

doi: 10.3897/bgcardio.27.e64020

## СПЕЦИФИЧНА ДИАГНОСТИКА НА SARS-COV-2

*P. Аргирова, В. Колева*

*Клинична лаборатория, Аджибадем Сити Клиник, Токуда Болница и ДКЦ – София*

## SPECIFIC DIAGNOSIS OF SARS-COV-2

*R. Argirova, V. Koleva*

*Acibadem City Clinic Tokuda Hospital and Medical Center, Clinical Laboratory*

- Резюме.** Бързото и точно диагностициране на причинителя SARS-CoV-2 в условията на пандемията COVID-19 е изключително важно за контрола на инфекцията както сред асимптомните носители, така и сред заболелите. Диагностичните тестове позволяват идентификация на контактните лица, навременно започване на лечението, правят възможна оценката за прогресиране на заболяването. Тестовите имат отношение към важни за обществото решения за минимизиране на разпространението на инфекцията, особено при липса на специфична терапия и ваксини. В настоящия обзор обобщаваме данните за двете основни групи диагностични тестове – молекулярно-биологични и серологични – обект на постоянно развитие и усъвършенстване. Специално внимание се отделя на фактори, влияещи на тяхното изпълнение като вида на пробите, предназначението на отделните тестове и тяхната интерпретация.
- Ключови думи:** SARS-CoV-2, COVID-19, молекулярно-биологични тестове, серологични тестове, интерпретация на различните тестове, диагностика
- Адрес за кореспонденция:** проф. д-р Радка Аргирова, дмн, лекар вирусолог, e-mail: radkaargirova@abv.bg, GSM: 0884 993 295; д-р Веселина Колева, началник на Клинична лаборатория, e-mail: vessi\_koleva@yahoo.com, GSM: 0884 933 340; Клинична лаборатория, Аджибадем Сити Клиник, Токуда Болница и ДКЦ, 1407 София, бул. “Н. Й. Вапцаров” 51Б

- Abstract.** Rapid and precise diagnosis of the causative virus SARS-CoV-2 under COVID-19 pandemic conditions is essential for the control of infection in both asymptomatic viral carriers and individuals with signs of the disease. Diagnostic tests allow identification of contact persons, timely starting of treatment, possibilities for assessing progress of disease. They are the basis for important decisions aiming minimizing of the virus spread in the society, especially when effective therapy and appropriate vaccines are lacking. In this review, we summarize the two main groups of diagnostic tests – molecular and serologic ones – a subject of permanent evolving and improvement. Special attention is paid to different factors during performance of the tests as types of samples, intended use of every test and its correct interpretation.
- Key words:** SARS-CoV-2, COVID-19, molecular tests, serologic tests, test interpretation, diagnostic
- Address for correspondence:** Prof. Radka Argirova, DSci, e-mail: radkaargirova@abv.bg, GSM: +359 884 993 295. Dr. Med. Vesselina Koleva, Head of Clinical Laboratory, e-mail: vessi\_koleva@yahoo.com, GSM: +359 884 933 340, Acibadem City Clinic Tokuda Hospital and Medical Center, Clinical Laboratory, Bg – 1407 Sofia, 51B N. Vaptzarov Boul.

### ВЪВЕДЕНИЕ

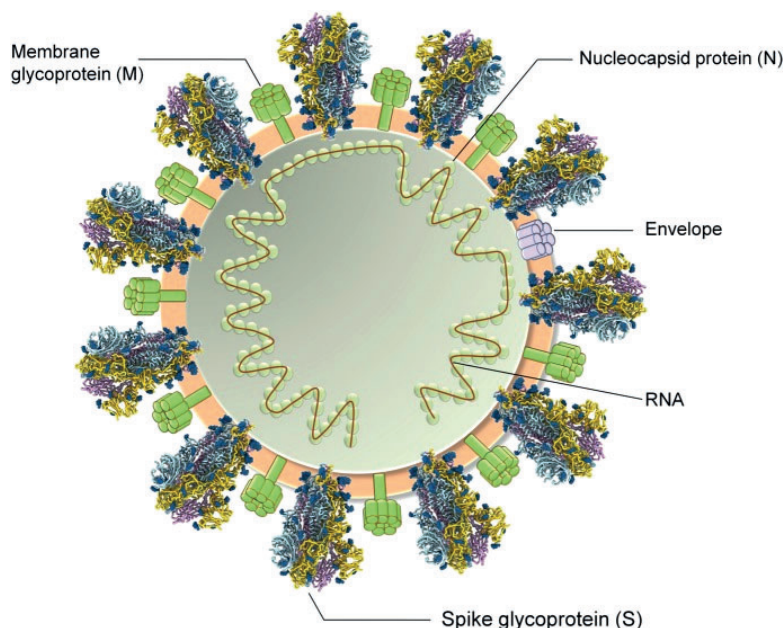
През декември 2019 г. Китай докладва ново бързо разпространяващо се заболяване в Ухан, провинция Хубей, обхванало над 216 страни и територии в света [1]. Изследванията бързо доказаха причинителя – нов РНК-съдържащ вирус от сем. Coronaviridae, наречен по-късно SARS-CoV-2, а болестта причинена от него – COVID-19.

Коронавирусите (CoV) са сферични вируси (фиг. 1), с големина около 150 nm, с обвивка, съдържащи позитивна несегментирана РНК и са широко разпространени сред хората и бозайниците [2]. Геномът им е най-големият сред РНК вирусите – с дължина 26-32 kb (фиг. 2). Две трети от геномната РНК кодира два припокриващи се полипротеина – ORF1a и ORF1b, сред които е вирусната полимераза – РНК-зависима-РНК-полимераза (RdRp) и

