



МИНИСТЕРСТВО НА ЗДРАВЕОПАЗВАНЕТО
НАЦИОНАЛЕН ЦЕНТЪР ПО ЗАРАЗНИ И ПАРАЗИТНИ БОЛЕСТИ

Ванчо Донеv

**ОХАРАКТЕРИЗИРАНЕ НА ПОТЕНЦИАЛНИТЕ
ИМУНОПРОФИЛАКТИЧНИ И ИМУНОТЕРАПЕВТИЧНИ
СВОЙСТВА НА ЧОВЕШКА КРЪВНА ПЛАЗМА**

АФТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд

за придобиване на образователна и научна степен „Доктор“

Област на висше образование: **4. Природни науки, математика и информатика**

Професионално направление: **4.3 Биологически науки**

Научна специалност: **Имунология**

Научен ръководител:

доц. Д-р Георги Николов, дм

СОФИЯ – 2025 г.

Дисертационният труд е изработен в отдел „Имунология“ към НЦЗПБ, гр. София.

Представен е на разширен колегиум на отдел „Имунология“ на 24.06.2024 година в 10:00

Дисертационният труд съдържа 130 страници, 23 фигури и 7 таблици. Библиографията включва 317 литературни източника.

СЪДЪРЖАНИЕ

УВОД	5
II ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	7
III. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ	8
I. ИЗСЛЕДВАНИ БИОЛОГИЧНИ ПРОБИ	8
II. БИОПРОДУКТИ	9
1. Анти-човешко IgG (Fc-специфично)	9
2. Staphylococcus aureus Alpha-hemolysin(Hla) антигено	9
3. Alpha-hemolysin(Hla) от Staphylococcus aureus	9
4. Говежди серумен албумин (BSA)	9
III. РАЗТВОРИ И БУФЕРИ	10
1. Разтвор за промиване на плаките.	10
2. Фосфатно-буфериран физиологичен разтвор (PBS)	10
3. Субстрат (TMB)	10
4. Стоп разтвор за TMB	10
IV. КИТОВЕ И КОНСУМАТИВИ	10
1. Стерилни криоепруветки	10
2. Стерилни плаки	10
3. Китове за определяне на RBD-свързващи SARS-CoV-2-специфични IgG и IgA (Anti-SARS-CoV-2 ELISA, Euroimmun, Lübeck, Germany)	10
4. Кит за определяне на цитокинов профил (ThermoFisher Scientific ProcartaPlex Hu Th1/Th2/Th9/Th17/Th22/Treg 25plex).	10
5. Кит за определяне на изотиповете антигено (ProcartaPlex™ Human Antibody Isotyping Panel 7-Plex)	10
6. Кит за определяне на неутрализиращи антигено срещу различни варианти на SARS-CoV2 (ProcartaPlex™ Human SARS-CoV-2 Variants Neutralizing Antibody Panel, 6plex)	10
7. Кит за определяне на специфични IgG срещу Candida albicans	10
V. ОБОРУДВАНЕ	11
1. LUMINEX® 200 (THERMO FISHER SCIENTIFIC)	11
2. СПЕКТРОФОТОМЕТЪР (BIOТЕК ЕPOCH MICROPLATE SPECTROPHOTOMETER)	11
VI. МЕТОДИ И АНАЛИЗ НА РЕЗУЛТАТИТЕ	11
1. Детекция на SARS-CoV-2-специфични RBD-IgG и -IgA	11
2. Определяне на цитокинов профил, изотипове антигено, неутрализиращи антигено срещу различните варианти на SARS Cov-2	11
3. Детекция на IgG срещу Candida albicans	11
4. Детекция на АНА	11
5. Характеризиране на АНА	11
6. Детекция на анти-Alpha-hemolysin(Hla) IgG от Staphylococcus aureus с home	11
7. Статистическа обработка на резултатите и обработка на библиографията	14
IV РЕЗУЛТАТИ	15
1. Изотипове и подкласове на имуноглобулини, присъстващи в интравенозен имуноглобулин (ИМУНОВЕНИН-ИНТАКТ 5%)	15
2. Изотипове и подкласове на имуноглобулини, в реконвалесцентната плазма от донори, прекарали COVID-19	17
3. Нива на SARS-CoV-2 специфични IgG и IgA в IVIG 5% и CCP	18

4. НЕУТРАЛИЗИРАЩА АКТИВНОСТ СРЕЩУ SARS-CoV-2 ВАРИАНТИ В РЕКОНВАЛЕСЦЕНТНИ ПЛАЗМЕНИ ПРОБИ И В IVIG 5%.....	24
5. ЦИТОКИНОВ ПРОФИЛ - ССР И СБОРНИ ПЛАЗМИ	28
6. АНТИТЕЛА СРЕЩУ <i>CANDIDA ALBICANS</i> В IVIG 5%	31
7. АНТИТЕЛА СРЕЩУ <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> В IVIG 5%.....	33
7.1. Разработка на ELISA метод за анализ на Hla от <i>S. aureus</i>	34
7.2. Анализ на 90 партии IVIG 5%	37
8. ДЕТЕКЦИЯ И ХАРАКТЕРИЗИРАНЕ НА АНА В ИМУНОВЕНИН-ИНТАКТ 5% И ССР.....	38
V. ОБСЪЖДАНЕ	41
VI. ИЗВОДИ	52
VII. ПРИНОСИ.....	54
ОРИГИНАЛНИ ПРИНОСИ С ТЕОРЕТИЧЕН ХАРАКТЕР	54
ПРИНОСИ С НАУЧНО-ПРИЛОЖЕН ХАРАКТЕР	55
VIII. ЛИТЕРАТУРА.....	56
ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	69
УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ	69
• УЧАСТИЯ В МЕЖДУНАРОДНИ НАУЧНИ ФОРУМИ, ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА	69
• УЧАСТИЕ В НАЦИОНАЛНИ НАУЧНИ ФОРУМИ, ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА	69
УЧАСТИЯ В ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКИ ПРОЕКТИ КАТО ИЗПЪЛНИТЕЛ.....	70
SUMMARY	71

УВОД

Човешката плазма е един много достъпен и клинично важен кръвен дериват. В сравнение с традиционните фармацевтични продукти и други биологични лекарства, човешката плазма е източник на основни терапевтични продукти с уникални характеристики поради човешкия си произход.

Плазмените протеинови терапии (PPT) са набор от биологично важни протеини използвани за терапия при вродени дефицитни заболявания и животозастрашаващи състояния. Хуморалната имунна недостатъчност може да бъде причинена от различни патологични механизми и може да бъде първична или вторична.

Преди почти 75 години д-р Огдън Брутън успешно лекува 8-годишно момче с хипогамаглобулинемия, при което се наблюдават рецидивиращи стрептококови инфекции на белия дроб, като използва иновативна за времето си терапия — мускулни инжекции с имуноимуноглобулин G.

Така с откриването и широкото приложение на PPT преживяемостта на изключително тежко болни се удължава благодарение на наличието на широк диапазон от различни специфични IgG антитела. Това води до началото на производството на интрамускулен (i.m.) имуноглобулинов препарат, който е важен кръвен продукт за лечение на редица заболявания. В продължение на много години имуноглобулините са се произвеждали в концентрирана форма, подходяща само за интрамускулно приложение. Интрамускулните препарати от донори с високи плазмени концентрации на специфични имуноглобулини са прилагани за профилактика и лечение на редица инфекции.

През 70-те години на миналия век бе разработен имуноглобулинов препарат, който се прилага интравенозно. Приложението на интравенозен имуноглобулин (IVIG) подобрява качеството на живот и спомага за терапията на различни животозастрашаващи състояния.

Получените от плазма IVIG препарати са успешно прилагани като заместителна терапия за превенция на инфекциозни заболявания при пациенти с имунен дефицит. Инфузията на IVIG има също имуномодулиращи ефекти чрез F(ab')(2)- и Fc-зависими механизми и се прилага за лечение на нарастващ брой автоимунни, възпалителни и

имуномедиирани заболявания. За съжаление, до сега тези ефекти не са много добре дефинирани най-вече поради променливото съдържание и индивидуалните характеристики на отделните сборни плазмени групи. Следователно има голяма нужда от разработването на високопроизводителни, добре контролирани производствени процеси за кръвни продукти, както и добро охарактеризиране на имуноглобулиновите препарати.

Тъй като IVIG се изготвя от множество донори, той съдържа различни антитела, насочени срещу широк спектър от бактериални, вирусни, паразитни и микоплазмени антигени. Тези антитела опсонизират и неутрализират микроорганизмите и някои токсини.

Така в допълнение на първоначалната си употреба като заместителна терапия при първични и вторични имунодефицити, IVIG все повече се препоръчват като терапевтично средство при широк спектър от възпалителни заболявания. В условията на пандемията от COVID-19 използването на IVIG бързо нарасна. В този контекст се увеличава и необходимостта от разширяване на обхвата на протоколите за стандартизация на IVIG, включително чрез въвеждане на прецизни количествени характеристики на отделните Ig класове, изотипове както и определяне съдържанието на специфични антитела и проследяване на нежелани компоненти в препаратите.

II ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на дисертационния труд е проучване на основните имунни компоненти на човешката кръвна плазма, използвана за производство на краен IVIG продукт Имуновенин интакт 5% и охарактеризиране на съдържащите се в него патоген - специфични антитела, с оглед евентуално имунопрофилактично и имунотерапевтично приложение.

Основните задачи, които си поставихме, бяха:

1. Да се охарактеризират човешка кръвна плазма и “Имуновенин интакт 5%” по отношение на изотиповете на съдържащите се имуноглобулини (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM).
2. Да се охарактеризират и да се направи оценка на потенциалните имунопрофилактични и имунотерапевтични свойства на хиперимунна човешка кръвна плазма и “Имуновенин интакт 5%” по отношение на вирусни (*Covid-19*) патогени.
3. Да се направи оценка на цитокинов профил на кръвни плазми и плазма пулове за производство на “Имуновенин интакт 5%” .
4. Да се направи оценка на съдържанието на гъбични (*Candida albicans*) патогени в човешка кръвна плазма и “Имуновенин интакт 5%”.
5. Да се направи оценка на човешка кръвна плазма и “Имуновенин интакт 5%” по отношение на съдържанието на бактериални (*Staphylococcus aureus*) патогени. Като за целта се разработи ELISA тест.
6. Да се направи оценка на “Имуновенин интакт 5%” за наличие на често срещани автоантитела.

III. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

I. ИЗСЛЕДВАНИ БИОЛОГИЧНИ ПРОБИ

A. Плазми

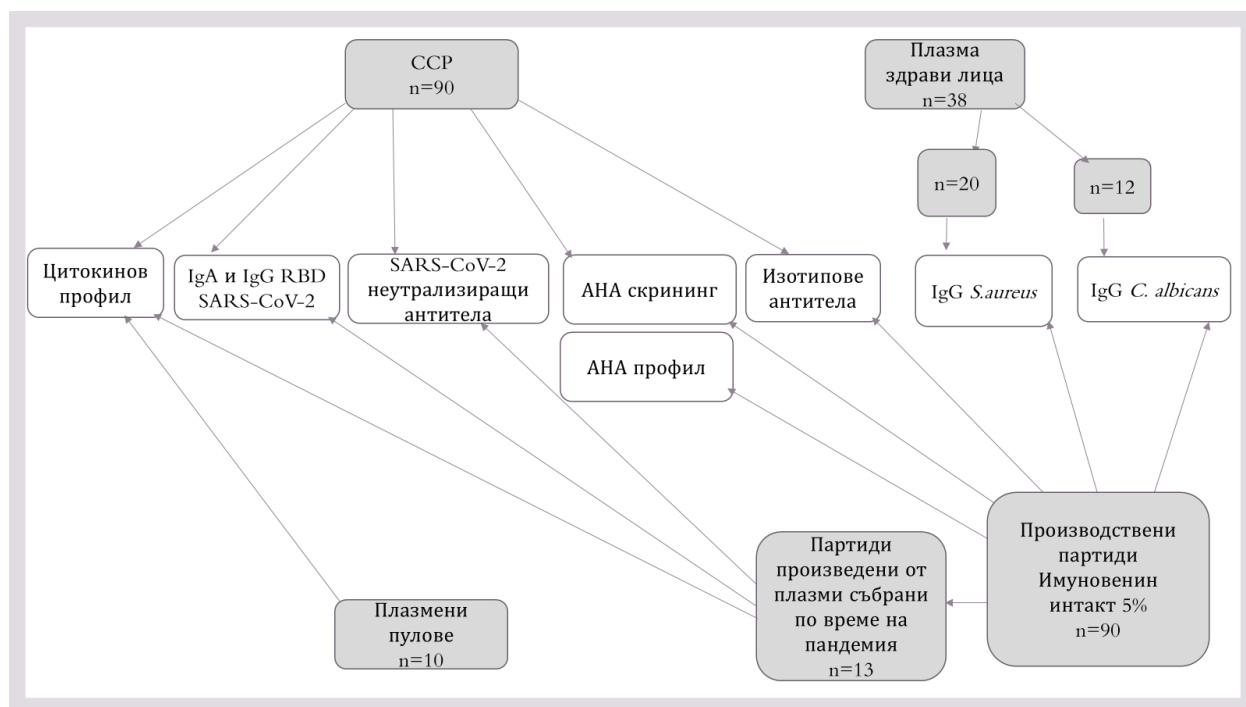
- COVID-19 реконвалесцентна донорска плазма (01.2021-05.2021) – 90 броя
- Плазма от клинично здрави лица (възраст в години от 2-55) – 32 броя
- Плазмени пулове от ~3000 дарявания с количество ~600 л. (период на даряване 01.2021-12.2021) – 10 броя

Б. Интравенозен имуноглобулин (Имуновенин-интакт 5%)

- Редовни производствени партии (2019-2024) - 90 броя
- Партии, произведени от плазми събрани по време на COVID-19 пандемията – 13 броя

Всички донори са били наскоро възстановени след лабораторно потвърдена инфекция със SARS-CoV-2. Тежката форма на COVID-19 инфекцията е определена според критериите на СЗО¹⁷⁶.

В. Схема на проучването (Фигура 3.)



Фигура 3. Дизайн на проучването

II. БИОПРОДУКТИ

1. **Анти-човешко IgG (Fc-специфично)** - за детекция на специфичните антитела срещу Hla, конюгирано с пероксидаза и пречистено за отстраняване на неконюгиран материал. Разрежда се 1:60 000 при използването му за ELISA спрямо указанията на производителя.
2. **Staphylococcus aureus Alpha-hemolysin(Hla) антитяло** – за разработването на home-made ELISA метод за оценка на анти-Hla антитела в изследваните проби.
3. **Alpha-hemolysin(Hla) от Staphylococcus aureus** - за разработването на home-made ELISA метод за оценка на анти- Hla
4. **Говежди серумен албумин (BSA)** - За блокиране на ямките при ELISA метода

III. РАЗТВОРИ И БУФЕРИ

1. **Разтвор за промиване** на плаките при ELISA метод.
2. **Фосфатно-буфериран физиологичен разтвор (PBS)** - за разреждане на антитела, плазма и кръвни продукти.
3. **Субстрат (ТМВ)** - за визуализиране и възможна детекция на реакция при ELISA метода
4. **Стоп разтвор за ТМВ**

IV. КИТОВЕ И КОНСУМАТИВИ

1. **Стерилни криоепруветки**
2. **Стерилни плаки** - 96 ямкови плаки с плоско дъно с общ обем 360 μL за home-made ELISA .
3. **Китове за определяне на RBD-свързващи SARS-CoV-2-специфични IgG и IgA (Anti-SARS-CoV-2 ELISA, Euroimmun, Lübeck, Germany)** - стандартизиран метод, базиран на ELISA
4. **Кит за определяне на цитокинов профил (ThermoFisher Scientific ProcartaPlex Hu Th1/Th2/Th9/Th17/Th22/Treg 25plex)** - за определяне на концентрацията pg/ml на GM-CSF, IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL- 6, IL-12p70, IL-13, IL-18, TNF- α ; IL-9, IL-10, IL-17A (CTLA-8), IL-21, IL-22, IL-23, IL-27, IFN- α , IL-1- α , IL-1RA, IL-7, IL -15, IL-31 и TNF- β в проби от плазма или серум.
5. **Кит за определяне на изотиповете антитела (ProcartaPlex™ Human Antibody Isotyping Panel 7-Plex)** - за определяне на концентрацията pg/ml на IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM в проби от плазма или серум.
6. **Кит за определяне на неутрализиращи антитела срещу различни варианти на SARS-CoV2 (ProcartaPlex™ Human SARS-CoV-2 Variants Neutralizing Antibody Panel, 6plex)** - за директно сравнение на неутрализиращия потенциал в % на антителата към оригиналния див тип вирус и пет варианта (B.1.1.529 ($\omicron$), B.1.617.2 (δ), P.1 (γ), B.1.351 (β) и B.1.1.7 (α)).
7. **Кит за определяне на специфични IgG срещу Candida albicans** - стандартизиран метод, базиран на ELISA

8. **Кит за определяне на антинуклеарни антитела (ANA)** - стандартизиран метод, базиран на ELISA
9. **Кит за определяне на ANA Profile** - стандартизиран метод, базиран на имуноблот.

V. ОБОРУДВАНЕ

1. **Luminex® 200 (Thermo Fisher Scientific)** - система базирана на флуориметрия, Използва се софтуер ProcartaPlex™ Analyst 1.0 за отчитане и анализ на пробите
2. **Спектрофотометър (BioTek Epoch Microplate Spectrophotometer)**- монохроматор за измерване на микроплаки.

VI. МЕТОДИ И АНАЛИЗ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

1. **Детекция на SARS-CoV-2-специфични RBD-IgG и -IgA с ELISA метод**
2. **Определяне на цитокинов профил, изотипове антитела, неутрализиращи антитела срещу различните варианти на SARS Cov-2 с Luminex**
3. **Детекция на IgG срещу Candida albicans с ELISA метод**
4. **Детекция на АНА с ELISA метод**
5. **Характеризиране на АНА с имуноблот метод**
6. **Детекция на анти-Alpha-hemolysin(Hla) IgG от Staphylococcus aureus с home-made ELISA.**

За тази цел са използвани:

- ✓ Неконюгирано заешко поликлонално антитяло срещу Staphylococcus aureus Alpha-hemolysin с чистота >90%
- ✓ Лиофилизиран рекомбинантен протеин α -Hemolysin от Staphylococcus aureus със специфична активност $\geq 10,000$ единици/mg
- ✓ Анти-човешко IgG специфично срещу FC фрагмента антитяло свързано с пероксидаза
- ✓ 96 ямкови, полистиренови плоскодънни плаки за ELISA, единично опаковани, стерилни с капак
- ✓ 10 пъти концентриран миеш разтвор за ELISA с pH 7.2-7.6.
- ✓ Стопиращ разтвор, съдържащ 0.5 моларна сярна киселина

- ✓ Суха субстанция 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМВ)

Съставени са два протокола (директен и сандвич метод) както и различни падащи концентрации на антигенна спрямо антителата за да анализираме дозовата зависимост при антиген-антитяло реакцията.

