

Мотиви
към Заповед № РД-01-915 от 9.11.2021 г. за изменение и допълнение на Заповед
№ РД-01-890 от 03.11.2021 г.

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 nAbs 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. Неутрализиращите антитела (nAbs) срещу нуклеокапсидния антиген корелират със степента на протективния имунен отговор при индивиди, които са преболедували COVID-19.

Количественото определяне на антитела срещу SARS-CoV-2 се извършва основно с имуноензимни (ELISA), хемилуминисцентни (CLIA), електрохемилуминисцентни (ECLIA) и флуоресцентни ензимни тестове (FEIA) (1). В зависимост от спецификата на теста може да се изследват тотални имуноглобулини (IgG, IgM и IgA) срещу SARS-CoV-2 или отделно вирус-специфични IgG или IgM (2). Наличните тестове използват различни таргетни антигени (вирусните протеини N и S, както и отделни участъци от S протеина - S1 домена или RBD), поради което е възможно получаването на противоречиви резултати при изследването на един биологичен материал с различни тестове (1,3). Като опит за стандартизация на резултатите е прието количеството на антителата да се измерва в международни мерни единици BAU/ml, изработени на базата на въведен стандарт от СЗО за антитела (4,5).

Референтният метод за оценка на протекцията срещу коронавируса е Плак-неутрализиращият метод (най-често ELISA), който измерва възможността на антителата да неутрализира (инхибират) вируса (6). На негова основа са адаптирани тестовете за рутинно

определяне на антитела. Оторизираните тестове са на сайта на Агенцията за контрол на храните и лекарствата на САЩ (U.S. Food and Drug Administration - FDA) и са стотици (<https://www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-disease-2019-covid-19-emergency-use-authorizations-medical-devices/eua-authorized-serology-test-performance>).

Съгласно COVID-19 Diagnostic Testing Database на Съвместния изследователски център към Европейската комисия към 03.11.2021 г. тестовете с CE марка за откриване на антитела срещу SARS-CoV-2 са значителен брой. Тестовете са базирани предимно на имуноензимни и имунохроматографски методи. При това изобилие на тестове сравнението и унифицирането на резултатите от тях е изключително трудно поради липсата на стандартизиране на тестовете към момента. Най-добър индикатор за наличие на протективен антитялов имунитет е установяването на достатъчно количество неутрализиращи антитела. Вече са разработени такива търговски тестове (сPass), базирани на сурогатен вирус-неутрализиращ тест. До момента повечето тестове са преминали процедура за спешна оторизация, одобрени са от Агенцията за контрол на храните и лекарствата на САЩ (FDA). Основните видове са:

- 1.1. Бързите тестове за доказване на IgM/IgG антитела срещу COVID-19** са качествени имунохроматографски 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 имуноглобулини, 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 имунен отговор на организма след ваксина, както и проследяването му в динамика. Нивото им е повишено и при пациенти, преболели 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.

Пример за това са следните стойности на някои тестове:

- 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 преболедуване, 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 ВАU/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 над 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 ВАU/ml единици.

Тестовите за количествено определяне на антитела от клас IgG срещу S-протеина (RBD) на коронавируса имат референтни граници, над които се приема положителен резултат за преболедуване или прекарана латентна инфекция. Серумните специфични IgG антитела и клетки след преболедуване се доказват поне 6 месеца след инфекция и могат да осигурят защита срещу повторна инфекция при високи концентрации (7,8,9,10). Защитният титър при количествените тестове не е конкретно уточнен. Провеждат се сравнителни анализи на няколко теста за антитела, които показват различията в тестовите и акцентират върху необходимостта от стандартизация и установяване на прагова граница за протективен имунитет.

Предварителните изследвания, извършени от някои наши лаборатории показват, че при количество на специфичните IgG, по-малко от 4-5 пъти над горната референтна граница при ваксинирани и преболедували, може да настъпи повторна инфекция. С оглед на това

предлагаме като протективен титър на специфичните IgG да се счита количество над 10 пъти от горна референтна граница.

При вирус-неутрализиращите тестове, измерването на инхибиращия ефект на антителата е в проценти. Според насоките на производителя за интерпретация на тестовете, вирусната инхибиция трябва да е над 30%. Тя показва възможността антителата да блокират прикрепянето и навлизането на вируса в клетките. Като протективна стойност за вирус-инхибиращите антитела може да се приема над 60% инхибиция, която е индикатор за умерена или висока вирусна неутрализация (<https://www.genscript.com/covid-19-detection-svnt.html>).

Неутрализиращите антитела, които са насочени към спайк протеина (S) и най-вече към рецептор свързващия участък (RBD), осигуряват защита от заболяване. За сега не е известен минималният защитен титър на неутрализиращите антитела, предпазващ от заболяване от SARS-CoV-2. Според инструкциите на производителите над 20% инхибиция е необходима за да се интерпретира един резултат като положителен. За да има реална протективна стойност е необходима над 50% инхибиция като индикатор за умерена вирусна неутрализация.

Референтните граници на тестовете за количествено изследване на антителата са различни за различните тестове и задължително следва да се представят от лабораторията в резултата от изследването. Чувствителността и специфичността на последните поколения тестове е достатъчно висока (над 90% до 100%), за да гарантира тяхната надеждност. Научни публикации доказват, че специфичните антитела IgG и имунните клетки срещу коронавируса са маркер за прекарана инфекция, която минимизира риска от повторно заразяване в не по-малка степен от ваксинирането. Тяхното присъствие в организма на изследвания показва преминала среща с вируса и образуване на имунна реакция, подобна при ваксинирането, а това дава основание да се счита, че генерираният имунен отговор може да е надеждна протекция срещу заболяването.

