

## ДЕТЕКЦИЯ НА АНТИТЕЛА СРЕЩУ SARS-COV-2 – МЕТОДИ И ПОКАЗАНИЯ

Сашка Михайлова<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Факултет по обществено здраве и здравни грижи,  
Университет „Проф. д-р Асен Златаров“, бул. „Проф. Якимов“ 1, Бургас 8010, България

<sup>2</sup> СМДЛ „ЛИНА“, ЖК „Зорница“ 75, Бургас 8018, България  
e-mail: sashkam@yahoo.com

**Резюме:** Специфичните антитела са част от имунния отговор срещу SARS-CoV-2 и могат да бъдат открити в различни етапи на инфекцията. Серологичните диагностични тестове се използват за по-добро разбиране на честотата на COVID-19 и за оценка на имунния статус на популацията. Настоящият обзор разглежда основните лабораторни методи за детекция на антитела срещу SARS-CoV-2 и показанията за тяхното приложение.

**Ключови думи:** SARS-CoV-2, антитела, методи, показания

## DETECTION OF ANTIBODIES AGAINST SARS-COV-2 - METHODS AND INDICATIONS

Sashka Mihailova

<sup>1</sup> Faculty of public health and health care, Prof. Assen Zlatarov University,  
Address: 1 Prof. Yakimov str. 8010 Burgas, Bulgaria

<sup>2</sup> Medical Diagnostic Laboratory LINA, Zornitsa 75, Burgas 8018, Bulgaria  
e-mail: sashkam@yahoo.com

**Abstract:** The specific antibodies are part of the immune response to SARS-CoV-2 and can be detected during different stages of the infection. Serological diagnostic tests are being used to provide a better understanding of COVID-19 incidence and to assess immunity status of the population. This review discusses the main laboratory methods for detection of antibodies to SARS-CoV-2 and indications for their application.

**Keywords:** SARS-CoV-2, antibodies, methods, indications

### 1. Въведение

Коронавирусите са голямо семейство от вируси, които причиняват заболявания при животните и хората. Човешките коронавируси 229E, NL63, OC43 и HKU1 са идентифицирани за първи път през 60-те години на 20-ти век и хората по света често се заразяват с тях. Понякога коронавирусите, които инфектират животните, могат да преминат в хората и да причинят заболяване. Пример за това са човешките коронавируси, описани през 21-ви век: MERS-CoV, SARS-CoV и SARS-CoV-2 [15].

Настоящата пандемия се причинява от вирус с официално научно наименование SARS-CoV-2 (*Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*); а заболяването, което причинява, е COVID-19 (*Coronavirus disease 2019*) [5].

### 2. Диагностични подходи при COVID-19

Откриването на надеждни и достъпни диагностични методи е ключов момент при поява на нова инфекция в обществото. Лабораторните изследвания са опорна точка за

контрол на разпространението на заболяването. Машабно епидемиологично проучване в огнището на заразата в Китай отчита, че преди въвеждане на ограничителните мерки, делът на недокументираните случаи на COVID-19 е бил 86% [7]. Тъй като безсимптомните и леките форми на инфекцията играят важна роля в предаването и разпространението на вируса [1, 7], клиничните прояви не са надеждни като единствен диагностичен маркер в хода на пандемията. В лабораторните изследвания за коронавирусна инфекция има две основни направления – директно доказване на вируса в материали от дихателната система и установяване на имунен отговор на човешкия организъм чрез кръвни тестове. Златен стандарт за откриване на вируса е генетичният анализ чрез полимеразна верижна реакция в реално време (real-time PCR). При доказване на вирусна РНК в човешкия организъм, обаче, не се получава информация доколко гостоприемникът е неутрализиран SARS-CoV-2 и не се оценява имунния статус на макроорганизма [19]. Серологично базираните тестове за антитела могат да допълнят молекулярно базирани тестове и да обогатят диагностиката в различни аспекти.

### **Антигени на SARS-CoV-2**

SARS-CoV-2 съдържа четири структурни протеина: S протеин на шиповете (Spike), E протеин на обвивката (Envelope), M протеин на мембраната (Membrane) и N протеин на нуклеокапсида (Nucleocapsid). S протеинът играе решаваща роля за предизвикване на имунен отговор по време на развитието на заболяването.

