

COVID-19 – TESTE DE NEUTRALIZARE

Mariana ULINICI, Valentina VOROJBIT,
IP Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie
Nicolae Testemițanu

Rezumat

Studiile privind seroprevalența recent publicate demonstrează că, într-o populație randomizată, incidența SARS-CoV-2 constituie aproximativ 5%. Lupta cu pandemia ”COVID-19” va depinde de testarea anticorpilor neutralizanți, indiferent dacă aceștia au apărut ca rezultat al expunerii la virus sau sunt induși de vaccin. Scopul acestei sinteze a fost de a elucidă disponibilitatea sau existența unor teste ce ar permite studierea prezenței anticorpilor neutralizanți la pacienții infectați cu SARS-CoV-2. Revizuirea literaturii a fost realizată accesând baza de date ”Scopus” (în conformitate cu cadrul metodologic sugerat de Arksey și O’Malley, anul 2005) și folosind motorul de căutare ”GoogleScholar”. Au fost analizate 22 de articole publicate înainte de 1 iunie 2020, în vederea studierii existenței metodelor de testare a anticorpilor neutralizanți față de SARS-CoV-2. Standardul de aur de testare a anticorpilor neutralizanți include utilizarea virusului, care în cazul SARS-CoV-2 va necesita facilități de biosecuritate BSL-3. Un studiu publicat recent ne oferă o abordare cu totul nouă, care poate fi realizată în laboratoarele BSL-2. Două soluții pot fi considerate în acest sens: pseudovirusurile și virusurile-surogat. Pseudovirusurile pot realiza un singur ciclu de infecție, deoarece își pierd capacitatea de autoreplicare, fiind, astfel, mai sigure din punct de vedere biologic decât virusurile infecțioase. În cazul unui test de neutralizare a virusului-surogat pentru SARS-CoV-2, surrogatul ar imita receptorul de legare al virusului. Cuantificarea anticorpilor neutralizanți este importantă pentru a evalua imunitatea postinfecțioasă.

Cuvinte-cheie: SARS-CoV-2, teste de neutralizare, imunitate COVID-19

Summary

COVID-19 – neutralization tests

Recently published seroprevalence studies indicate that in a randomized population the incidence of SARS-CoV-2 is approximately 5%. The road out of the ”COVID-19” pandemic will depend on the testing for neutralizing antibodies; whether they resulted from virus exposure, or they are vaccine induced. The aim of this review was to elucidate the availability or the existence of tests that would allow the study of the presence of neutralizing antibodies in patients infected with SARS-CoV-2. The literature review was performed by accessing the ”Scopus” database (according to the methodological framework suggested by Arksey and O’Malley, year 2005) and the ”GoogleScholar” search engine. We analyzed 22 articles published before June 1, 2020, in order to study the existence of methods for testing neutralizing antibodies to SARS-CoV-2. The gold standard for neutralizing antibody testing includes the use of the virus, which in the case of SARS-CoV-2 will

require BSL-3 biosecurity facilities. A recently published study offers a completely new approach that can be done in BSL-2 laboratories. Two solutions can be considered in this regard: pseudoviruses and surrogate viruses. Pseudoviruses can perform a single cycle of infection because they lose their ability to self-replicate, thus being safer from a biological point of view than infectious viruses. In the case of a SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test, the surrogate would mimic the virus binding receptor. Quantification of neutralizing antibodies will be important to assess post-infectious immunity.

Keywords: SARS-CoV-2, neutralization tests, COVID-19 immunity

Резюме

COVID-19 – тесты нейтрализации

Недавно опубликованные исследования серопревалентности показывают, что в общей популяции заболеваемость SARS-CoV-2 составляет приблизительно 5%. Выход из пандемии ”COVID-19” будет зависеть от тестирования на нейтрализующие антитела, возникшие в результате непосредственного воздействия вируса или после вакцинации. Целью обзора являлось выяснение доступности или существования тестов, которые позволили бы изучить наличие нейтрализующих антител у пациентов, инфицированных SARS-CoV-2. Обзор литературы осуществлен путем доступа к базе данных ”Scopus” (согласно методологической структуре предложенной Arksey и O’Malley, год 2005) и поисковой системе ”GoogleScholar”. Мы проанализировали 22 статьи, опубликованные до 1 июня 2020 г., чтобы изучить существование методов тестирования нейтрализующих антител к SARS-CoV-2. Золотым стандартом тестирования нейтрализующих антител является использование вируса, который в случае SARS-CoV-2 требует средств биологической защиты BSL-3. Недавно опубликованное исследование предлагает совершенно новый подход, который может быть реализован в лабораториях BSL-2. В данном случае возможны два решения: псевдо-вирусы и суррогатные вирусы. Псевдо-вирусы могут выполнить только один цикл заражения, поскольку теряют способность к самовоспроизведению, что делает их более безопасными с биологической точки зрения, чем инфекционные вирусы. В случае теста нейтрализации суррогатного вируса SARS-CoV-2, суррогат будет имитировать рецептор, связывающий вирус. Количественная оценка нейтрализующих антител важна для оценки постинфекционного иммунитета.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, тесты на нейтрализацию, иммунитет COVID-19