Подготовка на консумативи:

1. Пробата се разрежда 1:100 със PBS. И се хомогенизира на Vortex за кратко.
2. Неконюгирано заешко поликлонално антитяло срещу *Staphylococcus aureus* Alpha-hemolysin с чистота >90%- разрежда се до 1 µg/ml и се правят падащи разреждания 4кратно. Пипетират се 100 µl и се добавя 900 µl PBS. След което се правят падащи разреждания до 0.125 µl.
3. Лиофилизиран рекомбинантен протеин α-Hemolysin- разрежда се с 1 ml дейонизирана вода до концентрации от 500 µg/ml. Пипетират се 100 µl и се добавя 4900 µl разреждащ р-ор. Падащите разреждания се правят до 0.125 µl.
4. Анти-човешко IgG специфично срещу FC фрагмента антитяло свързано с пероксидаза се разрежда с PBS по инструкции 1:60 000.
5. 96 ямкови, полистиренови плоскодънни плаки за ELISA, единично опаковани, стерилни с капак са готови за ползване
6. 10 х концентриран миеш разтвор за ELISA с pH 7.2–7.6. 100ml от концентрирания разтвор се разреждат с 900ml де йонизирана вода.
7. Стопиращ р-ор, съдържащ 0.5 моларна сярна киселина. (готов за ползване)
8. Суха субстанция 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМВ)- Основният разтвор на ТМВ е приготвен чрез разтваряне 1 mg/ml в Диметил сулфоксид (DMSO). Работният разтвор се приготвя чрез разреждане на 1 ml от DMSO изходния разтвор с 9 ml фосфатно-цитратен буфер, pH 5,0 и след това добавяне на 2 µl пресен 30% водороден пероксид на 10 ml субстрат/буферен разтвор непосредствено преди употреба.
9. PBS буфер(готов за ползване)

а. Индиректна ELISA

1. 100 µl от предварително разтворен Лиофилизиран рекомбинантен протеин α-Hemolysin с концентрация (1,0.5,0.25,0.125) µg/ml се накапват в 4 ямки от всяко разреждане на две плаки еднакво. Така плаките се инкубират на 37°C за 1h
2. Съдържанието на плаката се отстранява се и се минава към следващ етап блокиране

3. Накапват се по 200 μ l 1% BSA във всички ямки и се инкубират на 37°C за 1h
4. Съдържанието на плаката се отстранява и плаката се подсушава нежно и внимателно с леки потупвания върху хартия неотделяща власинки.
5. Накапват се по 100 μ l Интравенозен имуноглобулин(предварително разреден 1:100) и едната плака се инкубира на 37°C за 1h а другата 4°C за 24h (с цел проверка на по добри взаимодействия на антиген-антитяло при продължителност)
6. Съдържанието се отстранява и плаката се промива с 300 μ l 3 пъти с миеш разтвор за ELISA с pH 7.2–7.6 (предварително разреден)
7. Накапват се по 100 μ l Анти-човешко IgG специфично срещу FC фрагмента антитяло свързано с пероксидаза и се инкубира на 37°C за 1h
8. Съдържанието се отстранява се и плаката се промива 300 μ l 3 пъти с 10 пъти концентриран миеш разтвор за ELISA с pH 7.2–7.6 (предварително разреден)
9. Накапват се по 100 μ l субстрат TMB за 15 минути на стайна температура
10. Накапват се по 100 μ l Стопиращ разтвор, съдържащ 0.5 моларна сярна киселина за 5 минути на стайна температура.
11. Отчитане спектрофотометрично (450nm, BioTek Epoch Microplate Spectrophotometer)

b. Санвич ELISA

1. 100 μ l от предварително разрежено (1,0.5,0.25,0.125) μ g/ml неконюгирано заешко поликлонално антитяло срещу *Staphylococcus aureus* Alpha-hemolysin с чистота >90% се накапват в 4 ямки от всяко разреждане на две плаки еднакво и така плаките се инкубират на 37°C за 1h
2. Съдържанието на плаката се отстранява се и се минава към следващ етап блокиране
3. Накапват се по 200 μ l 1% BSA във всички ямки и се инкубират на 37°C за 1h
4. Съдържанието и плаката се отстранява и плаката се подсушава нежно и внимателно с леки потупвания върху хартия неотделяща власинки.
5. 100 μ l от предварително разтворен Лиофилизиран рекомбинантен протеин α -Hemolysin с концентрация (1,0.5,0.25,0.125) μ g/ml се накапват в 4 ямки от всяко разреждане на две плаки еднакво. Така плаките се инкубират на 37°C за 1h
6. Съдържанието се отстранява и плаката се промива с 300 μ l 3 пъти с 10 пъти концентриран миеш разтвор за ELISA с pH 7.2–7.6 предварително разреден)

7. Накапват се по 100 μ l Интравенозен имуноглобулин (предварително разреден 1:100) и едната плака се инкубира на 37°C за 1h а другата 4°C за 24h (с цел проверка на по добри взаимодействия на антиген-антитяло при продължителност)
8. Съдържанието се отстранява и плаката се промива с 300 μ l 3 пъти с миеш разтвор за ELISA с pH 7.2–7.6 (предварително разреден)
9. Накапват се по 100 μ l Анти-човешко IgG специфично срещу FC фрагмента антитяло свързано с пероксидаза и се инкубира на 37°C за 1h
10. Съдържанието се отстранява и плаката се промива с 300 μ l 3 пъти с миеш разтвор за ELISA с pH 7.2–7.6 (предварително разреден)
11. Накапват се по 100 μ l субстрат TMB за 15 минути на стайна температура
12. Накапват се по 100 μ l Стопиращ разтвор, съдържащ 0.5 моларна сярна киселина за 5мин на стайна температура.
13. Отчитане спектрофотометрично (450nm, BioTek Epoch Microplate Spectrophotometer).

7. Статистическа обработка на резултатите и обработка на библиографията

Данните са обработени статистически с специализиран софтуер GraphPad 9.0. За подреждане на библиографията е използван специализиран софтуер: Zotero.

IV РЕЗУЛТАТИ

1. Изотипове и подкласове на имуноглобулини, присъстващи в Интравенозен имуноглобулин (Имуновенин-интакт 5%)

Имуновенин Интакт 5% е Български продукт произвеждан в БулБио-НЦЗПБ ЕАД София. Този препарат се получават от обединена човешка плазма с минимален размер от 6000 донора. IVIG продуктите съдържат специфични антитела, което води до неутрализиране на широк спектър от специфични антигени, включително патогени. В допълнение, IVIG препаратите от човешка обединена плазма се възползват от поликлоналния отговор на всеки отделен донор. IVIG е показан като заместителна терапия при пациенти с първичен и вторичен имунен дефицит. Тези състояния се характеризират с по-голяма чувствителност към инфекциозни заболявания поради количествени или качествени дефицити на антитела. В допълнение към употребата му при първични и вторични имунни дефицити, IVIG все повече се използва за лечение на голям брой автоимунни и възпалителни заболявания.

В зависимост от географския район, в който живее донорната популация, са докладвани разлики в профилите на антитела в произведените IVIG ¹⁻⁵. Например, имунният статус на донорите на плазма, повлиян от програмите за ваксиниране в общността и излагането на патогени, може да бъде отговорен за вариабилността на нивото на антителата в IgG препаратите от различни географски области. Търговското производство на Българския IVIG включва фракциониране на големи плазмени групи от здрави донори. Това осигурява уникален инструмент за изследване на профила на IgG реактивност в тези популации. Липсват обаче систематични проучвания, корелиращи нивата на патоген-специфични антитела с географския произход на донора.

За по-нататъшно повишаване на разбирането на характеристиките на профилите на IVIG антитела, в това проучване са определени нивата на антитела срещу широк спектър от вирусни, гъбични и бактериални патогени в търговски партии IVIG, получени от донори на територията на цяла България.

Първо бяха анализирани общите характеристики на 11 партии, произведени в рамките на една година (Таблица 2.). Като цяло, променливостта, наблюдавана между партидите, е ниска ($CV\% \leq 2\%$), което показва стабилен и възпроизводим производствен процес.

Таблица 2. Характеристики на продукта и съпътстващи протеини

Параметър	Единица	Средно	SD (CV%)	Брой
Total protein	mg/ml	59,42	1,16(1,95)	11
Gamma globulin	%	99,86	0,28(0,28)	11
pH		6,91	0,04(0,57)	11
Osmolality	mOsmol/kg	445,363	0,94(0,21)	11
D-Manitol	mg/ml	20	N/A	11
Sodium chloride	mg/ml	9	N/A	11
Albumin	mg/ml	10	N/A	11
IgA	mg/ml	0,67	0,01(1,79)	11

След това определихме съотношението в концентрацията на всички класове и подкласове на IgG в изследваните 90 партии. Разпределението спрямо стандартните изисквания, включително и концентрацията на всеки подклас IgG трябва да съответства на референтните стойности в кръвната плазма. Получените резултати от анализа на разпределението на подклас IgG възпроизвежда типичните стойности за човешка плазма (Таблица 3.).

Таблица 3. Разпределение на IgG подклас в IVIG 5%

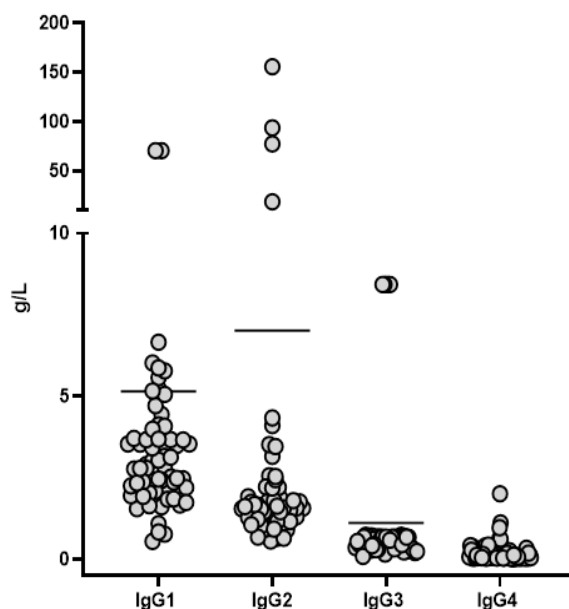
Параметър	Референтна стойност (g/L)	Средно (g/L)	Средно (%)	SD	Брой
IgG1	4.8-12.5	12,41083	65,695	7,907	90
IgG2	2.4-7	3,39919	17,993	2,873	90
IgG3	0.2-2	1,93028	10,217	0,512	90
IgG4	0.04-0.8	0,73347	3,882	2,325	90
IgA	0.8-3	0,27230	1,441	0,184	90
IgE	0-100(kU/L)	0,00038	0,002	0	90
IgM	0.4-2.5	0,14490	0,767	0,058	90

2. Изотипове и подкласове на имуноглобулини, в реконвалесцентната плазма от донори, прекарвали COVID-19

Хуморалният имунен отговор играе ключова роля в защитата на населението от предаване на SARS-CoV-2. Пациенти, преболедували COVID-19, както и напълно ваксинирани лица имат повишени нива на антитела. Динамичните нива на класовете и подкласовете на отговорите на антитела към нови варианти, които се срещат в различни популации, остават неясни. Различните класове подкласове IgG обаче имат различни свойства и ролята им в специфични анти-COVID-19 отговори все още не е определена.

За характеризиране на експресията на различните класове и подкласове и дали някой от тях играе важна роля при разпознаването на вируса и евентуалната неутрализираща активност анализирахме всички донорни ССР (n=90) за количествена концентрация (g/L) на общи имуноглобулини и на IgG подкласове (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM). От изследваните подкласове IgG2 е най-разпространен със средна концентрация от 7,01 g/L, следван от IgG1 (5,15 g/L), IgG3 (1,12 g/L) и IgG4 (0,21 g/L). Средните концентрации на серумните IgA, IgM и Ig E са съответно 0,5 g/L, 3,34 g/L, 0,0006 g/L. Значително високата средна концентрация на IgG2 се дължи на висока концентрация в 4 от изследваните проби (19-155 g/L) (Фигура 4.). Високите нива на IgG2 е възможно да се дължат на наличие на бактериална инфекция по време на кръводаряването.

Ако не вземем в предвид тези повишени нива на IgG2 получаваме референтни стойности както за класовете така и за подкласовете, което показва, че няма ясна изразена експресия на определен тип антитяло при преболедували хора, което да има отношение срещу SARS Cov-2.



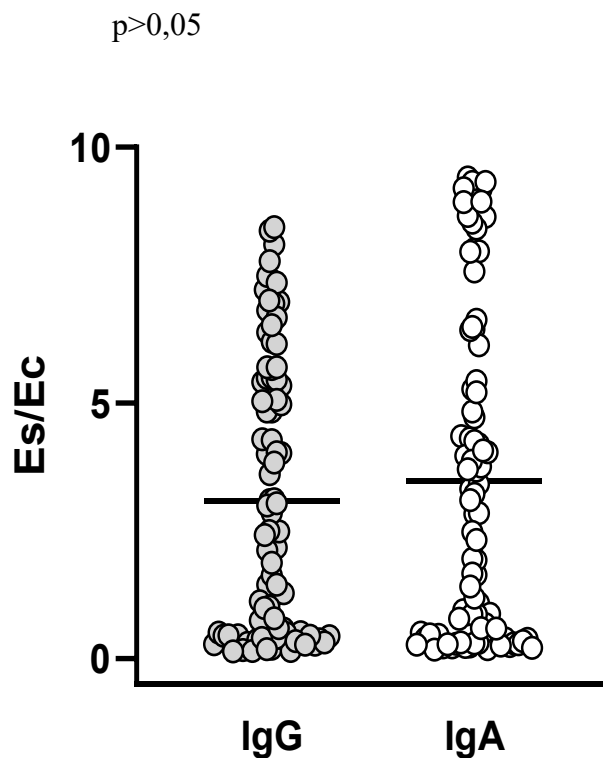
Фигура 4. Концентрация на IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 в тествани CCP. Средното ниво на всички подкласове IgG е в референтните граници.

3. Нива на SARS-CoV-2 специфични IgG и IgA в IVIG 5% и CCP

Различни фактори по време на инфекцията могат да окажат влияние върху качествата на адаптивния имунен отговор и формирането и на циркулиращи антитела. От практическа гледна точка представляват интерес показателите, отразяващи ефективен протективен имунен отговор и ефекта при евентуална необходимост за пасивна имунизация.

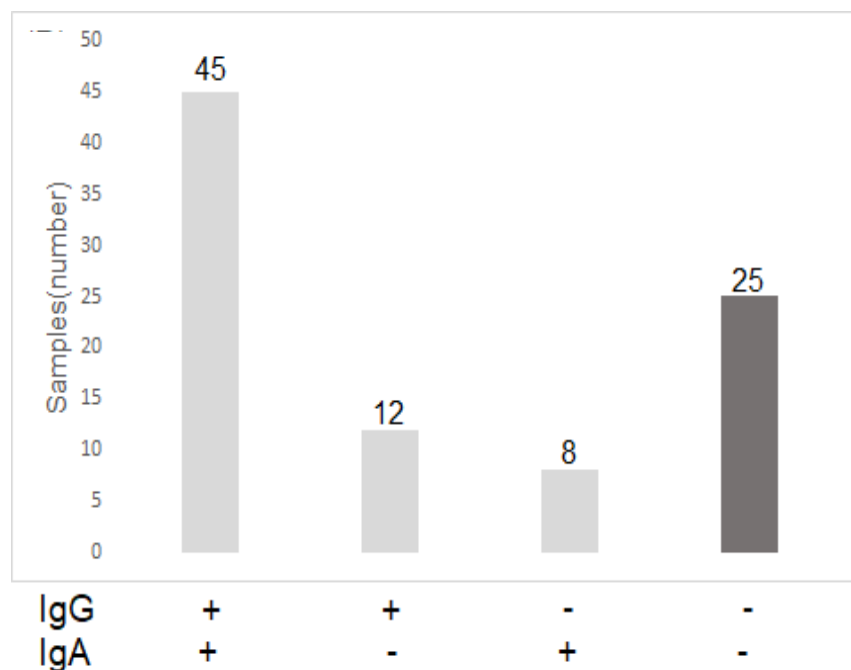
За целта е направен детайлен анализ на циркулиращите RBD- IgG и RBD-IgA в проби от донорска CCP от хора скоро оздравели след лабораторно доказано положителен тест за SARS Cov-2.

SARS-CoV-2 RBD-специфичен IgG се открива в 63% (57/90) от изследваните проби. Средното ниво на RBD-специфичен IgG в положителните проби е със стойности $3,11 \pm 2,9$. Anti SARS-CoV-2 IgA е открит в 59% (53/90) от пробите със средни стойности $3,50 \pm 2,27$. При сравнителен анализ на нивата на двата вида анти-SARS-CoV-2 специфични имуноглобулини не се наблюдават значими разлики при тяхната експресия значително (unpaired t-test, $p > 0,05$) (Фигура 5.)



Фигура 5. Съдържание на RBD-IgG и RBD-IgA. Нива на анти-SARS-CoV-2 специфични IgG и IgA, съотношение на RBD-IgG и RBD-IgA

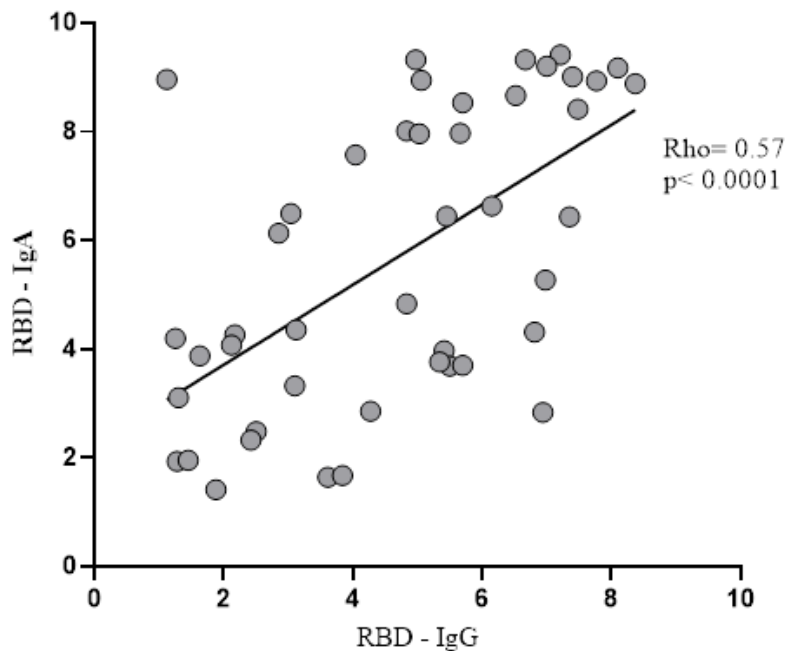
Същевременно установихме конкордантно производство на двата класа специфични имуноглобулини в 50% от тестваните плазмени проби. При останалите 12 (13.3%) се наблюдават високи нива само RBD-IgG-позитивни, при други 8 (8.8%) има експресия само на RBD-IgA. Въпреки лабораторно доказано боледуване от вирусна COVID 19 инфекция (прекарана скоро преди кръвовземането) не малък процент 25 (27.7%) бяха двойно отрицателни (Фигура 6.).



Фигура 6. Конкордантност на експресията на IgG и IgA, брой на RBD-IgG и RBD-IgA двойно положителни, единични положителни и двойно отрицателни.

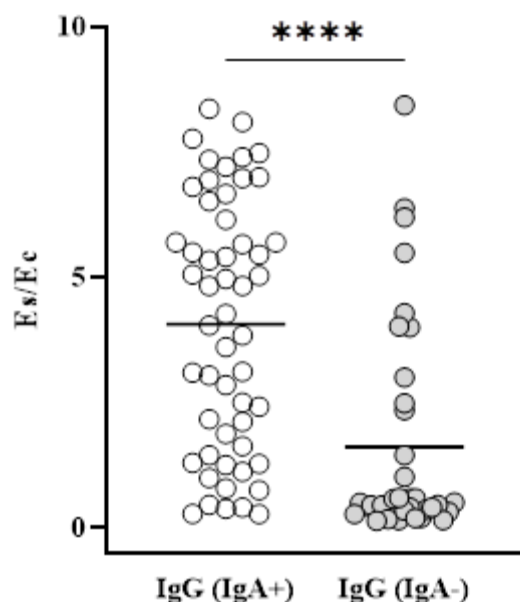
Допълнителен анализ на средните нива на RBD-IgA в IgA-единично положителни и двойно положителни проби показва сходни стойности: 3,33 срещу 3,50 ($p>0.05$). Подобни средни нива са наблюдават и за SARS-CoV-2 специфичния IgG при сравняване на RBD-IgG еднократно положителни и двойно положителни проби (3,07 срещу 3,11, $p>0.05$). Това показва че няма изразена корелация между експресията на RBD-IgA при наличие на експресиран RBD-IgG. Но от друга страна съществува значителна корелация между нивата на RBD-IgG и RBD-IgA в двойно положителните проби. $Rho=0.57$, $p<0.0001$, (Фигура 7.).

Поради липсата на данни за тежестта на протичането на инфекцията не можем да твърдим, но предполагаме, че при по-тежко протичаща инфекция имаме по-висок титър на антитела, което обяснява корелацията между двата типа специфични антитела при двойно положителните. Също така може да се касае за по-скорошна инфекция и наличие на серумни специфични антитела.



Фигура 7. Корелация между нивата на RBD-IgA и RBD-IgG в двойно положителните проби ($R=0.57$, $p<0.0001$).

