

Diagnostyka serologiczna w COVID-19

Podstawowe informacje dotyczące postępowania diagnostycznego

Jak wygląda diagnostyka zakażeń SARS-CoV-2?

Nowy koronawirus jest przyczyną pandemii – co oznacza, że jest bardzo zakaźny i z łatwością rozprzestrzenia się w wielu regionach świata. W związku z tym zahamowanie dalszego szerzenia się infekcji spowodowanej przez SARS-CoV-2 stało się głównym celem wielu krajów na całym świecie.

Badanie molekularne i jego zalety i ograniczenia

W obecnej sytuacji epidemiologicznej najbardziej istotne dla zahamowania rozprzestrzeniania się SARS-CoV-2 jest wykrywanie infekcji w jej **początkowej fazie**. W tym celu, zgodnie z zaleceniami Światowej Organizacji Zdrowia (WHO), stosuje się testy oparte o metodę **PCR**, które wykrywają materiał genetyczny wirusa i wykazują najwyższą **czułość między 7. a 14. dniem od kontaktu z SARS-CoV-2** (czyli wówczas gdy pacjent ma pierwsze objawy zakażenia) (1).

Na wynik RT-PCR ma jednak wpływ wiele czynników, m.in.:

- faza infekcji, w której pobrano od pacjenta próbkę do badania,
- jakość uzyskanego materiału (sposób pobrania wymazu z nosogardzieli),
- sposób transportu materiału biologicznego do laboratorium.

Po upływie około tygodnia od wystąpienia pierwszych objawów klinicznych czułość diagnostyki molekularnej (RT-PCR) w zakażeniach SARS-CoV-2 stopniowo maleje z powodu spadku liczby cząstek wirusa w nabłonku dróg oddechowych. Wówczas rośnie ryzyko wyników fałszywie ujemnych, pomimo toczącej się infekcji.

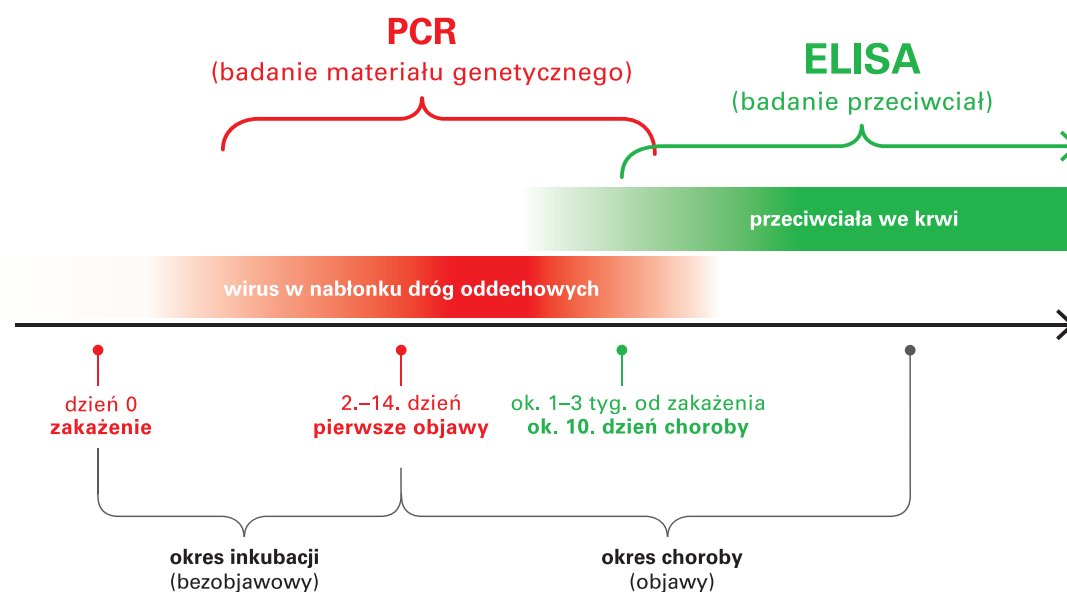
Rola diagnostyki serologicznej

Rozwój odpowiedzi immunologicznej przeciwko SARS-CoV-2

Na skutek kontaktu z koronawirusem SARS-CoV-2 układ immunologiczny rozpoczyna walkę z patogenem. W organizmie uruchamiane są różne mechanizmy obronne, m.in. **wytwarzane są specyficzne przeciwciała**, które można wykryć testem serologicznym (ELISA).