Introducere

În decembrie 2019, în orașul Wuhan, China, a izbucnit o serie de cazuri de pneumonie de origine necunoscută. Agentul cauzal a fost identificat în ianuarie 2020 de către cercetătorii chinezi, fiind numit 2019-nCoV [1], desemnat ulterior SARS-CoV-2 [2], a cărui analiză filogenetică arată că virusul este foarte asemănător coronavirusului sindromului respirator acut sever (SARS-CoV) [3], dar cu tendință de a se transmite de la o persoană la alta mult mai ușor.

Deoarece nu există niciun medicament sau vaccin înregistrat împotriva COVID-19 [4], sistemul imun este cea mai bună apărare. Răspunsul imun la SARS-CoV-2 implică atât imunitatea celulară, cât și producerea de anticorpi [5]. Celulele T citotoxice joacă un rol vital în clearance-ul și eliminarea celulelor infectate cu virus [6].

Formarea anticorpilor neutralizanți reprezintă o linie importantă de apărare în lupta contra noului coronavirus SARS-CoV-2. Acești anticorpi pot elimina particulele virale și au potențial mare de a fi utilizați pentru prevenirea și tratamentul infecției cu SARS-CoV-2.

Glicoproteina S (spike) a virusului SARS-CoV-2 determină penetrarea în celulele-gazdă și este ținta principală a anticorpilor neutralizanți. Detectarea anticorpilor împotriva SARS-CoV-2 nu indică direct imunitate protectoare și nu au fost încă stabilite corelațiile de protecție împotriva COVID-19 [7, 8].

Testele serologice pentru COVID-19 pot fi utilizate pentru identificarea persoanelor care au fost anterior infectate cu SARS-CoV-2, lucru important pentru sistemul de sănătate, deoarece reacția de polimerizare în lanț (PCR) și alte teste rapide de diagnostic, utilizate actualmente, identifică prezența materialului viral care se găsește doar la persoanele infectate la momentul testării [9].

Scopul acestei cercetări a fost de a elucida disponibilitatea sau existența unor teste ce ar permite studierea prezenței anticorpilor neutralizanți la pacienții infectați cu SARS-CoV-2.

Materiale și metode

Revizuirea literaturii de specialitate a fost realizată accesând baza de date *Scopus* (în conformitate cu cadrul metodologic sugerat de Arksey și O'Malley, anul 2005) și folosind motorul de căutare *Google-Scholar*. Au fost analizate 22 de articole publicate înainte de 1 iunie 2020, în vederea studierii existenței metodelor de testare a anticorpilor neutralizanți față de SARS-CoV-2.

Rezultate obținute

Anticorpii neutralizanți sunt foarte importanți în lupta cu COVID-19, iar testele de neutralizare sunt relevante și ne ajută să înțelegem cum avansează gazda în dezvoltarea răspunsului imun la boală. Stu-

diile de seroprevalență publicate recent demonstrează că la o populație aleatorie, incidența SARS-CoV-2 este de aproximativ 5% [10,11]. Aceste studii arată, de asemenea, că în localitățile cu densitate mare a populației, seroprevalența poate crește până la aproximativ 10%. Unele studii (în majoritate cele cu populații autoselectate) au raportat o seroprevalență până la 20% [12, 13].

În mai multe articole am atestat una dintre cele mai promițătoare abordări în combaterea bolii. Aceste cercetări studiază utilizarea serului convalescent de la pacienții cu COVID-19 care s-au recuperat, transferându-l la pacienții aflați în stadiul acut al bolii. Una dintre sarcinile importante ale acestor studii va fi determinarea potențialului protector al serului convalescent, pentru a ști care este titrul de anticorpi neutralizanți prezenți și care este longevitatea acestora, precum și cât timp durează protecția răspunsului imun [13, 14]. Titrarea anticorpilor cu ajutorul testelor de neutralizare este foarte importantă, mai ales la măsurarea imunității induse de vaccin. Prin urmare, testele de neutralizare ne vor ajuta atât în etapa de elaborare a unui vaccin împotriva SARS-CoV-2, cât și în etapa de testare preclinică pe animale și apoi clinică a acestor vaccinuri pentru a putea determina dacă vaccinurile funcționează în modul în care se presupune.