Както всеки серологичен или молекулно-биологичен тест (вкл. PCR), така и антителните тестове могат да дадат фалшиво-положителни или фалшиво-отрицателни резултати.

Фалшиво-отрицателния резултат може да се дължи на: 1) недобър транспорт или съхранение на взетата кръвна проба, които могат да доведат до разрушаване на антителата; 2) имунна недостатъчност и имунно стареене, при които имунната система на изследвания не може да образува достатъчно количество специфични антитела срещу патогена; 3) използване на антителен тест за оценка на имунната реактивност при ваксиниран с COVID-19 ваксина за детекция на IgG срещу други, не-S протеини на вируса; 4) изследване на заразен със SARS-CoV-2 в първите две седмици след инфекция, когато имунната система все още не е образувала специфични IgG.

Няма конкретни данни за фалшиво-положителни резултати от тестовете. Допуска се те да се дължат на кръстосани реакции от образувани антитела след преболедуване от SARS-CoV-1.

При втората група тестове – за вирус-неутрализиращите антитела, измерването на инхибиращия ефект на антителата е в проценти. Вирусната инхибиция е над 30%, като за умерена се считат резултати от 60 до 90%, а за висока – над 90% (<https://www.genscript.com/covid-19-detection-svnt.html>).

Във всеки търговски тест за антитела са указани референтните граници на стойностите на изследванията за антитела. Специфичността на тестовете трябва да бъде над 90%, тъй като съществува кръстосан имунитет срещу SARS-CoV-2 и ендемичните слабопатогенни коронавируси (OC43, 229E, NL63 и HKU1). При липса на достатъчна чувствителност и специфичност на теста са възможни са фалшиво отрицателни и фалшиво положителни резултати.

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 смисъл на надвишаване на най-ниската точка на отчитане, но в никакъв случай не корелират със степента на защита.

Изследването за количествено определяне на антитела като индикатори за защита срещу коронавирусната инфекция в Швейцария и Австрия е прието да се извършва на 3 месеца. Освен тестовете за антитела, като критерий за клетъчна защита срещу вируса, може да се приеме и наличието на специфични имунни Т клетки, доказани с интерферон-гама базирани тестове. След прекарана инфекция с SARS-CoV-2, специфичните антитела се запазват в серума поне 6 месеца. При проведено изследване за антитела срещу SARS-CoV-2, показало положителен резултат, ще бъде необходимо да се извърши повторно изследване след 3 мес. за установяване наличие/отсъствие на антитела. Двете изследвания трябва да се извършат с един и същи тест, за да могат да се сравнят резултатите. Ако не се установи значителен спад в нивата на антителата трябва да се проведе следващо изследване след около 3 мес. При липса на антитела при второто изследване е необходимо лицето да се ваксинира.

В заключение:

1. Изследването на специфични антитела от клас IgG срещу SARS-CoV-2 с тестове може да служи като маркер за защита срещу COVID-19 при предложените критерии за чувствителност и специфичност на използваните тестове и при стойности повече от 150 BAU/ml. За целта могат да се ползват диагностични тестове които имат “CE” маркировка и са включени в базата данни на Съвместния изследователски център към Европейската комисия.
2. Изследванията следва да се подновяват на 90 дни в случай на използването им като документ за имунна протекция срещу коронавирусна инфекция.

Литературна справка:

- 1) Infantino, M., et al. The who international standard for COVID-19 serological tests: towards harmonization of anti-spike assays. *International Immunopharmacology* 2021; doi: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.108095>
- 2) Centers for Disease Control and Prevention. Interim Guidelines for COVID-19 Antibody Testing in Clinical and Public Health Settings. Updated Sept. 21, 2021, <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antibody-tests-guidelines.html>
- 3) Padoan, A., et al. SARS-CoV-2 neutralizing antibodies after one or two doses of Comirnaty(BNT162b2, BioNTech/Pfizer): kinetics and comparison with chemiluminescent assays. *Clinica Chimica Acta* (2021), doi: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2021.10.028>
- 4) WHO International Standard First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin (human) NIBSC code: 20/136 Instructions for use (Version 2.0, Dated 17/12/2020)
- 5) Mattiuzzo et al. Establishment of the WHO International Standard and Reference Panel for anti-SARS-CoV-2 antibody. 2020, WHO Expert Committee on Biological Standardization. WHO/BS/2020.2403
- 6) Matusali G et al. SARS-CoV-2 Serum Neutralization Assay: A Traditional Tool for a Brand-New Virus. *Viruses* 2021, 13(4), 655; <https://doi.org/10.3390/v13040655>
- 7) Dan JM, Mateus J, Kato Y, et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science* 2021; 371. <https://science.sciencemag.org/content/371/6529/eabf4063>
- 8) Tan Y, Liu F, Xu X, et al. Durability of neutralizing antibodies and T-cell response post SARS-CoV-2 infection. *Front Med.* 2020 Dec;14(6):746-751.
- 9) Liu C, Yu X, Gao C, et al.. Characterization of antibody responses to SARS-CoV-2 in convalescent COVID-19 patients. *J Med Virol.* 2021 Apr; 93 (4):2227-2233. doi: 10.1002/jmv.26646.
- 10) Andreano, E., Paciello, I., Piccini, G. *et al.* Hybrid immunity improves B cells and antibodies against SARS-CoV-2 variants. *Nature* (2021). <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04117-7>