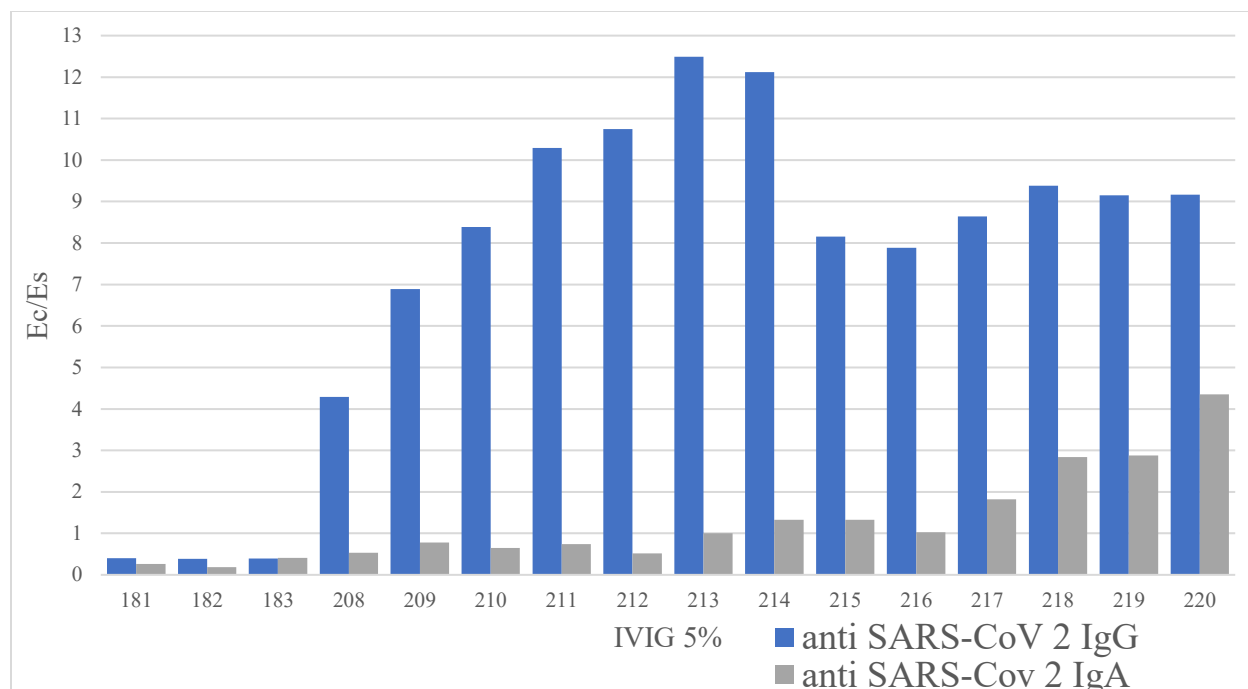
За да оценим евентуалното съотношение на експресия на RBD-IgG при налична експресия на RBD-IgA сравнихме нивата на специфично IgG при RBD-IgA положителни и отрицателни. При анализа на данните, представени на Фигура 8. при 14 проби се наблюдават значително по-високи стойности на RBD-IgA в границите от 8,64 до 9,41. Само една проба беше единично положителна за RBD-IgA, останалите 13 бяха двойно положителни със стойности на RBD-IgG, вариращи от 1,12 до 8,37. Наблюдава се значително по-високо ниво на RBD-IgG експресирано при RBD-IgA-позитивните проби в сравнение с RBD-IgA-отрицателните (3,03 срещу 3,11, $p<0,0001$).



Фигура 8. Анти SARS-CoV-2 IgG нива в RBD IgA-положителни и RBD IgA-отрицателни проби. Значително по-високо ниво на RBD-IgG беше открито в RBD-IgA-позитивните проби в сравнение с RBD-IgA-отрицателните (3,03 срещу 3,11, $p < 0,0001$)

Голям брой от общото население е заразено с SARS-CoV-2. С високи нива на инфекция и ваксинации сред общото население продуктите от здрава донорска плазма, а именно интравенозни имуноглобулини (IVIG), вече съдържат антитела срещу COVID-19. Проучванията за неутрализиране с див тип SARS-CoV-2 вирус показват, че IVIG продуктите имат неутрализиращ потенциал, което повдига въпроса дали IVIG предлага защитна или терапевтична полза в продължаващата пандемия.

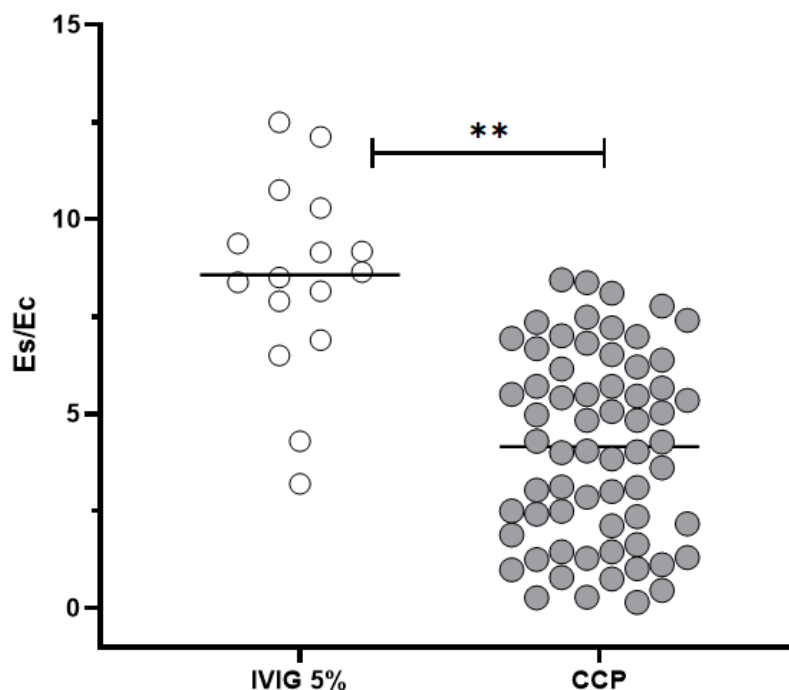
Наличието на RBD-IgG и RBD-IgA, въпреки много ниската концентрация в продукта на IgA, е анализирано в 13 (208-220) партии Имуновенин – интакт 5%, произведени от плазми на донори по време на Ковид пандемията и 3(181-183) контролни партии, произведени преди началото на пандемията. Бяха определени и SARS-CoV-2-свързващи IgA и IgG. Получените резултати показват значително увеличение на специфично IgG спрямо контролните групи в началото на пандемичния период и постепенно покачващи се нива на специфично IgA(Фигура 9.).



Фигура 9. Сравнителен анализ на съдържанието на RBD-IgG и RBD-IgA в партии Имуновенин Интакт 5 % произведени от плазми събрани по време на COVID-19 пандемията($n=13$) с партии произведени преди началото на пандемията($n=3$).

Въпреки че са изследвани няколко терапевтични стратегии, оптималният подход за лечение на пациенти с COVID-19 остава да бъде изяснен. Този сравнителен анализ има за цел да оцени ефикасността и безопасността на терапията с поликлонален интравенозен имуноглобулин IVIG и COVID-19 реконвалесцентна плазма.

Сравнителният анализ на SARS-CoV 2 RBD – специфични IgG антитела в Имуновенин-интакт 5% IgG и CCP показва, че средното ниво на RBD-специфични IgG в 16 партии е 7.4 ± 3.9 и е значително по-високо в сравнение с групата от 64 CCP. (4.1 ± 2.4 , $p=0.005$). (Фигура 10.)



Фигура 10. Нива на анти-SARS-CoV-2 специфично IgG съотношение на RBD-IgG в IVIG 5% и контролна група (CCP) ($p=0,005$).

4. Неутрализираща активност срещу SARS-CoV-2 варианти в реконвалесцентни плазмени проби и в IVIG 5%.

За детайлно характеризиране на наличните циркулиращи антитела в изследваните донорски плазми положителните проби за RBD-IgG и/или RBD-IgA ($n=65$) бяха допълнително анализирани за тяхната неутрализираща активност срещу S1 протеина на шест варианта на SARS CoV-2: див тип, B.1.617.2 (δ), P.1 (γ), B.1.351 (β), B.1.1.529 (omicron) и B.1.1.7 (α).

При анализа на получените данни се наблюдава отсъствие на неутрализираща активност срещу всички от тествани подтипове и се отразява само в 12,3% (8/65) от тестваните проби. Останалите 57 са неутрализиращи за някои или всички варианти на SARS CoV-2.

Най-ниският положителен резултат 39/57 (68,4%) е открит за γ варианта. (Таблица 4.) Средната неутрализираща активност варира от 54,2% за Delta S1 до 85,4% за Omicron. Въпреки факта, че по време на събирането на донорската плазма на територията на България беше активен α варианта при изследването се откриват антитела срещу варианти, които дотогава не са съществували. От получените резултати можем да кажем, че

неутрализиращата активност на реконвалесцентната плазма има пълна неутрализираща ефективност при прилагане и в по късен етап при наличие на нови мутации на същия вирус.

Таблица 4. Неутрализираща активност на тествани CCP за варианти на SARS-CoV-2. Проценти положителни проби и проценти на неутрализация за шестте варианта на SARS-CoV-2.

Проба /Таргетен протеин	S1 protein (wild type)	Spike B117 (Alpha)	Spike B1351 (Beta)	Spike P1 (Gamma)	Spike B16172 (Delta)	Spike B11529 (Omicron)
% позитивен	51 (89.5%)	49 (86%)	48 (84%)	39 (68.4%)	48 (84%)	49 (86%)
% неутрализация (средно)	68.7%	75.3%	71.6%	71.4%	54.2%	85.4%

За по-подробно характеризиране е направен сравнителен анализ на различните комбинации от неутрализираща активност за различните варианти на SARS CoV-2 на тестваните CCP, които са показани в таблица 5.

При 39/57 (68,42%) от тестваните проби са намерени неутрализиращи антитела за всички подтипове на варианти на SARS CoV-2 и почти всички (94,7%) могат да неутрализират повече от един вариант. Това потвърждава твърдението ни за ефективността на пасивната имунизация при спешни случаи дори и в по-късен етап при развитието на една световна пандемия.

Таблица 5. Модели на неутрализираща активност за шест варианта на SARS CoV-2 на RBD-положителни проби

Комбинация от SARS CoV-2 варианти: S1 wild type (1), Spike B117 (2), Spike B1351(3), Spike P1(4), Spike B16172(5), Spike B11529 (6)	Брой проби със съответния специфичен профил на откритите неутрализиращи антитела
1,2,3,4,5,6	39
1,2,3,4,6	2
1,2,3,5,6	6
1,2,4,5,6	1
1,3,4,6	2
1,2,3,5	1
1,2,5,6	2
1,2,5	1
1,3,4,5,6	1
6	1
1	1

Би следвало при плазми с по високи нива RBD-IgG или RBD-IgA да се появява по висок процент на неутрализация поради наличието на повече специфични антитела. Тоест дали RBD антитела освен свързване на S1 протеина намиращ се по повърхността на вируса могат да се явяват като неутрализиращи антитела.

От анализа на получените резултати не се установява корелация между нивото на RBD-IgG или RBD-IgA и общата неутрализираща активност на RBD-позитивните проби ($p > 0.05$).

След доказването на високи концентрации на специфично IgG в продукта за утвърдяване на евентуалния потенциал за пасивна имунизация и лечение пациенти в тежка фаза на заболяването IVIG (n=13) бяха анализирани за тяхната неутрализираща активност срещу протеина S1 на шест варианта на SARS CoV-2: див тип, B.1.617.2 (δ), P.1 (γ), B.1.351 (β), B.1.1.529 (omicron) и B.1.1.7 (α). Не намерихме липса на неутрализираща активност за всички подтипове във всички тествани проби. Най-нисък положителен резултат е открит за

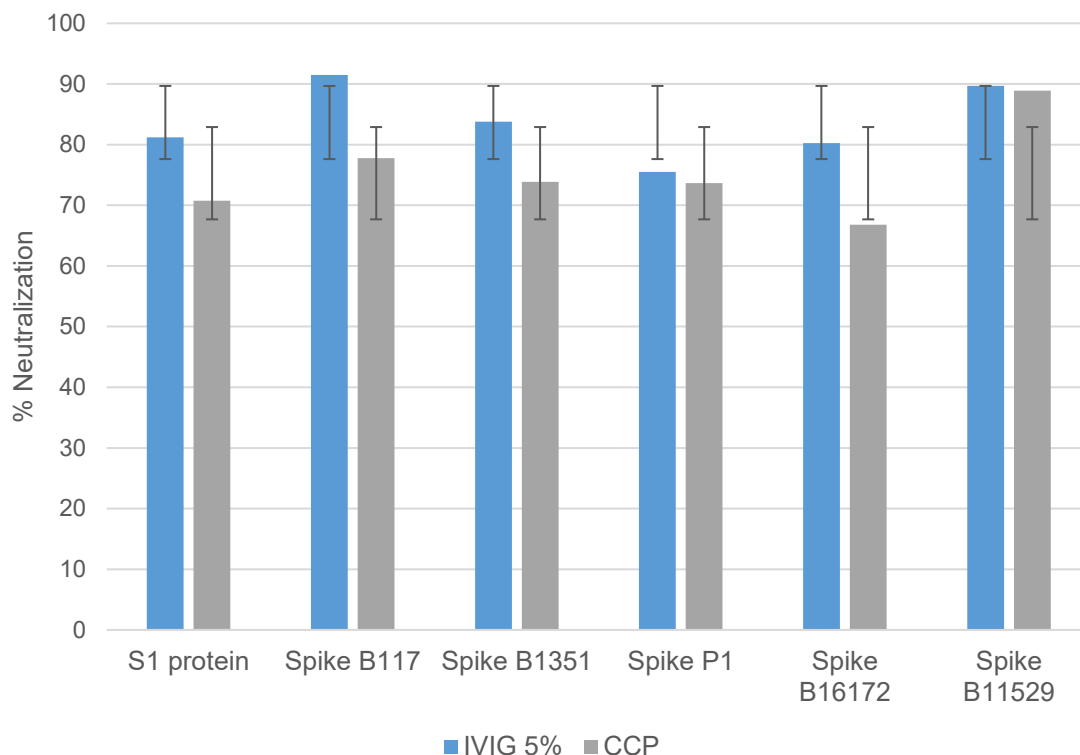
γ варианта докато най-висок процент на неутрализация е намерен срещу Alpha варианта (Таблица 6.).

Високите проценти на неутрализация показват, че потенциала на кръвните продукти като IVIG при използването му за лечение на пациенти, при който липсва друга алтернатива за подобряване на състоянието, може да се окаже надежден. С насоки към по специфично охарактеризиране и набор от научни и клинични данни за ефективността, този продукт може да бъде ефективно използван в редовната практика, но и при ново появили се неизвестни вирусни пандемии в началото, когато липсват алтернативни лечения.

Таблица 6. Неутрализираща активност на тествания IVIG 5% за SARS-CoV-2 варианти.
Проценти на неутрализация за шестте варианта на SARS-CoV-2

Таргетен протеин	S1 protein	Spike B117	Spike B1351	Spike P1	Spike B16172	Spike B11529
% неутрализация (средно)	81,2	91,5	83,8	75,5	80,2	89,7

От предишните анализи установихме, че няма зависимост между титъра на специфични антитела и неутрализиращият им ефект. Но все пак направихме сравнителен анализ на неутрализиращата ефективност на IVIG и ССР. Средната неутрализираща активност варира от 75,5% за γ S1 до 91,5% за α варианта, но не беше установена значителна разлика с ССР (n=64) (unpaired t-test $p > 0,05$) (Фигура 11.)

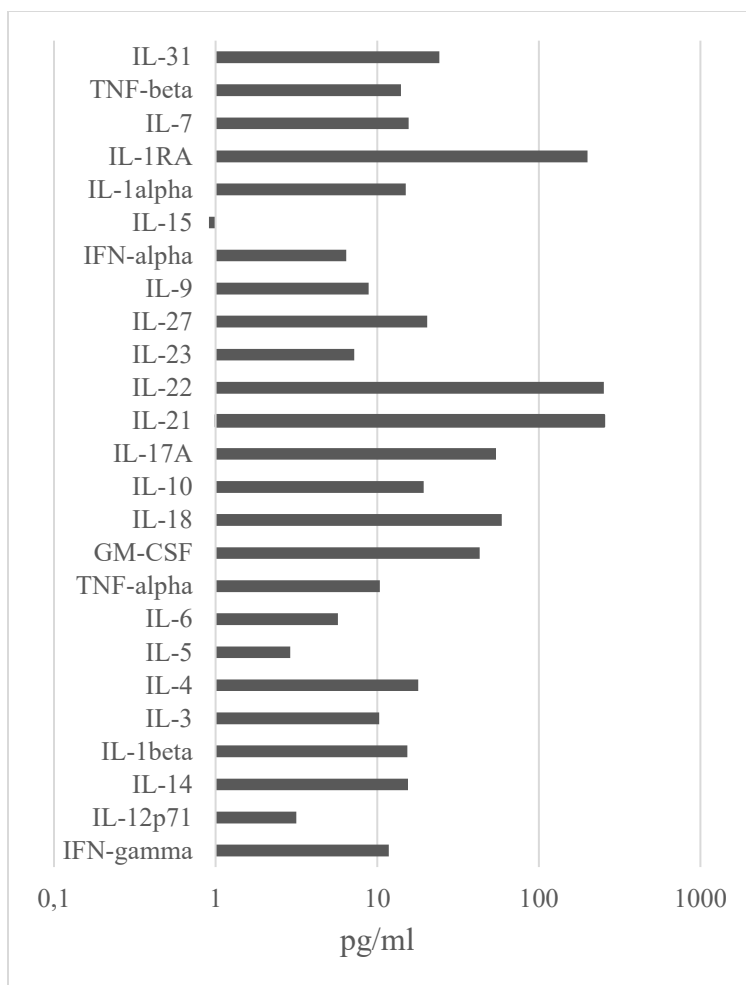


Фигура 11. Сравнение на неутрализиращия потенциал за шестте варианта на SARS-CoV-2 на IVIG 5% и CCP. Не са установени значими разлики (несдвоен *t*-тест $p > 0,05$).

5. Цитокинов профил - CCP и сборни плазми

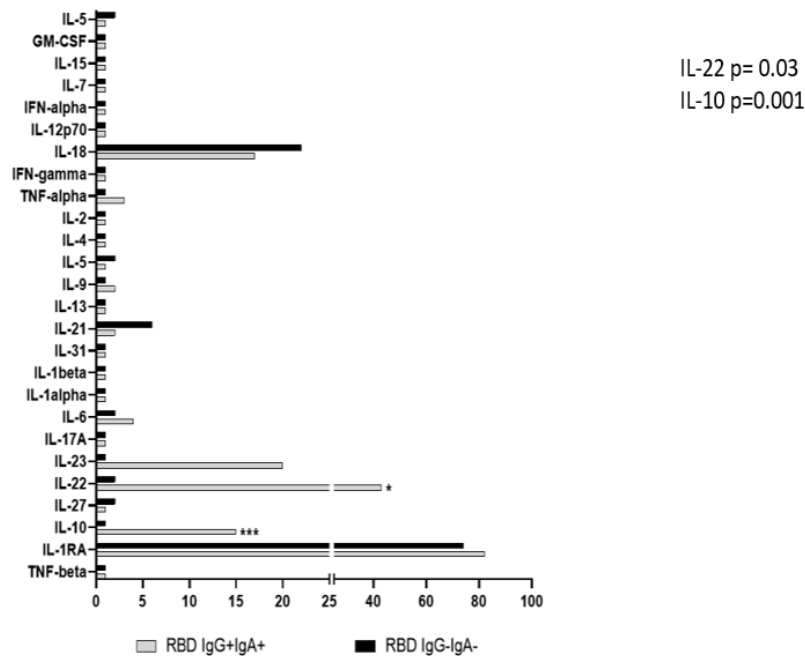
Ефикасността на реконвалесцентната плазма от коронавирусна болест 2019 се приписва основно като източник на неутрализиращи антитела срещу коронавирус 2 на тежък остър респираторен синдром. Въпреки това, съставът на други имунни компоненти в CCP и техните потенциални роли остават до голяма степен неизследвани.

Този анализ има за цел да опише състава и концентрациите на плазмени цитокини в донори на CCP. (Фигура 12.) Във всички анализирани проби се наблюдават значително повишени концентрации на IL-18 със средно ниво от 54,05 pg/ml. IL-27 е повишен в 92,2% (83/90) от пробите, (средно 18,23 pg/ml), а IL-1RA – в 76/90 (84,4%) (средно 222,96 pg/ml). Само 1/90 CP проби (двойно положителни) са със значително висока концентрация на IL-9 от 751,89 pg/ml (ниво на откриване = 8,23 pg/ml) и 1/90 (двойно отрицателни) проби с концентрация на IL-18 от 217 pg/ml (9,84 pg/ граница на откриване).