Testy serologiczne ELISA, wykrywające **specyficzne przeciwciała anty-SARS-CoV-2**, zaczynają odgrywać kluczową rolę w **późniejszej fazie** infekcji, ponieważ stają się idealnym dopełnieniem metody PCR, wydłużając czas umożliwiający przeprowadzenie wiarygodnej diagnostyki. Szacuje się, że w przypadku infekcji COVID-19 (**Coronavirus disease 2019**) **86% wszystkich przypadków pozostaje niezdiagnozowanych** (2).





Wykazano, że najbardziej wiarygodne wyniki otrzymuje się, badając **dwie klasy przeciwiata: IgA oraz IgG jednocześnie**.

Test serologiczny wykrywa obecność we krwi specyficznych przeciwiata, co wskazuje na kontakt pacjenta z wirusem.

UWAGA! Okno serologiczne – okres, w którym pacjent jest seronegatywny (badanie przeciwiata daje wynik ujemny) pomimo zakażenia.

- W początkowej fazie infekcji dochodzi do indukcji syntezy przeciwiata, ale ich poziom jest jeszcze bardzo niski, dlatego wyniki testów mogą być negatywne.
- Na skutek wzrostu poziomu przeciwiata danej klasy w czasie dochodzi do **serokonwersji**, czyli zmiany ujemnego odczynu serologicznego na dodatni.
- **Serokonwersja jest dowodem na aktywne zakażenie.**

UWAGA! Przeciwiata anty-SARS-CoV-2 pojawiają się dość późno (kilka dni po wystąpieniu objawów klinicznych), dlatego testy serologiczne nie mogą być stosowane jako podstawowe narzędzie w diagnostyce zakażeń SARS-CoV-2.

Wskazania do badania przeciwiata

Kiedy i w jakich przypadkach zaleca się wykonanie badania przeciwiata?

Wykrycie swoistych przeciwiata anty-SARS-CoV-2 **w klasie IgG** jest możliwe już **po około 10 dniach** od momentu wystąpienia pierwszych **objawów klinicznych** zakażenia (3).

Detekcja przeciwiata klasy IgG służy m.in. potwierdzeniu **kontakt z patogenem**. Ma to istotne znaczenie w następujących sytuacjach:

- **badania epidemiologiczne**, mające na celu ustalenie rozpowszechnienia zakażenia w populacji (3) (4),
- wykrywanie osób, które przeszły zakażenie bezobjawowo lub skąpo objawowo i mogły być źródłem infekcji dla innych ludzi (tzw. „cisi” nosiciele),
- **badania przesiewowe** osób, które miały kontakt z zakażonymi SARS-CoV-2, ale nie spełniają kryteriów wykonania badań PCR,
- **badania osób narażonych na SARS-CoV-2** (np. personel szpitali), które z uwagi na pracę mogą być źródłem zakażenia dla ludzi starszych i schorowanych, oraz **badania osób mających kontakt w wieloma ludźmi** (np. policja, personel sklepów, aptek),
- **wykonywane w interwałach czasu** pozwolą wychwycić ewentualną **serokonwersję** u osób bez/skąpo objawowych,
- u pacjentów z powikłaniami **po niedawnym przebyciu infekcji grypopodobnej**, którzy nie mieli diagnostyki w kierunku koronawirusa,
- podejmowanie **decyzji o kwarantannie**, jej kontynuacji lub przerwaniu,
- w wielu krajach europejskich badanie przeciwciał wdrażane jest w celu **wychwycenia osób odpornych na zakażenie**,
- wykrywanie **ozdrowieńców z wysokim poziomem IgG** w celu pobrania od nich plazmy do **stosowania w terapii** najcięższych przypadków COVID-19 (immunizacja bierna – transfuzja swoistych przeciwciał).

Dlaczego badać przeciwciała klasy IgA przeciwko SARS-CoV-2?