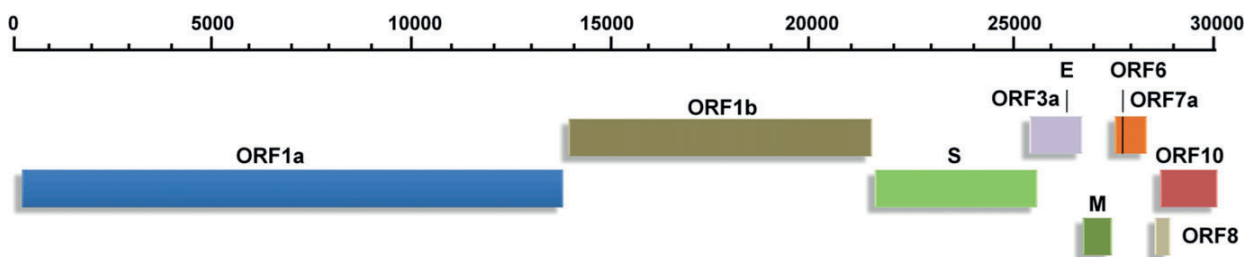
редица неструктурни протеини (Nsps), включени в синтеза на дъщерната вирусна РНК или имунния отговор [3]. Останалата една трета от генома кодира четири структурни белтъка – на шипчето – spike (S), на външната обвивка – повърхностен, envelope (E), мембранен (M) и нуклеокапсиден (N), както и други допълнителни (аксесорни) протеини (3a, 3b, р6, 7a, 7b, 8b, 9b, и ORF14). Филогенетичният анализ на генома показва, че SARS-CoV-2 има 80% и 50% идентичност на секвенциите си със SARS-CoV (причинителят на епидемията от ТОРС, 2003 г.) и с MERS-CoV (причинителят на Блискоизточния респираторен синдром, 2009 г.) – двата коронавируса, отговорни за предишните епидемии [4]. Освен това, SARS-CoV-2 показва повече от 90% сходство с важни ензими и структурни протеини, което говори за обща патогенеза, следователно и за общи терапевтични таргети с посочените вируси.

М- и Е-протеините са необходими за вирусната морфогенеза, сглобяването и пъпкуването. N-нуклеокапсидният протеин – свързва геномната РНК и

е включен в протектирането на генома, репликацията на РНК и сглобяването на вириона. S-гликопротеинът е голям трансмембранен фузионен вирусен протеин, който се състои от две субединици: S1 и S2. Разцепването на двете субединици – S1 и S2, е ензимно, осъществява се от протеазата фурин, на мястото на разцепването вирусът е придобил три O-свързани гликана, което има значение за вирусната инфекциозност и обхват на гостоприемниците. Както мястото на разцепване, така и трите O-свързани гликана са уникални за SARS-CoV-2 и не се откриват при други betacoronaviruses. S1-субединицата има отношение към прикрепянето на вируса към ACE-2 клетъчните рецептори. Тя обхваща NTD терминалния домейн, RBD (Receptor-Binding Domain), S1/SD2-субдомейни. S2-субединицата има отношение към осъществяване на фузионния процес с клетката и инфекциозността на вириона. В нейния състав влизат Fusion Peptide (FP), Heptat-повторите, трансмембраният домейн TD и цитоплазмената опашка СТ. От своя страна RBD домейнът има



**Фиг. 1.** Морфология на вириона на SARS-CoV-2. Вирионът има повърхностни протеини – проминиращ гликопротеин (S), който медира взаимодействието с повърхностния клетъчен рецептор ACE2. Вирусният мембранен гликопротеин (M) и повърхностният (E) се внедряват в двойната липидна мембрана (в жълтеникаво) с произход от клетката на хазяина. Под тази мембрана се намира нуклеокапсида (N), в който е и вирусната РНК [49]



**Фиг. 2.** Организация на генома на SARS-CoV-2 [49]

ключова роля в закрепянето на вируса към клетъчния рецептор и проникването му в клетката [5].

Заразените със SARS-CoV-2 могат да се представят с оплаквания като треска, суха кашлица, отпадналост, задух, хрема и други респираторни симптоми. Но пациентите може да са олигосимптомни или дори абсолютно безсимптомни. Дори и асимптомните пациенти обаче могат да пренасят SARS-CoV-2 чрез аерозолни капчици, с което имат съществен принос за бързото разпространение на инфекцията [6].

Своевременното и точно диагностициране на причинителя в условията на пандемия е изключително важно за контрола на инфекцията както сред асимптомните носители, така и сред заболелите, защото позволява идентификация на контактните и навременно започване на лечението [7]. Така епидемиолозите стигнаха бързо до масово тестване/скрининг, който обаче изисква често многократно изследване на едно и също лице, тъй като позволява да се постави навреме диагнозата, да се изолира болния, да се реши кога самият той е в безопасност и не предава инфекциозния агент. От своя страна, именно точната диагностика помага на здравните власти да вземат обосновано решение за затягане или разхлабване на рестрикционните мерки, а оттам – и за контрола на разпространението на вируса, особено без наличието на ваксина или специфична терапия<sup>1</sup>.

Диагностичните методи, които използваме днес, са два основни вида: молекулярно-биологични и серологични [8]. Различните диагностични тестове целят бърз отговор в борбата срещу пандемията, като всеки от тях има различна степен на чувствителност и специфичност и се базира на търсене на различни таргетни молекули във вируса или в организма като отговор на инфекцията [9]. Всеки диагностичен подход и тест има свои преимущества и недостатъци, различна трудност на изпълнение и интерпретация. „Златен стандарт“ за идентификацията на SARS-CoV-2 се счита количествената/качествената верижна полимеразна реакция (RT-qPCR, RT-PCR) [10, 11]. Но сравнително трудното ѝ изпълнение, необходимостта от обучен и опитен персонал, бавната процедура (90-120 min) и високата цена често налагат използването на няколко метода едновременно – например PCR и антигенен тест. Много изследвания пък търсят антитела в населението, което увеличава търсенето на тестове за определяне на различни класове антитела към SARS-CoV-2 [12]. Тук ще обобщим данните за при-

лаганите днес молекулярно-биологични и серологични методи.