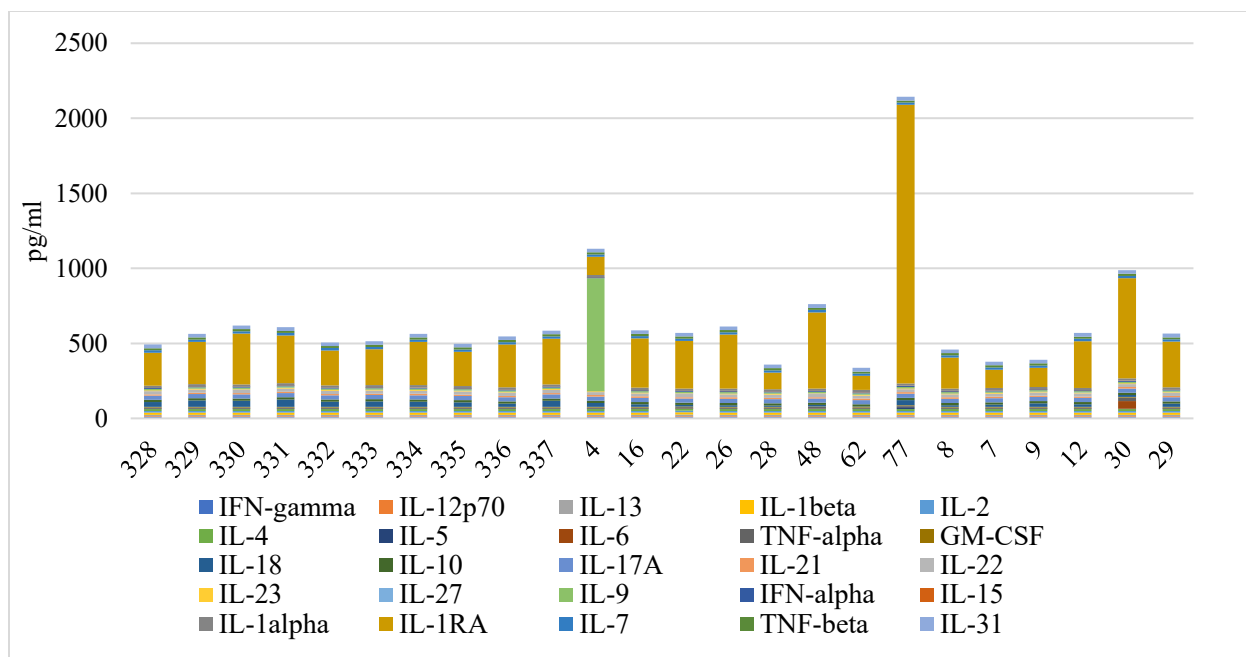
Фигура 12. Средна концентрация на тестваните 25 цитокини в 90 проби ковид реконвалесцентна плазма

Освен това е направен сравнителен анализ на 45-те двойно положителни (RBD-IgG+ RBD-IgA+) с 25-те RBD-отрицателни проби, за да видим дали някои значителни разлики в концентрациите на цитокини могат да обяснят липсата на вирус-специфични имуноглобулини (Фигура 13.). Наблюдавахме значителни статистически разлики само в два цитокина, IL-22 ($p=0,03$) и IL-10 ($p=0,001$) в RBD-двойно положителна група с кратно увеличение IL-22 (~40) и IL-10 (~15) в сравнение с RBD-двойно отрицателни RBD-IgA единични положителни серуми не се различават значително в концентрациите на цитокини от RBD-IgA отрицателен също. Същото се наблюдава при еднократно положителни RBD-IgG и RBD-IgG – отрицателни.



Фигура 13. Многократно увеличение на нивото на 25 тествани цитокини. Значителни статистически разлики само в два цитокина, IL-22 ($p=0,03$) и IL-10 ($p=0,001$) в RBD-двойно положителна група скратно увеличение на IL-22 (~40) и IL-10 (~15).

Направихме сравнителен анализ да оценим наличието на цитокинова експресия на сборни плазми за производство на Имуновенин – интакт 5%, събрани по време на Covid-19 пандемията и хиперимунни плазми от индивидуални донори, преболедували Covid-19. Проучването показва увеличена експресия на основен противовъзпалителен цитокин IL-1RA в три и IL-9 в една хиперимунна донорска плазма, докато при сборните плазми не се откриват повишени нива на цитокини (Фигура 14.).

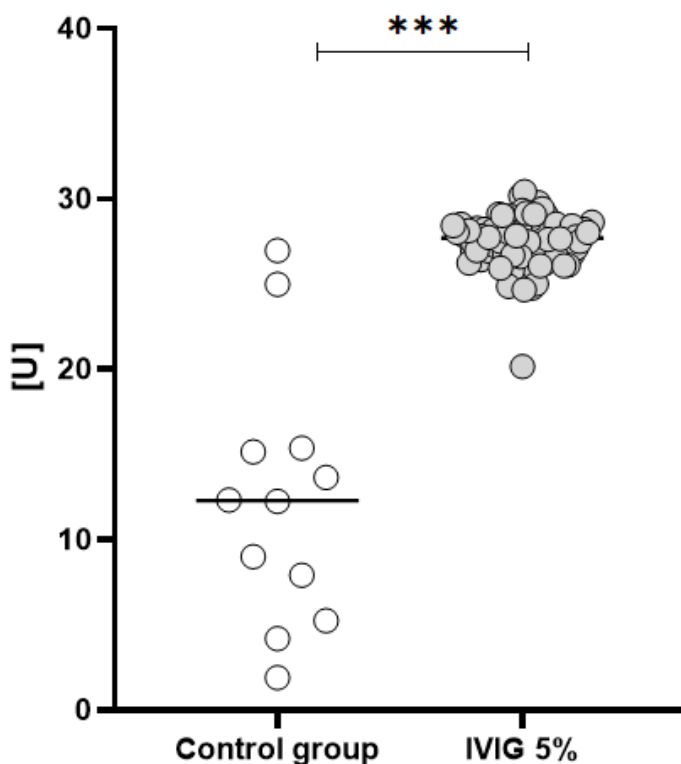


Фигура 14. Сравнителен анализ на цитокинов профил при сборни плазми(328-337) за производство на Имуновенин – интакт 5%, събрани по време на Covid-19 пандемията и хиперимунни плазми от индивидуални донори, преболеждали Covid-19.

6. Антитела срещу *Candida albicans* в IVIG 5%

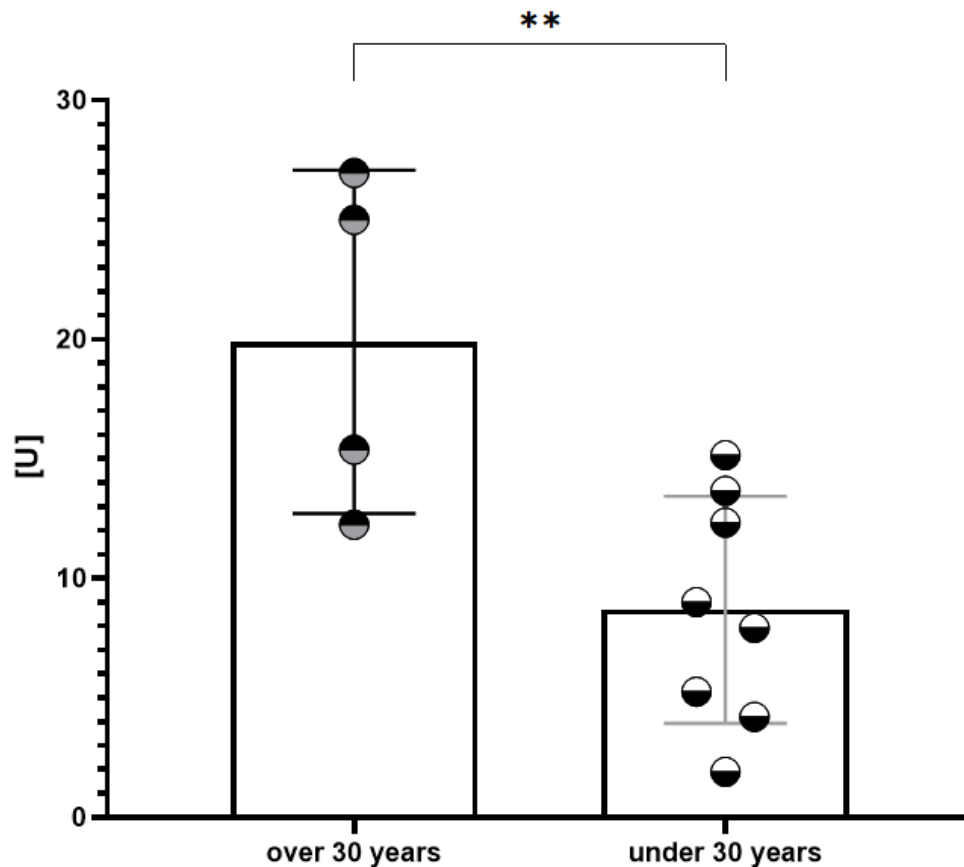
Инфекциите с *Candida albicans* продължават да бъдат сериозен клиничен проблем по отношение на високата им заболяемост и смъртност^{6,7}. Взаимодействието между гъбичния патоген и неговия гостоприемник се осъществява на нивото на клетъчната стена, която се състои главно от полизахариди, свързани с протеини и липиди. Най-вътрешните слоеве на *Candida albicans* са съставени от гъста мрежа от полизахариди, състояща се от глюкани (β -1,3 и β -1,6 свързана глюкоза) и хитин (полимер на β -1,4-свързан N-ацетилглюкозамин)⁸. Гъбичните полизахариди се отделят в кръвообращението по време на инфекцията и тяхното откриване позволява ранна диагностика на инвазивна гъбична инфекция.

За да оценим ролята на терапията с IVIG в елиминирането на гъбички анализирахме наличието на специфични антитела срещу *Candida albicans*. Анализът на 90 партии IVIG 5% за наличие на антитела срещу *Candida albicans* показва, че всички изследвани проби са положителни със средно ниво $27,4 \pm 1,4$. За сравнение, от 12 произволно избрани контролни серума 5 са отрицателни, а 7 - положителни (средно $\pm$ SD 17.2 ± 7.6) (Фигура 15.).



Фигура 15. Сравнителен анализ на анти-*Candida albicans* IgG в IVIG 5% спрямо контролни серуми. са установени значително по-високи нива в IVIG 5% спрямо контролни серуми (несдвоен *t*-тест $p < 0,0001$).

Candida albicans е често срещан обитател в нормалната микрофлора на човека. За да покажем значението на продължителността на контакт с определен микроорганизъм и при евентуалната селекция на донори за по ефективен резултат при евентуално лечение на пациенти с тежка инфекция, разделихме контролните серуми в две групи по възраст над 30 (n=4) и под 30 години. Анализ на получените данни показва сравнително по високи средни стойности при групата над 30 ($25,9 \pm 1,3$) в сравнение с групата под 30 ($9,7 \pm 4,7$) години, като unpaired t-test показва статистически значима разлика ($p < 0,0001$) (Фигура 16.).



Фигура 16. Сравняването на контролната група по възраст над 30 ($n=4$) и под 30 ($n=8$) показва значителна разлика (несдвоен t -тест $p<0,0001$).

7. Антитела срещу *Staphylococcus aureus* в IVIG 5%

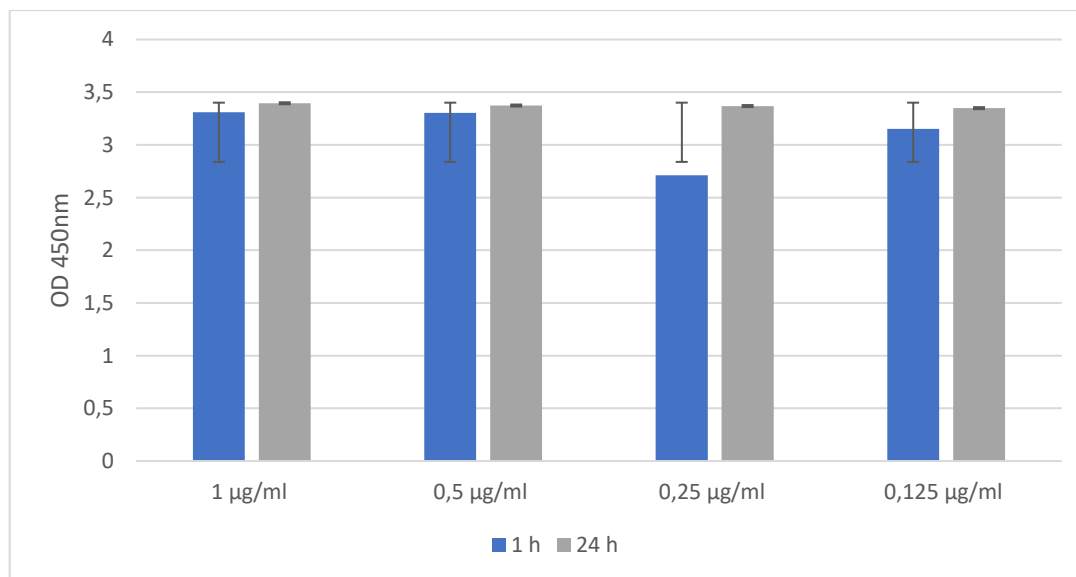
Staphylococcus aureus е често срещан инвазивен патоген в нашите страни и е причинител на честа заболяемост и смъртност. Способността на *S. aureus* да произвежда различни мощни цитолитични токсини и пептиди е основен механизъм за избягване на имунния отговор на гостоприемника и играе критична роля в патогенезата⁹. Двуконпонентните левкоцидини - гама-хемолизини (HIgAB и HIgCB), левкоцидин на Panton-Valentine (PVL), LukED и LukAB (известен също като LukGH) и alpha-hemolysin (Hla) - са група образувачи пори токсини, способни да лизират човешки клетки. Нарастващото разпространение на резистентни към антибиотици щамове *S. aureus* подчерта необходимостта както от подходи за активна, така и от пасивна имунизация. Интравенозният имуноглобулин е препарат с поликлонални антитела, който е предложен като допълнителна терапия при тежки

стафилококови и стрептококови инфекции^{10,11}. Предишни проучвания са изследвали способността на IVIG да неутрализира токсините от *S. aureus*, включително левкоцидин на Panton-Valentine (PVL), хемолизин и токсин-1 на синдрома на токсичен шок (TSST-1)^{12,13}. Като се има предвид честата клинична употреба на IVIG за тежки инфекции, причинени от *S. aureus*, подобряването на нашето разбиране за функционалните свойства на антителата, проявявани от този терапевтик, е от съществено значение.

7.1.Разработка на ELISA метод за анализ на Hla от *S. aureus*

За изследване наличието на Hla от *S. Aureus* в Имуновенин-интакт 5%, разработихме два ELISA метода (директна и сандвич).

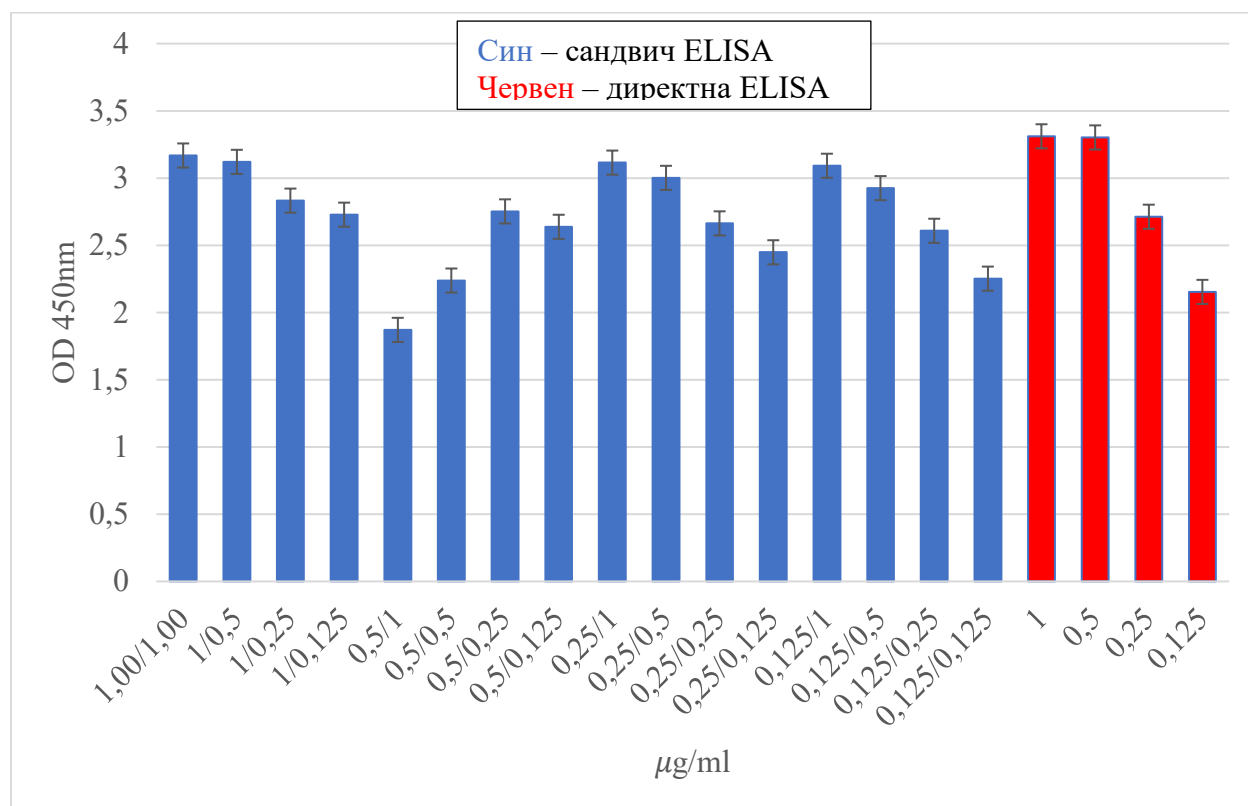
Анализ на резултатите не показва значителна разлика при стабилността на взаимодействие антиген-антитяло между двата типа ELISA методи. Това ни води към извода, че няма никаква зависимост между антиген-антитяло реакцията при по-продължителна инкубация (Фигура 17.).



Фигура 17. ELISA анализ на влиянието на времето на инкубация при взаимодействие антиген-антитяло при различни концентрации на антигена (1 µg/ml, 0.5 µg/ml, 0.25 µg/ml и 0.125µg/ml)

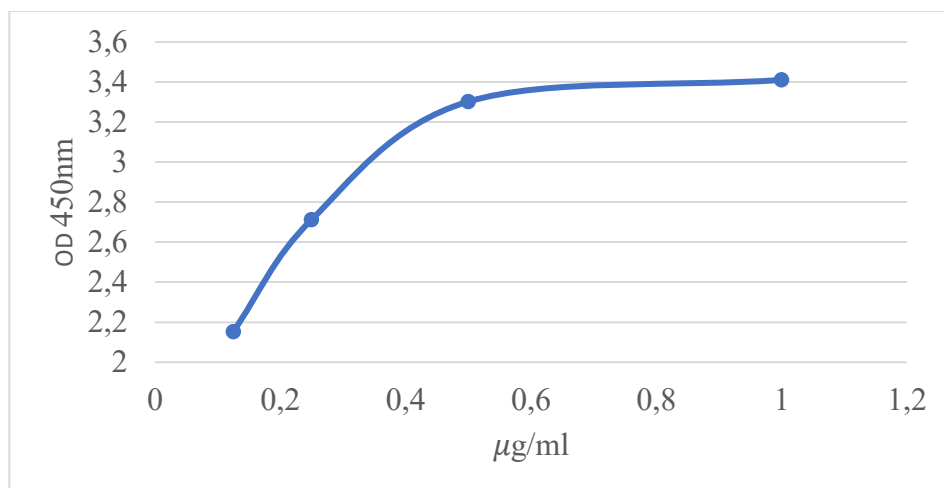
По-нататък анализирахме разлики между двата типа метод (сандвич и индиректна) ELISA. Регистрирахме и че двата типа показват сходни стойности, което улеснява по-нататъшната

разработка за избор на по малко компонентен метод, за да избегнем възможностите за допълнителни грешки при изпълняването на метода (Фигура 18.).



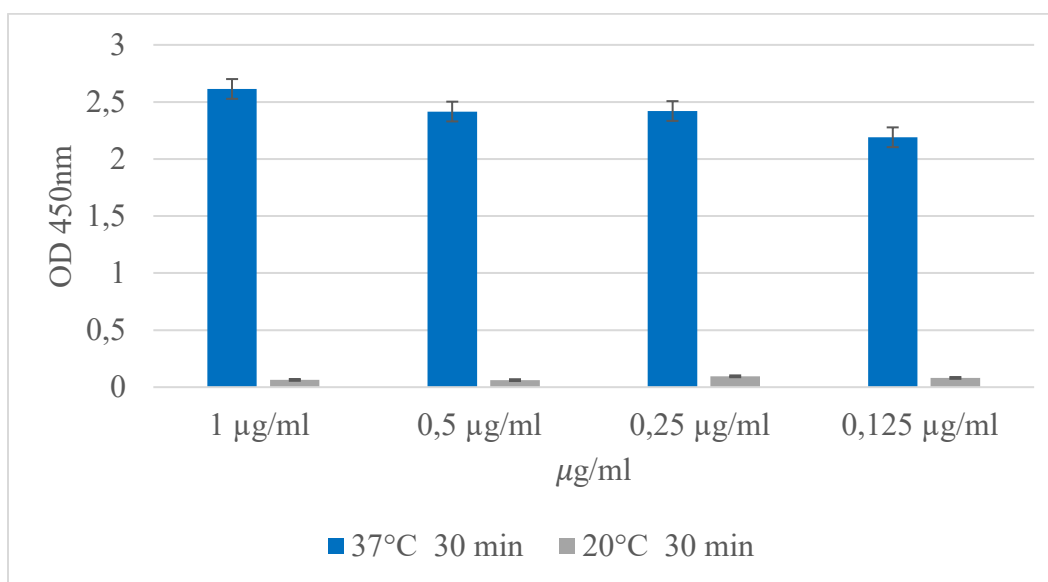
Фигура 18. Сравнителен анализ на двата типа (директна и сандвич) ELISA метод

След това анализирахме дозовата зависимост при нарастващите количества имобилизиран антиген (H1a) и Интравенозния имуноглобулин. Регистрирахме дозово зависимо взаимодействие с насищане при 1 µg/ml в ямка H1a (Фигура 19.).



