in samples obtained on average 3-5 days

after symptom onset. These antibody responses showed a strong correlation with the duration of the illness but were independent of the patient's age and gender. Particularly high serum titers of S-protein-specific IgA, but not IgG, correlated with severe SARS-CoV-2 infection [6,7].

In our research, we found that in children of the older age group (10-17 years), the median value of IgA to SARS-CoV-2 between 15-30 days was 0.93 [0.33; 1.74] (min-0.26, max-6.35). Meanwhile, in children aged 5-9 years, the median IgA value to SARS-CoV-2 was 0.22 [0.14; 0.33] (min-0.13, max-0.52) ($p>0.05$). In other age groups and at different stages of the study, median IgA values for SARS-CoV-2 were lower than the reference values.

Gender distribution revealed that IgA titers to SARS-CoV-2 were diagnostic in both females and males during the period from 15 to 30 days, with values of 0.26 [0.18; 0.32] (min-0.13, max-6.35) and 1.00 [0.49; 1.57] (min-0.38, max-1.82), respectively ($p>0.05$). Our research results on IgA to SARS-CoV-2 demonstrated no gender dependence, consistent with findings from Swiss scientists.

Interesting results were obtained from the

investigation of IgG to N SARS-CoV-2 based on the severity of COVID-19. Median IgG values to N SARS-CoV-2 in patients with severe COVID-19 increased from the second week (8-14 days) and were 2.34 [0.33; 3.41] (min-0.11, max-4.92) up to three months, where it reached 5.50 [3.51; 7.40] (min-1.52, max-9.30).

In patients with moderate disease, median IgG values to N SARS-CoV-2 were not high: 1-7 days - 0.24 [0.12; 2.90] (min-0.03, max-8.37), 8-14 days - 1.11 [0.65; 1.82] (min-0.08, max-5.53), 15-30 days - 0.54 [0.21; 1.89] (min-0.18, max-3.90). However, from day 31 to 90, the median value was highest and amounted to 5.85 [3.19; 8.59] (min-0.88, max-10.11). The significant difference between the IgG values for moderate severity and severe forms was only on days 15-30 of the illness: 0.54 [0.21; 1.89] versus 5.55 [4.99; 5.80], respectively ($p<0.05$).

In patients with both moderate and severe forms of the disease, median IgG values to N SARS-CoV-2 were positive throughout the study period and even after recovery at three months: 1.51 [0.59; 3.44] (min-0.12, max-6.06) and 1.46 [0.47; 5.04] (min-0.19, max-12.21), respectively ($p>0.05$) (Figure 2).

