

Stanovení a význam protilátek proti koronaviru SARS-CoV-2

Autoři: Václav Fejt¹; Zuzana Krátká^{2,5}; Hana Zelená^{3,6}; Tomáš Fürst^{4,5}

Působíště autorů: Oddělení společných laboratoří, Nemocnice Havlíčkův Brod¹; Imunologická laboratoř GENNET, s. r. o., Praha²; Centrum klinických laboratoří, Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě³; Katedra matematické analýzy a aplikací matematiky PřF UP v Olomouci⁴; 4BIN – Centrum pro bayesovskou inferenci⁵; Katedra biomedicínských oborů LF OU v Ostravě⁶

Infekce virem SARS-COV-2 vzbuzuje protilátkovou odpověď, kterou můžeme sledovat imunoenzymatickými (EIA, ELISA) nebo chemiluminiscenčními (CLIA) metodami. Protilátky se tvoří proti hrotovému (*spike*) antigenu (jeho podjednotkám S1 nebo S2), vazebné doméně (RBD), případně proti nukleoproteinu (NP). Detekovat můžeme protilátky tříd IgG, IgA, IgM nebo protilátky celkové. Zlatým standardem je virus neutralizační test (VNT), využívající neutralizaci virulentního původce protilátkou. Jeho alternativou je surogátní test neutralizačních protilátek, vycházející z principu kompetice o místo vazby ACE2r-S1.

Imunoenzymatické či CLIA metody poskytují podstatně lepší citlivost i specifitu než rychlotesty (laterální imunodifúze), různé imunoblotové a fluorescenční testy. Je třeba se uvědomit, že žádný test nemá stoprocentní senzitivitu. Proto je dobré používat k základnímu testu (zpravidla stanovujícím IgG proti S antigenu) ještě testy doplňkové, které umožní detekovat jiné typy protilátek. Zároveň je vhodné u sporných nebo hraničních nálezů sledovat dynamiku tvorby protilátek.

Většina souprav používá jako jednotku poměr optické denzity vzorku ku kalibrátoru. Jelikož nejsou zatím mezi sebou soupravy různých výrobců kalibrovány, je třeba vždy při hodnocení výsledků znát druh testu a použité jednotky (S/CO, firemní nebo arbitrární jednotky). Zvláště cennou informací, kterou někteří výrobci sami udávají, je uvedení korelace výsledků testu s VNT.

První diagnostické soupravy byly k dispozici již v březnu 2020. Postupně jsme vyzkoušeli soupravy zahraničních firem Euroimmun, Roche, Abbott, DiaSorin, Novatec, Binding Site, Epitope a domácích výrobců TestLine a Vidia. Další tuzemská pracoviště zkoušela soupravy např. firem DiaPro, Beckman Coulter, GA. V průběhu času vznikla pracovní skupina z lidí, kteří výsledky své práce začali prezentovat na různých seminářích a konferencích.

O koronavirové infekci bylo napsáno extrémní množství publikací, ale problematika diagnostiky je poměrně nepřehledná. Domníváme se, že je nezbytné nezapomínat na to, že infekce SARS-CoV-2 je virová infekce s obecnými vlastnostmi jiných virových infekcí a že nejvíc se naučíme praxí. V přednášce uvádíme výsledky z našich laboratoří. Naše soubory dat nejsou rozsáhlé, ale vychází z kvalitní diagnostiky (přímé i nepřímé) a znalosti anamnéz pacientů.

Poznatzky můžeme shrnout v těchto bodech:

- 1) Protilátky jsou dobrým markerem proběhlého onemocnění.
- 2) Nástup jejich detekovatelnosti se kryje zhruba s mizením infekciozity, tj. během druhého a třetího týdne od začátku onemocnění.
- 3) Produkce protilátek v dalším období je velmi variabilní. Je ovlivněna věkem pacientů (senioři mívají odpověď výraznější), typem imunitní odpovědi (zda dojde hlavně k aktivaci

nespecifické a T buněčné imunity nebo k aktivaci protilátkové imunity), přetrvávající expozici antigenům při komunitním přenosu apod. Vrchol IgG v některých typech stanovení je zhruba jeden měsíc od začátku onemocnění, v jiných souborech jsme viděli růst až během tří měsíců. IgM většinou klesá druhý až třetí měsíc, IgA má větší individuální variabilitu.

- 4) IgG bylo detekováno i po velmi dlouhé době. U seniorů z Domova Břevnice jsme zjistili vysoké hladiny IgG i celkových protilátek ještě 10 měsíců po onemocnění. V séru těchto seniorů byly přítomny neutralizační protilátky, které byly schopné zabránit reinfekci, i když sledovaní prokazatelně přišli do kontaktu s infekční osobou.
- 5) Naopak u mladých osob častěji zjišťujeme nízké hladiny protilátek, které klesají v řádu několika týdnů. Občas dochází k tvorbě IgG protilátek jen proti N proteinu nebo se IgG netvoří. Právě u těchto osob může docházet k reinfekcím. U výrazných sérologických nálezů jsme reinfekci nezaznamenali.
- 6) Prokazatelně jsme reinfekce zaznamenali pouze u lidí, kteří po prvním kontaktu bez výrazného klinického průběhu neměli kvalitně aktivovanou humorální odpověď. Až když se opakovaně setkali s vyšší dávkou viru, došlo k onemocnění a k výraznější imunitní reakci. Těchto případů jsme ze stovek vyšetřených viděli jen několik.
- 7) Za sporné nálezy považujeme :
 - slabé nebo hraniční pozitivitu v základním vyšetření (IgG anti S nebo total Ig anti S)
 - negativní IgG u jedinců s prokázaným onemocněním (s pozitivním PCR) nebo silnou suspekci (bez PCR testu, ale s odpovídajícím klinickým nálezem)
 - izolovanou pozitivitu IgA či IgM bez tvorby IgG protilátek
 - klinicky sporné stavy, suspektní, ale přímými metodami neověřené reinfekce

Sestavy testů:

1) Test základní

Jako základní diagnostický test doporučujeme stanovit IgG nebo celkové protilátky proti S1 nebo vazebné doméně RBD. Pro imunní stav svědčí zřetelná pozitivita. Některé firmy deklarují hranici pozitivní korelace s VNT (Roche 15 U/ml, Abbott 50 AU/ml). U indexů pozitivitu doporučujeme empiricky stanovenou hodnotu alespoň 1,5.