La moment sunt în desfășurare un număr mare de studii privind vaccinurile, cele mai multe din ele fiind studii asupra siguranței. Ele vor determina, cu ajutorul testelor de neutralizare, răspunsul imun, dacă au apărut sau nu anticorpi în urma vaccinării, care este titrul de anticorpi neutralizanți, care e longevitatea acestora. De asemenea, cercetarea anticorpilor neutralizanți se referă la tratament, molecule mici inhibitori de intrare, folosite ca medicament, care se bazează pe capacitatea de a preveni penetrarea virusului în celulă; de asemenea, trebuie măsurate și sistemele de neutralizare ce dispun de un astfel de mecanism [9].

Dezvoltarea anticorpilor și a imunității

Approape toate persoanele imunocompetente vor dezvolta un răspuns imun în urma infecției cu SARS-CoV-2. Până în prezent, au fost raportate detalii serologice limitate ale infecției cu acest virus. Conform unui studiu preliminar, un pacient a prezentat un titru maxim al IgM specific la a 9-a zi după debutul bolii și seroconversia în IgG către săptămâna a doua [15]. Serurile de la cinci pacienți cu COVID-19 confirmă o reactivitate încrucișată cu SARS-CoV, dar nu și cu alte coronavirusuri. Mai mult, serurile de la toți pacienții au fost capabile să neutralizeze SARS-CoV-2 in vitro, ceea ce sugerează dezvoltarea reușită a răspunsului imun umoral [15]. Rămâne de investigat dacă titrul anticorpilor specifici se corelează cu severitatea bolii.

Conform datelor disponibile în prezent, anticorpii IgM și IgG împotriva SARS-CoV-2 apar după 6-15 zile de la debutul bolii [16]. Timpul mediu de seroconversie pentru anticorpii totali, IgM și apoi IgG a fost: ziua a 11-a, ziua a 12-a și, respectiv, a 14-a de la debutul simptomelor. Astfel, detectarea IgM fără IgG este ceva neobișnuit. Nu se cunoaște cât timp anticorpii IgM și IgG rămân detectabili în urma unei infecții, dar se știe că anticorpii împotriva altor coronavirusuri scad în timp (intervalul: 12-52 de săptămâni de la debutul simptomelor) și au fost demonstrate reinfecții omoloage [17].

În plus, poate fi evaluată dezvoltarea anticorpilor neutralizanți. Aceștia inhibă replicarea virală *in vitro* și, la fel ca în cazul multor boli infecțioase, prezența lor se corelează cu imunitatea la o infecție ulterioară, cel puțin temporar [5].

Eforturile inițiale de obținere a anticorpilor neutralizanți s-au concentrat pe reevaluarea anticorpilor monoclonali specifici contra SARS-CoV, izolați după izbucnirea epidemiei din 2003, care ar putea neutraliza încrucișat SARS-CoV-2 [18, 19]. Deși au fost descrise două tipuri de anticorpi monoclonali pentru a neutraliza încrucișat SARS-CoV-2, majoritatea anticorpilor neutralizanți anti-SARS-CoV nu au legat proteina S a virusului SARS-CoV-2 și nici nu au neutralizat virusul respectiv [18, 19]. Recent, accentul s-a deplasat de la anticorpii de neutralizare încrucișată a SARS-CoV la izolarea a noi anticorpi neutralizanți anti-SARS-CoV-2 de la pacienții care s-au vindecat de COVID-19 [20].

Rui Shi și colab. (anul 2020) au raportat izolarea a doi anticorpi monoclonali umani specifici (numiți CA1 și CB6) de la un pacient care a suportat COVID-19. CA1 și CB6 au demonstrat o activitate puternică de neutralizare specifică a SARS-CoV-2 *in vitro*. În plus, CB6 a inhibat infecția cu SARS-CoV-2 la maimuțele rhesus atât în testările profilactice, cât și în cele de tratament. Rezultatele sugerează că CB6 necesită studii suplimentare în calitate de candidat pentru interpretarea clinică [21].

Tipurile testelor de neutralizare

Testele de neutralizare determină capacitatea funcțională a anticorpilor de a preveni infecția virală *in vitro*. Un test de neutralizare implică incubarea serului sau a plasmei pacientului cu virusul viu, urmată de infectarea și incubarea culturilor celulare. Testele de neutralizare trebuie să fie efectuate în laboratoarele de biosecuritate (BSL) cu nivel 3 sau BSL-2, în funcție de forma virusului SARS-CoV-2 utilizat.