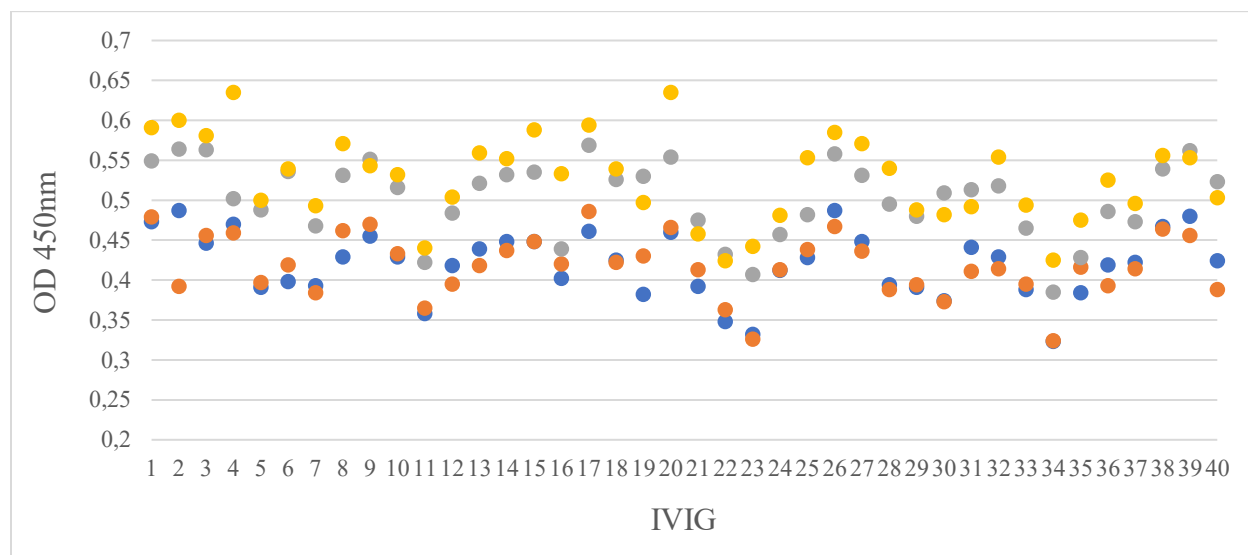
Фигура 19. ELISA анализ на дозова зависимост на H1a при взаимодействие с антителата.

Получените сигнали и стойности на оптична плътност при измерване на реакцията са високи. За да се предотвратят фалшиво положителни резултати е направен анализ на продължителността на инкубация и температурата по време на инкубиране. За тази цел две идентични плаки бяха инкубирани на 37°C и стайна температура около 20°C за 30 минути. Получените резултати показват значимо голяма разлика между двете температури като при 20°C не се наблюдава никаква реакция докато при 37°C се наблюдава взаимодействие с по нисък интензитет от този инкубиран на 1 час на 37°C (Фигура 20.).



Фигура 20. ELISA анализ на влиянието на температурата върху взаимодействието антиген-антитяло

След оптимизиране на протокола за работа на ELISA анализа бе необходимо да се валидира метода 4кратно, за да се утвърди точност и стабилност. За тази цел всеки ден по един и същ установен вече протокол, 4 последователни дни се изработиха 40 проби от Интравенозен имуноглобулин като една проба се анализира на 4 ямки. Анализ на получените резултати ни показва висока стабилност на ELISA метода (Фигура 21.).

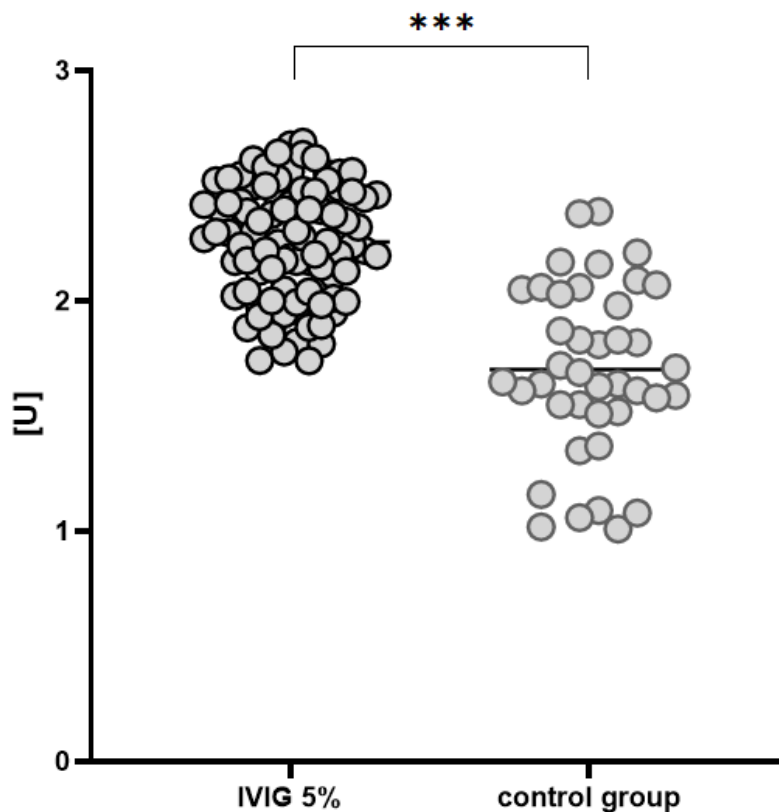


Фигура 21. Валидиране на оптимизирания протокол за ELISA метода.

7.2. Анализ на 90 партии IVIG 5%

Изследваните 90 партии от IVIG 5% бяха анализирани за наличие на IgG срещу *Staphylococcus aureus* алфа-хемолизин (Hla). Като контролна група са използвани серуми от здрави донори 20<30 години и 20>30 години. Ние наблюдавахме нива от $2,21 \pm 0,36$ U за 88/90 положителни IVIG 5% проби в сравнение с контролната група, всички положителни със средно ниво $1,7 \pm 0,37$ U. Статистическият анализ на unpaired t-test показва статистически значима разлика ($p < 0.0001$) (Фигура 22.).

Сравнявайки средните нива >30 възраст ($1,8 \pm 0,36$) и <30 възраст ($1,5 \pm 0,30$) контролна група, наблюдавахме сходни нива без статистически значима разлика (unpaired t-test $p > 0,05$).



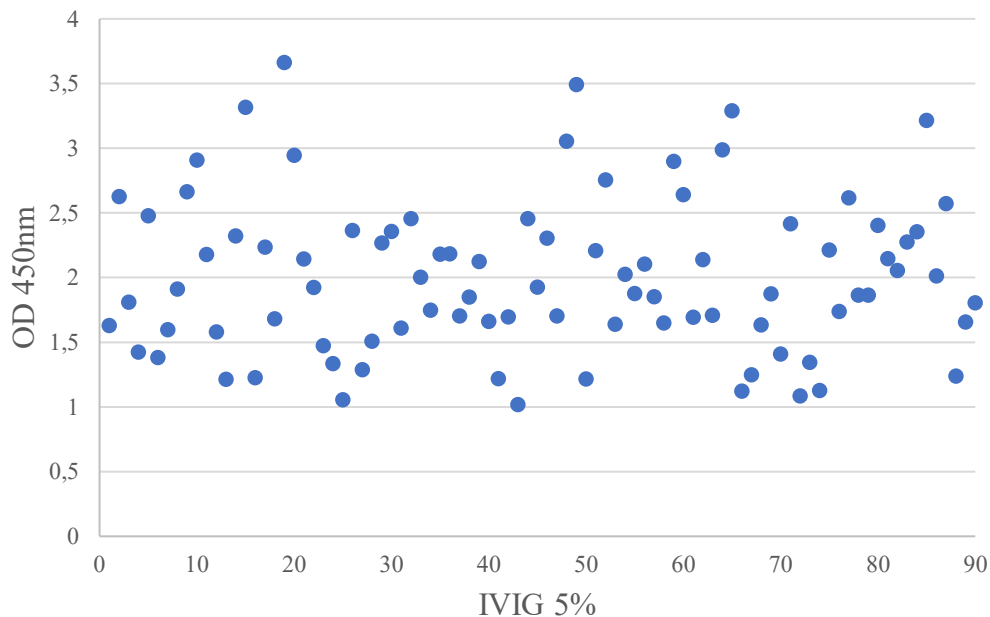
Фигура 22. Наличие на IgG срещу алфа-хемолизин (Hla) от *Staphylococcus aureus* в IVIG 5% спрямо контролната група. Статистическият анализ на несдвоен *t*-тест показва статистически значима разлика ($p < 0,0001$)

8. Детекция и характеризиране на АНА в Имуновенин-интакт 5% и ССР

Инфекцията със SARS-CoV-2 както много други вирусни инфекции може да предизвика автоимунни заболявания и образуването на АНА не е изключено. Тези твърдения в литературата са докладвани като много единични случаи. В този преглед ние се фокусираме върху оценка на разпространението на автоантитела. Всичките ССР на 90 донори бяха анализирани за наличие на АНА. Според нашите резултати всички изследвани проби са АНА-отрицателни.

Антинуклеарните антитела представляват автоантитела, които разпознават и реагират със собствени молекули. В зависимост от тяхната антигенна специфичност, те обикновено се класифицират като органоспецифични или неспецифични. Важно е, че е известно, че някои автоантитела се произвеждат в серуми на пациенти с автоимунни заболявания и тяхното

присъствие е включено в диагностичните критерии за тези заболявания. По този начин автоантителата, получени от IVIG, които могат да нарушат серологичните анализи, могат да доведат до погрешна диагноза и последваща неправилно насочена терапия. Всъщност тази възможност е подкрепена от няколко проучвания, които съобщават за наличие на специфични автоантитела в IVIG препарати и/или повишаване на титрите на автоантитела при IVIG реципиенти¹⁴⁻²³. Освен това, предупреждение относно откриването на пасивно прехвърлено антитяло е описано в основното резюме на характеристиките на продукта и в листовките на IVIG продукти, въпреки че не са посочени отделни автоантитела. Съответно, характеризирането на множество профили на автоантитела в IVIG препарати и оценката на ефекта от инфузията на IVIG е от изключително значение при стандартизиране на продукта. За тази цел изследвахме наличието на АНА в Имуновенин-интакт 5%, като при всички изследвани (90) партии се откриват АНА (Фигура 23).



Фигура 23. Анализ на АНА в 90 производствени партии Имуновенин-интакт 5%.

За по-детайлно характеризиране на наличните АНА детектирани на предишния анализ избрахме 5 партии Имуновенин-интакт 5% с най-високи нива да определим специфичността на детектираните АНА, ги анализирахме с имуноблот техника АНА профил. Анализ на резултатите е показан на таблица 7, където ясно се виждат силно

положителни две от изследваните партии за Ro-52 (59) и AMA M2 (33) при едната и AMA M2 (60) при другата. Тези два типа АНА се регистрират при 4 партии, но с по слаб интензитет. SS-A е с положителен само в една партида.

Таблица 7. АНА профил на 5(с най-високо ниво на АНА от предишния анализ) производствени партии Имуновенин-интакт 5%

АНА/проба	1	2	3	4	5
PM-Scl,					
nRNP/Sm					
Sm					
SS-A		6			19
Ro-52	20	18	24	10	59
SS-B					
Scl-70					
Jo-1,					
CENP B					
PCNA					
dsDNA,					
nucleosomes					
histones					
ribosomal P-proteins					
AMA M2	17	10	21	60	33
DFS70		6			

V. ОБСЪЖДАНЕ

Българският венозен имуноглобулин Имуновенин интакт 5% е висококачествен и добре поносим IgG препарат. Получава се от утвърден производствен процес, използващ за производство българска човешка плазма. Според нас това е установен производствен процес за получаване на кръвен продукт с висок добив от човешка плазма. В днешно време човешката плазма е силно търсен кръвен продукт, като според Prevot и Jolles²⁴ (2020) се очаква търсенето ѝ да нарасне още повече в бъдеще. Настоящото проучване разглежда основните спецификации на IVIG и нивата на антителата с потенциална терапевтична ефективност при различни инфекциозни заболявания. Всички характеристики на продукта са в норма, като за IgA са наблюдават остатъчни ниски нива от 0,1%. Това не е риск за пациентите, тъй като нормалното ниво на серумен IgA е по-високо²⁵. Въпреки това, пациентите с дефицит на IgA могат в редки случаи да отговорят на оставащите IgA антитела в продукта. Тъй като тези събития са много редки, 1 на 600 индивида²⁶ и честотата на анти-IgA антитела при IgA дефицит е около 1/1200²⁷, не е ясно дали съществува някаква зависимост от дозата относно остатъчните IgA антитела²⁸.

Според данните на Shakib и Stanworth, (1980)²⁹ и French, (1986)³⁰, нивото на концентрация на всеки имуноглобулин в серума на здрави индивиди зависи отчасти от броя на плазматичните клетки, които произвеждат този конкретен подклас имуноглобулин; от скоростта на синтеза, катаболизма и обмяна между интра- и екстраваскуларните пространства. Тяхното изследване показва, че при възрастни концентрацията на IgG1 е 5-12 g/l, следвана от IgG2 - 2 - 6 g/l, IgA1 - 0,5 - 2 g/l, IgM - 0,5 - 1,5 g/l, IgG3 - 0,5 - 1,0 g/l, IgG4 0,2 - 1,0 g/l, IgA2 - 0 - 0,2 g/l, IgD - 0 - 0,4 g/l и IgE 0 - 0,002 g/l.

В нашето проучване установихме, че концентрацията и разпределението на подкласове и класове имуноглобулини, присъстващи в българския IVIG, има същото разпределение като нормалното ниво при възрастни здрави хора. Установихме най-високата средна концентрация на IgG1 (12,41 g/l), последвана от IgG2 (3,39 g/l), IgG3 (1,93 g/l), IgG4 (0,73 g/l), IgA (0,27 g/l), IgM (0,14 g/l) и IgE (0 - 0,0003 g/l).

Коронавирусите са вируси с обвивка, съдържащи едноверижна РНК с положителна полярност, които могат да заразят както хора, така и животни.

Геномът на SARS-CoV-2 се състои от променлив брой отворени рамки за четене (Open Reading Frames, ORFs). Шестнадесет неструктурни протеина (NSPs) са от съществено

значение за процесите на репликация/транскрипция. Приблизително 67% от целия геном, се кодират от първия ORF докато останалите ORFs кодират структурни протеини, необходими за изграждането на нови вириони^{60,61}.

Шипчестият (спайк, S) протеин, съставен от два основни компонента (S1 и S2) образува на повърхността на вируса подобни на корона израстъци, които дават името на рода коронавируси⁶². S1 компонентът опосредства навлизането на вируса в клетките-гостоприемници. Това се осъществява чрез взаимодействие между рецептор-свързващия домен от S1 (Receptor-Binding domain, RBD) и рецептора за ангиотензин-конвертиращия ензим 2 (ACE2), последвано от сливане с клетъчната мембрана с помощта на S2 субединицата. Това взаимодействие позволява на вируса да проникне в клетки, експресиращи ACE2 и да предизвика инфекция. Спайк протеинът е силно имуногенен, което означава, че предизвиква силен хуморален и клетъчен отговор⁶³. Вирусният геном е опакован в спираловиден рибонуклеокапсид, съставен от нуклеокапсидния протеин (N) и затворен от обвивка (Envelope, E),⁶². Протеинът на вирусната обвивка е много разнообразен и играе критична роля за морфогенезата и освобождаването на вириони⁶⁴. Формата на коронавируса се поддържа от матричния протеин (M), най-разпространеният и разнообразен протеин на вирусната обвивка⁶⁰⁻⁶².

COVID-19 инфекцията, причинена от тежък остър респираторен синдром коронавирус 2 (SARS-CoV-2), е основен проблем за общественото здраве от началото на пандемията през 2019 г. Макар че ваксините защитават повечето хора, тези с тежки имунни дефицити често имат слаба реакция към ваксината и по-голяма вероятност да развият тежко или персистиращо заболяване.^{65,66} Няма препоръки за лечение на персистираща инфекция при имунокомпрометирани лица. Описани са опити с повтаряща се моно- или комбинирана антивирусна терапия⁶⁷. Използването на рекомбинантни анти-SARS-CoV-2 моноклонални антитела (mAb) е възпрепятствано от еволюцията на резистентни вирусни щамове⁶⁸. Имунокомпрометираните пациенти с COVID-19 могат да получат полза от терапия с реконвалесцентна плазма или анти-SARS-CoV-2 хиперимуноглобулин, добити от преболедевали, но все още липсват категорични доказателства за ефективността на тези методи⁶⁹⁻⁷¹.

Въздействието на СР върху качеството и профила на антителата при лекувани пациенти с COVID-19 е неясно и маркерите на антителата, които предсказват изхода от COVID-19, не

са напълно проучени. Във тази връзка, за да се определи въздействието на пасивното лечение и да се идентифицират параметрите, свързани с терапевтичния ефект, е необходима оценка на профилите на антитела при СР на COVID-19 след (SARS-CoV-2) инфекция. Обширната характеристика ще помогне за по-доброто разбиране на положителните ефекти на ССР за пасивно лечение по време на бързо разпространяваща се епидемия.

Пациенти, заразени със SARS-CoV-2, произвеждат вирус-специфични IgM, IgG и IgA антитела, с добре дефинирана динамика ⁷²⁻⁷⁴, където спайк-специфичните IgG антитела са най-често срещаните имуноглобулини ⁷⁴. Селективната секреция на димерен IgA през лигавичните бариери⁷⁵ предоставя важни предимства или имуногенност срещу респираторни патогени ^{76,77}. Циркулиращият димерен и мономерен IgA може да медира независими от локализацията изотип-специфични функции ⁷⁸. Мономерният IgA в серума няма секреторната верига на димерния IgA и се свързва с Fcα рецептор 1 (FcαR1), който активира възпалителната програма на миелоидните клетки ⁷⁹. О друга страна има експериментални доказателства за противовъзпалителна роля на мономерни IgA при взаимодействия с FcαR1⁸⁰ и за терапевтично приложение на IgA⁸¹. Проучване на кинетиката на антителата при седем пациенти с COVID 19 показва, че докато нивата на IgG се повишават и се поддържат поне три месеца, нивата на IgM и IgA намаляват 35-50 дни след инфекцията ⁸². Vâță и сътр.⁸³ демонстрират, че при 75 пациенти с потвърдена COVID-19 инфекция тежестта на заболяването варира значително между групите с наличие и липса на анти-SARS-CoV-2 IgA антитела. В групата с положителен IgA към SARS-CoV-2, повече пациенти са имали напреднали стадии на заболяването (31,5%) в сравнение с пациентите с отрицателен IgA (14,3%). Ма и сътр.⁸⁴, Carnicelli и сътр.⁸⁵ и Zervouz и сътр.⁸⁶ съобщават, че пациентите с тежка форма на COVID-19 показват високи нива на IgA антитела. Тъй като производството на IgA е свързано с тежки инфекции, това може да се обясни с повишения имунен отговор при остри респираторни заболявания. Марклунд и др. ⁸⁷ са установили, че почти 10% от пациентите с лек COVID-19 не са развили откриваем анти-SARS-CoV-2 IgG в серума. Етапът и тежестта на COVID-19 инфекцията са важни фактори, свързани с наличието на RBD-IgA и RBD-IgG, но развитието на имунни комплекси, имунната система и генетичните характеристики на пациента могат да повлияят на хуморалния отговор срещу SARS-CoV-2.

Специфичният за SARS-CoV-2 хуморален отговор в ранния стадий се управлява силно от IgA антитела. Освен това, експанзията на периферните IgA плазмобласти се открива скоро след началото на симптомите и достига пик около ден 22 от третата седмица на заболяването⁸⁸. Поради тази причина Kober и сътр. приемат, че IgA може да играе по-важна роля в началото на инфекцията⁸⁹.

IgM и IgG играят важна роля при неутрализирането на SARS-CoV-2⁹⁰, като IgM неутрализиращите антитела се откриват рано, но намаляват с времето, докато IgG неутрализиращите антитела се появяват по-късно и остават относително стабилни във времето^{91,92}. Няколко проучвания са установили, че IgG1 играе ключова роля в неутрализирането⁹³⁻⁹⁷. Luio и сътр. разкрива, че при 63 донори с тежък, умерен, лек и асимптомнен COVID-19, IgG1 и IgG3 са критични за хуморалните имунни отговори⁹⁸. Те могат да бъдат свързани с преходен модел, т.е. ранен IgG3 отговор, последван от преминаване към по-висок афинитетен IgG1 антитялов отговор⁹⁹. Другите IgG подтипове, IgG2 и IgG4, не участват в свързването на SARS-CoV-2 антиген или при неутрализиране на вируса¹⁰⁰. Маличев и сътр. също установи, че IgG1 е най-разпространен в реконвалесцентната плазма, следван от IgG2, IgG3 и IgG4.

В нашето изследване наблюдавахме, че IgG2 е с най-висока средна концентрация, следван от IgG1, IgG3 и IgG4. Високата средна концентрация на IgG2 се дължи на много високи концентрации в 4 проби (19-155 g/l). Ние анализирахме, че всички 4 проби с по-високи IgG2 антитела имат по-висока концентрация на IgM и това може да е връзка между двата типа антитела в ранните етапи на имунния отговор на SARS-CoV-2. Добре известно е, че IgG2 играе важна роля в отговорите на бактериални капсулни полизахаридни антигени¹⁰¹. Така че високата концентрация на IgG2 в анализираниите проби може да е резултат от съпътстваща бактериална инфекция, която е доста често срещана, особено при тежки случаи на COVID-19 и пациенти със съпътстващи респираторни заболявания.