SARS-CoV-2 навлиза в клетките на гостоприемника чрез рецептор на повърхността им – ангиотензин-конвертиращ ензим 2 (Angiotensin-converting enzyme 2, ACE2). S протеинът, който е изграден от две субединици – S1 и S2, е необходим за този процес. Субединица S1 съдържа рецептор свързващ домен (Receptor binding domain, RBD), който е отговорен за разпознаване и свързване с ACE2 на клетъчната повърхност. Субединица S2 съдържа други основни елементи, необходими за сливане с клетъчната мембрана.

Освен S протеина, други протеини като N протеин, M протеин, неструктурни протеини и допълнителни протеини, могат да имат потенциал на антигени [3].

### **Методи за детекция на антитела срещу SARS-CoV-2**

Антителата срещу SARS-CoV-2 могат да бъдат разделени в две групи: свързващи и неутрализиращи [17, 23].

- **Методи за откриване на свързващи антитела**

Тестовете за откриване на свързващи антитела използват пречистени протеини на SARS-CoV-2, а не живи вируси, и затова могат да се извършват в лаборатории с по-ниско ниво на биологична безопасност (напр. Biological safety level 2, BSL-2). В тази категория влизат бързите, ELISA и CLIA тестове.

**Бързите имунохроматографски тестове** откриват IgM и/или IgG в серум, плазма или пълна кръв. Предимство на някои от тестовете, използващи пълна кръв, е че могат да се извършват с проби, получени чрез убождане на пръста, а не чрез венепункция. Бързите тестове са лесни за изпълнение и дават резултат в рамките на 10-15 минути.

**Методите ELISA** (ензимно-свързан имуносорбентен анализ) и **CLIA** (хемилуминесцентен имуноанализ) се използват за откриване на антитела от класове IgM, IgG и IgA поотделно или в комбинация. Тези анализи изискват обучен лабораторен персонал и специализирана апаратура.

Разработени са и **заместващи тестове за неутрализация на вируси** (surrogate Virus neutralization tests, sVNT). Те са предназначени да открият потенциални неутрализиращи антитела, най-често такива, които предотвратяват взаимодействието на RBD с ACE2 рецептора. Понастоящем това са най-надеждните тестове за антитела за широка употреба.

- **Методи за откриване на неутрализиращи антитела**

Тестовите за неутрализация определят функционалната способност на антителата да предотвратяват инфекцията с вируса *in vitro*. Изследванията включват смесване на серум с жив вирус, последвано от инфекция на клетъчна линия и няколкодневна инкубация. Тестването изисква лаборатории BSL-3 или BSL-2.

Златен стандарт за откриване на неутрализиращи антитела е т. нар. **тест за неутрализация с редукция на плаките** (Plaque reduction neutralization test, PRNT), при който се използва SARS-CoV-2 вирус от клиничен изолат. Това тестване изисква лаборатории BSL-3 и отнема до 5 дни.

**Тестовите за неутрализация на псевдовирус** (pseudovirus neutralization test, pVNT) използват рекомбинантни псевдовируси (напр. *Vesicular stomatitis virus*, VSV), които включват S протеина на SARS-CoV-2. Това тестване може да се извърши в лаборатории BSL-2.

### **3. Динамика на образуване на антитела при COVID-19**

Повечето хора, заразени със SARS-CoV-2, показват антителен отговор между 10-ти и 21-ви ден от инфектирането. При леките форми на заболяването детекцията на антитела може да изисква повече време ( $\geq 4$  седмици), а в малък брой случаи изобщо не се откриват антитела. Въз основа на наличните данни, IgM и IgG антителата срещу SARS-CoV-2 се развиват между 6 и 15 дни от началото на заболяването [8, 9, 12, 18, 20, 22, 25]. Средното време за сероконверсия на общите, IgM и IgG антитела е съответно 11-ти, 12-ти и 14-ти ден от появата на симптоми. Наличието на антитела се открива при  $< 40\%$  от пациентите в рамките на първата седмица и бързо се увеличава до  $100\%$  (общи антитела),  $94,3\%$  (IgM) и  $79,8\%$  (IgG) на 15-ти ден от началото на заболяването [25].

