

MULTIDISCIPLINÁRNÍ SPOLUPRÁCE PŘI VÝZKUMU STANOVENÍ HLADIN PROTILÁTEK IGG A IGM U ONEMOCNĚNÍ COVID 19

Mgr. Bc. Ludmila Maffei Svobodová

Doc. RNDr. Jiří Hrdý, Ph.D.

Mgr. Jan Zeman, PhD.

MUDr. et Ing. Lubomír Štěpánek

Ústav biofyziky a informatiky, 1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova

Souhrn

Onemocnění COVID-19 postihlo celý svět za poslední 2 roky. Obyvatelé byli vystaveni nebývalé míře rizika onemocnění virem SARS-CoV-2, který stále je přítomen okolo nás všech, avšak pomocí zavedení vakcinace se jej podařilo částečně uvést pod kontrolu. V rámci studie, kterou jsme navrhli, bylo zjištěno, že vakcinace v kombinaci s prodělaným onemocněním COVID-19 chrání před závažným průběhem i možným úmrtím. Na studii se podílel multidisciplinární tým složený všeobecnou sestrou, statistikem a odborníkem na imunologii. Byly sledovány hladiny specifických protilátek IgG a IgM, které jsou jasným ukazatelem stavu imunitního systému organismu. Vybraní dobrovolníci byli po vakcinování firmou Pfizer BioNTech v období prosinec 2020 – listopad 2021.

Klíčová slova: SARS-CoV-2, COVID-19, Pfizer, vakcína, protilátky IgG a IgM

Summary

COVID-19 has affected the entire globe in the last 2 years. Residents have been exposed to an unprecedented level of risk of the SARS-CoV-2 virus, which is still present around all of us, but with the introduction of vaccination, it has been partially brought under control. In a study we designed, vaccination in combination with past COVID-19 disease was found to protect against serious progression and possible death. A multidisciplinary team of nurses, statisticians and immunologists participated in the study. The levels of specific IgG and IgM antibodies were monitored, which are a clear indicator of the state of the body's immune system. The selected volunteers were vaccinated by Pfizer BioNTech in the period December 2020 - November 2021.

Key words: SARS-CoV-2, COVID-19, Pfizer, vaccination, antibodies IgG and IgM.

Úvod

Infekční onemocnění představují významný celosvětový problém zdravotní péče. Současná pandemie způsobená těžkým akutním respiračním syndromem coronavirus-2 (SARS-CoV-2) způsobujícím Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) se objevila v prosinci 2019 v čínském Wuchanu a rychle se stala celosvětovou pandemií. Infekce SARS-CoV-2 má obrovskou nemocnost a úmrtnost, protože způsobuje vážné celkové onemocnění se zvláštním postižením dýchacích cest. Infekce SARS-CoV-2 u náchylných pacientů vede k dysregulovaným imunitním odpovědím spouštěným uvolněním molekulárních vzorců spojených s poškozením (DAMP), které aktivují různé

signální dráhy vedoucí k dysregulaci imunitních odpovědí, což vede k sekreci širokého spektra prozánětlivých cytokinů označovaných tzv. - tzv. cytokinová bouře korelující se závažností průběhu COVID-19 (Huang et al., 2020). Dosud (13. května 2022) bylo infikováno 517 milionu lidí, což mělo za následek přibližně přes 6 milionu úmrtí (Světová zdravotnická organizace (WHO), <https://www.who.int/data>). Současná pandemie ovlivňuje nejen zdravotnictví, ale i ekonomiku. Zejména Česká republika byla jednou z nejvíce postižených zemí, kde zdravotnictví dosáhlo hranice své kapacity. V roce 2020 byly představeny nové vakcíny, které mají zabránit šíření SARS-CoV-2 a omezit závažnost klinických příznaků možného rozvoje COVID-19. Bohužel stále vznikají nové mutanty SARS-CoV-2, což činí očkování méně účinným.

