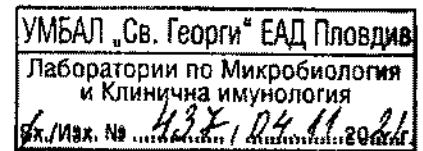


ДО Д-Р СТОЙЧО КАЦАРОВ  
МИНИСТЪР НА ЗДРАВЕОПАЗВАНЕТО  
МЗ, гр. СОФИЯ



## СТАНОВИЩЕ

ОТ ПРОФ. Д-Р МАРИАНА МУРДЖЕВА

главен координатор на ЕС по клинична имунология

**ОТНОСНО:** Ваше запитване за тестовете за количествено определяне на антитела срещу SARS-CoV-2

**УВАЖАЕМИ Г-Н МИНИСТЪР,**

В отговор на Вашите въпроси представям становище, с което съм запознала членовете на ЕС по клинична имунология и го изпращам с копие и до тях:

**1. Към момента какви и кои са валидираните методи за количествено определяне на антитела срещу SARS-CoV-2?**

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 неутрализират (инхибират) вируса (6). На негова основа са адаптирани тестовете за рутинно определяне на антитела. Оторизираните тестове са на сайта на 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>).

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

Тестовете 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 тестовете и акцентират върху необходимостта от стандартизация и установяване на прагова граница за протективен имунитет. Учените не са установили все още т. нар. „корелати на протекция“ – точната концентрация на антителата, необходими за защита от инфекция или заболяване. Трудно е да бъде намерена абсолютна прагова стойност на титъра, над която антителата да се считат за протективни и съответно под която да не се считат. Основният проблем е, че измерването на концентрацията на антителата е количествен показател и не отразява качествените свойства на антителата. 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. Предлагаме като протективна стойност за вирус-инхибиращите антитела да се приема над 60% инхибиция, която е индикатор за умерена или висока вирусна неутрализация (<https://www.genscript.com/covid-19-detection-svnt.html>).

**3. Какви са референтните граници на стойностите на изследванията за антитела, тяхната чувствителност и специфичност? Възможни ли са фалшиво положителни или фалшиво отрицателни резултати и при какви състояния/заболявания?**

Референтните граници на тестовете за количествено изследване на антитела 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 имуноен 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 инфекцията, 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>).

4. С каква честота следва да се провеждат изследвания за определяне на антитела, така че изследването да служи като доказателство за наличието на защита срещу SARS-CoV-2?

Изследването за количествено определяне на антитела като индикатори за защита срещу коронавирусната инфекция предлагаме да се извършва на 3 месеца. Така е прието в Швейцария и Австрия. Освен тестовете за антитела, може да се приеме и наличието на специфични имунни Т клетки, доказани с интерферон-гама базирани тестове, като критерий за клетъчна защита срещу вируса.

#### **В ЗАКЛЮЧЕНИЕ,**

1. Изследването на специфични антитела от клас IgG срещу SARS-CoV-2 с два типа тестове може да служи като маркер за защита срещу COVID-19 при предложените критерии на използваните тестове. За целта могат да се ползват оторизирани от FDA тестове за: 1) количествено определяне на антитела срещу RBD (S1 сегмент на Spike протеина) на вируса при количество над 10 пъти от горна референтна граница, отразена в резултата от изследването и 2) вирус-неутрализиращи антитела, измерени с ELISA със стойност над 60% за вирусна инхибиция.
2. Интерферон-гама базираните тестове за определяне на клетъчен имунитет срещу коронавируса (квантиферонов и T SPOT.COVID) също могат да дадат информация за протекция.
3. 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>

С уважение:

ПРОФ. Д-Р М. МУРДЖЕВА, ДМ, МЗМ

04.11.2021г