Znaczenie biologiczne przeciwciał w klasie IgA

- Znane są dwa typy immunoglobulin klasy A: surowiczy i wydzielniczy (sIgA). **Przeciwciała IgA stanowią główną klasę immunoglobulin w ludzkich wydzielinach śluzowo-surowiczych** (np. nosowo-gardłowych, oskrzelowych czy jelitowych), w których występują głównie w postaci dimeru. **W surowicy przeciwciała IgA występują głównie w postaci monomerycznej** (5).
- Przeciwciała klasy IgA uważane są za **pierwszą linię obrony organizmu przed szkodliwymi czynnikami** środowiska zewnętrznego. Przeciwciała sIgA odpowiadają m.in. za **neutralizację wirusów**, toksyn oraz enzymów wytwarzanych przez mikroorganizmy. W surowicy przeciwciała IgA pełnią rolę uzupełniającą, biorą udział m.in. w **neutralizowaniu tych antygenów, które przekroczyły barierę śluzówkową i przedostały się do krwioobiegu** (6).
- Synteza przeciwciał klasy IgA jest indukowana głównie w błonach śluzowych, ale również systemowo. **Odpowiedź immunologiczną w klasie IgA wywołuje wiele patogenów atakujących drogi oddechowe**, m.in. wirus grypy, adenowirusy czy togowirusy (7).
- Przeciwciała IgA są kluczowymi **cząsteczkami efektorowymi układu immunologicznego w przewodzie pokarmowym**. Znaczenie diagnostyczne tych przeciwciał w schorzeniach gastroenterologicznych związanych z **naruszeniem błon śluzowych** jest dobrze poznane.

IgA w COVID-19

Ze względu na pojawienie się infekcji SARS-CoV-2 (COVID-19) pod koniec 2019 roku kompleksowe badania na temat odpowiedzi układu immunologicznego na tę infekcję nie zostały jeszcze opublikowane, jednakże jest już dostępnych kilka doniesień naukowych:



- Przeciwciała w klasie IgA są wykrywane w wysokich mianach w przypadku wielu zakażeń układu oddechowego i są uznawane za cenny marker diagnostyczny. **Intensywna synteza przeciwciał klasy IgA u chorych na COVID-19** została już opisana (8).
- Badania czułości testu EUROIMMUN Anty-SARS-CoV-2 wykazały, że **przeciwciała klasy IgA** są wykrywane u części chorych już **przed upływem 10 dni od pojawienia się pierwszych objawów klinicznych COVID-19**.
- Detekcja swoistych przeciwciał anty-SARS-CoV-2 w klasie IgA może być **dotatkowym narzędziem diagnostycznym już we wczesnej fazie infekcji** wywołanej przez SARS-CoV-2, ponieważ produkowane są wcześniej niż IgG (4).
Najwyższą czułość diagnostyczną uzyskuje się podczas równoległego badania specyficznych przeciwciał anty-SARS-CoV-2 w klasie IgA oraz IgG.
- Pomimo zastosowania swoistego antygeny **część próbek od zdrowych dawców krwi pobranych przed pandemią COVID-19 dała pozytywne wyniki** w teście ELISA Anty-SARS-CoV-2 (**IgA**) podczas naszych badań wewnętrznych (do 12,7%).
- W przypadku zakażeń SARS-CoV(-1) specyficzne przeciwciała przeciwko białku S jako jedyne wykazywały **właściwości neutralizujące** (9). Ponadto wykazano ścisłą **korelację pomiędzy testem ELISA Anty-SARS-CoV-2 (IgA, IgG) a testem neutralizacji PRNT** (*Plaque Reduction Neutralization Test*) (4). Test PRNT uważa się za „złoty standard” pomiaru skuteczności przeciwciał w neutralizowaniu wirusów chorobotwórczych (10).

Porównanie badania przeciwciał klasy IgA vs. IgM

- Przeciwciała klasy **IgM** są skierowane głównie przeciwko **białku N, które wykazuje wysoki poziom homologii** (90%) pomiędzy różnymi koronawirusami patogennymi dla człowieka, co powoduje **wiele reakcji krzyżowych**. Dlatego test do wykrywania przeciwciał **klasy IgA ma wyższą specyficzność** w porównaniu do testu wykrywającego przeciwciała w klasie IgM.
- Detekcja swoistych przeciwciał anty-SARS-CoV-2 w klasie IgA może być przydatnym narzędziem diagnostycznym we wczesnej fazie infekcji wywołanej przez SARS-CoV-2 (COVID-19), ponieważ produkowane są wcześniej niż IgG.

Rola przeciwciał IgG

Przeciwciała klasy IgG a odporność

- **Rola przeciwciał w klasie IgG jest szczególnie istotna w walce z mikroorganizmami**. W surowicy przeciwciała te stanowią około 75% wszystkich immunoglobulin (11).
- W przypadku większości zakażeń **podwyższony poziom specyficznych przeciwciał klasy IgG przeciwko określonemu patogenowi koreluje ze zwiększoną odpornością** na zakażenie tym chorobotwórczym drobnoustrojem.
- Przeciwciała **neutralizujące** IgG powstają w odpowiedzi immunologicznej na zakażenie (lub szczepienie) i pełnią kluczową rolę w kontrolowaniu infekcji wirusowej (12).
- Badanie obecności specyficznych przeciwciał klasy IgG jest formą badania skuteczności szczepionek oraz oceny odporności poszczepiennej (13).



