

# Vliv prodělání onemocnění Covid-19 na hladiny protilátek proti Ag RBD a NP po očkování

A. Adámková, N. Žárská, V. Kolář

Cílem této studie bylo sledovat dynamiku humorální imunitní odpovědi po očkování proti Covid-19. Zaměřili jsme se na IgG protilátky, důležité pro imunitní paměť, a se slizniční imunitou spojené protilátky třídy IgA proti diagnosticky nejvýznamnějším antigenům NP a RBD viru SARS-CoV-2. U 179 dobrovolníků s různou historií prodělání nemoci Covid-19 jsme měřili hladiny protilátek před očkováním a ve třech intervalech po aplikaci vakcíny Comirnaty od společnosti Pfizer-BioNTech nebo Janssen od Johnson & Johnson. Koncentrace protilátek byly stanovovány novou automatizovanou metodou CLIA.

## Úvod

Globální dopad pandemie Covid-19 vyústil ve veřejný zájem o účinné vakcíny. Vakcíny hrají zásadní roli v prevenci úmrtí, hospitalizací způsobených infekcí Covid-19 a přispívají ke kontrole šíření nemoci (WHO, červen 2021).

Původcem těžkého akutního respiračního syndromu označeného jako Covid-19 je obalený jednovláknový RNA virus SARS-CoV-2. Genom SARS-CoV-2 kóduje čtyři strukturální proteiny: spike (S), nukleokapsidový (NP), obálkový (E) a membránový (M). Proteiny S a NP jsou hlavní cílové antigeny v sérologických testech Covid-19 [1]. Protein S je exponován na vnější straně virové membrány, zatímco NP enkapsuluje virovou RNA v membránovém obalu. S se skládá z N-koncové oblasti S1 obsahující doménu vázající receptor (RBD), která se váže na receptor ACE2 (angiotensin konvertující enzym 2) na hostitelských buňkách, a C-koncové oblasti S2, která následně zprostředkovává fúzi mezi virovými a hostitelskými buněčnými membránami, a tak umožní vstup virové RNA do buňky [2].

Očkovací látky proti Covid-19, které jsou v ČR a v EU schválené, jsou postavené na třech odlišných technologiích: mRNA obalená lipidovými nanočásticemi (Comirnaty od Pfizer/BioNTech

a Spikevax od Moderna), DNA v adenovirovém vektoru (Vaxzevria od AstraZeneca a Janssen od Johnson & Johnson) a rekombinantní proteinová (Nuvaxovid od Novavax). Přestože se tyto vakcíny liší z hlediska použité technologie, všechny buď kódují tvorbu nebo přímo obsahují jediný antigen viru SARS-CoV-2, a to S protein včetně domény RBD. Indukují tedy tvorbu anti-S, včetně anti-RBD, nikoli anti-NP protilátek [3,4].

Analýza humorální imunitní odpovědi ukázala, že virus SARS-CoV-2 indukuje specifické protilátky ve třech izotypech imunoglobulinů – IgM, IgA a IgG. Řada zahraničních individuálních i populačních studií ukazuje, že medián detekce IgM a IgA protilátek proti SARS-CoV-2 u symptomatických pacientů je 5 dní, zatímco IgG jsou detekovány za 14 dní. Během prvních 3-4 týdnů se titry anti-SARS-CoV-2 Ab neustále zvyšují. Svého vrcholu dosahují zhruba 14-30 dní po nástupu příznaků a následně pomalu klesají. Perzistence sérových protilátek vyvolaných infekcí se pohybuje od jednoho měsíce do nejméně 6 měsíců [5]. Obdobná je dynamika tvorby protilátek i po očkování. Ta se však významně liší v hladinách a specifitě protilátek. Zatímco po očkování pozorujeme stejně jako u infikovaných osob vysoké hladiny protilátek proti S proteinu a jeho RBD doméně, protilátky proti NP jsou detekovány jen u post-infekčních pacientů, po aplikaci vakcíny se netvoří [6].

## Metody

Vzorky byly odebrány na základě informovaného souhlasu dárců, kteří se účastnili očkování proti Covid-19 v Nemocnici Tišnov. Všichni respondenti byli informováni o účelu využití naměřených dat a vše proběhlo v souladu s etickými pravidly zdravotnického zařízení.

Použité vakcíny byly Comirnaty (Pfizer/BioNTech) a Janssen (Johnson & Johnson). Booster vakcíny v době studie podány nebyly.