## 1. МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧНИ МЕТОДИ

### 1.1. Верижна полимеразна реакция (RT-PCR)

Верижната полимеразна реакция (RT-PCR) е първи метод на избор за скриниране за SARS-CoV-2 и се отличава с висока чувствителност, сравнително бавно изпълнение (около 90-120 min), а може да се използва и за количествено определяне на вируса при наличие на количествени стандарти [13]. RT-PCR тестовете идентифицират SARS-CoV-2 в проби на симптомни и асимптомни пациенти чрез определяне на специфична вирусна РНК. RT-PCR тестовете включват три последователни стъпки: екстракция на вирусна РНК от пробите, обратна транскрипция чрез ензима обратна транскриптаза на вирусната РНК в едноверижна ДНК – сорудНА (сDNA) и амплификация (намножаване) на сDNA в присъствие на флуоресцентни оцветители, чрез които се определя (качествено или количествено) амплифицираната сDNA. Реакцията се използва успешно в различни изходни материали – слюнка, хръчка, бронхо-алвеоларен лаваж, трахеални, назофарингеални, орофарингеални секрети. Възможно е използването ѝ и в кръв (плазма или серум), урина, фецес – но в последните изброени материали РНК се открива в значително по-малко количество, поради което отрицателният резултат в такива проби е често труден за интерпретиране. Отделните производители на RT-PCR използват различни по брой и по вид вирусни таргети (гени или части от тях), така че търговските тестове се отличават по чувствителност, специфичност, стабилност, точност и време за изпълнението им [14]. Усъвършенстването на RT-PCR тестовете продължава не само по отношение на бързина, включване на нови таргетни молекули, но и във връзка със своевременното определяне на нововъзникващи мутанти [15]. Идеалният RT-PCR тест таргетира един силно консервативен регион и един специфичен регион от вирусния геном, за да се минимализират и най-малките генетични промени, които могат да настъпят в различни популации [16]. Особено важно е точното спазване на указанията на производителя за интерпретация на резултатите.

Тук искаме да се спрем на основните общоприети факти за динамиката на SARS-CoV-2 след заразяване и връзката на тези факти с използваните RT-PCR тестове (фиг. 3).

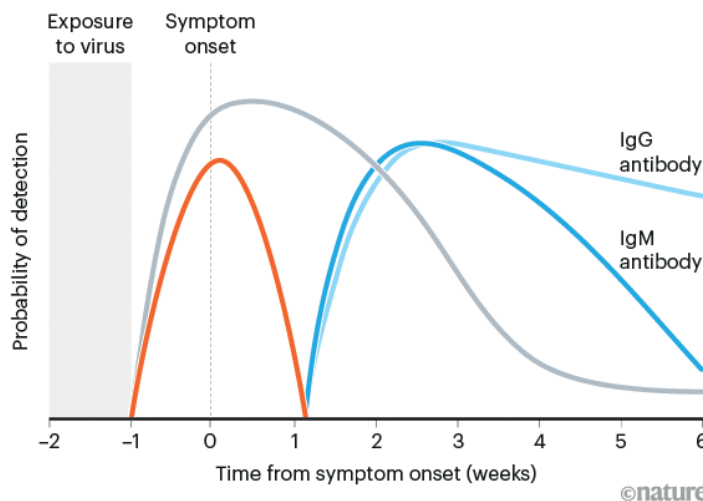
Вирусът се излъчва 5-6 дни преди първите симптоми на инфекцията, като това излъчване започва 3-4 дни след заразяването. Следователно 3-4 дни след заразяването вече RT-PCR е положителна, най-често без да се наблюдават симптоми.

<sup>1</sup>Към момента на подготовката на тази статия ваксината BNT162b2 – BioNTech се прилага едва от 1 месец след спешно приложена процедура за одобрение.

## CATCHING COVID-19

Different types of COVID-19 test can detect the presence of the SARS-CoV-2 virus or the body's response to infection. The probability of a positive result varies with each test before and after symptoms appear.

- **PCR-based tests** can detect small amounts of viral genetic material, so a test can be positive long after a person stops being infectious.
- **Rapid antigen tests** detect the presence of viral proteins and can return positive results when a person is most infectious.
- **Antibody tests** detect the body's immune response to the virus and are not effective at the earliest phase of infection.



**Фиг. 3.** Различни диагностични тестове, определящи SARS-CoV-2 или отговора на организма към него. PCR тестовете (сиво) остават позитивни дълго след като заразеният вече не е инфекциозен. Антигенните тестове (червено) определят вирусни протеини и са положителни, когато заразеният е най-инфекциозен. Тестовете за антитела (светло- и тъмносиньо) определят отговора на имунната система срещу вируса; те не се използват за ранна диагноза на инфекцията [50]

Скоро след RT-PCR се позитивира и антигенният тест – най-често 48 часа преди поява на симптоми и през първите 7 дни от клиничната манифестация на заболяването.

След началото на симптомите вирусният товар започва стремително да спада. Вирусът е определен чрез PCR средно 14-16 дни след началото на симптомите, но инфекциозността му намалява значително след 8-ия-9-ия ден от началото на симптомите. Тогава и антигенният тест става негативен. След този срок вирус вече не се изолира в клетъчна култура и вирусна субгеномна mРНК не се открива, т.е. на практика вирусът се открива само биохимично, но не е инфекциозен, не се изолира и не може да заразява и да се предава. За яснота, вирусна субгеномна mRNA се транскрибира само в заразени клетки, не се пакетира във вирионите и следователно наличието ѝ говори за присъствие на активно заразени клетки в изследваните проби [17].

Тези резултати се подкрепят и от съобщения за асимптомно и пресимптомно заразяване. Горните данни демонстрират, че положителен PCR след 8-ия-9-ия ден от началото на симптомите вече не говори за наличието на **инфекциозен** вирус. Това е и причината да бъде спряно изискването за два последователно негативни PCR резултата като критерий за изписване на болните с COVID-19.

Често в практиката се сблъскваме със ситуацията – негативен PCR при асимптомни пациенти – контактни на болни с COVID-19 или на доказано заразени със SARS-CoV-2.