Rola ochronna IgG w COVID-19

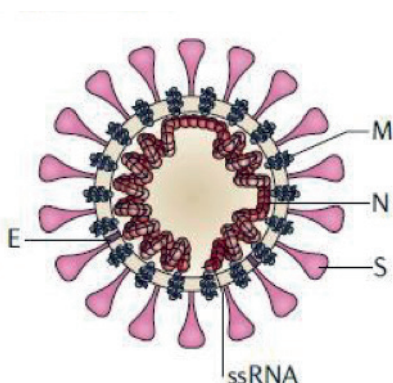
- Na modelu zwierzęcym (makaki) wykazano, że **obecność przeciwciał klasy IgG** wytworzonych w wyniku pierwotnej infekcji SARS-CoV-2 pełni **funkcję ochronną w przypadku reinfekcji** (14).
- W leczeniu chorych na COVID-19 zaczęto **z powodzeniem wykorzystywać przeciwciała pozyskane od osób, które przeszły infekcję SARS-CoV-2**. Stan zdrowia chorych, którzy otrzymali 1 dawkę osocza od ozdowieńców (200 mL, miano przeciwciał neutralizujących 1:640), znacząco się poprawił, a wirurgia zanikła do 7 dni od podania osocza (15).

Antygen, przeciwko któremu badamy przeciwciała w teście ELISA EUROIMMUN

Unikalny antygen zastosowany w teście: rekombinowana podjednostka S1 białka strukturalnego S SARS-CoV-2

to wysokospecyficzny antygen, który zapewnia wiarygodną diagnostykę:

- Podobnie jak u innych koronawirusów, białka strukturalne SARS-CoV-2 to: **białko S** (glikoproteina powierzchniowa), E (białko osłonkowe), M (membranowe), N (białko nukleokapsydu). **Białka S oraz N to białka o właściwościach immunogennych.**



Źródło: Cui J. i wsp. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology*. 2019, 17, strony 181–192.

- Analiza genomu SARS-CoV-2 wykazała, że **region S1 wykazuje niższą homologię z analogicznymi regionami innych patogennych dla człowieka koronawirusów**, w porównaniu do regionu N, dla którego homologia ta wynosi 90% (16). W związku z tym w teście EUROIMMUN Anty-SARS-CoV-2 jako antygen zastosowano podjednostkę S1 białka S w celu uzyskania jak najwyższej specyficznego testu.
- Antygen S1 zapewnia **wyższą specyficzność** testu serologicznego w porównaniu do antygeny N lub S. Ze względu na niską homologię podjednostki S1 w obrębie koronawirusów **reakcje krzyżowe z przeciwciałami przeciwko większości patogennych dla ludzi przedstawicieli tej rodziny wirusów są wykluczone.**
- Nowy koronawirus wnika do komórek gospodarza dzięki **wiązaniu podjednostki S1 białka strukturalnego S SARS-CoV-2 z receptorem ACE2 (Angiotensin-Converting Enzyme 2)** na powierzchni komórek gospodarza (17).



Interpretacja wyników

Wynik negatywny IgA, IgG (nie wykryto przeciwciał we krwi pacjenta):

1. brak kontaktu z koronawirusem SARS-CoV-2,
2. badanie wykonano w trakcie trwania „okna serologicznego”.

By wykluczyć „okno serologiczne”, badanie należy powtórzyć po około 2–4 tygodniach. **Wynik ujemny pierwszego badania oraz dodatni drugiego (tzw. serokonwersja) potwierdza świeże zakażenia.**

Wynik wątpliwy IgA, IgG (wynik w rejonie „szarej strefy”, punktu odcięcia, cut-off):

1. badanie należy powtórzyć (po 1–2 tygodniach).

Wynik pozytywny IgA, IgG (obecne przeciwciała we krwi pacjenta):

1. przebyta lub aktywna infekcja SARS-CoV-2,
2. reaktywność krzyżowa – u 3,4% osób szczepionych na grypę oraz 2,5% pacjentów z autoprzeciwciałami wynik badania (IgG) może być pozytywny, mimo braku zakażenia.