Продължителността на отговора на антителата все още е неуточнена, но е известно, че антителата към други коронавируси намаляват с времето (диапазон: 12-52 седмици от появата на симптомите) и са доказани повторни инфекции [6]. Нивата на SARS-CoV-2 IgM и IgG антитела могат да останат в продължение на 7 седмици [6] или поне в  $80\%$  от случаите до ден 49 [24]. За сравнение е доказано, че  $90\%$  и  $50\%$  от инфектираните със SARS-CoV-1 пациенти поддържат IgG антитела съответно за две и три години [21]. Вероятно от значение ще бъде и търсенето на назални IgA антитела, тъй като след инфекция със сезонен коронавирус 229E серумните IgA антитела не са били повишени, но IgA в носната лигавица се запазили една година [2].

### **4. Надеждност на серологични тестове**

Спешната необходимост от разработване на серологични диагностични тестове в отговор на COVID-19 пандемията ускори процеса на тяхната комерсиализация. Това налага независимо и достоверно оценяване на продуктите след появата им на пазара, за да се потвърдят претенциите на производителите за ефективност. Основните мерки за количествено определяне на резултатите от даден диагностичен тест са чувствителността и специфичността. Чувствителността е способността на теста да открие отговора на гостоприемника към инфекцията (в случая антитела), когато причинителят наистина присъства, докато специфичността е способността на теста да даде правилно отрицателен резултат, когато отговорът на гостоприемника отсъства [10].

### **5. Серопревалентност на специфични за SARS-CoV-2 антитела**

Масщабни проучвания за серопревалентност се прилагат, за да се получи по-точна оценка на случаите с положителни, специфични за SARS-CoV-2 антитела, независимо от симптомите на заболяването. Тези проучвания са необходими, за да се установи състоянието на имунитета във връзка с политическите решения за пълн или частичен локдаун. През април 2020 г. в Лос Анджелис разпространението на антителата срещу SARS-CoV-2 в общността е оценено на  $4,65\%$ , еквивалентно на 367000 възрастни, което

е значително повече от 8430 потвърдени случая в същото населено място по време на проучването [14]. Към 2 май 2020 г. в Ню Йорк 19,9% от населението има антитела срещу SARS-CoV-2, в сравнение с 2,1% потвърдени случаи към същия период [11]. Подобни проучвания в Германия, Великобритания, Сингапур и Китай показват значително по-високи оценки на положителни случаи на антитела срещу SARS-CoV-2 в сравнение с клинично проявените инфекции, потвърдени с молекулярни тестове [13]. Тъй като безсимптомните индивиди и тези с леки форми могат да предадат вируса, не е изненадващо, че страни (напр. Южна Корея, Германия и Сингапур) с широкомащабни и добре организирани програми за тестване, съчетани с обширна изолация и проследяване на контактите лица, са постигнали успех в свеждането до минимум на смъртността, свързана с COVID-19 [4].

## **6. Показания за серологично изследване**

1. За диагностика при лица със симптоми, предполагащи COVID-19, когато директното изследване (за антиген или РНК) не е успяло да открие SARS-CoV-2, особено при пациенти, които се представят две седмици или повече след появата на симптоми (когато тестването за антитела става по-надеждно).

2. За проследяване на качеството и продължителността на имунния отговор при пациенти с предварително потвърдено заболяване COVID-19, дефиниране на времето за сероконверсия и корелация на титрите на антителата с клиничната картина и тежестта на заболяването.

3. За скрининг или наблюдение на безсимптомни пациенти с цел определяне на разпространението на COVID-19 сред населението.

4. За идентифициране на подходящи реконвалесцентни серумни донори.

5. За оценка на имуногенността на ваксината и идентифициране на защитените индивиди [16].

## **Библиография**

1. Bai, Y., L. Yao, T. Wei, et al. Presumed asymptomatic carrier transmission of COVID-19. *JAMA*, 323(14), 2020, 1406-1407.
2. Callow, K.A., H.F. Parry, M. Sergeant, D.A. Tyrrell. The time course of the immune response to experimental coronavirus infection of man. *Epidemiol. Infect.*, 105(2), 1990, 435-446.
3. Chen, Y., Q. Liu, D. Guo. Emerging coronaviruses: genome structure, replication, and pathogenesis. *J. Med. Virol.*, 92, 2020, 418-423.
4. Cohen, J., K. Kupferschmidt. Countries test tactics in 'war' against COVID-19. *Science*, 367, 2020, 1287-1288.
5. Gorbalenya, A.E., S.C. Baker, R.S. Baric, et al. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat. Microbiol.*, 2020.
6. Kellam, P., W. Barclay. The dynamics of humoral immune responses following SARS-CoV-2 infection and the potential for reinfection. *The Journal of general virology*, 2020, May 20.
7. Li, R., S. Pei, B. Chen, Y. Song, T. Zhang, W. Yang, J. Shaman. Substantial undocumented infection facilitates the rapid dissemination of novel coronavirus (SARS-CoV-2). *Science*, 368, 2020, 489-493.
8. Liu, W., L. Liu, G. Kou, Y. Zheng, Y. Ding, W. Ni, et al. Evaluation of nucleocapsid and spike protein-based ELISAs for detecting antibodies against SARS-CoV-2. *medRxiv*. 2020:2020.03.16.20035014.