Se efectuează trei tipuri de teste de neutralizare și anume:

1. Teste de neutralizare a virusului viu, cum ar fi testul de neutralizare a reducerii formării plajelor și microneutralizarea, utilizează virusul SARS-CoV-2

dintr-un izolat clinic sau proteinele raportoare ce exprimă SARS-CoV-2 recombinant. Această metodă este considerată standardul de aur al testării neutralizării virusului și este efectuată în laboratoare BSL-3, iar rezultatele pot fi obținute în aproximativ cinci zile.

2. Testele de neutralizare a pseudovirusului folosesc pseudovirusuri recombinante (cum ar fi virusul stomatitei veziculare), care încorporează proteina S a virusului SARS-CoV-2. Acest test poate fi efectuat în laboratoarele BSL-2, în funcție de tulpina virusului stomatitei veziculare utilizată.

3. Testele de neutralizare a virusului-surogat folosesc un virus-surogat ce imită receptorul de legare a virusului SARS-CoV-2 și pot fi efectuate în laboratoarele BSL-2.

Standardul de aur – metoda convențională de testare a neutralizării virusului

Standardul de aur al neutralizării virusului viu a fost descris de către Johns Hopkins Center for Health Security la mijlocul lunii mai 2020 [9]. În figura 1 sunt descrise etapele și principiul testului de neutralizare în care sunt utilizate culturi celulare și virusul viu. Ceea ce căutăm să facem prin această metodă este să măsurăm cantitatea de anticorpi neutralizanți din serul pacientului, care pot inhiba intrarea virusului în celulă. Punctele cenușii de pe plăcile din partea de jos a schemei reprezintă monostratul de cultură celulară pusă pe cutia Petri. Înainte de a inocula culturile celulare cu suspensia ce conține serul pacientului în diluții seriale și tulpina de virus SARS-CoV-2, este necesară incubarea prealabilă. În cazul în care serul pacientului nu conține anticorpi, virusul va intra în celule, iar acest fapt va fi demonstrat prin formarea plajelor de liză sau a găurilor în monostratul de culturi celulare [9].

Acestea sunt studii destul de complexe și necesită facilități cum ar fi cultura de virus, nivelul de biosecuritate și reactivii utilizați la efectuarea testului. Echipamentul pentru efectuarea unui astfel de test nu este atât de complex și implică folosirea microscopelor și a incubatoarelor. Având în vedere faptul că virusul este încă puțin studiat, precum și potențialul virusului de a suferi mutații, ceea ce ar afecta testul în sine, infectivitatea virusului asupra culturilor celulare, precum și rezultatul testului, este necesară o corectare permanentă.

Testele de neutralizare a pseudovirusului

Pseudovirusurile sunt similare plasmidelor bacteriene. La intrarea în celulele sensibile, pseudovirusurile sunt capabile să se reproducă o singură dată, comparativ cu virusurile sălbatice, care se reproduc de multe ori. În plus, pseudovirusurile lipsesc virusul-mamă de componentele virulente, ceea ce elimină practic posibilitatea ca aceste particule să poată provoca o infecție activă la un individ expus [16, 22,