2) Test pro detekci časně infekce

V prvních týdnech infekce je možné stanovovat IgM, případně i IgA. U nálezů s nízkým IgG a vysokým IgM předpokládáme růst IgG během následujících týdnů.

3) Testy doplňkové

Pro sporné nálezy doporučujeme použít kombinaci metod stanovení protilátek proti dalším antigenům epitopům (S1, S2, NP). V případě pochybností je možné použít pro konfirmaci soupravu od jiného výrobce, protože jím použitý antigen S1 může mít trochu jinou specifitu. Vhodné je provést i opakované vyšetření v časovém odstupu.

4) Speciální – neutralizační protilátky

Neutralizační protilátky se stanovují VNT, který je pro účely produkce léčebné konvalescentní plazmy nenahraditelný. Vyhledání vhodných osob se může provést i běžnými testy IgG, nebo surogátním neutralizačním testem (též vazebný test).

Indikační situace

1) Ověření proběhlého, ale neprokázaného onemocnění.

U suspektních postkovidových komplikací, nebyla-li přímým průkazem potvrzena diagnóza (PCR bylo nedostupné, pozdě nebo chybně provedené), je stanovení protilátek jediným způsobem, jak proběhlou infekci zjistit.

2) Vyloučení infekciozity u slabé pozitivivity PCR

PCR s Ct nad 35 s dobře prokázanými protilátkami IgG znamená průkaz ribonukleových fragmentů bez infekčnosti. Tento stav je provozní komplikací, pokud se zjistí např. před operací, překladem nemocného na jiné oddělení, přijetím do ústavu následné nebo sociální péče. Vyžadované PCR může být pozitivní celou řadu týdnů, proto je výhodné stanovením protilátek vyloučit akutní infekci.

3) Stanovení vnímavosti pro epidemiologické účely

V ČR je vysoký počet osob po infekci, které již protilátky mají a vůči infekci jsou imunní. Doporučujeme spíše pátrat po přítomnosti humorální imunity než plošně používat antigenní testy. Stanovení protilátek stojí stejně jako dva testy antigenní. V případě prokázané imunity je riziko opakované infekce velmi nízké. Do Laboratorní skupiny MZ byl proto předložen návrh na úpravu schématu preventivního testování tak, aby osoby s protilátkami nemusely být následně 3 měsíce po testu vyšetřovány pomocí PCR či antigenním testem.

4) Odložení vakcinace

U osob s protilátkami není nutné provádět vakcinaci nyní, ale je možné ji odložit a ušetřené vakcíny použít ve prospěch rizikovějších a vnímavých osob .

5) Kontrola nestandardní vakcinace

Byla zaznamenána řada případů silné reakce po první dávce nebo propuknutí onemocnění těsně po očkování (pokud byla vakcinace provedena v inkubační době). Na místě je kontrola hladiny protilátek a zvážení posunutí očkování druhou dávkou na pozdější dobu.

6) Hledání dárců konvalescentní plazmy

Osoby po onemocnění s vysokými hladinami mohou být dárci léčebné plazmy. K vyhledání je možno použít jakoukoli sérologii, konečné rozhodnutí závisí na výsledku VNT.

7) Ověření imunity

Celá řada lidí chce vědět, jakou mají hladinu protilátek po infekci či vakcinaci nebo chtějí zjistit, zda neprodělali infekci asymptomaticky. Tato samoplátcovská vyšetření se dělají zcela běžně.

Interpretace stanovených protilátek v různém kontextu

Situace	PCR	Protilátky	Epidemiologická interpretace
Neimunní stav	negativní	negativní	Vnímový, neinfekční
Počínající onemocnění	Vysoce pozitivní	negativní	Infekční
2.-3.týden onemocnění	Pozitivní, někdy už negativní	pozitivní IgM, někdy i ostatní třídy	Suspektně infekční

Trvající průkaz fragmentů RNA	Slabě poz. (Ct nad 30-35)	zřetelně pozitivní	Nevnímový, neinfekční
Stav po onemocnění	negativní	zřetelně pozitivní	Nevnímový, neinfekční
Nediagnostikované onemocnění	negativní	zřetelně pozitivní	Nevnímový, neinfekční
Neimunní stav po onemocnění	aktuálně negativní, v minulosti pozitivní průkaz	negativní	Neinfekční, potenciálně vnímavý
Po vakcinaci	negativní	zřetelně pozitivní	Nevnímový, neinfekční

Závěr

Stanovení protilátek proti SARS-CoV-2 je běžně používané vyšetření, ale zatím nemá ustálená pravidla indikace ani interpretace. S přibývajícím zkušenostmi laboratorních pracovníků se interpretace výsledků stává jednodušší, ale je třeba respektovat základní principy antivirové imunitní odpovědi. Stanovení hladiny protilátek může pomoci řešit mnoho reálných situací a doufáme, že se v blízké době stane běžnou součástí diagnostické praxe. Uvítáme zapojení vyššího počtu zdravotníků do odborné diskuse.