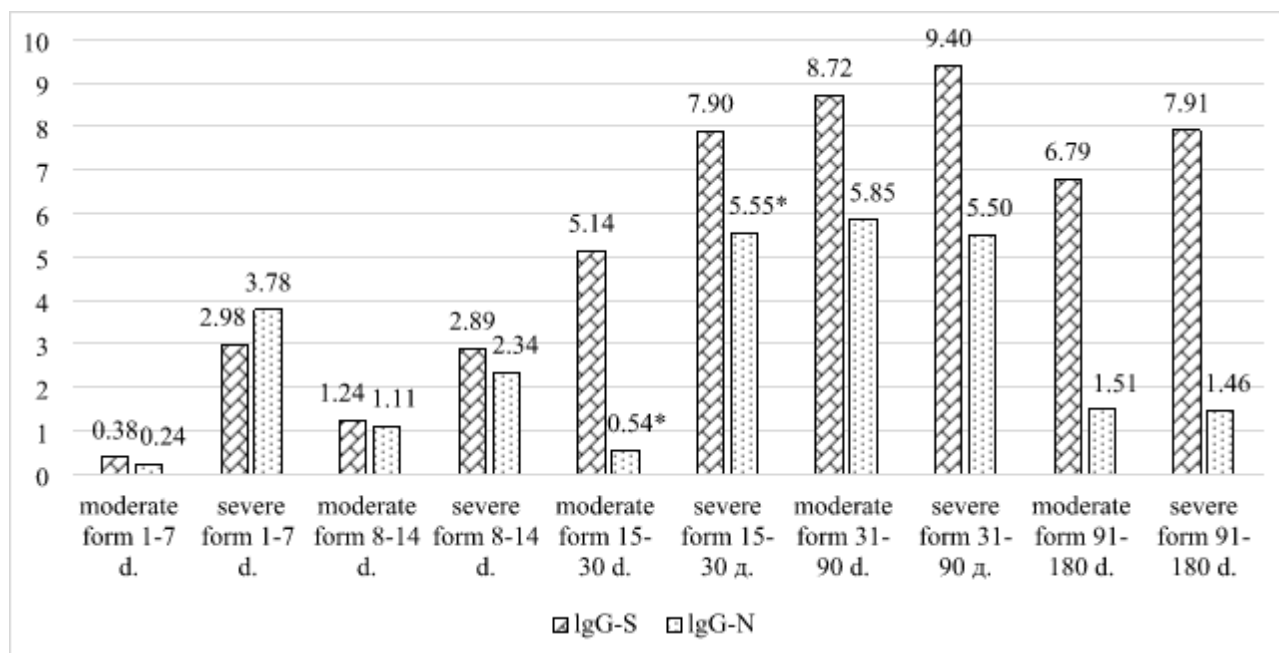


Fig. 2

Median values of IgG-S and IgG-N to SARS-CoV-2 at different stages of the infectious process depending on the severity of the disease

* - The difference is statistically significant between moderate and severe disease courses regarding IgG-N ($p<0.05$)

While investigating IgG against N SARS-CoV-2, certain gender-specific features were observed. In almost all (except one) study periods, the level of IgG against N was nonsignificantly ($p>0.05$) higher in males than in females. Specifically, the median value of IgG to N SARS-CoV-2 in the first week was 0.20 [0.14; 5.19] (min-0.08, max-13.17) in females compared to 0.38 [0.14; 1.92] (min-0.03, max-6.44) in males; in the second week of the study, in females, it was 0.76 [0.29; 1.59] (min-0.11, max-4.90), and in males, it was 3.05 [1.15; 4.07] (min-0.08, max-5.53); in 15-30 days, it was 2.45 [0.54; 5.50] (min-0.18, max-5.86) and 3.06 [1.02; 5.44] (min-0.18, max-7.31), respectively. However, in the period from 31 to 90 days, a significant increase in the median value of IgG to N SARS-CoV-2 was observed in females, reaching 7.52 [5.68; 9.48] (min-4.98, max-10.11), unlike in males, where this indicator decreased to the level of 1.40 [1.14; 1.46] (min-0.88, max-1.52) ($p<0.05$) (Figure 3). Positive results of IgG up to three months post-infection process have been described in available literature [15].

In severe forms of the disease, IgG to N SARS-CoV-2 appears quickly and in the first week of the disease is higher than IgG to S SARS-CoV-2. Both immunoglobulins remain positive during the study period of up to six months, excluding the possibility of secondary infection. Our research results align with the findings of Jacobsen EM et al. and Maniu I et al., demonstrating that the immune response in children persists for 6-12 months but dynamically changes in terms of progressing neutralization, breadth, and memory maturation [6,11]. Children were found to have a narrower spectrum of anti-SARS-CoV-2-specific antibodies, predominantly generating S-protein-specific IgG, not N-protein-specific [10].

According to the results of our study, IgG to S SARS-CoV-2, based on the severity of COVID-19, revealed that in children with this disease, both in severe and moderate forms, there was a continuous increase in its median value up to three months of the study period. However, the highest median value of 9.40 [7.80; 10.60]

(min-6.20, max-11.80) IgG to S SARS-CoV-2 was found in patients with a severe form of the disease from 31 to 90 days of the study, while in children with a moderate form, this indicator was at the level of 8.72 [8.64; 8.97] (min-0.18, max-9.32). In severe forms of the disease, during the study period from three to six months, the median value of IgG to S SARS-CoV-2 was 7.91 [7.90; 8.97] (min-6.98, max-9.88) and was slightly higher ($p>0.05$) than in patients with moderate disease - 6.79 [6.11; 8.49] (min-0.88, max-9.15) during the same period (Figure 2).

Comparing IgG to S SARS-CoV-2 by gender, we found that median values of IgG to S SARS-CoV-2 were positive throughout the study period in both males and females, with slightly higher values in females in most periods (except the last one) ($p>0.05$). With its continuous increase in all patients, it was found that the highest value was in females from 31 to 90 days - 9.32 [8.72; 9.40] (min-8.64, max-11.80), compared to 6.20 [3.19; 7.59] (min-0.18, max-8.97) in males during the same period. However, in males, it remained sufficiently high until the end of the observation period (more than 3 months) at 8.25 [7.95; 8.57] (min-1.70, max-9.88) (Figure 3).