Wyniki badań laboratoryjnych powinny zawsze być interpretowane przez lekarza z uwzględnieniem wywiadu, danych epidemiologicznych, objawów klinicznych oraz chorób współistniejących.

Informacje o teście ELISA Anty-SARS-CoV-2

nr katalogowy: EI 2606-9601 A, EI 2606-9601 G

metodyka: ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)

oznaczane klasy przeciwciał: IgA, IgG

oznaczenie: półilościowe (współczynnik *Ratio*)

materiał do badania: krew (surowica lub osocze)

certyfiakat CE-IVD: TAK

czułość:

klasa IgA: 100%

klasa IgG: 80%

równoległe badania IgA i IgG: 100% (10 dni od wystąpienia objawów)

specyficzność:

klasa IgA: 92,5%

klasa IgG: 98,5%

antygen: rekombinowana podjednostka S1 białka strukturalnego S SARS-CoV-2 (wysokoswoisty dla SARS-CoVs, niewielka liczba reakcji krzyżowych)

1 zestaw ELISA służy do badania: 93 próbek (IgG), 90 próbek (IgA)

możliwość automatyzacji: TAK



Automatyzacja, czas wykonania oznaczenia, przepustowość:

- manualnie: 93 oznaczenia (1 płytka) w 2 h
- Analizator ELISIA: 16–32 surowice x 2:15 h
- EUROIMMUN Analyzer I-2P: 224 oznaczenia w 5:51 h
- EUROIMMUN Analyzer I: 360 oznaczeń w 7:16 h
- EUROLabWorkstation: 1392 oznaczenia w 8:52 h

Autorytety o testach serologicznych

Wiele organizacji, w tym **Światowa Organizacja Zdrowia (WHO)** oraz **Centra Prewencji i Kontroli Chorób (CDC)**, rozpoczynają **badania specyficznych przeciwciał anty-SARS-CoV-2 na globalną skalę**. Według wybitnych, światowych ekspertów testy serologiczne są niezbędne do zrozumienia epidemiologii COVID-19 (18).

H. Holden Thorp, Redaktor Naczelny Science:

„Pilnie potrzebujemy testów serologicznych, które pokazują, czy ktoś miał infekcję i wyzdrowiał. Musimy być w stanie zidentyfikować osoby, które mają pewną odporność na SARS-CoV-2, ponieważ zrozumienie ich biologii może przyczynić się do pomocy światu w odzyskaniu sił”.

Science, 27.03.2020, Vol. 367, Issue 6485, strona 1405, doi: 10.1126/science.abb8492.

Michael Ryan, WHO Executive Director for Health Emergencies, briefing 27.03.2020:

„Znajomość prawdziwej liczby przypadków – w tym łagodnych – pomoże ustalić częstość występowania i śmiertelność COVID-19 w różnych grupach wiekowych. Pomoże również politykom decydować o tym, jak długo powinny trwać wyłączenia i kwarantanny. Potrzebujemy właściwych odpowiedzi, aby kierować polityką”.

Matt Hancock, Sekretarz Zdrowia UK:

„Kupiliśmy teraz 3,5 miliona testów na przeciwciała, które pozwolą ludziom zobaczyć, czy mają wirusa i są na niego odporni, a następnie wrócić do pracy. Oczekujemy, że ludzie nie będą w stanie go złapać, z wyjątkiem wyjątkowych okoliczności, po raz drugi”.

Profesor Yvonne Doyle, Dyrektor Medyczny Public Health England:

„Test na przeciwciała, powie Ci, czy miałeś tę chorobę. Jest to absolutnie niezbędne z dwóch powodów: aby zrozumieć, co się dzieje, ale także pozwolić ludziom wrócić do pracy. (...) Członkowie społeczeństwa będą mogli wykonać badanie krwi, odesłać go pocztą i poddać analizie”.

Jason Horowitz, The New York Times, 4.04.2020:

„Posiadanie swoistych przeciwciał przeciwko wirusowi we krwi – potencjalny marker odporności – może wkrótce określić, komu wolno iść do pracy, a kto nadal pozostanie zamknięty”.