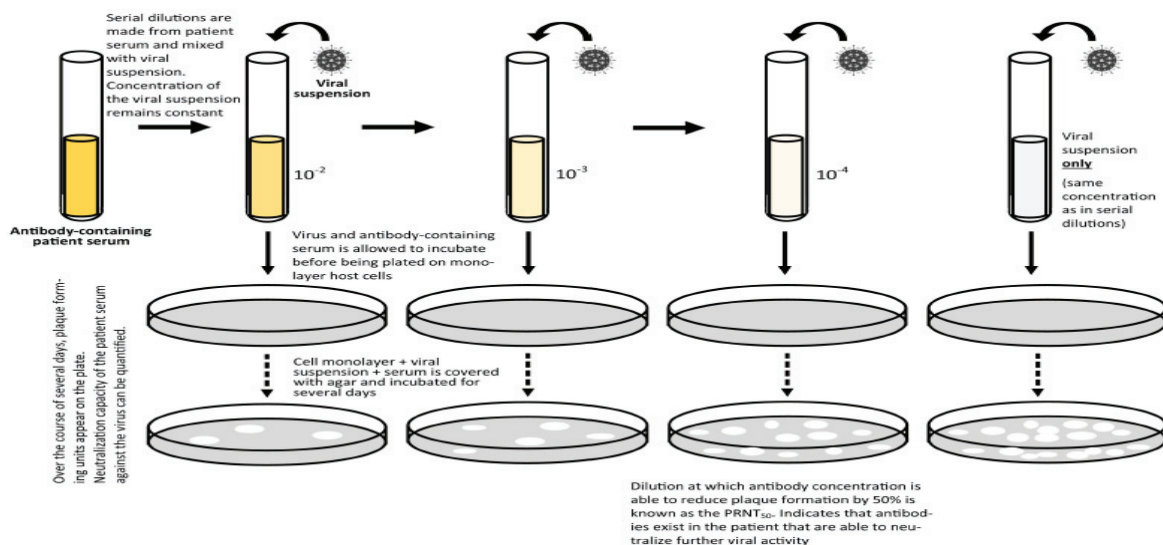


Figura 1. Testul de neutralizare a virusului viu [9]

23]. Aceste proprietăți unice ale pseudovirusurilor permit manipularea lor în condiții de siguranță în laboratoarele cu biosecuritate de nivel 2. Deși aceste virusuri sunt mult mai sigure de manipulat decât cel de la care au provenit, structura conformațională a proteinelor de suprafață ale pseudovirusurilor seamănă foarte mult cu cea a virusului nativ. Astfel de asemănări în structura proteinelor de suprafață le permit pseudovirusurilor să rămână eficiente în capacitatea lor de a intra în celule.

Pe lângă aceste avantaje, pseudovirusurile pot fi cuantificate și pot fi produse rapid. Numeroasele beneficii asociate cu efectuarea studiilor științifice asupra pseudovirusurilor au însoțit cercetătorii în timpul detectării anticorpilor, dezvoltării și evaluării vaccinurilor, oferind informații despre recunoașterea receptorilor, căile de inhibare a virusului și mecanismele de tropism celular.

Recent au fost făcute mai multe încercări de a genera un sistem de pseudovirus fiabil pentru virusul SARS-CoV-2 [16, 24].

Testele de neutralizare a virusului-surogat

O altă cale prin care se poate de studiat prezența anticorpilor neutralizanți este utilizarea virusurilor-surogat. Un virus-surogat va imita (adică va prezenta comportamente similare) virusul țintă (nativ), dar fără nicio capacitate virulentă.

Exemple de virusuri-surogat pot fi: a) virusurile neinfecțioase (inactivate sau atenuate); b) entitățile chimice care imită virusul.

Testul de neutralizare a virusului-surogat cuantifică capacitatea anticorpilor de neutralizare de a preveni legarea virusului de receptorul-țintă [25]. În acest test, anticorpilor de neutralizare anti-SARS-CoV-2 blochează proteina HRP conjugată la domeniul de legare la receptor (RBD) de a se lega la enzima de conversie a angiotensinei 2 (ACE2) umane pre-acoperite pe o placă ELISA. Avantajul acestei metode este faptul că nu sunt necesare culturile celulare și nici particulele virale. Măsurarea conexiunii domeniului de legare a receptorului la ACE2 se face prin utilizarea unei proteine-semnal (figura 2) cu ajutorul testului colorimetric ELISA [25].