Důležité je, že je otázkou času, kdy se objeví nový mutant. Je možné, že bude nutné každý rok upravovat současnou vakcínu podle budoucí epidemiologické situace tak, jak je tomu u vakcíny proti chřipce. Lepší pochopení mechanismu působení vakcíny SARS-CoV-2 na imunitní systém hostitele spolu se znalostí dlouhodobé perzistence protilátek a buněčné imunity navozené očkováním je proto vysoce žádoucí pro zvážení očkovacích schémat u zdravých jedinců a nemocných lidí. Nedávné studie uvádějí indukci specifických protilátek proti SARS-CoV-2, ale dlouhodobou perzistenci těchto protilátek neznáme. Kromě toho různé metodologické přístupy k testování přítomnosti specifických protilátek SARS-CoV-2 ztěžují vyvození závěru. Navzdory snaze WHO sjednotit sérologické metody detekce protilátek specifických pro SARS-CoV-2 (Kristiansen et al, 2021), různé výzkumné laboratoře a diagnostické laboratoře používají odlišné

metody uvádějící hodnoty specifických protilátek SARS-CoV-2 v různých jednotkách nebo koncentraci. Rozsahy založené na použitých čidlech. Kromě humorálních imunitních odpovědí reprezentovaných protilátkami hraje klíčovou roli v průběhu infekce buněčná imunita tím, že omezuje počet buněk infikovaných virem a brání dalšímu šíření viru v těle. Některé zprávy již naznačovaly indukci buněčné imunity po vakcinaci pomocí mRNA vakcíny, ale opět zbývá charakterizovat dlouhodobost buněčných imunitních odpovědí.

Cíle, hypotéza, metody

Hlavním cílem projektu bylo charakterizovat dlouhodobost jak humorální, tak buněčné imunitní odpovědi po očkování proti SARS-CoV-2 u zdravých jedinců.

- 1) Pro testování buněčné imunity byla produkce IFN-gama plné krve očkovaných jedinců stimulována spike proteinem, který byl stanoven pomocí ELISA.
- 2) Pro identifikaci buněčné populace adaptivní imunity produkující IFN-gama byly IFN-gama pozitivní CD4+ a CD8+ T buňky stanoveny v plné krvi po restimulaci spike proteinem pomocí průtokové cytometrie.
- 3) Vliv spike proteinu na genovou expresi cytokinů (např. IFN-gama, IL-2, TNF-alfa, IL-6, IL1beta) v PBMC izolovaných z periferní krve byla stanoven pomocí PCR v reálném čase.
- 4) Schopnost spike proteinu indukovat proliferaci CD4+ a CD8+ T buněk po restimulaci PBMC spike proteinem byla stanovena ředěním

karboxyfluorescein sukcinimidyl esteru (CFSE) pomocí průtokové cytometrie.

5) Potenciál PBMC očkováných jedinců specificky reagovat na stimulaci spike proteinem sekrecí IFN-gama byl sledován Enzyme Linked Immuno Spot Assay (ELISPOT). Využití různých metodických přístupů ke sledování kapacity buněčné imunity očkováných pacientů produkovat IFN-gama povede k návrhu nejvhodnějších metod dokumentujících buněčnou imunitu po vakcinaci mRNA vakcínou. Humorální imunita reprezentovaná produkcí SARS-CoV-2 specifických protilátek byla stanovena pomocí ELISA.

Metodologie

Nejprve bylo nutné předložit návrh s veškerou příslušnou dokumentací včetně metodologie studie pro Etickou komisi, která na základě hlasování rozhodla kladně, že studie může být započata.