При анализа на СР по съдържание на RBD-специфични IgG и IgA в настоящото проучване е установено съгласувано производство на двата класа в 50% от тестваните плазмени проби. От останалите 12 (13,3%) са само RBD-IgG-положителни, други 8 (8,8%) - само RBD-IgA положителни, а 25 (27,7%) са отрицателни както за RBD-IgG, така и за RBD-IgA.

Подобни резултати показват Qian и сътр.¹⁰² в систематичен преглед и мета-анализ на 21 478 пациенти (11 163 ССР група и 10 315 контролна група) и те не откриват значителна разлика

в пациентите, лекувани с ССР, и контролната група. Друго изследване на 107 пациенти (36 пациенти, лекувани с ССР и 71 контроли) установява, че ефектът на ССР е сходен между групите¹⁰³. Това най-вероятно се дължи на непълната характеристика на ССР за пасивно лечение и подчертава важността на характеризирането на ССР преди вливане в пациента.

Генетичните варианти на SARS-CoV-2, алфа, бета, гама, делта и омикрон са заразили милиони хора по света¹⁰⁴. Ние оценихме неутрализиращите активности на IgG антитела срещу тези варианти, получени от реконвалесцентни плазмени проби. Според GISAID, чрез CoVariants.org (последна актуализация на 03 май 2024 г.), през периода на събиране на плазма за нашето изследване до 15 май 2021 г. най-разпространеният вариант на SARS-CoV-2 в България е бил вариантът Алфа (85,71%). След тази дата е установено увеличение на вариант Делта до 52,38%. Вариантните мутации в SARS-CoV-2 са свързани с промени в активността на рецепторното свързване и намалена неутрализация от антитела¹⁰⁵⁻¹⁰⁷.

Нашите резултати показват, че 39/57 (68,42%) от ССР съдържат неутрализиращи антитела за всички подтипове на варианти на SARS CoV-2 и почти всички (94,7%) могат да неутрализират повече от един вариант.

Резултатите от Li и сътр., които показват, че ССР с висок титър неутрализира вариантите на SARS-CoV-2, въпреки липсата на предишна експозиция на донора на вариантите, са в съответствие с нашите¹⁰⁸.

Въпреки зависимостта на нивото на неутрализираща активност от индуциращия вирусен щам, реконвалесцентната плазма проявява активност и срещу по-късно възникнали варианти. Следователно, индивидуалната неутрализираща активност трябва да се анализира в зависимост от периода. Реконвалесцентната плазма има ефективен неутрализиращ ефект при скоро появилите се варианти, но вероятно е с ограничена стойност, когато настъпи значителна еволюция на циркулиращите варианти.

При пациенти с COVID-19 с тежко протичане са описани различни цитокинови дисбаланси и екстремни стойности, определени като „цитокинова буря“, водеща до хипервъзпаление и мултиорганна недостатъчност¹⁰⁹. В тези случаи ефектите на имунния отговор, а не самата инфекция са причина за обширно и необратимо увреждане¹¹⁰. Бързо развиващото се възпаление и коагулация, предизвикани от повишените концентрации на провъзпалителни цитокини, предизвикват системен ендотелиит и ускорено образуване на тромби¹¹¹. Такъв процес може все още да продължава и в началото на възстановяването. В допълнение,

имунните комплекси и зависимите от антитяло макрофаги могат да обострят възпалението¹¹². В такива случаи преди вливането на хиперимунна плазма на пациенти с COVID-19 е важно да се определят нивата на провъзпалителните цитокини в нея, за да се оцени възможната ѝ роля за влошаване на клиничното състояние на реципиента. Rajamanickam и сътр. показват, че нивата на цитокините IL-10, IL-19, IL-20, IL-22 и IL-24 намаляват от 15-30 ден до 61-90 ден от инфекцията и достигат плато след това¹¹³. В нашето проучване наблюдаваме значителни статистически разлики само в два цитокина, IL-22 ($p=0,03$) и IL-10 ($p=0,001$). В сравнение с RBD-двойно отрицателните плазми в RBD-двойно положителната група, е установено кратно увеличение на IL-22 (~40) и IL-10 (~15). Друго проучване също установява, че тежките пациенти с COVID-19 показват повишени плазмени нива на IL-10, IL-19, IL-20, IL-22 и IL-24 в сравнение с пациентите с леко протичане. Авторите предоставят доказателства за промени в плазмените нива на фамилията цитокини IL-10 и при реконвалесцентни индивиди с COVID-19¹¹⁴. Това може да обясни резултатите от нашето проучване за ниски нива на IL-10 и IL-22 в двойно отрицателния ССР, ако приемем, че са от донори с лека инфекция.

Maličev и сътр.¹¹⁵ анализират нивата на 23 цитокини в плазмата на 190 (105 донори на ССР и 85 контролни донори) кръводарители и резултатите показват, че няма разлики в нивата на цитокини между двете групи. Същите резултати се наблюдават при нашето изследване на нивото на цитокини в ССР, въпреки ограничения брой на донори без реконвалесцент в нашето проучване за сравнение.

ССР имат широк спектър от характеристики, които могат да варират значително между отделните донори, което води до различна ефективност на лечението или дори до нежелани ефекти. Нашите резултати показваха, че лабораторно доказана инфекция не е гаранция за траен отговор на неутрализиращи антитела и нивата на RBD-специфични имуноглобулини не корелират непременно с плазмената неутрализираща активност. Съставът на изотипа и подкласа на специфичните за SARS-CoV-2 антитела може да следва индивидуална динамика, както и съдържанието на цитокини.

Следователно, подробна характеристика на ССР на донорите, включваща най-малко SARS-CoV-2-специфичен mAbs изотип, специфичност за клинично важни варианти и оценка на цитокиновия профил, би обогатило познанията за този основен терапевтичен продукт,

който може да бъде особено важен в условия на ограничени ресурси и бързо разрастваща се пандемия.

Сао и сътр.,¹²¹ описват ефективната употреба на IVIG при COVID-19 при трима пациенти с влошено състояние. Няколко проучвания съобщават за ползата от IVIG при критично болни пациенти в различни страни, включително САЩ, Иран, Италия, Китай, Турция и Бутан¹²²⁻¹²⁷. Ние анализирахме наличието на RBD-специфични IgG в 16 партии IVIG, произведени от плазмени пулове, събрани по време на периода на пандемията, и открихме средно съотношение $7,4 \pm 3,9$, което е почти два пъти по-високо в сравнение със средното RBD-специфично IgG съотношение ($4,1 \pm 2,4$) на реконвалесцентна плазма от отделни донори. Интравенозният имуноглобулин (IVIg), получен от група от най-малко хиляди здрави донори, съдържа естествени IgG антитела срещу различни антигени при различни прагове на откриване поради натрупване на ниски концентрации на антитела от отделни индивиди. Въпреки високото съдържание на RBD-специфични IgG в IVIG, RBD-специфични IgG ще бъде уместно да се проверят дали отбелязаните анти-SARS-CoV-2 антитела имат неутрализираща активност. Във тази връзка в настоящото проучване и направена оценка на неутрализиращата активност на IgG антителата в българския IVIG Имуновенин-интакт 5% спрямо няколко варианта на SARS-CoV-2: див тип, алфа, бета, гама, делта и омикрон. Нашите резултати показват, че всички тествани партии имат потенциална неутрализираща активност за всички тествани варианти от 75,5% до 91,5% (мин-макс). В сравнение с пробите от реконвалесцентна плазма на COVID не открихме значителна разлика в нереализационната активност (несдвоен t-тест $p > 0,05$).

IVIG може да бъде добър източник на пасивни и неутрализиращи имунотерапевтични антитела за пациенти при необходимост от липса или ниски нива на специфични антитела. Изследователски проучвания³¹⁻³³ показват, че естествените антитела играят важна роля в защитата срещу гъбични патогени, включително инфекции с *Candida albicans*. *Candida albicans* е обичаен обитател на лигавиците при хората. При отслабване на имунната система или нарушаване на нормалната микрофлора, тя може да предизвика кандидоза. Дори без наличието на активна инфекция, организмът често образува антитела срещу *Candida albicans*, включително от тип IgG.

В нашето изследване наблюдавахме, че всички IVIG партии имат високо ниво на специфичен анти-*Candida albicans* IgG със средно ниво $27,4 \pm 1,4$ в сравнение с контролната

група на здрав донорен серум от 12 души от различна възрастова група (2-55 години) със $(17,2 \pm 7,6)$ средно ниво. За да направим сравнителен анализ на нивото специфични анти-Candida albicans IgG при хора с различна възраст разделихме контролните серуми на две групи, една на възраст над 30 години и една на възраст под 30 години. Установихме, че има значителна разлика между две групи над-под 30 години $(25,9 \pm 1,3 - 9,7 \pm 4,7)$ средно ниво. По-продължителното излагане на антигените, присъстващи в червата, води до по-постоянно високо ниво на антитела срещу Candida albicans. Според данни от изследването на Wang и сътр.,³⁴ високо ниво на анти-Candida albicans IgG са намерени във всичките четири тествани IVIG продукта произведени от различни производители, което потвърждава нашите получени резултати.

В това проучване ние показваме, че високи нива антиген-специфични IgG анти-Candida albicans антитела са открити сред всички тествани IVIG произведени от сборна плазма от здрави донори.

Много от щамовете на Staphylococcus aureus произвеждат алфа-хемолизин (Hla)^{35,36} протеинов цитолизин, който уврежда клетките чрез образуване на хидрофилни пори през плазмената мембрана^{37,38}. Токсинът е признат като причина за некроза на кожата и инфекция с летален изход, както и невротоксично действие както при хора, така и при животни чрез цитотоксични ефекти върху няколко типа клетки³⁹⁻⁴¹. Терапията с IVIG би могла да бъде полезна при лечението на този тип инфекция. Широкият спектър от специфични IgG може да неутрализира ефектите на Hla и да има благоприятен резултат.

За изследване на специфични IgG към Hla разработихме и валидирахме качествен ELISA метод.

При анализа за наличие на анти-Hla IgG бе установено, че в 88 (97,7%) от тестваните 90 партии български IVIG има високо ниво на специфични анти-Hla IgG антитела $(2,21 \pm 0,36)$ средно) в сравнение с нивото на контролната група $(1,7 \pm 0,37)$ средно).

Според проучването на Bhakdi и сътр.⁴² хиперимунните глобулинови препарати с висок титър на антитела срещу алфа-стафилококовия токсин ефективно предпазват от цитотоксичните ефекти на токсина. В нашето проучване открихме високо ниво на анти-Hla IgG в българския IVIG. Това поражда интереса за по-нататъшно задълбочено характеризиране на функционалността на специфичните антитела, с което да се оцени потенциала за клиничната употреба на IVIG при пациенти с остра стафилококова инфекция.

Интравенозните имуноглобулини (IVIGs), получени от събраната плазма на хиляди донори, съдържат множество видове IgG молекули, включително и автоантитела. Със задълбочаване на разбирането за автоимунните заболявания, през последните години се диагностицират все по-голям брой пациенти с ревматични заболявания⁴³. Поради разнообразните клинични прояви на този тип заболявания, лекуващите често откриват ANA при пациенти с необяснима треска или мултисистемно засягане. Автоантителата са много важни серологични маркери на ревматични заболявания^{44,45}.

Някои специфични автоантитела, като анти-dsDNA при системен лупус еритематозус (SLE), анти-SSA при синдром на Sjögren (SS) и anti-U1nRNP при смесено заболяване на съединителната тъкан, са важни критерии за диагнозат и прогната заболяването^{46,47}. Откриването на повишени нива на ANA или специфични автоантитела, обаче, не е патогномонично за наличие на клинично проявено автоимунно заболяване. Например, ANA могат също да бъдат положителни при вирусни инфекции (вирус на хепатит С, парвовирус), туберкулозни инфекции, паразитни инфекции (шистозомиаза) и тумори⁴⁸⁻⁵⁰. В допълнение, приблизително 5% от здравите хора може също да имат нисък титър на ANA⁵¹.

Според предишни проучвания, анти-SSA антитела присъстват в IVIG продукти и при здрави кръводарители без клинични симптоми. Това показва, че заместителната терапия с IVIG може да затрудни интерпретацията на серологични изследвания за автоантитела като ANA и ENA поради пасивния им трансфер.⁵²⁻⁵⁴ В свое наблюдение Renate съобщава за развитие на дискоиден еритематозен лупус при пациент с обща променлива имунна недостатъчност (CVID), получаващ редовна заместителна терапия с IVIG. Това може да е свързано с прехвърлянето на анти-SSA чрез инфузия на IVIG⁵⁵.

В проучването на Li Xu и съавт.⁵⁶, трите най-често срещани автоантитела в групата, третирана с IVIG, са анти-Ro52 (87,96%), анти-Mi-2 (52,78%) и анти-SSA (38,89%). Същите три автоантитела са и най-чести сред 1489 ANA-позитивни участници в изследване с 25 110 здрави възрастни, като честотата им е съответно 14,24%, 12,69% и 9,67%.⁵⁷

L. J. Yang и сътр.⁵⁸ докладва за анти-SSA, анти-Ro52, анти-митохондриални M2 и анти-центромерни антитела, ясно откриваеми в IVIG продукти, които се пренасят върху пациенти, но след 4 дни тяхната концентрация в кръвта се губи.

Нашите резултати също показват наличието на АНА в българския интравенозен имуноглобулин. В две от изследваните IVIG партии се откриват високи нива на ANA. В

едната са повишени Ro-52 (59) и AMA M2 (33), а в другата - AMA M2 (60). Тези два типа ANA се регистрират още и в 4 партиди, но с по слаб интензитет. SS-A е положителен само в една партида.

Molen и сътр.⁵⁹ също съобщават, че въпреки, че са изготвени от плазмата на клинично здрави донори, в IVIG препаратите се откриват високи титри на анти-SSA/Ro60 и анти-SSA/Ro52. В последствие се оказало, че трима от донорите са с висок титър на анти-SSA >1000 U/mL). Те също показват, че отделните донори могат да имат много високи концентрации без клинични симптоми. Съставът на анти-SSA при видимо здрави индивиди не се различава от този при пациенти със системни автоимунни заболявания (анти-SSA/Ro62 положителни и/или анти-SSA/Ro52 положителни).

Въпреки малкия брой на изследвана донорска плазма ние не открихме АНА в нито една от изследваните, докато литературни данни показват за наличието на АНА при здрави донори. Явно високи титри на АНА могат да присъстват при очевидно здрави кръводарители, което обяснява документираното присъствие на тях в Имуновенинитакт 5%.

При 11–57%¹¹⁶⁻¹¹⁸ от хоспитализираните пациенти с COVID-19 са открити антинуклеарни автоантитела (ANA). Woodruff и сътр.¹¹⁹ идентифицират ANA при 44% от 31 критично болни пациенти с COVID-19 без известна история на автоимунитет. По-конкретно, Gomes и сътр.¹²⁰ показаха, че антителата срещу ДНК корелират силно с по-късното развитие на тежко заболяване, показвайки положителна прогностична стойност от 89,5% и представлявайки 22% от общите тежки случаи. В нашето проучване след тестване на всички CCP (n=90) не установихме положителни проби за наличието на ANA.

В заключение, резултатите от изследванията показват, че CCP притежава висока междуиндивидуална вариабилност, обуславяна от разликите в имунния отговор на дарителите. Установено беше, че наличието на лабораторно потвърдена инфекция не гарантира стабилен и дълготраен неутрализиращ антителен отговор. Освен това, нивата на RBD-специфични имуноглобулини не корелират задължително с неутрализиращата активност на плазмата. Имунохарактеристиките, включително изотиповият и подкласов състав на антителата, както и съдържанието на цитокини, демонстрират индивидуална динамика.

В този контекст, задълбочената характеристика на ССР — чрез определяне на изотипа на SARS-CoV-2-специфичните антитела, тяхната специфичност към клинично значими вирусни варианти и профила на свързаните с тях цитокини — се явява съществена за оптимизиране на терапевтичната ефективност на продукта, особено при условия на ограничени ресурси и при динамично развиващи се пандемични ситуации.

В допълнение, в настоящото изследване се извърши функционална оценка на българския IVIG, базирана на измервания на титри срещу широк спектър от патогени и клетъчно-базирани *in vitro* анализи. Данните показаха, че съдържащите се в продукта IgG антитела демонстрират пълна функционалност на епитопното свързване, което потвърждава неговата способност да осигурява защитни нива на антитела при пациенти. Това подчертава високия клиничен потенциал на българския IVIG.

Продуктът се отличава с изразени антибактериални, антивирусни и антимикотични свойства, което го прави ценен терапевтичен инструмент при липса на специфично лечение. Хомогенността на антителния състав, произхождащ от донори от един географски регион, предполага наличие на богат колективен имунен отговор, съответстващ на локалния спектър от патогени.

Въпреки че натрупаният клиничен опит с IVIG при гъбични, бактериални и вирусни инфекции остава ограничен, съществуващите доказателства подкрепят неговата защитна роля срещу инфекция и възпаление. Липсата на количествени стандарти и недостатъчната последователност в публикуваните данни обаче възпрепятстват разработването на универсални терапевтични протоколи.

Поради това ефикасността на IVIG следва да се оценява чрез прецизен анализ на антителния профил и неговия неутрализиращ капацитет спрямо конкретни патогени. Получените резултати разкриват перспективи за разширяване на клиничното приложение на IVIG и подчертават необходимостта от допълнителни изследвания за характеристика на функционалните антитела с цел повишаване на терапевтичната му ефективност при тежки инфекции.

VI. ИЗВОДИ

1. Разпределението на субкласовете на IgG в Имуновенин – интакт 5% (IgG1 (12,41 g/l), IgG2 (3,39 g/l), IgG3 (1,93 g/l), IgG4 (0,73 g/l), IgA (0,27 g/l), IgM (0,14 g/l) и IgE (0–0,0003 g/l)) съответства на това в нативната плазма.
2. Нивата на двата типа анти SARS-CoV-2 (IgG и IgA) специфични имуноглобулини в изследваните донорски плазми не се отличават значимо. В 35.6% от изследваните проби се наблюдаваше конкордантна продукция и на двата класа SARS-CoV-2 специфични имуноглобулини. В 20%от пробите се установи експресия само на един вид имуноглобулин, а в 44% липсваха SARS-CoV-2 специфични антитела.
3. Интравенозният имуноглобулин показва статистически значимо по-висока неутрализираща активност в сравнение с реконвалесцентната плазма (ССР).
4. В ССР и в плазмените пулове за Имуновенин-Инттакт 5% не се откриват повишени нива на провъзпалителни цитокини, които да стимулират развитие на патологични имунни реакции.
5. В състава на Имуновенин-Инттакт 5% са установени специфични антитела срещу α -хемолизин (Hla) на *Staphylococcus aureus*, които демонстрират потенциал за терапевтично приложение при остри бактериални инфекции, причинени от този патоген, както и възможна профилактична роля при имунокомпрометирани пациенти.
6. Наблюдаваните високи нива на специфични IgG антитела срещу *Candida albicans* в Имуновенин-Инттакт 5% подкрепят възможността този продукт да бъде използван като терапевтично биологично средство при пациенти с тежка кандидоза
7. Наличието на специфичен анти S1-IgG и в интравенозния имуноглобулин позволява неговото надеждно и ефективно използване за пасивна имунизация при вирусни инфекции.
8. Ефективното използване на ССР за пасивна имунизация, налага предварителното им изследване за наличие и титър на SARS-CoV-2 специфични антитела.
9. В отделните партии на Имуновенин-интакт 5% може да се открият ниски до умерени нива на ANA, анти-SSA, анти-Ro52 и други автоантитела, без това да е индикатор за замърсяване или проблем с качеството. Това присъствие обикновено няма клинично значение, но може да повлияе серологичните изследвания, извършвани след прилагане на IVIG.

10. Наличието на специфични IgG антитела срещу широко разпространени патогени в практически всички изследвани партии интравенозен имуноглобулин е възможност за ефективно им приложение за пасивна имунизация и имунотерапия след въвеждане на алгоритъм за оценка на съдържанието на специфични антитела и необходимите клинични проучвания

VII. ПРИНОСИ

ОРИГИНАЛНИ ПРИНОСИ С ТЕОРЕТИЧЕН ХАРАКТЕР

1. Проведено е първо ретроспективно проучване, целящо да анализира пригодността и ефективността на ССР преди нейното прилагане в началните етапи на развиваща се пандемия.
2. Доказано е, че титъра на антителата в ССР не са от значение при прилагането им като заместваща терапия при пациенти с тежка форма на инфекция.
3. Чрез съвременни методи е направен количествен и функционален анализ на субкласовете на антителата, съдържащи се в българския венозен имуноглобулин (IVIG). Анализът интегрира както количествени, така и качествени параметри, като акцентът е поставен върху афинитета на антителата към специфични антигени, патогени и автоантигени. Чрез този подход се постига по-задълбочено разбиране на имуномодулиращите механизми на IVIG, особено в контекста на различни клинични състояния, включително инфекциозни заболявания.
4. Проучени са различни аспекти на възможната терапевтична употреба на венозния имуноглобулин (IVIG) и са формулирани препоръки за бъдещи изследвания и клинични изпитвания, насочени към по-прецизно определяне на терапевтичните показания и оптимизиране на лечението с IVIG.
5. Направен е анализ на съдържанието на някои основни видове антинуклеарни автоантитела в изследваните партии венозен имуноглобулин (IVIG) и са обсъдени мерки за минимизиране на риска от диагностични грешки при пациенти на дългосрочна IVIG терапия.

