

ДО
Д-Р СТОЙЧО КАЦАРОВ
МИНИСТЪР НА ЗДРАВЕОПАЗВАНЕТО,
ПЛ. СВЕТА НЕДЕЛЯ
СОФИЯ

СТАНОВИЩЕ

От доц. д-р Милена Велизарова, дм
Главен координатор на Експертен съвет по клинична лаборатория,
Председател на Българското дружество по клинична лаборатория (БДКЛ),

Относно: валидирани методи за количествено определяне, референтни стойности, интерференции и значение на антитела срещу SARS-CoV-2.

УВАЖАЕМИ ГОСПОДИН МИНИСТЪР,

SARS-CoV-2 е бетакоронавирус, който причинява остро респираторно заболяване (Коронавирусно заболяване-2019, COVID-19). Коронавирусът има четири основни структурни протеини: шипчест (spike, S), мембранен (membrane, M), протеин на вирусната обвивка (envelope, E) и нуклеокапсиден (nucleocapsid, N) протеин. От тях spike (S) и nucleocapsid (N) са най-силно имуногенни. По-специално, S-протеинът е основен защитен антиген, който предизвиква усилен синтез на протеин неутрализиращи антитела (nAbs) и играе съществена роля във вирусното прикрепване, сливане, навлизане и разпространение. S-протеинът включва N-терминална S1 субединица, отговорна за свързването на вирусния рецептор и С-терминална S2 субединица, отговорна за навлизането на вируса в клетката. S1 субединицата има N-терминален домейн (NTD) и рецептор-свързващ домейн (RBD), като RBD директно се свързва с човешкия ангиотензин-конвертиращ ензим 2 (hACE2) рецептори в мембраната на клетката-гостоприемник.

Нуклеокапсидният протеин N образува комплекси с вирусна РНК и участва в транскрипцията и репликацията на вирусна РНК, сглобяването на генома, капсулиран във вириони, и инхибира процесите на клетъчния цикъл на клетките гостоприемници.

При инфекция със SARS-CoV-2 организмът създава сложен имунен отговор срещу вируса, който включва производството на специфични антитела срещу вирусни антигени, като шипчестия (spike) протеин (S) и нуклеокапсида (N), които са основните антигени.

Неутрализиращите антитела (nAbs) предотвратяват инфектирането на клетките чрез неутрализиране или инхибиране на биологичното действие на вирусния агент. SARS-CoV-

2 пAbs имат силно неутрализиращо действие срещу RBD в S1 субединицата, като пречат на свързването на RBD към рецептора ACE2. Точно тези антитела се синтезират в организма след ваксина и засега имат най-голямо значение за състоянието на изградения имунитет.

пAbs срещу нуклеокапсидния антиген корелират със степента на протективния имуен отговор при индивиди, които са преболедували COVID-19.

1. Методи за определяне на антитела срещу SARS-CoV-2

До момента повечето тестове са преминали процедура за спешна оторизация, одобрени са от FDA, но поради липсата на достатъчно време, не са валидирани от FDA (този процес е дълъг и изисква ресурси от всякакво естество, с които сега не разполагаме).

1.1. Бързите тестове за доказване на IgM/IgG антитела срещу COVID-19 са качествени имуохроматографски тестове за доказване на антитела от класове IgM и IgG, които имат най-висока чувствителност и специфичност и за двата вида антитела във времеви интервал 14-19 дни от появата на симптомите. Резултатът се изразява като "положителен" или "отрицателен". Недостатък на този вид анализ е субективното отчитане на резултата и по-ниската чувствителност, но все още намират приложение.

1.2. Тестовете за доказване на антитела срещу COVID-19 с хемилуминесцентен метод (CLIA) са подходящи за откриване на антитела от всички класове имуоглобулини, включително IgG срещу нуклеокапсидния антиген. Приложими са при всички случаи, когато има съмнение за прекарана COVID-19 инфекция, като допълваща диагностика към PCR диагностиката при доказване и проследяване на пациенти с COVID-19 инфекция, при симптоми, съмнителни за COVID-19 инфекция с давност от поне 10 дни, но отрицателен PCR и/или антигенен тест

1.3. Количествените тестове за доказване на неутрализиращи антитела срещу шипчестия (spike) протеин определят количеството на IgG антитела срещу антигена на S1 рецептор-свързващия домейн на Spike протеина (шипчестия протеин) на SARS CoV-2. Тези тестове позволяват количествена оценка на хуморалния имуен отговор на организма след ваксина, както и проследяването му в динамика. Нивото им е повишено и при пациенти, преболедували от COVID-19.

1.4. SARS-COV-2 IgM антителата са свидетелство за ранна инфекция с коронавирус. Появата им може да бъде установена средно не по-рано от 10 дни след заразяване. Не се препоръчва използването им като единствено изследване за диагностициране или изключване на инфекцията

Декларираната от производителите на тестове **диагностична чувствителност и специфичност** зависи от използвания метод. Според критериите на СЗО, използваните аналитични методи трябва да имат **95–97% чувствителност и 98–99% специфичност**.

Прилагам някои стойности, само като пример.