Zamówienia:

województwo łódzkie, mazowieckie
mgr inż. **Mateusz Miłosz**
e-mail m.milosz@euroimmun.pl
tel. kom. 501 411 390

województwo dolnośląskie, śląskie, opolskie
dr n. farm. **Marta Janik**
e-mail m.janik@euroimmun.pl
tel. kom. 508 399 744

województwo pomorskie, kujawsko-pomorskie
mgr **Magdalena Ratajczak**
e-mail m.ratajczak@euroimmun.pl
tel. kom. 510 171 461

województwo lubuskie, wielkopolskie, zachodniopomorskie
mgr **Małgorzata Walerych**
e-mail m.walerych@euroimmun.pl
tel. kom. 509 836 090

województwo świętokrzyskie, lubelskie, podkarpackie, małopolskie
mgr **Paweł Krzemień**
e-mail p.krzemien@euroimmun.pl
tel. kom. 509 657 480

województwo warmińsko-mazurskie, podlaskie
dr **Marek Łaszyn**
e-mail m.laszyn@euroimmun.pl
tel. kom. 501 411 235



Bibliografia

1. **Zhao J. i wsp.** Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. *medRxiv (Preprint)*. [Online] 2020. doi: 10.1101/2020.03.02.20030189.
2. **Li R. i wsp.** Substantial undocumented infection facilitates the rapid dissemination of novel coronavirus (SARS-CoV2). *Science*. [Online] 2020. doi: 10.1126/science.abb3221.
3. **Liu L. i wsp.** A preliminary study on serological assay for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in 238 admitted hospital patients. *medRxiv (Preprint)*. [Online] 2020. doi: 10.1101/2020.03.06.20031856.
4. **Okba N.M.A. i wsp.** SARS-CoV-2 specific antibody responses in COVID-19 patients. *medRxiv (Preprint)*. [Online] 2020. doi: 10.1101/2020.03.18.20038059.
5. **Czyżewska-Buczyńska A. i wsp.** IgA istotny element układu odporności – wybrane zagadnienia. *Postepy Hig Med Dosw.* (online). 2007, 61, strony 38–47.
6. **Cunningham-Rundles C.** Physiology of IgA and IgA deficiency. *J. Clin. Immunol.* 2001, 21(5), strony 303–309.
7. **Grzesiowski P., Hryniewicz W.** Immunologia szczepień ochronnych. [red.] Gołąb J., Jakóbsiak M., Lasek W. *Immunologia*. Warszawa : Wydawnictwo Naukowe PWN, 2002, strony 356–370.
8. **Amanat F. i wsp.** A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. *medRxiv (Preprint)*. [Online] 2020. doi: 10.1101/2020.03.17.20037713.
9. **Yu S. i wsp.** Retrospective Serological Investigation of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Antibodies in Recruits from Mainland China. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005, 12(4), strony 552–554.
10. **Thomas S.J. i wsp.** Dengue Plaque Reduction Neutralization Test (PRNT) in Primary and Secondary Dengue Virus Infections: How Alterations in Assay Conditions Impact Performance. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 2009, 81(5), strony 825–833.
11. **Napiórkowska-Baran K. i wsp.** Oznaczanie przeciwciał w codziennej praktyce. Część I – właściwości przeciwciał. *Alergia Astma Immunologia.* 2019, 24(2), strony 51–58.
12. **Wu F.** Neutralizing antibody responses to SARS-CoV-2 in a COVID-19 recovered. *medRxiv (Preprint)*. [Online] 2020. doi: 10.1101/2020.03.30.20047365.
13. **Davidkin I.** Persistence of Measles, Mumps, and Rubella Antibodies in an MMR-Vaccinated Cohort: A 20-Year Follow-up. *The Journal of Infectious Diseases.* 2008, 197(7), strony 950–956.
14. **Bao L. i wsp.** Reinfection could not occur in SARS-CoV-2 infected rhesus macaques. *bioRxiv (Preprint)*. [Online] 2020. doi: 10.1101/2020.03.13.990226.
15. **Duan K. i wsp.** Effectiveness of convalescent plasma therapy in severe COVID-19 patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* [Online] 2020. doi: 10.1073/pnas.2004168117.
16. **Lu R. i wsp.** Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet.* 2020, 395(10224), strony 565–574.
17. **Hoffmann M. i wsp.** SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell.* [Online] 2020. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.052.
18. **Vogel G.** These are answers we need. WHO plans global study to discover true extent of coronavirus infections. *American Association for the Advancement of Science.* [Online] 02 04 2020. [Zacytowano: 09 04 2020.]
<https://www.sciencemag.org/news/2020/04/these-are-answers-we-need-who-plans-global-study-discover-true-extent-coronavirus#>