ПРИНОСИ С НАУЧНО-ПРИЛОЖЕН ХАРАКТЕР

1. Осъществено е пълно охарактеризиране на Имуновенин-интакт 5% по отношение на класовете и субкласовете имуноглобулини, както и анализ на широк спектър от специфични IgG срещу различни патогенни причиняващи сериозни инфекции, което би увеличило приложението на този препарат.
2. Сравнена е приложимостта на различни подходи за оценка на ССР като терапевтичен подход в началото на възникнала пандемия и специфичния имунен състав и е доказано, че:
 - a. RBD-IgG RBD-IgA базираните тестове зависят от времето след експозиция и са информативни в условия на активна циркулация на вируса;
 - b. необходимо е по-детайлно характеризиране чрез идентифициране на неутрализиращи антитела и съпътстващи имунологични молекули въз основа на експресионния им профил.
3. Въведен и валидиран е качествен ELISA метод за детекция на специфични IgG срещу хемолизинов токсин (Hla) на *Staphylococcus aureus*.

VIII. ЛІТЕРАТУРА

1. Rabel P.O., Planitzer C.B., Farcet M.R., Kreil T.R. Tick-borne encephalitis virus-neutralizing antibodies in different immunoglobulin preparations. *Clin Vaccine Immunol.* 2012;19:623–625. doi: 10.1128/CVI.05705-11.
2. Goldacker S., Witte T., Huzly D., Schlesier M., Peter H.H., Warnatz K. Analysis of specific IgG titers against tick-borne encephalitis in patients with primary antibody deficiency under immunoglobulin substitution therapy: impact of plasma donor origin. *Front Immunol.* 2014;5:675. doi: 10.3389/fimmu.2014.00675.
3. Planitzer C.B., Farcet M.R., Schiff R.I., Ochs H.D., Kreil T.R. Neutralization of different echovirus serotypes by individual lots of intravenous immunoglobulin. *J Med Virol.* 2011;83:305–310. doi: 10.1002/jmv.21980.
4. Audet S., Virata-Theimer M.L., Beeler J.A., Scott D.E., Frazier D.J., Mikolajczyk M.G., Eller N., Chen F.M., Yu M.Y. Measles-virus-neutralizing antibodies in intravenous immunoglobulins. *J Infect Dis.* 2006;194:781–789. doi: 10.1086/506363.
5. Weeke-Luttmann M., Schmidt I., Fenyves A., von W.G., Fischer L. [Neutralizing virus antibodies in human immunoglobulins for intravenous use] *Immun Infekt.* 1984;12:201–207.
6. Poulain D. *Candida albicans*, plasticity and pathogenesis. *Crit. Rev. Microbiol.* 2015;41:208–217. doi: 10.3109/1040841X.2013.813904.
7. Kullberg B.J., Arendrup M.C. Invasive candidiasis. *N. Engl. J. Med.* 2015;373:1445–1456. doi: 10.1056/NEJMra1315399.
8. Gow N.A., van de Veerdonk F.L., Brown A.J., Netea M.G. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: Discriminating invasion from colonization. *Nat. Rev. Microbiol.* 2012;10:112–122. doi: 10.1038/nrmicro2711.
9. Dumont AL, Nygaard TK, Watkins RL, Smith A, Kozhaya L, Kreiswirth BN, Shopsis B, Unutmaz D, Voyich JM, Torres VJ. 2011. Characterization of a new cytotoxin that contributes to *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *Mol Microbiol* 79:814–825. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07490.x.
10. Cone LA, Stone RA, Schlievert PM, Sneider RA, Rubin AM, Jesser K, Renker SW. 2006. An early favorable outcome of streptococcal toxic shock syndrome may require a

- combination of antimicrobial and intravenous gamma globulin therapy together with activated protein C. *Scand J Infect Dis* 38:960–963. doi: 10.1080/00365540500373224.
11. Schlievert PM. 2001. Use of intravenous immunoglobulin in the treatment of staphylococcal and streptococcal toxic shock syndromes and related illnesses. *J Allergy Clin Immunol* 108:S107–S110.
 12. Gauduchon V, Cozon G, Vandenesch F, Genestier AL, Eyssade N, Peyrol S, Etienne J, Lina G. 2004. Neutralization of *Staphylococcus aureus* Panton Valentine leukocidin by intravenous immunoglobulin in vitro. *J Infect Dis* 189:346–353. doi: 10.1086/380909.
 13. Yanagisawa C, Hanaki H, Natae T, Sunakawa K. 2007. Neutralization of staphylococcal exotoxins in vitro by human-origin intravenous immunoglobulin. *J Infect Chemother* 13:368–372. doi: 10.1007/s10156-007-0551-6.
 14. Khan S, Sims S, Raine D, Sewell WA. Both autoantibodies and pathogen-specific antibodies are present in immunoglobulin preparations and reflect characteristics of the donor population. *J Am Acad Dermatol*. 2008; 59(6): 1089–1090.
 15. Dimitriadou MM, Alexopoulos H, Akrivou S, Gola E, Dalakas MC. Anti-neuronal antibodies within the IVIg preparations: importance in clinical practice. *Neurotherapeutics*. 2020; 17(1): 235–242.
 16. Hao W, Davis C, Daniels T, Hampe CS, Lernmark A. Epitope-specific glutamic acid decarboxylase-65 autoantibodies in intravenous immunoglobulin preparations. *Transfus Med*. 1999; 9(4): 307–310.
 17. Uchida Y, Kato D, Adachi K, Toyoda T, Matsukawa N. Passively acquired thyroid autoantibodies from intravenous immunoglobulin in autoimmune encephalitis: two case reports. *J Neurol Sci*. 2017; 383: 116–117.
 18. van der Molen RG, Hamann D, Jacobs JF, van der Meer A, de Jong J, Kramer C, et al. Anti-SSA antibodies are present in immunoglobulin preparations. *Transfusion*. 2015; 55(4): 832–837.
 19. arius S, Eichhorn P, Albert MH, Wagenpfeil S, Wick M, Belohradsky BH, et al. Intravenous immunoglobulins contain naturally occurring antibodies that mimic antineutrophil cytoplasmic antibodies and activate neutrophils in a TNF α -dependent and fc-receptor-independent way. *Blood*. 2007; 109(10): 4376–4382.

20. Yasuda N, Nishikawa M, Shimosaka H, Ono Y, Yatomi Y. Effect of administration of immunoglobulin preparations on the results of tests for autoantibodies. *Mod Rheumatol*. 2022; 32(5): 946–952.
21. Smith TD, Cunningham-Rundles C. Detection of anti-glutamic acid decarboxylase antibodies in immunoglobulin products. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2018; 6(1): 260–261.
22. Grüter T, Ott A, Meyer W, Jarius S, Kinner M, Motte J, et al. Effects of IVIg treatment on autoantibody testing in neurological patients: marked reduction in sensitivity but reliable specificity. *J Neurol*. 2020; 267(3): 715–720.
23. El Hasbani G, Chahine R, Uthman I, Taher AT. Intravenous immunoglobulin, neonatal alloimmune thrombocytopenia, and Sjogren's syndrome: a case report. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2021; 258: 476–477.
24. Prevot J, Jolles S. Global immunoglobulin supply: steaming towards the iceberg? *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2020 Dec;20(6):557-564. doi: 10.1097/ACI.0000000000000696. PMID: 33044340; PMCID: PMC7752222.
25. Gonzalez-Quintela A, Alende R, Gude F, Campos J, Rey J, Meijide LM, et al. Serum levels of immunoglobulins (IgG, IgA, IgM) in a general adult population and their relationship with alcohol consumption, smoking and common metabolic abnormalities. *Clin Exp Immunol*. 2008;151:42–50.
26. Hammarström L, Vorechovsky I, Webster D. Selective IgA deficiency (SIgAD) and common variable immunodeficiency (CVID). *Clin Exp Immunol*. 2000 May;120(2):225-31.
27. Sandler SG, Eckrich R, Malamut D, Mallory D. Hemagglutination assays for the diagnosis and prevention of IgA anaphylactic transfusion reactions. *Blood*. 1994 Sep 15;84(6):2031-5.
28. Martinez C, Wallenhorst C, van Nunen S. Intravenous immunoglobulin and the current risk of moderate and severe anaphylactic events, a cohort study. *Clin Exp Immunol*. 2021;206:384–94.
29. Shakib, F., and Stanworth, D.R. 1980. Human IgG subclasses in health and disease. (A Review) Part I. *Ric. Clin. Lab*. 10, 463.
30. French, M.A. 1986. Serum IgG subclasses in normal adults. *Monogr. Allergy* 19, 100.

31. Stäger S, Alexander J, Kirby AC, Botto M, Van Rooijen N, Smith DF, Brombacher F, Kaye PM. 2003. Natural antibodies and complement are endogenous adjuvants for vaccine-induced CD8⁺ T-cell responses. *Nat Med* 9:1287–1292.
32. Kozel TR, MacGill RS, Percival A, Zhou Q. 2004. Biological activities of naturally occurring antibodies reactive with *Candida albicans* mannan. *Infect Immun* 72:209–218.
33. Reid RR, Prodeus AP, Khan W, Hsu T, Rosen FS, Carroll MC. 1997. Endotoxin shock in antibody-deficient mice. Unraveling the role of natural antibody and complement in the clearance of lipopolysaccharide. *J Immunol* 159:970–975.
34. Kohler H, Bayry J, Nicoletti A, Kaveri SV. 2003. Natural autoantibodies as tools to predict the outcome of immune response? *Scand J Immunol* 58:285–289.
35. Wang, Y., Liu, Y., Jiang, S. et al. Antifungal antibodies present in intravenous immunoglobulin derived from China. *Braz J Microbiol* 54, 81–92 (2023). <https://doi.org/10.1007/s42770-022-00894-z>
36. Gray, G. S., and M. Kehoe. 1984. Primary sequence of the α -toxin gene from *Staphylococcus aureus* Wood 46. *Infect. Immun.* 46:615-618.
37. Harshman, S. 1979. Action of staphylococcal α -toxin on membranes: some recent advances. *Mol. Cell. Biochem.* 23:142-152.
38. Tobkes, N., B. A. Wallace, and H. Bayley. 1985. Secondary structure and assembly mechanism of an oligomeric channel proteip. *Biochemistry* 24:1915-1920.
39. Watanabe, M., T. Tomita, and T. Yasuda. 1987. Membranedamaging action of staphylococcal α -toxin on phospholipidcholesterol liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* 898:257-265.
40. O'Reilly, M., J. C. S. Azavedo, S. Kennedy, and T. J. Foster. 1986. Inactivation of the α -hemolysin gene of *Staphylococcus aureus* 8325-4 by site-directed mutagenesis and studies on the expression of its hemolysins. *Microb. Pathog.* 1:125-138.
41. McCartney, C., and J. P. Arbuthnott. 1978. Mode of action of membrane-damaging toxins produced by staphylococci, p. 89127. In J. Jeljaszewicz and T. Wadstrom (ed.), *Bacterial toxins and cell membranes*. Academic Press, Inc., New York.
42. Berube BJ, Bubeck-Wandenburg J. *Staphylococcus aureus* α -toxin: nearly a century of intrigue. *Toxins (Basel)* 2013;5:1140–66

43. Bhakdi S, Mannhardt U, Muhly M, Hugo F, Ronneberger H, Hungerer KD. Human hyperimmune globulin protects against the cytotoxic action of staphylococcal alpha-toxin in vitro and in vivo. *Infect Immun*. 1989 Oct;57(10):3214-20. doi: 10.1128/iai.57.10.3214-3220.1989. PMID: 2777380; PMCID: PMC260792.
44. Hou YP, Wang L, Luo C, Tang WJ, Dai RX, An YF, et al. Clinical characteristics of early-onset paediatric systemic lupus erythematosus in a single centre in China. *Rheumatology*. (2023) 62:3373–81. doi: 10.1093/rheumatology/kead086
45. Pisetsky DS. Annals of the Rheumatic Diseases collection on autoantibodies in the rheumatic diseases: new insights into pathogenesis and the development of novel biomarkers. *Ann Rheum Dis*. (2023) 82:1243–7. doi: 10.1136/ard-2023-224692
46. Pisetsky DS, Bossuyt X, Meroni OL. ANA as an entry criterion for the classification of SLE. *Autoimmun Rev*. (2019) 18:102400–22. doi: 10.1016/j.autrev.2019.102400
47. Aringer M, Costenbader K, Daikh D, Brinks R, Mosca M, Ramsey GR, et al. 2019 European league against rheumatism/American college of rheumatology classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. (2019) 78:1151–59. doi: 10.1002/art.40930
48. Shiboski CH, Shiboski SC, Seror R, Criswell LA, Labetoulle M, Lietman TM, et al. 2016 american college of rheumatology/european league against rheumatism classification criteria for primary sjögren's syndrome: A consensus and data-driven methodology involving three international patient cohorts. *Arthritis Rheumatol*. (2017) 69:35–45. doi: 10.1080/03009742.2018.1523456
49. Emara M, Mohsen E, Shawky RM, El-Domany RA. Assessment of the prevalence of non-organ-specific autoantibodies in Egyptian patients with HCV. *Immunol Invest*. (2020) 49:676–86. doi: 10.1080/08820139.2019.1699108
50. Im JH, Chung MH, Park YK, Kwon HY, Baek JH, Lee SY, et al. Antinuclear antibodies in infectious diseases. *Infect Dis-Nor*. (2020) 52:177–85. doi: 10.1080/23744235.2019.1690676
51. Lu X, Qi P, Wang GC. The role of cancer-associated autoantibodies as biomarkers in paraneoplastic myositis syndrome. *Curr Opin Rheumatol*. (2019) 31:643–9. doi: 10.1097/BOR.0000000000000641

52. Grygiel-Górniak B, Rogacka N, Puszczewicz M. Antinuclear antibodies in healthy people and non-rheumatic diseases - diagnostic and clinical implications. *Reumatologia*. (2018) 56:243–8. doi: 10.5114/reum.2018.77976
53. van der Molen RG, Hamann D, Jacobs JF, van der Meer A, de Jong J, Kramer C, et al. Anti-SSA antibodies are present in immunoglobulin preparations. *Transfusion*. (2015) 55:832–7. doi: 10.1111/trf.12922
54. Ephrem A, Chamat S, Miquel C, et al. Expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells by intravenous immunoglobulin: a critical factor in controlling experimental autoimmune encephalomyelitis. *Blood* 2008;111:715–22.
55. Kessel A, Ammuri H, Peri R, et al. Intravenous immunoglobulin therapy affects T regulatory cells by increasing their suppressive function. *J Immunol* 2007;179:5571–5.
56. Bayry J, Siberil S, Triebel F, Tough DF, Kaveri SV. Rescuing CD4+CD25+ regulatory T-cell functions in rheumatoid arthritis by cytokine-targeted monoclonal antibody therapy. *Drug Discov Today* 2007;12:548–52.
57. Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Dasgupta S, Kazatchkine MD, Kaveri SV. Efficacy of regulatory T-cell immunotherapy: are inflammatory cytokines key determinants? *Nat Rev Immunol* 2008;8: 1p following 86.
58. Steinman RM, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature* 2007;449:419–26.
59. Naqvi AAT, Fatima K, Mohammad T, et al. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2020;1866(10):165878. doi:10.1016/j.bbadis.2020.165878
60. Wu A, Peng Y, Huang B, et al. Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China. *Cell Host Microbe*. 2020;27(3):325–328. doi:10.1016/j.chom.2020.02.001
61. Arya R, Kumari S, Pandey B, et al. Structural insights into SARS-CoV-2 proteins. *J Mol Biol*. 2021;433(2):166725. doi:10.1016/j.jmb.2020.11.024
62. Borkotoky S, Dey D, Hazarika Z. Interactions of angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2) and SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain (RBD): a structural perspective. *Mol Biol Rep*. 2023;50(3):2713–2721. doi:10.1007/s11033-022-08193-4

63. Li S, Yuan L, Dai G, Chen RA, Liu DX, Fung TS. Regulation of the ER Stress Response by the Ion Channel Activity of the Infectious Bronchitis Coronavirus Envelope Protein Modulates Virion Release, Apoptosis, Viral Fitness, and Pathogenesis. *Front Microbiol.* 2019;10:3022. doi:10.3389/fmicb.2019.03022
64. Malard F, Gaugler B, Gozlan J, Bouquet L, Fofana D, Siblany L, et al. Weak immunogenicity of SARS-CoV-2 vaccine in patients with hematologic malignancies. *Blood Cancer J* 2021;11(8):142.
65. Belkin A, Leibowitz A, Shargian L, Yahav D. The unique presentation of SARSCoV-2 Infection in patients with B-cell depletion: definition of 'persistent inflammatory sero-negative COVID'. *Clin Microbiol Infect* 2023;29(1):1–3.
66. Trottier CA, Wong B, Kohli R, Boomsma C, Magro F, Kher S, et al. Dual antiviral therapy for persistent Coronavirus disease 2019 and associated organizing pneumonia in an immunocompromised host. *Clin Infect Dis* 2023;76(5):923–5.
67. Casadevall A, Focosi D. SARS-CoV-2 variants resistant to monoclonal antibodies in immunocompromised patients constitute a public health concern. *J Clin Invest* 2023;133(6):e168603.
68. Senefeld JW, Franchini M, Mengoli C, Cruciani M, Zani M, Gorman EK, et al. COVID-19 convalescent plasma for the treatment of immunocompromised patients: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Netw Open* 2023;6(1):e2250647.
69. Lacombe K, Hueso T, Porcher R, Mekinian A, Chiarabini T, Georgin-Lavialle S, et al. Use of COVID-19 convalescent plasma to treat patients admitted to hospital for covid-19 with or without underlying immunodeficiency: open label, randomised clinical trial. *BMJ Med* 2023;2(1): e000427.
70. Huygens S, Hofsink Q, Nijhof IS, Goorhuis A, Kater AP, Te Boekhorst PAW, et al. Hyperimmune Globulin for Severely Immunocompromised Patients Hospitalized With Coronavirus Disease
Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Carbonneil C, et al. Inhibition of maturation and function of dendritic cells by intravenous immunoglobulin. *Blood* 2003;101:758–65.
71. Liu, C. et al. Characterization of antibody responses to SARS-CoV-2 in convalescent COVID-19 patients. *J. Med. Virol.* 93, 2227–2233 (2021).