Ето и няколко причини, потенциално водещи до фалшивонегативни резултати в PCR при асимптомни пациенти:

- Лошо пробовземане (в това число и използване на неподходящи консумативи), особено неправилно съхранение или транспортиране. **Обучавайте хората, които ще вземат проби!**
- Неадекватно време за пробовземането – твърде рано или твърде късно – PCR е **положителен до около 2,5 седмици (20-ина дни)** след началото на симптомите!
- Нисък вирусен товар – непосредствено след заразяването или след 2,5 седмици от началото на симптомите
- Инхибиране на амплификацията – ролята на вътрешните контроли, доказващи, че амплификацията не е инхибирана. Задължение на всяка молекулярна лаборатория и на специалистите, работещи в нея, е да осигурят системен вътрелaborаторен качествен контрол!
- Наличие на вирусни мутанти, особено в S-гена (но не само). Напоследък на пазара се появяват все повече PCR тестове, определящи 3 гена и ин-



терпретацията им често е трудна (мутанти?), особено ако един от гените не е експресиран.

По този повод бихме искали да споменем за т.нар. **нов „английски“ вирус**, при който се откриват многобройни мутации, най-вече в spike (S) протеина на вируса, но и в други геномни региони. Клъстерът се различава с 29 нуклеотидни замествания в сравнение с оригиналния вирусен геном в Wuhan, който е идентифициран и секвениран от F. Wu, S. Zhao, B. Yu и кол. [18], още в началото на 2020 г. Тъй като една от мутациите на „английския“ вариант е делеция в S-гена, тази промяна може да повлияе върху резултата при диагностични PCR анализи, които използват S-гена за таргетна молекула. Реагентите за PCR диагностичните тестове са проектирани въз основа на клинични проби, съдържащи пълния спектър на SARS-CoV-2 и съответно използват повече от 1 таргетна молекула. Така мутациите в spike протеина няма да доведат до фалшивонегативни резултати, защото обикновено той не се използва самостоятелно за откриване на вируса. Въпреки това European Centre for Prevention and Control (ECDC) и World Health Organization (WHO) препоръчват да бъдат прегледани и обновени реагентите и праймерите, които се използват за засичане на spike протеина и по-конкретно S-гена, за да се предотврати възможността за фалшивонегативни резултати. Склонният към мутации РНК геном на SARS-CoV-2 ни задължава да имаме на разположение минимум два различни RT-PCR кита, таргетиращи различни гени.

Засега няма данни, че новите мутации на вируса биха повлияли негативно на бързите антигенни тестове, тъй като повечето от предлаганите в търговската мрежа се основават на откриването на нуклеопротеина на SARS-CoV-2. Идентифицираните мутации ще повлияят единствено на онези антигенни тестове, които се основават на откриване на spike протеина.

В заключение, относно използването на PCR тестовете, може да се каже, че винаги водеща е клиниката, епидемиологичното проучване (пътуване в рискова зона, контакти с лица с доказан SARS-CoV-2 и др.), като един или повече негативни PCR резултата не изключват възможността за инфекция със SARS-CoV-2, особено ако пациентът е високосуспектен за COVID-19 – симптоми, СТ, доказани контакти.

Сега ще се спрем на фактори, потенциално водещи до фалшивонегативни резултати по RT-PCR в **СИМПТОМНИ** пациенти.

- Опитайте се да вземете нови проби от ниските отдели на респираторния тракт. При продуктивна кашлица хрчката е полезен материал.
- Проследете лицата, живеещи с пациента! При два наши случая с високосуспектни клинични симп-

томи и убедителна образна диагностика, но PCR негативни, 2 дни след приемането им в COVID отделения, техните контактни лица показаха PCR (+) резултати.

А сега за един особен, но често срещан случай. Става дума за позитивиране на RT-PCR за SARS-CoV-2 след 2 последователни отрицателни резултата. Това може да е фалшивопозитивен RT-PCR при удължено време за конверсия на РНК [19]. Среца се обикновено при пациенти с леко или средно тежко протичане. Времето за конверсия на РНК се определя от периода от началото на симптомите до първия негативен RT-PCR резултат. Това време обикновено е средно 20 дни и е по-кратко при млади пациенти – мъже (21 дни срещу 36 дни при пациенти до 73 г.). Някои пациенти демонстрират удължено време за конверсия на РНК, независимо от подобряването на състоянието си и/или на образната находка. Да си припомним, че практическите ръководства в началото на пандемията предлагат два последователно негативни резултата от RT-PCR като критерий за изписване (оздравяване) и често такива пациенти се приемаха втори път за лечение, но вече се счита, че това не е нито рецидив, нито втора инфекция.

*Кои характеристики на RT-PCR тестовете все още не знаем?*

Считаме, че е важно да измерваме предтестовата вероятност за заразеност – т.е. вероятността асимптомен пациент да бъде заразен. Това е важно, защото сме в условия на пандемия и искаме да потиснем и редуцираме разпространението на инфекцията. До голяма степен предтестовата вероятност за заразеност зависи от чувствителността на PCR теста. Но не всички RT-PCR тестове имат еднаква висока чувствителност. От друга страна, предтестовата вероятност за заразеност зависи и от наличието на симптоми, контакти, локалното разпространение на вируса и други причини. Следователно чувствителността на RT-PCR теста, когато се използва при асимптомни пациенти, е много важна не само като аналитичен показател, но и за епидемиологични и клинични цели. Така че днес все още не се правят изследвания, определящи предтестовата вероятност за заразеност в асимптомни пациенти.

## 1.2. LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification)

LAMP е молекулярно-биологичен тест, базиран на амплификация на ДНК и РНК с изключително висока чувствителност и специфичност, които се дължат на шест различни таргетни секвенции, идентифицирани едновременно от четири различни праймера [20, 21]. Допълнителен чифт “loop primers” ускорява реакцията. Количеството на получената ДНК при LAMP е значително повече в сравнение с

това при амплификацията чрез PCR. LAMP изотермалната амплификация се провежда при постоянна температура – напр. 60° C или 65° C за 20-30 минути и не е необходим термосайкълър, а само термоблок. Реакцията може да се види с просто око – цветът се променя от розово в оранжево-жълт, но е възможно и количествено колориметрично определяне на ампликоните. LAMP се счита като point-of-care тест поради факта, че резултатът се получава бързо и не се изискват специализирани инструменти и специално обучен персонал. От особен интерес е използването на слюнка като проба за LAMP тестовете. Чрез комбиниране на LAMP с термостабилен ензим и резистентна на соли обратна транскриптаза проби, съдържащи РНК, може да се използват направо като матрица.