Koncentrace protilátek anti-RBD a anti-NP ve třídách IgA a IgG byly měřeny kity CLIA COVID-19 RBD IgA, CLIA COVID-19 RBD IgG, CLIA COVID-19 NP IgA, CLIA COVID-19 NP IgG na analyzátoru KleeYa® (TestLine / BioVendor Group). Hladiny pozitivit: negativní  $\leq 18$  U/ml, hraniční 18-22 U/ml, pozitivní  $\geq 22$  U/ml. Limit detekce 5 U/ml. CLIA kity byly standardizovány pomocí mezinárodního standardu WHO 20/136. Pro CLIA COVID-19 RBD IgG platí 1 U/ml = 1 BAU/ml.

Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí programu TIBCO STATISTICA 13, hladina významnosti činila 5 %.

## Výsledky a diskuse

V krátkodobé prospektivní vakcinační studii, které se zúčastnilo 179 dárců, byly měřeny vybrané druhy protilátek proti viru SARS-CoV-2 ve čtyřech časových intervalech: T0: před očkováním tentýž den, T1: T0 + 3 týdny (2. dávka vakcíny Comirnaty), T2: T1 + 3 týdny, T3: T2 + 6 týdnů.

Ve studii byla vyhodnocena protilátková odpověď u skupiny 145 osob, které se dostavily ke všem plánovaným odběrům. Z nich bylo 61 mužů (42 %) a 84 žen (58 %) ve věku 16-90 let, 135 osobám (93 %) byly podány dvě dávky vakcíny Comirnaty v rozmezí 21 dnů (v T0 a T1), 10 osobám (7 %) jedna dávka vakcíny Janssen (v T0).

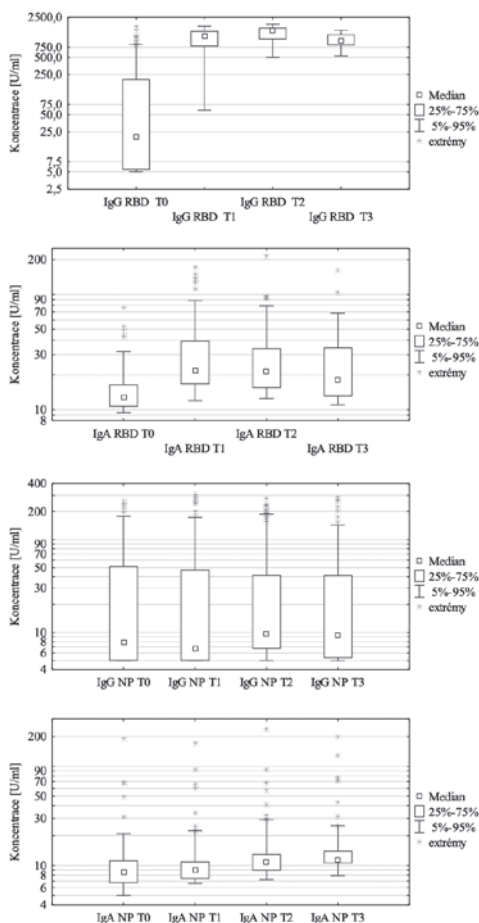
Odezva na vakcinaci byla zdaleka nejvýraznější u protilátek RBD IgG. K velkému nárůstu koncentrace RBD IgG došlo mezi časy T0-T1 (v mediánu 56x) a T1-T2 (1,26x), zatímco mezi časy T2-T3 došlo k poklesu (na 0,67x). Také koncentrace RBD IgA vzrostly mezi časy T0-T1 (v mediánu 1,71x), ale už mezi časy T1-T2 došlo k jejich poklesu (0,97x) a dále v T2-T3 (0,85x). Všechny změny byly statisticky významné. U koncentrací NP IgG nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl pro žádnou konkrétní dvojici časů měření. U koncentrací NP IgA došlo k sice statisticky významnému, ale velmi mírnému růstu koncentrací v celém průběhu měření.

Sedmdesát dobrovolníků (48 %) uvedlo v dotazníku, že prodělali Covid-19, nejčastěji 5-6 měsíců před T0. Tomu v této skupině odpovídaly nalezené hladiny paměťových IgG protilátek v T0: RBD IgG medián 89,2 U/ml NP IgG medián 36,7 U/ml, jak je uvedeno v tabulce.

Oproti tomu ve skupině 75 osob (52 %) bez uvedené historie Covid-19 byly u 15 z nich (20 %) naměřeny zvýšené hodnoty protilátek, zvl. RBD IgG a NP IgG. U této skupiny osob by se dalo předpokládat, že zřejmě prodělali Covid-19 s asymptomatickým průběhem nebo jen s lehkými příznaky, považovanými za jiné onemocnění.

U respondentů s prodělaným onemocněním Covid-19 byly statisticky významné nejen vyšší hladiny RBD IgG, ale také RBD IgA a NP IgA protilátek v porovnání s dobrovolníky bez historie tohoto onemocnění. To se projevilo zvláště v čase T1 (3 týdny po 1. dávce).