9. Long, Q-X., H-J. Deng, J. Chen, J. Hu, B-Z. Liu, P. Liao, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in COVID-19 patients: the perspective application of serological tests in clinical practice. medRxiv. 2020:2020.03.18.20038018.
10. Mandrekar, J.N. Simple statistical measures for diagnostic accuracy assessment. *J. Thorac. Oncol.*, 5, 2010, 763-764.
11. New York State Governor Website. Available online: <https://www.governor.ny.gov/news/amid-ongoing-covid-19-pandemic-governor-cuomo-announces-results-completed-antibody-testing> (accessed on 22 February 2021).
12. Okba, N.M.A., M.A. Muller, W. Li, C. Wang, C.H. GeurtsvanKessel, V.M. Corman, et al. SARS-CoV-2 specific antibody responses in COVID-19 patients. medRxiv. 2020:2020.03.18.20038059.
13. Popovich, N., M. Sanger-Katz. The world is still far from herd immunity for Coronavirus. Available online: <https://www.nytimes.com/interactive/2020/05/28/upshot/coronavirus-herd-immunity.html> (accessed on 22 February 2021).
14. Sood, N., P. Simon, P. Ebner, D. Eichner, J. Reynolds, E. Bendavid, J. Bhattacharya, Seroprevalence of SARS-CoV-2-specific antibodies among adults in Los Angeles County, California, on April 10-11, 2020. *JAMA*, 2020.
15. Su, S., G. Wong, W. Shi, J. Liu, A.C.K. Lai, J. Zhou, W. Liu, Y. Bi, G.F. Gao. Epidemiology, genetic recombination, and pathogenesis of coronaviruses. *Trends Microbiol.*, 24(6), 2016, 490-502.
16. Theel, E.S., P. Slev, S. Wheeler, M.R. Couturier, S.J. Wong, K. Kadkhoda. *Journal of Clinical Microbiology*, 58 (8), 2020, e00797-20.
17. Vashist, S.K. In vitro diagnostic assays for COVID-19: Recent advances and emerging trends. *Diagnostics*, 10, 2020, 202.
18. Wan, W.Y., S.H. Lim, E.H. Seng. Cross-reaction of sera from COVID-19 patients with SARS-CoV assays. medRxiv. 2020:2020.03.17.20034454.
19. Winter, A.K., S.T. Hegde. The important role of serology for COVID-19 control. *Lancet Infect. Dis.*, 2020.
20. Woelfel, R., V.M. Corman, W. Guggemos, M. Seilmaier, S. Zange, M.A. Mueller, et al. Clinical presentation and virological assessment of hospitalized cases of coronavirus disease 2019 in a travel-associated transmission cluster. medRxiv. 2020:2020.03.05.20030502.
21. Wu, L-P., N-C. Wang, Y-H. Chang, X-Y. Tian, D-Y. Na, L-Y. Zhang, et al. Duration of antibody responses after severe acute respiratory syndrome. *Emerging infectious diseases*, 13(10), 2007, 1562-1564.
22. Xiao, A.T., C. Gao, S. Zhang. Profile of specific antibodies to SARS-CoV-2: The first report. *The Journal of infection*, 2020, Mar 21.
23. Yan, Y., L. Chang, L. Wang. Laboratory testing of SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2 (2019-nCoV): Current status, challenges, and countermeasures. *Rev. Med. Virol.*, 2020.
24. Zeng, H., C. Xu, J. Fan, Y. Tang, Q. Deng, W. Zhang, et al. Antibodies in infants born to mothers with COVID-19 pneumonia. *JAMA*, 2020.
25. Zhao, J., Q. Yuan, H. Wang, W. Liu, X. Liao, Y. Su, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. *Clinical Infectious Diseases*, 71(16), 2020, 2027-2034.