Предлаганите днес LAMP китове за определяне на SARS-CoV-2 при сравнение с RT-PCR са показали 100% чувствителност и специфичност при използване на бронхоалвеоларен лаваж, но по-ниска чувствителност при използване на слюнка – 89.9% [22, 23]. Основната трудност при RT-LAMP е дизайнът на праймерите за специфичните секвенции и оптимизирането на условията на реакцията. Неточният дизайн на праймерите може да доведе до неспецифични амплификации, а оттам – и до неточни резултати. Например, фалшивоположителна амплификация може да е в резултат на хибридизация от праймерите на нетаргетна секвенция [24]. Прецизността на реакцията може да се повлияе и от възникнали мутанти в таргетния ген [22].

### 1.3. CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)

Това е молекулярен метод, използващ части от нуклеинови киселини, съдържащи къси, повтарящи се секвенции и ензими (Cas), досега използвани за редактиране (поправяне) на генома, известни като Cas9, Cas12, Cas13 [25]. Cas ефекторите могат да бъдат задействани за чувствително, бързо и специфично определяне на нуклеинови киселини [26]. Протеините Cas12 и Cas13 се насочват от CRISPR РНК (crRNA) към специфична секвенция на нуклеинова киселина, като едноверижната област на crRNA е комплементарна на таргета. Следователно функциите на Cas12 и Cas13 са различни: Cas12 таргетира едноверижна ДНК, а Cas13 – едноверижна РНК. Подобно на RT-LAMP, CRISPR assay може да се използва като point-of-care изследване за диагностика на SARS-CoV-2, тъй като CRISPR базираните тестове могат да използват директно първични клинични проби при минимум необходимо оборудване. Като възможни point-of-care изследвания RT-LAMP и CRISPR бързо ще се наложат в бъдеще като бързи и евтини, при това и за редица други вируси освен SARS-CoV-2.

## 2. СЕРОЛОГИЧНИ ТЕСТОВЕ

### 2.1. Антигенни тестове

В търсене на надеждна и бърза алтернатива на молекулярната диагностика на SARS CoV-2 напоследък се въведоха антигенни тестове като диагностично средство за откриване и ограничаване на разпространението на пандемията COVID-19 сред населението [27]. Най-общо казано, с помощта на моноклонални антитела антигенните тестове определят наличие на специфичен вирусен антиген, което означава вирусна инфекция в момента на изследването – в случая инфекция със SARS-CoV-2. Важно е, че този тест се провежда с назофарингеален или назален секрет, не изисква специализирана аналитична апаратура и висококвалифициран персонал, може да се извършва в линейката, в дома на пациента, в офиса и дава бърз резултат (обичайно отчитането е между 15-20 min). Редица изследвания сравняват антигенния тест с молекулярно-биологичния (PCR), като го намират по-слабо чувствителен от молекулярния [28, 29]. Изследване на Blairon et al. [30] е показало 22% фалшивонегативни резултати. Освен това, тъй като антигенните тестове имат по-ниска специфичност от RT-PCR тестовете в общности с ниска серопревалентност могат да се получат фалшивоотрицателни резултати. Следователно отрицателните резултати при бързите антигенни тестове не изключват възможността за реална инфекция със SARS-CoV-2. В същото време качеството им бързо се подобрява, поради което в редица страни, включително и у нас, антигенните тестове с висока чувствителност (препоръчва се над 90%) са приравнени към PCR и положителният резултат от тях се зачита в статистиката наравно с този от RT-PCR.

Антигенните тестове се препоръчват за лица, при които симптомите са започнали преди 5-7 дни, но не по-късно. В проби, взети 5-7 дни след началото на симптомите, резултатът пада под границата на определяне за теста и той се отчита като отрицателен. Бързият антигенен тест се препоръчва като point-of-care (POC) тест при симптоматични пациенти, контактни на COVID-19 лица, но не по-рано от 4-ти-7-и ден след контакта, както и в места с гъсто населени лица – старчески домове, мигрантски общежития, ученици. Обикновено антигенният тест не подлежи на потвърждаване с PCR. Единственият случай, когато се препоръчва потвърждаване с RT-PCR е при **негативен антигенен тест**, ако пациентът е симптоматичен или има явна експозиция с вируса. В идеалния случай, потвърдителен RT-PCR трябва да се извърши до не повече от 2 дни след теста за антиген. **Не се препоръчва прекратяването на изолацията на пациента да става с антигенен тест!**

## 2.2. Тестове за определяне на антитела

В резултат на вирусната инфекция се образуват антитела от различни класове и изотипове с различни мишени и специфичности. За разлика от други вирусни инфекции при SARS-CoV-2 появата на специфични антитела от класове IgM и IgG се наблюдава почти едновременно – най-рано са открити на 5-ия ден от началото на клиниката с медiana на сероконверсията между 10-ия и 13-ия ден за IgM и между 12-ия и 14-ия ден за IgG. Максимални концентрации на IgM антитела се доказват на 2-рата-3-тата седмица, за IgG – на 3-тата-6-ата седмица, а за общи антитела – на 2-рата седмица. Към настоящия момент няма достатъчни доказателства за препоръка дали да се изследват само IgG, IgM и IgG, или общи антитела [31]. Наблюдава се значима интериндивидуална вариация в концентрацията и хронологията на поява на различните класове антитела. Поради това установяването на IgM без IgG антитела е рядко и необичайно. Все още не е ясно и колко дълго след инфекцията се задържат откриваеми концентрации на антитела. Важно е да се отбележи също, че 3-5% от пациентите, преболели COVID-19 (особено такива с леко и умеренотезко протичане), не образуват антитела (поне не в концентрация, която може да бъде открита в кръвта). Затова липсата на положителен тест за антитела не изключва предходна инфекция [32, 33]. Има доказателства, че образуването на антитела корелира със значимо намаление на вирусния товар в респираторния тракт [34]. Това от своя страна предполага, че наличието на антитела би могло да е свързано с намаление на контагиозността на пациента и защитата му от реинфекция. Засега обаче няма ясни препоръки в каква степен и колко дълго пациентите с антитела (неутрализиращи или общи) са защитени от реинфекция със SARS-CoV-2, както и каква концентрация на антитела е необходима за осигуряване на такава протекция [35].