72. Glück, V. et al. SARS-CoV-2-directed antibodies persist for more than six months in a cohort with mild to moderate COVID-19. *Infection* 49, 739–746 (2021)
73. Takamatsu, Y. et al. SARS-CoV-2-neutralizing humoral IgA response occurs earlier but is modest and diminishes faster than IgG response. *Microbiol. Spectr.* 21, e0271622 (2022).
74. Maeda, K. et al. Neutralization of SARS-CoV-2 with IgG from COVID-19-convalescent plasma. *Sci. Rep.* 11, 5563 (2021)
75. Cortes B. Multi-faceted functions of secretory IgA at mucosal surfaces. *Front Immunol.* 2013;4:185.
76. Renegar KB, Small PA Jr, Boykins LG, Wright PF. Role of IgA versus IgG in the control of influenza viral infection in the murine respiratory tract. *J Immunol.* 2004;173:1978–86.
77. Lombana TN, Rajan S, Zorn JA, Mandikian D, Chen EC, Estevez A, et al. Production, characterization, and in vivo half-life extension of polymeric IgA molecules in mice. *MAbs.* 2019; 11:1122–38.
78. Leong KW, Ding JL. The unexplored roles of human serum IgA. *DNA Cell Biol.* 2014;33:823–9.
79. Hansen IS, Baeten DLP, den Dunnen J. The inflammatory function of human IgA. *Cell Mol Life Sci.* 2019;76:1041–55.
80. Lecocq M, Detry B, Guisset A, Pilette C. FcαRI-mediated inhibition of IL-12 production and priming by IFN-γ of human monocytes and dendritic cells. *J Immunol.* 2013;190: 2362–71.
81. Rossato E, Ben Mkaddem S, Kanamaru Y, Hurtado-Nedelec M, Hayem G, Descatoire V, et al. Reversal of arthritis by human monomeric IgA through the receptor-mediated SH2 domain-containing phosphatase 1 inhibitory pathway. *Arthritis Rheumatol.* 2015;67:1766–77.
82. Indenbaum V, Koren R, Katz-Likvornik S, Yitzchaki M, Halpern O, Regev-Yochay G, Cohen C, Biber A, Feferman T, Cohen Saban N, Dhan R, Levin T, Gozlan Y, Weil M, Mor O, Mandelboim M, Sofer D, Mendelson E, Lustig Y. Testing IgG antibodies against the RBD of SARS-CoV-2 is sufficient and necessary for COVID-19 diagnosis. *PLoS One.* 2020 Nov 23;15(11):e0241164.
83. Văță, A., Anita, A., Manciu, C. D., Savuta, G., Luca, C. M., Roșu, F. M., Mihai, I. F., Anita, D. "Clinical significance of early IgA anti-SARS-CoV-2 antibody detection in

- patients from a Romanian referral COVID-19 hospital". *Experimental and Therapeutic Medicine* 23.6 (2022): 391.
84. Ma H, Zeng W, He H, Zhao D, Jiang D, Zhou P, Cheng L, Li Y, Ma X and Jin T: Serum IgA, IgM, and IgG responses in COVID-19. *Cell Mol Immunol.* 17:773–775. 2020.PubMed/NCBI View Article : Google Scholar
 85. Carnicelli A, Fiori B, Ricci R, Piano A, Bonadia N, Taddei E, Fantoni M, Murri R, Cingolani A, Barillaro C, et al: Characteristic of IgA and IgG antibody response to SARS-CoV-2 infection in an Italian referral COVID-19 hospital. *Intern Emerg Med.* 17:53–64. 2022.
 86. Zervou FN, Louie P, Stachel A, Zacharioudakis IM, Ortiz-Mendez Y, Thomas K and Agüero-Rosenfeld ME: SARS-CoV-2 antibodies: IgA correlates with severity of disease in early COVID-19 infection. *J Med Virol.* 93:5409–5415. 2021.PubMed/NCBI View Article : Google Scholar
 87. Marklund E, Leach S, Axelsson H, Nyström K, Norder H, Bemark M, Angeletti D, Lundgren A, Nilsson S, Andersson LM, Yilmaz A, Lindh M, Liljeqvist JÅ, Gisslén M. Serum-IgG responses to SARS-CoV-2 after mild and severe COVID-19 infection and analysis of IgG non-responders. *PLoS One.* 2020 Oct 21;15(10):e0241104.
 88. Sterlin D, Mathian A, Miyara M, Mohr A, Anna F, Claër L, et al. IgA dominates the early neutralizing antibody response to SARS-CoV-2. *Sci Transl Med.* 2021;13: eabd2223. pmid:33288662
 89. Kober C, Manni S, Wolff S, Barnes T, Mukherjee S, Vogel T, et al. (2022) IgG3 and IgM Identified as Key to SARS-CoV-2 Neutralization in Convalescent Plasma Pools. *PLoS ONE* 17(1): e0262162. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262162>
 90. Liu X, Wang J, Xu X, Liao G, Chen Y, Hu C-H. Patterns of IgG and IgM antibody response in COVID-19 patients. *Emerg Microbes Infect.* 2020;9: 1269–1274. pmid:32515684
 91. Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol.* 2014 Oct 20;5:520. doi: 10.3389/fimmu.2014.00520. PMID: 25368619; PMCID: PMC4202688.
 92. Prévost J, Gasser R, Beaudoin-Bussi res G, Richard J, Duerr R, Laumaea A, et al. Cross-sectional evaluation of humoral responses against SARS-CoV-2 Spike. *Cell Reports Medicine.* 2020;1: 100126. pmid:33015650

93. Goh YS, Chavatte J-M, Jielsing AL, Lee B, Hor PX, Amrun SN, et al. Sensitive detection of total anti-Spike antibodies and isotype switching in asymptomatic and symptomatic individuals with COVID-19. *Cell Reports Medicine*. 2021;2: 100193. pmid:33495757
94. Rowntree LC, Chua BY, Nicholson S, Koutsakos M, Hensen L, Douros C, et al. Robust correlations across six SARS-CoV-2 serology assays detecting distinct antibody features. *Clin Transl Immunol*. 2021;10: e1258. pmid:33680466
95. Suthar MS, Zimmerman MG, Kauffman RC, Mantus G, Linderman SL, Vanderheiden A, et al. Rapid generation of neutralizing antibody responses in COVID-19 patients. *Medrxiv*. 2020; 2020.05.03.20084442. pmid:32511565
96. Klingler J, Weiss S, Itri V, Liu X, Oguntuyo KY, Stevens C, et al. Role of IgM and IgA Antibodies to the Neutralization of SARS-CoV-2. *Medrxiv*. 2020; 2020.08.18.20177303. pmid:33173891
97. Luo H, Jia T, Chen J, Zeng S, Qiu Z, Wu S, et al. The Characterization of Disease Severity Associated IgG Subclasses Response in COVID-19 Patients. *Front Immunol*. 2021;12: 632814. pmid:33763078
98. Collins AM, Jackson KJL. A Temporal Model of Human IgE and IgG Antibody Function. *Front Immunol*. 2013;4: 235. pmid:23950757
99. Whitcombe AL, McGregor R, Craigie A, James A, Charlewood R, Lorenz N, et al. Comprehensive analysis of SARS-CoV-2 antibody dynamics in New Zealand. *Clin Transl Immunol*. 2021;10: e1261. pmid:33747511
100. Ferrante A, Beard LJ, Feldman RG. IgG subclass distribution of antibodies to bacterial and viral antigens. *Pediatr Infect Dis J* (1990) 9(8 Suppl):S16–24. 10.1097/00006454-199008001-00004
101. Qian Z, Zhang Z, Ma H, Shao S, Kang H and Tong Z (2022) The efficiency of convalescent plasma in COVID-19 patients: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *Front. Immunol*. 13:964398.
102. De Santis GC, Oliveira LC, Garibaldi PMM, Almado CEL, Croda J, Arcanjo GGA, Oliveira ÉAF, Tonacio AC, Langhi DM Jr, Bordin JO, Gilio RN, Palma LC, Santos EV, Haddad SK, Prado BPA Jr, Pontelli MC, Gomes R, Miranda CH, Auxiliadora Martins M, Covas DT, Arruda E, Fonseca BAL, Calado RT. High-Dose Convalescent Plasma for Treatment of Severe COVID-19. *Emerg Infect Dis*. 2022 Mar;28(3):548-555.

103. Centers for Disease Control and Prevention. SARS-CoV-2 Variant Classifications and Definitions. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-classifications.html> (Accessed January 2023).
104. Maeda, K. et al. Correlates of neutralizing/SARS-CoV-2-S1-binding antibody response with adverse effects and immune kinetics in BNT162b2-vaccinated individuals. *Sci. Rep.* 11, 22848 (2021).
105. Pérez-Then, E. et al. Neutralizing antibodies against the SARS-CoV-2 delta and omicron variants following heterologous CoronaVac plus BNT162b2 booster vaccination. *Nat. Med.* 28, 481–485 (2022).
106. Hernández-Luis, P. et al. Decreased and heterogeneous neutralizing antibody responses against RBD of SARS-CoV-2 variants after mRNA vaccination. *Front. Immunol.* 13, 816389 (2022).
107. Maggie Li, Evan J. Beck, Oliver Laeyendecker, Yolanda Eby, Aaron A. R. Tobian, Patrizio Caturegli, Camille Wouters, Gregory R. Chiklis, William Block, Robert O. McKie, Michael J. Joyner, Timothy D. Wiltshire, Allan B. Dietz, Thomas J. Gniadek, Arell J. Shapiro, Anusha Yarava, Karen Lane, Daniel F. Hanley, Evan M. Bloch, Shmuel Shoham, Edward R. Cachay, Barry R. Meisenberg, Moises A. Huaman, Yuriko Fukuta, Bela Patel, Sonya L. Heath, Adam C. Levine, James H. Paxton, Shweta Anjan, Jonathan M. Gerber, Kelly A. Gebo, Arturo Casadevall, Andrew Pekosz, David J. Sullivan; and the CSSC group, Convalescent plasma with a high level of virus-specific antibody effectively neutralizes SARS-CoV-2 variants of concern. *Blood Adv* 2022; 6 (12): 3678–3683.
108. Gasser R, Cloutier M, Prévost J, Fink C, Ducas É, Ding S, et al. Major role of IgM in the neutralizing activity of convalescent plasma against SARS-CoV-2. *Cell Reports*. 2021;34: 108790. pmid :33596407
109. Leisman DE, Ronner L, Pinotti R, et al. Cytokine elevation in severe and critical COVID-19: a rapid systematic review, meta-analysis, and comparison with other inflammatory syndromes. *Lancet Respir Med.* 2020;8(12):1233–1244.
110. Wong RSY. Inflammation in COVID-19: from pathogenesis to treatment. *Int J Clin Exp Pathol.* 2021;14(7):831–844.
111. von Meijenfeldt FA, Thålin C, Lissman T. Sustained prothrombotic changes in convalescent patients with COVID-19. *Lancet Haematol.* 2021;8(7): e475.

112. Rajamanickam A, Nathella PK, Selvaraj N, Manoj M, Thangaraj JWV, Muthusamy SK, Chethrapilly Purushothaman GK, Bhatnagar T, Ponnaiah M, Ramasamy S, Velusamy S, Babu S. Characterization of IL-10 Family of Cytokines in Acute and Convalescent COVID-19 Individuals. *J Interferon Cytokine Res.* 2023 Oct;43(10):469-477
113. Junqueira C, Crespo Â, Ranjbar S, et al. FcγR-mediated SARS-CoV- 2 infection of monocytes activates inflammation. *Nature.* 2022;606(7914):576–584.
114. Elvira Maličev, Klemen Žiberna, Katerina Jazbec, Ana Kolenc, Polonca Mali, Urška Rahne Potokar, Primož Rožman; Cytokine, Anti-SARS-CoV-2 Antibody, and Neutralizing Antibody Levels in Conventional Blood Donors Who Have Recovered from COVID-19. *Transfus Med Hemother* 11 June 2024; 51 (3): 175–184.
115. Pascolini, S.; Vannini, A.; Deleonardi, G.; Ciordinik, M.; Sensoli, A.; Carletti, I.; Veronesi, L.; Ricci, C.; Pronesti, A.; Mazzanti, L.; et al. COVID-19 and Immunological Dysregulation: Can Autoantibodies be Useful? *Clin. Transl. Sci.* 2021, 14, 502–508.
116. Sacchi, M.C.; Tamiazzo, S.; Stobbione, P.; Agatea, L.; De Gaspari, P.; Stecca, A.; Lauritano, E.C.; Roveta, A.; Tozzoli, R.; Guaschino, R.; et al. SARS-CoV-2 infection as a trigger of autoimmune response. *Clin. Transl. Sci.* 2020.
117. Gazzaruso, C.; Carlo Stella, N.; Mariani, G.; Nai, C.; Coppola, A.; Naldani, D.; Gallotti, P. High prevalence of antinuclear antibodies and lupus anticoagulant in patients hospitalized for SARS-CoV2 pneumonia. *Clin. Rheumatol.* 2020, 39, 2095–2097.
118. Woodruff, M.C.; Ramonell, R.P.; Lee, F.E.-H.; Sanz, I. Clinically identifiable autoreactivity is common in severe SARS-CoV-2 Infection. *medRxiv* 2020.
119. Gomes, C.; Zuniga, M.; Crotty, K.A.; Qian, K.; Hsu Lin, L.; Argyropoulos, K.; Li, H.; Cotzia, P.; Rodriguez, A. Autoimmune anti-DNA antibodies predict disease severity in COVID-19 patients. *medRxiv* 2021.
120. Cao W, Liu X, Bai T, et al. High-dose intravenous immunoglobulin as a therapeutic option for deteriorating patients with coronavirus disease 2019. *Open Forum Infect Dis* 2020;7:ofaa102.
121. Mohtadi N, Ghaysouri A, Shirazi S, et al. Recovery of severely ill COVID-19 patients by intravenous immunoglobulin (IVIG) treatment: a case series. *Virology.* 2020;548:1-5.
122. Lanza M, Polistina GE, Imitazione P, et al. Successful intravenous immunoglobulin treatment in severe COVID-19 pneumonia. *IDCases.* 2020;21:e00794.

123. Zhou Z, Jiang D, Xie SM, et al. Low-dose corticosteroid combined with immunoglobulin reverses deterioration in severe cases with COVID-19. *Signal Transduct Target Ther.* 2020;5:276.
124. LeVine S, Dhakal GP, Penjor T, et al. Case report: the first case of COVID-19 in Bhutan. *Am J Trop Med Hyg.* 2020;102(6):1205-1207.
125. Sakoulas G, Geriak M, Kullar R, et al. Intravenous immunoglobulin(IVIG) significantly reduces respiratory morbidity in COVID-19 pneumonia: a prospective randomized trial. *MedRxiv* 2020;2020.07.20.20157891.
126. Esen F, Özcan PE, Orhum G, et al. Effects of adjunct treatment with intravenous immunoglobulins on the course of severe COVID-19: results from a retrospective cohort study. *Curr Med Res Opin.* 2021;37:543-548.

ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. **Vancho Donev**, Georgi Nikolov THE POTENTIAL OF HUMAN PLASMA AND HUMAN BLOOD PRODUCTS FOR IMMUNE PROTECTION, *Probl Infect Parasit Dis* 2024, 52 (1), 22-28.
<https://doi.org/10.58395/w7sjj435>.
2. **Vancho Donev**, Yana Todorova, Radoslava Emilova, Georgi Nikolov & Maria Nikolova EXTENSIVE CHARACTERIZATION OF COVID-19 CONVALESCENT PLASMA FROM BULGARIAN DONORS, *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 2024, 38(1).
<https://doi.org/10.1080/13102818.2024.2432986>
3. **Donev V**, Emilova R, Todorova Y, Nacheva J, Stefanova T, Nikolov G, Nikolova M (2025) Immunotherapeutic potential of Bulgarian intravenous immunoglobulin (Immunovenin-intact 5% IgG). *Pharmacia* 72: 1-9.
<https://doi.org/10.3897/pharmacia.72.e149467>

УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ

- Участия в международни научни форуми, по темата на дисертацията

1. **12то EFIS/EJI Югоизточно Европейско Училище по Имунология (SEEIS 2023), 20-23.10.2023, Трогир, Хърватия:** Detection and characterization of SARS-COV-2 specific IgG and IgA in IVIG (intravenous immunoglobulin) produced from plasma collected during COVID-19 pandemic, **Ванчо Донеv**, Милена Алексова, Яна Тодорова, Радослава Емилова, Георги Николов, Мария Николова
2. **7th EUROPEAN CONGRESS OF IMMUNOLOGY(ECI 2024), 1-4.09.2024, Dublin, Ireland:** Recovery plasma from patients with covid-19 and intravenous immunoglobulin as rescue passive immunization in sars-cov-2 infection, **Vancho Donev**, Georgi Nikolov

- Участие в национални научни форуми, по темата на дисертацията

1. **XXI Национален конгрес по клинична микробиология и инфектология на БАМ (29.09 - 01.10.2023г.):** Детекция и характеризиране на SARS-COV-2 специфичните IgG И IgA в

реконвалесцентна плазма (ССР) от пациенти с COVID-19, **Ванчо Донеv**, Милена Алексова, Яна Тодорова, Радослава Емилова, , Георги Николов и Мария Николова

2. **Годишна научна конференция по имунология, 15 декември 2023 г., София:** Реконвалесцентна плазма от пациенти с COVID-19 и интравенозен имуноглобулин като спасителна пасивна имунизация при инфекция с SARS-COV-2, **Ванчо Донеv**, Милена Алексова, Яна Димитрова Тодорова, Радослава Емилова Грозданова, Георги Стоянов Николов , Мария Християнова Николова
3. **XXII Национален конгрес по клинична микробиология и инфектология на БАМ (13-15.09.2024г.):** Ковид реконвалесцентна плазма и интравенозен имуноглобулин като пасивна имунизация, **Ванчо Донеv**, Яна Димитрова Тодорова, Радослава Емилова Грозданова, Георги Стоянов Николов , Мария Християнова Николова
4. **Годишна научна конференция по имунология 13 декември 2024:** Имунотерапевтични и имуно-профилактични свойства на българския интравенозен имуноглобулин (имуновенин-интакт 5% igG, **Ванчо Донеv**, Яна Димитрова Тодорова, Радослава Емилова Грозданова, Георги Стоянов Николов , Мария Християнова Николова.

УЧАСТИЯ В ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКИ ПРОЕКТИ КАТО ИЗПЪЛНИТЕЛ

1. ***„Неинвазивни маркери за възпаление при пациенти с ринит с или без придружаваща бронхиална астма“***, Статус на проекта: приключил 2024, КП06-М63/9 от 2022г.

SUMMARY

Introduction: Human plasma is a clinically significant biological material, serving as a source of essential therapeutic proteins. Plasma Protein Therapies (PPT) are used in the treatment of congenital immunodeficiencies and life-threatening conditions. Since the first successful use of intramuscular immunoglobulin G (IgG) by Dr. Ogden Bruton in the 1950s, immunoglobulin therapy has become a cornerstone in managing primary and secondary immune deficiencies.

The development of intravenous immunoglobulin (IVIG) in the 1970s expanded therapeutic applications, offering both replacement and immunomodulatory functions. IVIG is derived from pooled donor plasma and contains a broad spectrum of antibodies, enabling its use in various autoimmune and inflammatory disorders. Despite its clinical utility, the variability in donor composition and product content presents challenges for standardization and efficacy assessment. With rising global demand—especially during events such as the COVID-19 pandemic—there is a growing need for optimized manufacturing processes and robust characterization of IVIG products, including detailed profiling of immunoglobulin subclasses, specific antibody content, and potential contaminants.

Aim: The aim of this dissertation is to investigate the principal immune components of human blood plasma used in the production of the final IVIG product, Imunovenin Intact 5%, and to characterize the pathogen-specific antibodies contained therein, with a view toward potential immunoprophylactic and immunotherapeutic applications.

Material and methods: A combination of standardized immunoassays, multiplex bead-based platforms and home-made immunoassays were employed. SARS-CoV-2 RBD-specific IgG and IgA antibodies were quantified in plasma samples using semi-quantitative ELISA (Euroimmun, Germany). Cytokine profiling, including 25 pro- and anti-inflammatory markers, neutralizing antibody activity against the SARS-CoV-2 wild-type strain and five major variants of concern (Alpha, Beta, Gamma, Delta, Omicron) and immunoglobulin isotyping (IgG1–4, IgA, IgM, IgE), were performed using Luminex-based ProcartaPlex™ panels (Thermo Fisher Scientific), with data acquisition and analysis via ProcartaPlex Analyst 1.0 software. Pathogen-specific IgG antibodies against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* (α -hemolysin) were detected using ELISA,

the latter via an in-house developed assay. Autoantibody screening was conducted using standardized ANA ELISA kits and confirmed by immunoblot analysis. Multiplex immunoassays were carried out on the Luminex® 200 system, and ELISA absorbance readings were obtained using a BioTek Epoch Microplate Spectrophotometer.

Results and conclusions: This study provides comprehensive insights into the immunological characteristics and therapeutic potential of convalescent plasma (CCP) and the Bulgarian intravenous immunoglobulin (IVIG) product "Imunovenin-Intact 5%." The findings confirm that CCP demonstrates considerable inter-individual variability, influenced by differences in donor immune responses. Notably, laboratory-confirmed SARS-CoV-2 infection does not consistently result in stable or high neutralizing antibody titers. Moreover, the presence of RBD-specific IgG and IgA antibodies does not necessarily correlate with neutralizing activity, indicating that qualitative assessments of antibody presence are insufficient for predicting functional efficacy.

The immunoprofile of CCP, including isotype and subclass composition and cytokine content, shows donor-specific variability, emphasizing the need for standardized screening and selection protocols prior to clinical use. In this context, a detailed immunological characterization of CCP—especially the specificity of antibodies against clinically relevant viral variants and the associated cytokine milieu—is essential to optimize its therapeutic value, particularly in resource-limited settings or during rapidly evolving pandemic conditions.

In contrast, "Imunovenin-Intact 5%" IVIG displays a consistent and native-like distribution of IgG subclasses (IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4), along with measurable levels of IgA, IgM, and minimal IgE. Functional evaluations revealed significantly higher neutralizing activity in IVIG compared to CCP, confirming its capacity to provide effective passive immunity. The product also demonstrated potent antibody-mediated activity against a broad spectrum of pathogens, including *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*, supporting its potential use in both therapeutic and prophylactic settings, particularly for immunocompromised patients.

Importantly, the IVIG batches analyzed contained pathogen-specific IgG antibodies, confirming their suitability for passive immunization. While some autoantibodies (e.g., ANA, anti-SSA, anti-Ro52) were detected at low to moderate levels, their presence did not suggest product contamination and is not expected to have clinical relevance, although they may interfere with post-infusion serological testing.

Overall, the study underscores the importance of rigorous immunological profiling and quality

control for both CCP and IVIG products. The data support the expanded clinical application of IVIG in infectious and immune-mediated diseases and highlight the need for further research into antibody functionality, specificity, and standardization protocols to enhance therapeutic efficacy and safety.