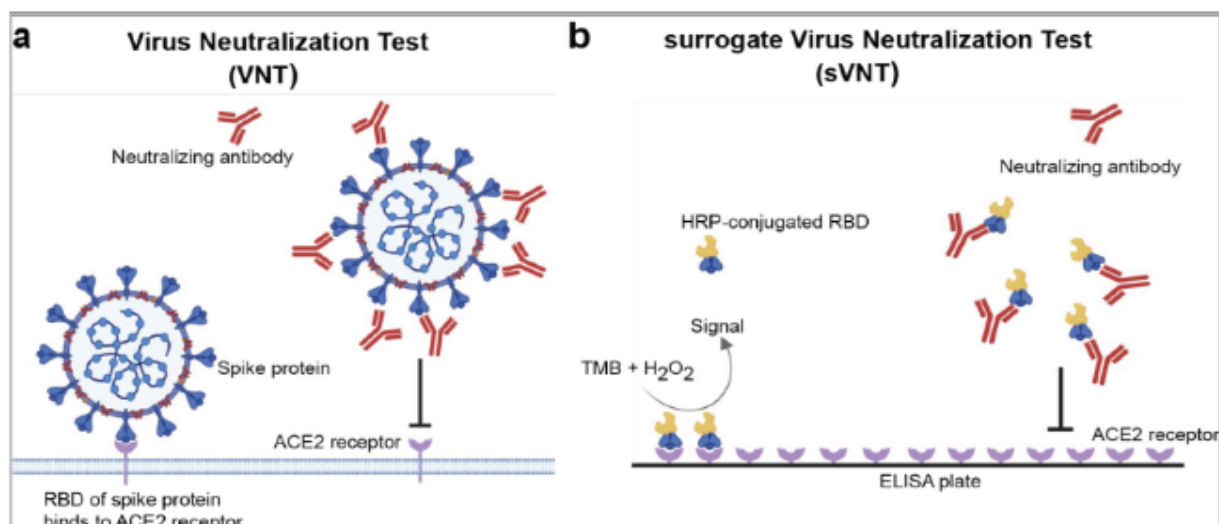


Figura 2. Principiul testului de neutralizare a virusului-surogat SARS-CoV-2 [25]

Două studii comparative publicate recent, unul care a avut loc în Singapore și altul în China, au cercetat corelația dintre reacția de neutralizare în care se utilizează virusul viu și reacția de neutralizare în care se folosește virusul-surogat. În aceste studii a fost utilizat un panel de seruri COVID-19 cu diferite concentrații de anticorpi anti-SARS-CoV-2 (figura 3a). Rezultatele demonstrează o corelație generală între cele două analize (figura 3a). Testul de neutralizare a virusului-surogat este mai sensibil decât cel de neutralizare a virusului viu. La un *cutoff* de inhibiție de 50%, care poate fi luat în considerare, toate serurile de la pacienții cu COVID-19 au arătat neutralizarea la 1:20 sau un titru de neutralizare egal sau mai mare decât 640 [25]. Pentru a valida performanța testului de neutralizare a virusului-surogat SARS-CoV-2, au

fost testate două cohorte diferite de seruri pozitive și negative. Testul a fost efectuat în două țări – Singapore și China, pe două grupuri independente pentru a asigura în continuare fiabilitatea și reproductibilitatea. Pentru prima cohortă, au fost testate 77 de seruri de la pacienții cu COVID-19 confirmați prin PCR, din Singapore, și 75 de seruri de control de la pacienții sănătoși (figura 3b). Pentru cea de-a doua cohortă, au fost testate câte 50 de seruri din fiecare categorie din Nanjing, China (figura 3c). Aceste teste prezintă 100% specificitate, 95-100% sensibilitate și nicio reacție încrucișată cu alte coronavirusuri cunoscute. Spre deosebire de standardul de aur sau de testele de neutralizare a pseudovirusului, acest test poate fi finalizat în una-două ore, iar celelalte necesită incubarea peste noapte [25].

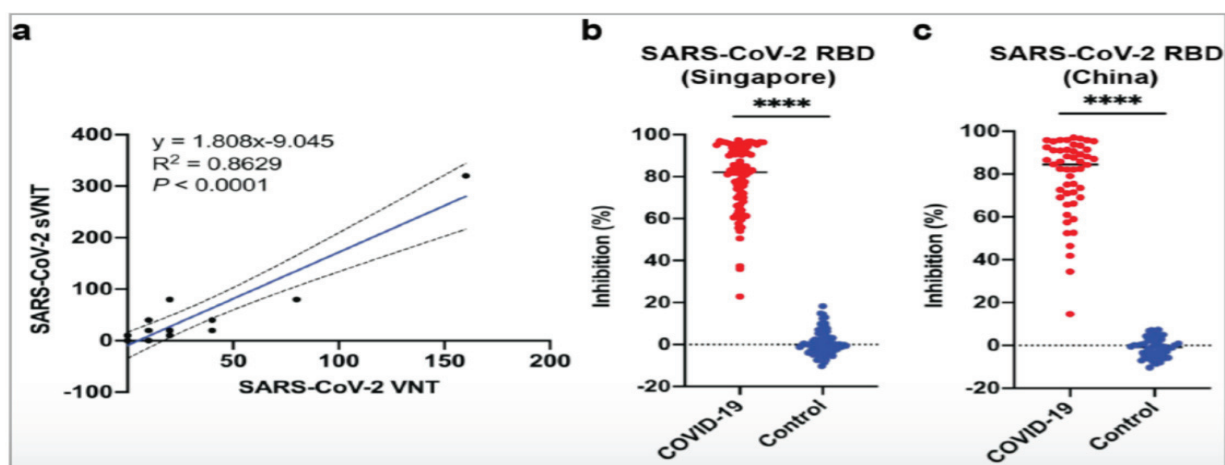


Figura 3. Corelația dintre testul de neutralizare a virusului-surogat și testul de neutralizare a virusului viu și evaluarea testului de neutralizare al virusului-surogat pe două cohorte de pacienți COVID-19 din două națiuni diferite [25]

Discuții

În prezent nu sunt bine definite corelațiile imunologice ale imunității împotriva infecției cu SARS-CoV-2. Studiile în curs includ: evaluarea nivelului de anticorpi necesari pentru protecția împotriva reinfecției, durata acestei protecții și factorii asociați cu dezvoltarea răspunsului imun protector (formarea anticorpilor neutralizanți).