В създаването на тестове за доказване на антитела срещу SARS-CoV-2 се използват главно два антигенни таргета – spike (S) гликопротеин и нуклеокапсиден (N) фосфопротеин. Данни от скорошни публикации сочат, че приблизително 50% от антителата, които показват висока неутрализираща активност се свързват към RBD домейна на spike протеина. При акумулиране на мутации в генома на вируса и настъпили последващи структурни промени в RBD домейна тази активност се губи. Останалите приблизително 50% от неутрализиращите антитела показват афинитет към N-терминалния край на S1-протеина, извън региона на RBD домейна [36]. В разработването на тестове за количествено измерване на IgG антителата срещу spike протеина се използват като антигенен таргет или целия протеин (S1

+ S2), или части от него – обикновено S1 и/или RBD домейна. N-протеинът е най-силно експресираният имунодоминантен протеин, който си взаимодейства с РНК. Обичайно антителата, които се изграждат към N-антигена, са невируснеутрализиращи. Ненеутрализиращите антитела „познават“ вирусни епитопи, които не въздействат на инфекциозния вирус, т.е. не го унищожават, докато неутрализиращите антитела „познават“ вирусни епитопи, които елиминират или значително намаляват инфекциозния вирус. Именно последните антитела са критични за предотвратяване на реинфекцията и за създаване на траен имунитет. Както при всички вирусни инфекции, развитието на неутрализиращите антитела обикновено предхожда неутрализиращите [37].

Ограничения на серологичните тестове и предизвикателства [38]:

- повечето тестове не измерват неутрализиращите антитела, а са таргетирани към нуклеокапсидния антиген и следователно не дават надеждна информация относно развитието на имунна защита;

- някои от тестовете за антитела имат лоша клинична специфичност (дават кръстосана реактивност с други коронавируси), което означава, че се наблюдава висока степен на фалшивоположителни резултати [24].

- Както отбелязахме и по-рано, част от пациентите не образуват детектируеми антитела след коронавирусна инфекция. В други случаи е възможно концентрацията на антителата да намалее до степен да не се откриват. В допълнение, широкият времеви диапазон на появата и вариацията в хронологията на поява на класовете антитела не позволяват те да бъдат ползвани като диагностично средство за доказване на настояща инфекция. Затова при трудни за интерпретиране резултати от тестове за антитела, се препоръчват допълнително 2 независими теста, определящи антитела или използване на различни антигенни таргети или протоколи. С други думи, използването на 2 теста от различни видове може да увеличи цената на тестирането, но затова пък се постига ясен и категоричен резултат. Затова във всеки отделен случай според целта на изследването трябва внимателно да се прецизира какъв тест да се приложи.

### 2.2.1. Типове тестове за откриване на антитела

Различни типове тестове за откриване на антитела се използват за оценка на различни аспекти на имунния отговор и функционалността на антителата. Най-общо тестовете могат да се класифицират като такива, които откриват свързващите антитела, и такива, които откриват неутрализиращите антитела. Според антигенните таргети те детектират поотделно или в комбинация IgM, IgG, IgA в пълна

кръв, серум или плазма. Според принципа на използваната аналитична техника те биват:

- латерална имунохроматография (LFIA) – такива обичайно са бързите *point-of-care* тестове, които могат да се изпълнят с капка капилярна кръв, серум, плазма или слюнка). Тези тестове се използват широко, защото са бързи и евтини. Пробата мигрира чрез капилярнен ефект по протежение на нитроцелулозна мембрана, при което антителата от пробата се свързват с конюгата от антигени и колоидно злато и се образува цветна ивица на мястото на антиген–антитяло комплекса [39].

- ELISA (ензимносвързан имunosорбентен метод) – най-често това е методът, който се използва при разработване на нов тест и за научни цели. Съществува в различни формати – директна, компетитивна, сандвич и др. В контекста на пандемията COVID-19 методът се използва широко, защото резултатът се получава относително бързо, отчитането му може да се превърне в количествено, изпълнението е сравнително лесно и едновременно е възможно изследване на голям брой проби. Освен ELISA за определяне на IgA, IgM и IgG антитела, са разработени и китове за определяне на отделни вирусни антигени на SARS-CoV-2 (например за S- и N-вирусните протеини). Последните се използват само за научно-изследователски цели, но не и за целите на клиничната диагностика [40]. До неотдавна се считаеше за недостатък на тестовете на основата на ELISA метода, че той не може да измерва неутрализиращата активност [41]. Вече съществува обаче ELISA, имитираща взаимодействието „вирусен spike протеин – човешки клетъчен рецептор ACE2“, което може да бъде блокирано от неутрализиращи антитела [42]. Друг недостатък на метода (а всъщност и на всички серологични методи) е съществуването на кръстосана реактивност с други антитела [43]. Например антигените, използвани в ELISA за определяне на антитела към SARS-CoV-2, могат да реагират с антитела срещу други корона-вируси (HKU1, 229E, OC43 и NL63), за които е известно, че причиняват обикновени настинки [44]. Въпреки недостатъците и предизвикателствата ELISA предлага възможности като диагностична опция за контрол на епидемията и проследяване на нововъзникващи коронавируси.

