



ČESKÁ LÉKAŘSKÁ SPOLEČNOST J. E. PURKYNĚ Společnost pro lékařskou mikrobiologii

Odborné stanovisko Společnosti pro lékařskou mikrobiologii vypracované ve spolupráci s Národní referenční laboratoří SZÚ pro chřipku a nechřipková respirační virová onemocnění, podpořené Laboratorní skupinou COVID MZ

Sérologický průkaz protilátek proti SARS-CoV-2

Detekce protilátek umožňuje pouze **nepřímý průkaz infekce COVID-19**. Jejich hladina a dynamika je výrazně ovlivněna vztahem mezi patogenem a hostitelem a v současné době, krátce po zavlečení SARS-CoV-2 do lidské populace, je znalost těchto parametrů málo robustní a podložená malým počtem studií s malým množstvím pacientů (řádově desítky).

Podle současných výsledků případových studií **(4)** dochází k vzestupu hladin protilátek nad detekční mez testů u většiny pacientů ve 2. týdnu po nástupu příznaků. Na vzorku 208 sér byla pozorována pozitivita IgM a IgA protilátek průměrně 5. den (rozptyl 3. - 6. den), u IgG 14. den (rozptyl 10. - 18. den) po nástupu příznaků **(3)**, v jiné studii na 173 probandech byla zaznamenána pozdější sérokonverze s mediánem 11 dní pro IgM **(10)**. Pozitivní prediktivní hodnota průkazu IgM a IgG je 100 % respektive 88,9 %, ale negativní prediktivní hodnota se pohybuje od 70 do 90 % **(3)**. Ve srovnání s přímým průkazem PCR byla pozorována senzitivita testů IgM cca 48 % a IgG cca 89 %, specifická byla 100 %, respektive 91 % **(5)**. Z těchto důvodů je využití při diagnostice akutní infekce problematické a výrazně méně spolehlivé než přímý průkaz metodou RT-PCR **(2)**. Při využití stanovení protilátek v diagnostice je vždy třeba respektovat pozdější nástup positivity (imunologické okno) a větší možnost selhání testu (horší negativní prediktivní hodnotu) zejména u asymptomatických a oligosymptomatických případů, případně u imunokompromitovaných osob (opožděná sérokonverze). Výsledek vyšetření přítomnosti protilátek tak může být i při dobré senzitivitě použitého testu u infekčního, i již symptomatického, pacienta dosud negativní **(11)**. Stejně jako u jiných respiračních virových infekcí **není sérologie v současné době doporučena k detekci akutní infekce ani k posuzování infekčnosti pacienta (1, 2, 12)**.

Některé práce uvádějí možnost ukončení izolace pacienta s dříve PCR prokázanou SARS-Cov-2 pozitivitou na základě 1 negativního PCR vyšetření v kombinaci s průkazem specifických IgG protilátek jako alternativu standardně, dle doporučení WHO, požadovaných 2 negativních PCR vyšetření v odstupu nejméně 24 hodin. V ČR k této alternativě zatím nebylo přistoupeno.

Některé studie zaznamenaly zkříženou reaktivitu s protilátkami proti jiným endemickým lidským koronaviřům **(6)**. V aktuální respirační sezóně byl takový původ respiračních infekcí (tj. způsobený jinými koronaviři než SARS-CoV-2) prokázán v ČR u cca 1% zaslaných do NRL pro chřipku a nechřipková respirační virová onemocnění.

Sérologické testy budou využity v prevalenčních studiích a jejich význam může stoupat s odstupem od introdukce agens do populace (včetně lokálních rozdílů). Vývoj protilátek a jejich přetrvávání po přirozené infekci bude však nutné ještě upřesnit stejně jako samotnou interpretaci nálezu **(6)**. Částečně lze využít studie, které byly provedeny s pacienty po infekci SARS, kde se prokázalo přetrvávání specifických protilátek méně než 6 let. T buněčná paměť zůstala zachována **(8)**. Také se sérologické testy jistě uplatní při validaci účinnosti budoucích vakcín. **(1, 2, 12)**.

Prof. MUDr. Pavel Dřevínek, Ph.D.
2. LF UK a Fakultní nemocnice v Motole
Ústav lékařské mikrobiologie
V Úvalu 84, 150 06 Praha 5
tel: +420 224435390
e-mail: pavel.drevinek@lfmotol.cuni.cz

Prof. MUDr. Milan Kolář, Ph.D.
Lékařská fakulta UP v Olomouci a Fakultní nemocnice Olomouc
Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc
tel: +420 585 63 2407 (2402),
fax: +420 585 63 2417
e-mail: kolar@fnol.cz

Z výše uvedeného vyplývají následující hlavní možnosti využití stanovení protilátek v praxi:

- 1) Prevalenční studie
- 2) Možnost ukončení karantény - v tomto smyslu je využitelné jen v případě negativního výsledku sérologického průkazu protilátek
- 3) Možnost ukončení izolace - ovšem WHO ani národní doporučení tuto variantu za běžných podmínek zvládnutí pandemie a dobré lokální úrovně zdravotnictví zatím nepřipouštějí

1. Preanalytická část vyšetření

Odpovídajícím materiálem je lidské sérum nebo plasma, v případě imunochromatografických rychlých testů je také možné bezprostředně využít periferní kapilární krev. Vzhledem k tomu, že při právě zrealizované studii kolektivní imunity byla zjištěna nižší citlivost testu při užití plně kapilární krve, **doporučujeme provádět i rychlé testy ze séra získaného odběrem srážlivé venózní krve**. Koagulace proběhne spontánně při pokojové teplotě během 15 minut, sérum není třeba vzhledem k velmi malému množství potřebnému pro reakci separovat centrifugací.