An analysis of age-related distribution revealed that the highest median values of both IgG N and IgG S to SARS-CoV-2 were observed in the group of children aged 10-17 years from day 31 to day 90: 9.32 [7.76; 10.56] (min-6.20, max-11.80) for IgG S and 5.85 [4.98; 9.30] (min-1.52, max-10.11) for IgG-N to SARS-CoV-2. Studies of IgG N and IgG S levels demonstrated their long-term presence in patients of different age groups with different courses of the disease. Thus, in the period from 91 to 180 days in children aged one to five years, the median value of IgG-S was 8.53 [7.81; 9.01] (min-6.98, max-9.14), IgG N - 1.56 [1.01; 4.32] (min-0.20, max-6.06); in children aged 5-9 years, it was 7.08 [6.20; 8.31] (min-5.91, max-9.14) and 2.97 [1.24; 4.29] (min-0.59, max-6.06), respectively; in children aged 10-17 years - 7.73 [6.57; 8.51] (min-0.88, max-9.88) and 1.21 [0.47; 4.51] (min-0.12, max-12.21), respectively (Figure 4).

Foreign researchers have investigated

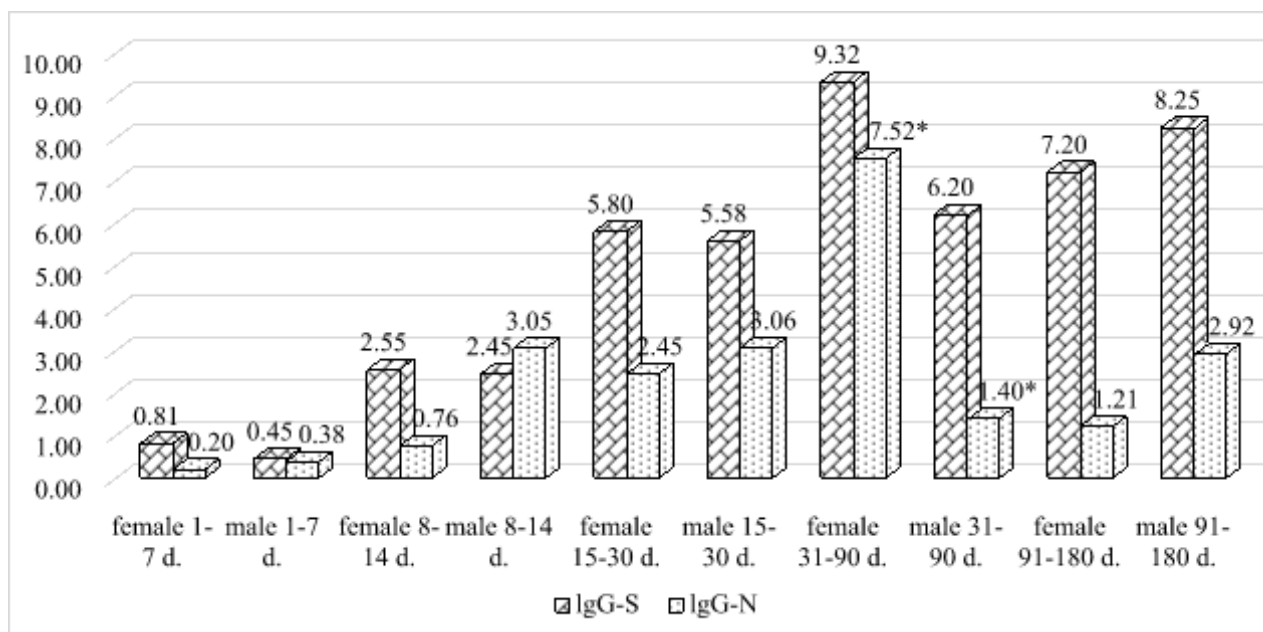


Fig. 3

Median values of IgG-S and IgG-N to SARS-CoV-2 at different stages of the infectious process based on gender
* - The difference is statistically significant between IgG-N indicators from 31 to 90 days in females and males ($p < 0.05$)

that in individuals with mild cases of SARS-CoV-2, IgA and IgM become detectable starting from the second week of the illness, and their presence is temporary. Conversely, in individuals experiencing a severe course of the disease, both IgA and IgM manifest earlier, yet IgG remains

detectable for an extended period [12].