- CLIA/ECLIA/CMIA (различни техники на индиректен имунохимичен анализ с хемилуминесцентен завършек, които се характеризират с много висока аналитична чувствителност и възпроизводимост). Това са аналитичните имунохимични методи, заложи в съвременните големи интегрирани аналитични системи. Те позволяват тестването на единични проби, пълно автоматизиране на анализа и намаляване на риска от грешка, постигането на

кратки срокове от вземане на пробите до рапортуване на готовите резултати – в рамките на минути до час, много добри аналитични характеристики като достоверност и възпроизводимост на тестовете и многократно по-висока аналитична чувствителност и специфичност спрямо ELISA тестовете [40]. CLIA има сериозен принос в разбирането на кинетиката на антитяловия отговор в хода на COVID-19 [45, 46]. Чрез тях е определена ретроспективно динамиката на IgM и IgG антителата при пациентите с COVID-19. Те показват, че количеството на IgM спада с времето, а концентрацията на IgG нараства. Друго изследване установи, че максималната концентрация на антителата е 73.6% на 16-ия–18-ия ден за IgM и 98.6% на 19-ия–21-вия ден след началото на симптомите за IgG [47].

През последните два месеца вече са налични IVD одобрени CE маркирани автоматични тестове на принципа на CLIA техниката, които позволяват количествено измерване на неутрализиращи антитела от клас IgG срещу spike протеина. Повечето от наличните тестове таргетират S1/RBD домейна, но се разработват и нови тримерни тестове, които да откриват целия спектър от вируснеутрализиращи антитела и да не се влияят от структурните промени в различни домейни като последица от мутации. На количествените тестове за определяне концентрацията на анти-spike IgG се възлагат надежди при изследването на ефективността на ваксините и проследяването на поствакциналния имунитет [48]. За момента обаче тестовете са метод-зависими (няма наличен международен калибрационен стандарт) и резултатите, получени с различни аналитични платформи, не могат да се сравняват.

- Тестове за определяне на процента на вируснеутрализиращи антитела в клетъчни култури – такива тестове са plaque-reduction neutralization test (PRNT), които използват SARS-CoV-2 вирус от клиничен изолат или рекомбинантен SARS-CoV-2 вирус. Тези методи изискват лаборатории с високо ниво на биозащита и не са приложими за рутинна практика. Друг недостатък е продължителността на анализа – обикновено са нужни около 5 дни за получаване на резултата. Опция са псевдовирус неутрализиращите тестове (pVNT), които използват рекомбинантни псевдовируси (като vesicular stomatitis virus – VSV), в които е инкорпориран S-протеин на SARS-CoV-2.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пандемията COVID-19 отправи огромно предизвикателство не само към медицинската общност, но и към биотехнологичната наука и медицинската практика. В началото на пандемията често се получаваха фалшивоположителни/фал-



шивоотрицателни резултати, чието редуциране бе жизнено важно за контрола на инфекцията. Често се налагаше (а и досега понякога, но все по-рядко) да се използват повече от един тест и/или многократни повторения, за да се стигне до диагнозата. Днес всички видове подходи и тестове се усъвършенстват, особено молекулярно-биологичните, а се задават и нови такива – напр. LAMP assay и CRISPR tests, за които не се изисква специализирана апаратура и специално обучение, а амплификацията на генетичния материал и отчитането на резултата става бързо и надеждно. Тази пандемия ни показва необходимостта от сериозни инвестиции в биотехнологиите и диагностичните методи, които единствено могат да решат бързия контрол на инфекциозния агент – жизнено важно при нововъзникващи вируси, за които няма нито ваксини, нито адекватна терапия.

*Не е деклариран конфликт на интереси*

## Библиография

1. WHO. World Health Organisation. Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard. Available online: <https://covid19.who.int/> (accessed on 14 December 2020)
2. De Wit E, Van Doremalen N, Falzarano D et al. SARS and MERS: Recent insights into emerging coronaviruses. *Nat Rev Microbiol*; 2016, 14:523-534.
3. Romano M, Ruggiero A, Squeglia F, et al. A Structural View of SARS-CoV-2 RNA Replication Machinery: RNA Synthesis, Proof-reading and Final Capping. *Cells*; 2020, 9:1267.
4. Lu R, Zhao X, Li J, et al. Genomic characterization and epidemiology of 2019 novel coronavirus: Implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*; 2020, 395:565-574.
5. Andersen KG, Rambaut A, Lipkin W, et al. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nature Medicine*; 2020, 26:450-452.
6. Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*; 2020; 395:497-506.
7. Zhang Z, Yao W, Wang Y, et al. Wuhan and Hubei COVID-19 mortality analysis reveals the critical role of timely supply of medical resources. *J. Infect.*; 2020, 81:147.
8. Zhang W, Du RH, Li B, et al. Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: Implication of multiple shedding routes. *Emerg Microbes Infect*; 2020, 9:386-389.
9. Loeffelholz MJ, Tang YW. Laboratory diagnosis of emerging human coronavirus infections—the state of the art. *Emerg. Microbes Infect.*; 2020, 9:747-756.
10. WHO. World Health Organisation. Coronavirus Disease (COVID-19) Technical Guidance: Laboratory Testing for 2019-nCoV in Humans; WHO: Washington, DC, USA, 2020.
11. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel for Emergency Use Only. Available online: <https://www.fda.gov/media/134922/download> (accessed on 9 September 2020).
12. Anand S, Montez-Rath M, Han J, et al. Prevalence of SARS-CoV-2 antibodies in a large nationwide sample of patients on dialysis in the USA: A cross-sectional study. *Lancet*; 2020, 396:1335-1344.
13. Corman VM, Landt O, Kaise M, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance* 2020, 25:2000045.
14. Kubina R, Dziedzic A. Molecular and Serological Tests for COVID-19. A Comparative Review of SARS-CoV-2 Coronavirus Laboratory and Point-of-Care Diagnostics. *Diagnostics*; 2020, 10:434.
15. Tang Y-W, Schmitz JE, Persing DH, et al. The Laboratory Diagnosis of COVID-19 Infection: Current Issues and Challenges. *J Clin Microbiol*, 2020, 58:e00512-20.
16. Chan JFW, Yip CCY, To KKW, et al. Improved molecular diagnosis of COVID-19 by the novel, highly sensitive and specific COVID-19-RdRp/HeI real-time reverse transcription-PCR assay validated in vitro and with clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.*; 2020, 58:e00310-20.
17. Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature*; 2020, 581:465-469. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2196-x>
18. Wu F, Zhao S, Yu B et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, 2020, 579:265-9.
19. Xiao AT, Tong YX, Zhang S, et al. False-negative of RT-PCR and prolonged nucleic acid conversion in COVID-19: Rather than recurrence. *J Med. Virol.*; 2020, doi:10.1002/jmv.25855
20. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H. et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.*; 2000, 28:63-70.
21. Mori Y, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): Expansion of its practical application as a tool to achieve universal health coverage. *J. Infect. Chemother.*; 2020, 26:13-17.
22. Yan C, Cui J, Huang L. et al. Rapid and visual detection of 2019 coronavirus (SARS-CoV-2) by a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *Clin. Microbiol. Infect.*; 2020, 26:773-779.
23. Nagura-Ikeda M, Imai K, Tabata S. et al. Clinical evaluation of self-collected saliva by RT-qPCR, direct RT-qPCR, RT-LAMP and rapid antigen test to diagnose COVID-19. *J. Clin. Microbiol.*; 2020, 164:112316.
24. Feng W, Newbigging A, Le C. et al. Molecular diagnosis of COVID-19: Challenges and research needs. *Anal. Chem.*; 2020, 92:10196-10209.
25. McCarthy MW. Harnessing the potential of CRISPR-based platforms to advance the field of hospital medicine. *Expert Rev. Anti-infect. Ther.*; 2020, 18:799-805.
26. Esbin MN, Whitney ON, Chong S. et al. Overcoming the bottleneck to widespread testing: A rapid review of nucleic acid testing approaches for COVID-19 detection. *RNA*; 2020, 26:771-783.
27. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Interim Guidance for Antigen Testing for SARS-CoV-2. Available online: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antigen-tests-guidelines.html> (accessed on 17 December 2020).
28. Mak GC, Cheng PK, Lau SS. et al. Evaluation of rapid antigen test for detection of SARS-CoV-2 virus. *J. Clin. Virol.*; 2020, 129:104500.
29. Krüttgen A, Cornelissen CG, Dreher M, et al. Comparison of the SARS-CoV-2 Rapid Antigen Test to the Real Star Sars-CoV-2 RT PCR Kit. *J. Virol. Methods*; 2020, 288:114024.
30. Blairon L, Wilmet A, Beukinga I, et al. Implementation of rapid SARS-CoV-2 antigenic testing in a laboratory without access to molecular methods: Experiences of a general hospital. *J. Clin. Virol.* 2020, 129:104472.
31. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Interim Guidelines for COVID-19 Antibody Testing [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention. Updated Aug.1, 2020. Available from: <http://www.cdc.gov/coronavirus.2019-ncov/lab/resources/antibody-tests-guidelines.html>
32. Long Q-X, Liu B-Z, Deng H-J, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat Med*; 2020, 26:845-848. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0897-1>
33. Lou B, Li T-D, Zhen S-F, et al. Serology characteristics of SARS-CoV-2 infection since exposure and post symptom onset. *Eur Respir J*; 2020, 56:2000763.