Materiál je zpracováván a před testováním skladován standardně podle návodu výrobce testu – obecně je možno sérum nebo plasmu uchovávat, po separaci provedené optimálně do 12 hodin po odběru, 72 hodin při teplotě 2-8°C, při delším skladování při teplotě -20°C. Pro zachování kvality vzorku je nutné se vyhnout vystavení primárního materiálu (srážlivé nebo nesrážlivé krve) teplotním výkyvům, opakovanému zamrazování a rozmrazování separovaného séra nebo plasmy. V opačném případě může nevhodnou manipulací s odebraným materiálem dojít k ovlivnění výsledku testu (např. u hemolytického séra).

2. Analytická část vyšetření

Vždy je třeba používat CE certifikované testy (**2**) a postupovat v souladu s návodem výrobce.

Hlavními imunogeny jsou strukturální nukleokapsidový (N), membránový (M) a spike (S) protein a rekombinantní varianty N a S proteinu jsou využívány při přípravě sérologických testů. S1 část Spike proteinu je považována za méně konzervativní, ale více specifickou pro SARS-CoV-2 (**6**). S protein, zejména receptor binding domain (RBD pro ACE2 receptor) S1 subjednotky, je nejvýznamnějším induktorem tvorby neutralizačních protilátek (**7, 9, 13**).

V současné době jsou k dispozici komerční testy k průkazu IgM, IgA a IgG protilátek pracující na principu ELISA, CLIA, imunochromatografie na nitrocelulóзовé membráně (rychlé testy), případně testy založené na nepřímé imunofluorescenci a virus neutralizační testy.

Z hlediska přesnosti stanovení a uživatelského komfortu jsou vhodnější standardní laboratorní testy založené na přístrojovém odečítání bez vlivu subjektivní chyby, která zatěžuje nepřímou imunofluorescenční mikroskopii nebo imunochromatografii na nitrocelulóзовé membráně, a bez nutnosti pracovat s infekčním virem u virus neutralizačního testu (SARS-CoV-2 náleží do skupiny vysoce rizikových agens). Některé praktické zkušenosti z dosud omezeného počtu studií ukazují menší citlivost rychlých imunochromatografických testů k nízké hladině protilátek a tím i nižší celkovou citlivost testu. Pokud by měly být testy protilátek použity k ukončení karantény, je z výše uvedeného zřejmé, že standardní laboratorní metodika (kvantitativní test např. na bázi ELISA) je pro toto vyšetření vhodnější.

Způsob hlášení pozitivních sérologických nálezů na národní úrovni bude upřesněn. Aktuálně by měl být konfirmován přímým průkazem (vyšetřením PCR), pro vyloučení infekčnosti pacienta.

S ohledem na aktuální stav znalostí bude odborné doporučení revidováno na základě dat získaných při testování pacientů v ČR nebo v zahraničí.

Vypracovali:

Za SZÚ a Národní referenční laboratoř:
MUDr. Barbora Macková
RNDr. Helena Jiřincová
MUDr. Hana Zákoucká
MUDr. Jan Kynčl, Ph.D.

Za Společnost pro lékařskou mikrobiologii:
Prof. MUDr. Pavel Dřevínek, Ph.D.
MUDr. Petr Hubáček, Ph.D.

Schválil: Výbor SLM ČLS JEP (4. května 2020)

doc. Marián Hajdúch za Laboratorní skupinu COVID MZ (7. května 2020)

Literatura:

1. European Centre for Disease Prevention and Control. Guidance for discharge and ending isolation in the context of widespread community transmission of COVID-19, 8 April 2020. Stockholm: ECDC; 2020.
2. European Commission. Guidelines on COVID-19 *in vitro* Diagnostic tests and their performance. Brussels, 15.4.2020, C(2020) 2391 final.
3. Guo Li et al. Profiling early humoral response to diagnose Novel Coronavirus disease (COVID-19). Oxford University Press for the Infectious Diseases Society of America. 2020
4. Haverl Anu et al. Serological nad molecular findings during SARS-Cov-2 infection: the first case study in Finland, January to February 2020. Euro Surveill. 2020; 25(11)
5. Jin Yuhiao et al. Diagnostic value and dynamic variance of serum antibody in coronavirus disease 2019. Journal Pre-proof Int. J. of Inf. Diseases.
6. Okba Nisreen M.A. et al. SARS-CoV-2 specific antibody responses in COVID-19 patients. medRxiv preprint. <https://doi.org/10.1101/2020.03.18.20038059>
7. Ronki M. et al. Immune responses and pathogenesis of SARS-CoV-2 during an outbreak in Iran: Comparison with SARS and MERS. Rev.Med.Virol. 2020;1-6
8. Tang F. et al. Lack of periferal memory B cell responses in recovered patients with Severe Acute Respiratory Syndrome: A six-year follow-up study. J. Immunol. 2011; 186:7264-7268
9. Woo Patrick C.Y. et al. Longitudinal profile of immunoglobulin G (IgG), IgM, and IgA antibodies against the Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) Coronavirus nucleocapsid protein in patients with pneumonia due to SARS Coronavirus. Clinical and Diagnostics Laboratory Immunology, July 2004, p.665-668
10. World Health Organisation. Laboratory testing strategy recommendations for COVID-19. Interim guidance 21 March 2020.
11. Yongchen Z. et al. Different longitudinal patterns of nucleic acid and sérology testing results based on disease severity of COVID-19 patients. Emerging Microbes&Infections, DOI:10.1080/22221751.2020.1756699
12. Zhao J. et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. medRxiv preprint. <https://doi.org/10.1101/2020.03.02.20030189>.
13. Zhou Guangyu et al. Perspectives on therapeutic neutralizing antibodies against the Novel Coronavirus SARS-Cov-2. Int. J. Biol. Sci. 2020, Vol. 16.