A comprehensive preliminary examination of the kinetics of diverse antibody isotypes to SARS-CoV-2 will guarantee the meaningful application of findings in the diagnosis, treatment, and prevention of the disease [7].

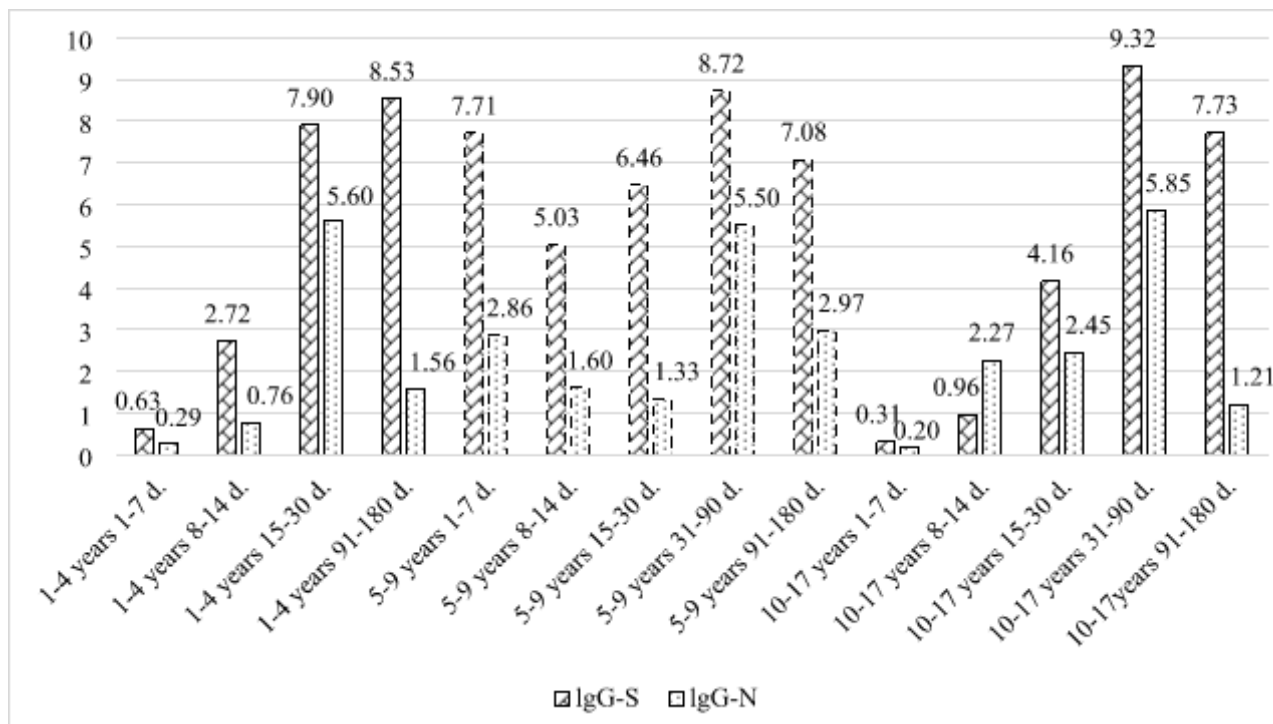


Fig. 4

Median values of IgG-S and IgG-N to SARS-CoV-2 at different stages of three age groups

Conclusions

1. Serological studies allow for the investigation of the immune response to SARS-CoV-2, identification of seroconversion, and characterization of the course of COVID-19, making them crucial for epidemiological research.
2. The highest level of IgM to SARS-CoV-2 was detected in patients with a severe course of the disease from 15 to 30 days, with a median value of 4.42 [2.08; 6.38], which significantly decreases after 90 days from the onset of illness.
3. IgA to SARS-CoV-2 exceeds reference values from the second week of the disease in patients with a severe form of the disease, while in patients with a moderate form of the disease, the level of these immunoglobulins does not exceed the norm. In the first week of the disease, IgA to SARS-CoV-2 is negative in patients with both moderate and severe forms of the disease ($p < 0.05$). The median value of IgA to SARS-CoV-2 in the age group of 10-17 years on days 15-30 of the disease was diagnostic, in contrast to a negative result in children aged 5-9 years ($p > 0.05$).
4. Early appearance and prolonged presence of IgG to N and IgG to S proteins of SARS-CoV-2 in the blood are observed in all patients. However, the median value of IgG-S is higher in all study periods, with its highest indicator being 8.85 [8.03; 9.34] up to three months post-infection. Additionally, the median value of IgG-S is highest in severe forms in females from 31 to 90 days.