34. Zhao J, Yuan Q, Wang H, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. *Clin Infect Dis.*; 2020, medRxiv, doi: 10.1093/cid/ciaa344.
35. Liu A, Wang W, Zhao X, et al. Disappearance of antibodies to SARS-CoV-2 in Covid-19 patient after recovery. *Clin.Microbiol.Inf.*; 2020, 26:1703-1705.
36. Liu L, Wang P, Nair M, et al. Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike. *Nature*; 2020, 584:450-456.
37. Neurath AR, Encyclopedia of Virology. Third Edition, Brian Mahy and Marc H.V. Van Regenmortel eds. Academic Press, 2008,3234 pp. p.56
38. Machado BAS, Hodel KVS, Barbosa-Junior VG, et al. The Main Molecular and Serological Methods for Diagnosing COVID-19: An Overview Based on the Literature. *Viruses*, 2021, 13: 40. <https://doi.org/10.3390/v130100402020>.
39. Kim H, Chung D.-R, Kang A. A new point-of-care test for the diagnosis of infectious diseases based on multiplex lateral flow immunoassays. *Analyst*; 2019, 144: 2460.
40. Vashist, SK. In Vitro Diagnostic Assays for COVID-19: Recent Advances and Emerging Trends. *Diagnostics*; 2020; 10:202.
41. Johns Hopkins Center for Health Security. Serology-based tests for COVID-19. <https://www.centerforhealthsecurity.org/resources/COVID-19/serology/Serology-based-tests-for-COVID-19.html>.
42. SARTS-CoV-2 test. Neutralization Test kit, GenScript, 2020.
43. Abduljalil, J.M. Laboratory diagnosis of SARS-CoV-2: Available approaches and limitations. *New Microbes New Infect.*; 2020, 36:100713.
44. Wang Y, Wang Y, Chen Y, et al. Unique epidemiological and clinical features of the emerging 2019 novel coronavirus pneumonia (COVID-19) implicate special control measures. *J. Med. Virol.*; 2020, 92:568–576. et al.
45. Padoan A, Cosma C, Sciacovelli L, et al. Analytical performances of a chemiluminescence immunoassay for SARS-CoV-2 IgM/IgG and antibody kinetics. *Clin. Chem. Lab. Med.*; 2020, 58:1081-1088.
46. Jin Y, Wang M, Zuo Z, et al. Diagnostic value and dynamic variance of serum antibody in coronavirus disease 2019. *Int. J. Infect. Dis.*; 2020, 94:49-52.
47. Hu Q, Cui X, Liu X, et al. The production of antibodies for SARS-CoV-2 and its clinical implication. medRxiv 2020.
48. Yujie B, Yun L, Ying-ying C, et al. Dynamic anti-spike protein antibody profiles in COVID-19 patients. *Int J of Infect Dis.*; 2021, :540-548, <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.12.014>.
49. Kumar S, Nyodu R, Maurya V, et al. Morphology, Genome Organization, Replication, and Pathogenesis of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)*, 2020:23-31, doi: 10.1007/978-981-15-4814-7\_3
50. Sethuraman P, Jeremiah SS, Ryo A. Interpreting diagnostic tests for SARA-CoV-2. *Am.Med.Assoc.*; 2020, 323:2249-2251. doi:10.1001/jama.2020.8259