Graf: Závislost koncentrace jednotlivých protilátek na době stanovení



Tabulka: Přehled hodnot RBD IgG dle prodělaní onemocnění

RBD IgG	Covid-19 prodělán	Medián	25-75 %	5-95 %	M-W p
T0	ano	89,2	47,3 - 512,9	11,88 - 966,5	0,000
	ne	5,6	5 - 16,31	5 - 411,1	
T1	ano	1428,6	1243,7 - 1524,2	914,6 - 1809,2	0,000
	ne	837,1	408,3 - 1110,6	47,12 - 1439,8	
T2	ano	1481,3	1070,9 - 1694,9	777,8 - 1911,9	0,031
	ne	1440,9	998,5 - 1572,6	116,9 - 1843	
T3	ano	1051,9	840,7 - 1277,8	625,8 - 1579,6	0,067
	ne	930,7	760,9 - 1172,8	192 - 1455,2	

Nepatrný nárůst koncentrace NP IgA byl také v čase T2 a T3. Vzhledem k podzimmému období s narůstajícím počtem případů onemocnění Covid-19, mohlo dojít ke kontaktu osob po očkování s virem SARS Cov-2 (tehdy šířící se variantou delta). Respondenti v čase odběru T2 a T3 neuvledli žádné příznaky Covid-19. Onemocnění tak mohlo díky očkování proběhnout pouze na sliznicích. Což poukazuje na protektivní funkci IgA. K podobnému závěru došli také autoři článku [7].

Vliv prodělání Covid-19 na tvorbu vakcinačních protilátek je nejvýraznější u osob s relativně nižší hladinou protilátek po očkování. Celá vyšetřovaná skupina měla po očkování vysoké hladiny RBD IgG, ale u nativních osob byla dolní hranice koncentrací těchto protilátek několika násobně nižší (viz Tabulka).

## Závěry

V naší studii jsme ukázali, že vyšetření hladin širšího spektra protilátek proti viru SARS-CoV-2 poskytuje komplexnější obraz o stavu imunity osob po infekci Covid-19 nebo po očkování.

V souladu s dříve publikovanými studiemi řady autorů se potvrdilo, že IgG protilátky proti RBD a NP IgG přetrvávají více než 6 měsíců po prodělání nemoci. Citlivějším markerem je v tomto RBD IgG ale NP IgG umožňuje prokázat prodělanou infekci i u očkovaných osob.

U očkovaných osob se vytvářejí vysoké koncentrace RBD IgG, ale tvoří se také protektivní RBD IgA. Zvýšené hladiny RBD a NP IgA u očkovaných osob bez příznaků onemocnění indikují kontakt s virem, kdy infekce proběhla pouze na sliznicích. Sledování hladin IgA protilátek v séru, ale i ve slinách a stěrech ze sliznic, by mělo být předmětem bližšího zkoumání.

Metoda CLIA používá rychlou separaci imunokomplexu na magnetických částicích s vysoce citlivou chemiluminiscencí pro detekci, a proto

je hlavní metodou na moderních automatických imunoanalýzátorech. Nový imunoanalýzátor KleeYa®, v současné době jediný, který umožňuje, vedle IgG a IgM, automatizované měření IgA protilátek proti SARS-CoV-2, se ukázal jako vhodný pro populační studie i klinickou praxi.

## Poděkování

Děkujeme Mgr. Tomáši Zdražilovi za pomoc se statistickým zpracováním naměřených dat.

## Literatura

1. Bai Z, et al. The SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein and Its Role in Viral Structure, Biological Functions, and a Potential Target for Drug or Vaccine Mitigation. *Viruses*. 2021 10;13(6):1115.
2. Walls AC, et al. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*. 2020;181(2):281-292.e6.
3. Informace o dostupných vakcínách (z 1.3.2022). [covid.gov.cz/situace/informace-o-vaccine/informace-o-dostupnych-vakcinach](https://covid.gov.cz/situace/informace-o-vaccine/informace-o-dostupnych-vakcinach)
4. Sadarangani M, et al. Immunological mechanisms of vaccine-induced protection against Covid-19 in humans. *Nat Rev Immunol*. 2021;21(8):475-484.
5. Fu Y, et al. The Utility of Specific Antibodies Against SARS-CoV-2 in Laboratory Diagnosis. *Front Microbiol*. 2021;11:603058.
6. Assis R, et al. Distinct SARS-CoV-2 antibody reactivity patterns elicited by natural infection and mRNA vaccination. *NPJ Vaccines*. 2021;6(1):132.
7. Hennings V, et al. The presence of serum anti-SARS-CoV-2 IgA appears to protect primary health care workers from Covid-19. *Eur J Immunol*. 2022;52(5):800-809.