Problemele care necesită soluționare sunt: cinetica răspunsului la anticorpi, longevitatea anticorpilor, capacitatea acestora de a ne proteja de infecțiile repetate, titrul de protecție al anticorpului de neutralizare și corelarea titrelor de anticorpi de legare la capacitatea de neutralizare. Rezolvarea acestor probleme ne va ajuta să înțelegem cu o anumită certitudine prezența sau absența unei infecții anterioare cu SARS-CoV-2 și, cel mai important, să înțelegem când pot oferi imunitate anticorpii formați. În absența datelor suplimentare, prezența

anticorpilor nu poate fi echivalată cu imunitatea unei persoane față de infecția cu SARS-CoV-2.

Astfel, rezultatele testelor serologice nu indică cu certitudine prezența sau absența infecției curente sau anterioare cu SARS-CoV-2.

Sunt foarte multe discuții în ceea ce privește testarea prezenței anticorpilor pentru a asigura revenirea în siguranță înapoi la muncă sau deplasarea în siguranță. Prezența unui răspuns umoral nu înseamnă obligatoriu protecția față de reinfecția cu virusul SARS-CoV-2 și nici față de dezvoltarea bolii.

Concluzii

Cu toate că în comerț există multe tipuri de teste disponibile ce indică prezența anticorpilor anti-SARS-CoV-2, teste ce se efectuează în laborator sau care pot fi efectuate la punctul de îngrijire a pacientului, niciunul nu este capabil să măsoare anticorpii neutralizanți. Testele de neutralizare a virusului viu,

a pseudovirusului sau a virusului-surogat rămân singura platformă pentru detectarea anticorpilor neutralizanți. Primele două necesită virus viu și culturi celulare, operatori cu calificare înaltă, sunt mai puțin sensibile în general și necesită zile pentru obținerea rezultatelor. Astfel, testele de neutralizare a virusului viu și a pseudovirusului nu sunt adecvate pentru producția și testarea în masă, chiar și în cele mai dezvoltate țări.

Datele obținute în acest studiu au demonstrat că testul de neutralizare a virusului-surogat este la fel de specific și chiar mai sensibil decât standardul de aur. Avantajul major al acestui test este că poate fi realizat rapid în majoritatea laboratoarelor de cercetare sau clinice, fără a fi nevoie de utilizarea materialelor biologice vii și de condiții de biosecuritate de nivelul 3.

Testele de neutralizare pot acoperi multe aspecte ale investigației COVID-19 – de la urmărirea contactilor, efectuarea studiilor de seroprevalență, urmărirea rezervorului/intermediarului animalelor până la evaluarea imunității efective, a longevității imunității protectoare și a eficacității diferitor vaccinuri.