- LIAISON SARS-CoV-2 TrimericS IgG. чувствителност 96.9%, специфичност 99.5%;
- SARS-CoV-2 S-RBD IgG, MAGLUMI, SNIBE: чувствителност 100%, специфичност 99.6% след 15-ден от началото на симптомите.
- Anti- SARS CoV-2 total (CLIA метод), Cobas 6000, Roche Diagnostics: специфичност 99.8%, като спрямо други коронавируси декларираната специфичност е 100%, както и спрямо панел от най-чести простудни инфекциозни причинители е 100%. Този тест не е количествен, но е подходящ за доказване на преболеждане, защото детектира антитела срещу нуклеокапсиден антиген.
- Anti S1 RBD SARS CoV-2 IgG, Atellica IM, Siemens (CLIA метод)- количествен тест, хармонизиран спрямо СЗО стандарт с фактор 21,8 за превръщане от AU/ml в BAU/ml. След 15-ти ден от начало на инфекцията декларираната чувствителност на теста е 95.58% и декларирана специфичност 99.9 %. В сравнителни проучвания, проведени от производителя, е определено, че концентрация на Anti S1 RBD SARS CoV-2 IgG > 7.0 AU/ml корелира в 99.9% с наличие на вирус-неутрализиращи антитела с инхибираща сила над 50%.
- SARS-CoV-2 IgG II метод (Access, BECKMAN-COULTER - USA)- хемилуминесцентен имуноанализ с парамагнитни частици, предназначен за полуколичествено откриване на IgG антитела срещу SARS-CoV-2
- AdviseDx SARS-CoV-2 IgG II (ARCHITECT, ABBOTT DIAGNOSTICS), CMIA метод- за полуколичествено определяне на Anti S1 RBD SARS CoV-2 Ig G
- Справка в European Centre for Disease Prevention and Control (www.ecdc.europa.eu) и Joint Research Centre (JRC) показва, че са налични и се използват в EU 469 търговки кита със CE марка

С цел хармонизация на резултатите за **SARS-CoV-2 IgG** се препоръчва преизчисляване на стойностите с помощта на коефициенти (според вида на използваната аналитична платформа) в BAU/ml единици.

2. Има ли минимален защитен титър на антитела, предпазващ от заболяване от SARS-CoV-2?

Към момента все още няма препоръки за концентрация на вирус неутрализиращи антитела, над която да се приеме наличие на сигурна защита. Важно е да се уточни, че поради липсата на международни стандарти всяка компания-производител на такъв диагностичен тест, използва вътрешни стандарти и това прави резултатите, получени с различни аналитични платформи, несравними помежду си. Затова за проследяване на

концентрацията на вирус-неутрализиращи антитела във времето трябва да се използва един и същ метод, на един производител на диагностичен кит.

Все още няма научни данни и за това колко дълго антителата осигуряват защита. Това е продължителен процес на наблюдение с периодично мониториране на нивата на антителата в корелация с евентуалното наличие на симптоми на инфекция

Справка по темата в сайта на FDA ([EUA Authorized Serology Test Performance](#)) показва, че резултатите от тези тестове

- не следва да се интерпретират като степен на имунитет или защита от инфекция.
- не следва да са основа за диагноза, за изключване на остра инфекция или лечение на пациенти
- не следва да се използват за доказване на поствакцинален имунитет

Изрично се подчертава, че FDA е направила достъпни тези тестове по протокол за спешно одобрение и че тези IVD тестове могат да се използват за подпомагане на диагнозата на текуща или предишна инфекция със SARS-CoV-2, като идентифицират индивидите с адаптивен имунен отговор към вирус, който причинява COVID-19.

3. Референтни граници

При изследване на SARS CoV-2 IgG антитела, няма дефинирани референтни граници. Въведени са условни cut-off стойности, които разграничават отрицателен резултат (липса на антитела) и положителен резултат (наличие на антитела).

За някои аналитични платформи, cut-off стойности са:

DiaSorin 33.8 BAU/ml

Roche 0.823 BAU/ml

Snibe 4.33 BAU/ml

Abbot 7.1 BAU/ml

Mindray 12.16 BAU/ml

Thermo Fisher 28 BAU/ml (28–40 borderline)

Euroimmun (ELISA) 25.6 BAU/ml (25.6–35.2 borderline)

Резултати над тези cut-off стойности се отчитат като „положителни“ в смъсъл на надвишаване на най-ниската точка на отчитане, но в никакъв случай не корелират със степента на защита.

4. Интерференция на резултатите

Интерференцията зависи от вида на метода. Възможно е получаване на фалшиво положителни резултати за определяне на SARS-CoV-2-антитела при ревматологични, някои системни заболявания и след преболеждане от различни вирусни заболявания (парагрип).

5. Честота на изследванията за определяне на антитела срещу SARS-CoV-2.

Няма достоверни научни данни.

FDA дефинира невъзможност да се предскаже колко дълго антителата ще се детектират при положителните индивиди, както и че е неизвестно към момента дали те доказват протективен имунитет.

Заклучение:

1. На базата на гореизложените факти считаме, че изследването на антитела срещу SARS-CoV-2 от клас IgG може да потвърди „преболедуване“ (и двата типа IgG, но по-специално антителата срещу nucleocapsid (N) протеина).
2. Използваните аналитични методи трябва да отговарят на минималните критерии на СЗО за 95–97% чувствителност и 98–99% специфичност.
3. Все още няма достатъчно научни данни за корелация между нивата на SARS-CoV-2 IgG и силата на протективния им ефект, както и за тяхната динамика във времето.
4. Призоваваме колегите да изразяват резултатите в хармонизираните BAU/ml единици
5. Препоръчваме да се ползват методи и автоматични анализатори с предоставен от производителя коефициент за хармонизация към BAU единици.
6. Насърчаваме колегите да препоръчват минимален имунен праг от 130 BAU/ml, независимо от посочените от производителите cut-off стойности (предполага се, че при тези стойности вече има надежден имунен отговор).

С уважение:

Доц. д-р Милена Велизарова, дм

Гл. координатор на експертен съвет по клинична лаборатория