References

1. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* [Internet]. 2020 Feb;395(10223):497-506. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673620301835>
2. Dong Y, Dong Y, Mo X, Hu Y, Qi X, Jiang F, et al. Epidemiology of COVID-19 among children in China. *Pediatrics*. 2020;145(6).
3. Dobano C, Alonso S, Vidal M, Jimenez A, Rubio R, Santano R, et al. Multiplex Antibody Analysis of IgM, IgA and IgG to SARS-CoV-2 in Saliva and Serum From Infected Children and Their Close Contacts. *Front Immunol* [Internet]. 2022 Jan 27;13(January):1-13. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.751705/full>
4. Chiotos K, Tamma PD, Goldman DL, Aldrich ML, Hagmann SHF, Camacho-gonzalez A, et al. Compassionate Use of Remdesivir in Children With Severe COVID-19 Time to Discharge by Baseline Oxygen Support. 2020;(July):11763.
5. Quinti I, Mortari EP, Fernandez Salinas A, Milito C, Carsetti R. IgA Antibodies and IgA Deficiency in SARS-CoV-2 Infection. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11(April):1-5.
6. Maniu I, Maniu GC, Antonescu E, Duica L, Grigore N, Totan M. SARS-CoV-2 Antibody Responses in Pediatric Patients: A Bibliometric Analysis. *Biomedicine*. 2023;11(5).
7. Padoan A, Sciacovelli L, Basso D, Negrini D, Zuin S, Cosma C, et al. IgA-Ab response to spike glycoprotein of SARS-CoV-2 in patients with COVID-19: A longitudinal study. *Clin Chim Acta*. 2020; 507: 164-6.
8. Panzeri Carlotti AP de C, de Carvalho WB, Johnston C, Rodriguez IS, Delgado AF. Covid-19 diagnostic and management protocol for pediatric patients. *Clinics*. 2020;75:1-5.
9. Becker M, Dulovic A, Junker D, Ruetalo N, Kaiser PD, Pinilla YT, et al. Immune response to SARS-CoV-2 variants of concern in vaccinated individuals. *Nat Commun* [Internet]. 2021;12(1):1-8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-021-23473-6>
10. Weisberg SP, Connors TJ, Zhu Y, Baldwin MR, Lin W-H, Wontakal S, et al. Distinct antibody responses to SARS-CoV-2 in children and adults across the COVID-19 clinical spectrum. *Nat Immunol* [Internet]. 2021 Jan 5;22(1):25-31. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41590-020-00826-9>
11. Jacobsen EM, Fabricius D, Class M, Topfstedt F, Lorenzetti R, Janowska I, et al. High antibody levels and reduced cellular response in children up to one year after SARS-CoV-2 infection. *Nat Commun*. 2022;13(1):1-16.
12. Padoan A, Padoan A, Cosma C, Sciacovelli L, Faggian D, Plebani M, et al. Analytical performances of a chemiluminescence immunoassay for SARS-CoV-2 IgM/IgG and antibody kinetics. *Clin Chem Lab Med*. 2020;58(7):1081-8.
13. Cervia C, Nilsson J, Zurbuchen Y, Valaperti A, Schreiner J, Wolfensberger A, et al. Systemic and mucosal antibody responses specific to SARS-CoV-2 during mild versus severe COVID-19. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2021 Feb;147(2):545-557.e9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091674920316237>
14. Ishaq SE, Abdulqadir SZ, khudhur ZO, Omar SA, Qadir MK, Awla H khdar, et al. Comparative study of SARS-CoV-2 antibody titers between male and female COVID-19 patients living in Kurdistan region of Iraq. *Gene Reports*. 2021;25(January).
15. Han MS, Um J, Lee EJ, Kim KM, Chang SH, Lee H, et al. Antibody Responses to SARS-CoV-2 in Children With COVID-19. *J Pediatric Infect Dis Soc*. 2022;11(6):267-73.