Bibliografie

- Kermali M., et al. The role of biomarkers in diagnosis of COVID-19 – A systematic review. In. *Life Sciences*. 2020, vol. 254, p. 117788. Disponibil pe: doi:10.1016/j.lfs.2020.117788
- Yuan M., et al. A highly conserved cryptic epitope in the receptor binding domains of SARS-CoV-2 and SARS-CoV. In. *Science*. 2020, vol. 368, nr. 6491, pp. 630–633. Disponibil pe: doi:10.1126/science.abb7269
- Zhu N., et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China. In. *New England Journal of Medicine*. 2020, vol. 382, nr. 8, pp. 727–733. Disponibil pe: doi:10.1056/NEJMoa2001017
- Zhang L., Liu Y. Potential interventions for novel coronavirus in China: A systematic review. In. *Journal of Medical Virology*. 2020, vol. 92, nr. 5, pp. 479–490. Disponibil pe: doi:10.1002/jmv.25707
- Latest-evidence on immune-responses. [citat 1.06.2020]. Disponibil pe: <https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/latest-evidence/immune-responses>.
- Kumar S., et al. Host Immune Response and Immunobiology of Human SARS-CoV-2 Infection. In. Saxena S. (eds). *Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). Medical Virology: From Pathogenesis to Disease Control*. Springer, Singapore. 2020, pp. 43–53. Disponibil pe: doi:10.1007/978-981-15-4814-7_5
- Promptchara E. Ketloy, Palaga T. Immune responses in COVID-19 and potential vaccines: Lessons learned from SARS and MERS epidemic. In. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*. 2020, vol. 38, nr. 1, pp. 1–9. Disponibil pe: doi:10.12932/AP-200220-0772
- Walls A.C., et al. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. In. *Cell*. 2020, vol. 181, nr. 2, pp. 281–292. Disponibil pe: doi:10.1016/j.cell.2020.02.058
- Serology-based-tests-for-COVID-19. [citat 29.05.2020]. Disponibil pe: <https://www.centerforhealthsecurity.org/resources/COVID19/serology/Serology-based-tests-for-COVID-19.html>
- Khan F.A. The role of selectivity of the SARS-CoV-2 virus for human genetic profiles in susceptibility and resistance to COVID-19. In. *New Microbes New Infections*. 2020, vol. 36, p. 100697. Disponibil pe: doi:10.1016/j.nmni.2020.100697
- Rabi F.A., et al. Sars-cov-2 and coronavirus disease 2019: What we know so far. In. *Pathogens*. 2020, vol. 9, nr. 3, pp. 1–14. Disponibil pe: doi:10.3390/pathogens9030231
- Okba N., et al. SARS-CoV-2 specific antibody responses in COVID-19 patients. In. *Emerging Infectious Diseases*. 2020, pp. 1–18. Disponibil pe: doi:10.1101/2020.03.18.20038059
- Zhao J., et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. In. *Clinical Infectious Diseases*. 2020. Disponibil pe: doi:10.1093/cid/ciaa344
- Cao Y., et al. Potent Neutralizing Antibodies against SARS-CoV-2 Identified by High-Throughput Single-Cell Sequencing of Convalescent Patients' B Cells. In. *Cell*. 2020, pp. 73–84. Disponibil pe: doi:10.1016/j.cell.2020.05.025
- Zhou P., et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. In. *Nature*. 2020, vol. 579, nr. 7798, pp. 270–273. Disponibil pe: doi:10.1038/s41586-020-2012-7
- Nie J., et al. Establishment and validation of a pseudovirus neutralization assay for SARS-CoV-2. In. *Emerging Microbes and Infections*. 2020, vol. 9, nr. 1, pp. 680–686. Disponibil pe: doi:10.1080/22221751.2020.1743767
- Kellam P., Barclay W. The dynamics of humoral immune responses following SARS-CoV-2 infection and the potential for reinfection. In. *Journal of General Virology*. 2020. Disponibil pe: doi:10.1099/jgv.0.001439
- Tian X., et al. Potent binding of 2019 novel coronavirus spike protein by a SARS coronavirus-specific human monoclonal antibody. In. *Emerging Microbes and Infections*. 2020, vol. 9, nr. 1, pp. 382–385. Disponibil pe: doi:10.1080/22221751.2020.1729069
- Wang C., et al. A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection. In. *Nature Communications*. 2020, vol. 11, nr. 1, pp. 1–6. Disponibil pe: doi:10.1038/s41467-020-16256-y
- Ju B., et al. Human neutralizing antibodies elicited by SARS-CoV-2 infection. In. *Nature*. 2020. Disponibil pe: doi:10.1038/s41586-020-2380-z
- Shi R., et al. A human neutralizing antibody targets the receptor binding site of SARS-CoV-2. In. *Nature*. 2020. Disponibil pe: doi:10.1038/s41586-020-2381-y
- Protocol for recombinant RBD-based SARS vaccines protein preparation [citat 27.05.2020]. Disponibil pe: <https://www.jove.com/v/2444/protocol-for-recombinant-rbd-based-sars-vaccines-protein-preparation>
- Li Q., et al. Current status on the development of pseudoviruses for enveloped viruses. In. *Reviews in Medical Virology*. 2018, vol. 28, nr. 1, pp. 1–10. Disponibil pe: doi:10.1002/rmv.1963
- Huang S.W., et al. Assessing the application of a pseudovirus system for emerging SARS-CoV-2 and re-emerging avian influenza virus H5 subtypes in vaccine development. In. *Biomedical Journal*. 2020. Disponibil pe: doi:10.1016/j.bj.2020.06.003
- Tan C.W., et al. A SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test (svNT) based on antibody-mediated blockage of ACE2-spike (RBD) protein-protein interaction. In. *Nature Research*. 2020. Disponibil pe: doi:10.21203/rs.3.rs-24574/v1

Mariana Ulinici,

asistent universitar,

Catedra de microbiologie și imunologie,

IP USMF Nicolae Testemițanu,

tel.: 069973591, e-mail: mariana.ulinici@usmf.md