V rámci spolupráce s Všeobecnou fakultní nemocnicí v Praze byli osloveni potenciaální dobrovolníci formou inzerování na webových stránkách nemocnice a 1. lékařské fakulty. Jednalo se o zaměstnance Všeobecné fakultní nemocnice a 1. lékařské fakulty. Byl vytvořen online dotazník, který obsahoval podstatné a relevantní informace o zdravotním stavu potenciaálního dobrovolníka (věk, výška, váha, muž/žena, datum očkování, datum prodělání onemocnění COVID 19, přidružená onemocnění, chronická medikace, pracoviště). Podle jasně stanovených kritérií byli vybráni uchazeči do studie. Celkem 173 dobrovolníků. Cílem bylo získat do studie dobrovolníky, kteří jsou věkovou skladbou mezi 18. až 80. rokem života, s prodělaným onemocněním, po prodělaném očkování příslušnou

vakcínou Comirnaty (Pfizer BioNTech) s chronickou medikací a bez chronické medikace. Bylo třeba sledovat možnost vlivů, které mohou působit na imunitní systém člověka.

Všichni vybraní dobrovolníci byli osloveni, kdy a jak budou probíhat odběry periferní žilní krve, nutné ke stanovení vlastních protilátek IgG a IgM. Tyto dva druhy protilátek byly vybrány z důvodu jasně ukazující imunitní odpověď, ať už na očkování, ale i vlastní reakci po prodělaném onemocnění COVID-19.

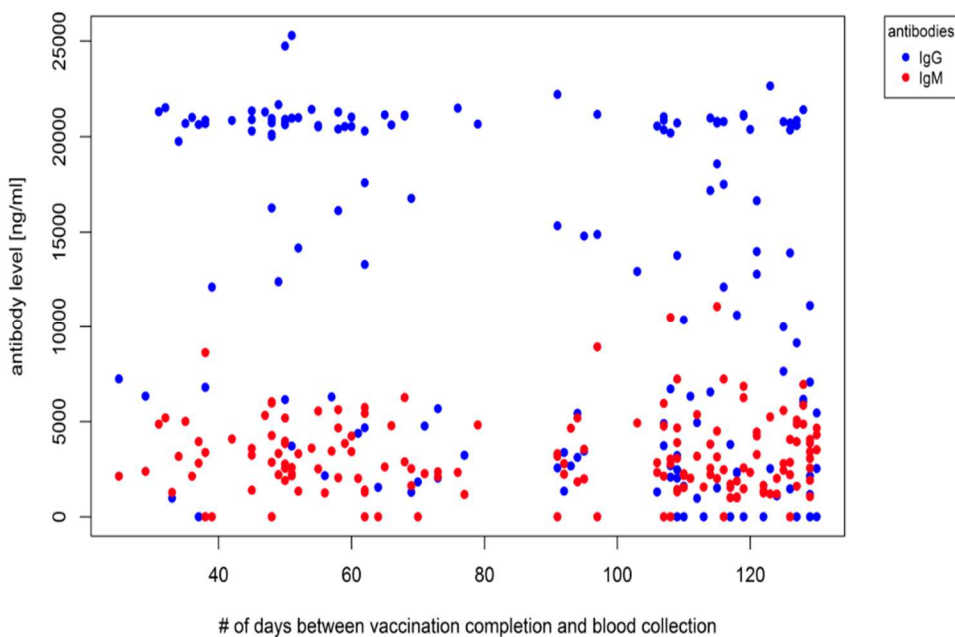
Všichni byli informováni s průběhem studie a zároveň podepisovali Informované souhlasy, týkající se nejen studie, ale možného zasílání výsledků z daných odběrů.

Odběry se prováděly s odstupem 2 – 4 měsíců od očkování nebo proděláním onemocnění. Všeobecná sestra s mnohaletými zkušenostmi z intenzivní péče, ale i se zkušeností s „covidovými“, pacienty plánovala návštěvy dobrovolníků na odběrové místo, kde je i sama odebírala. Laboratorní vyšetření prováděl imunolog v laboratoři Imunologie ústavu Imunologie a Mikrobiologie 1. LF UK. Veškeré statistické zpracování prováděl statistik z Ústavu biofyziky a informatiky 1. LF UK.

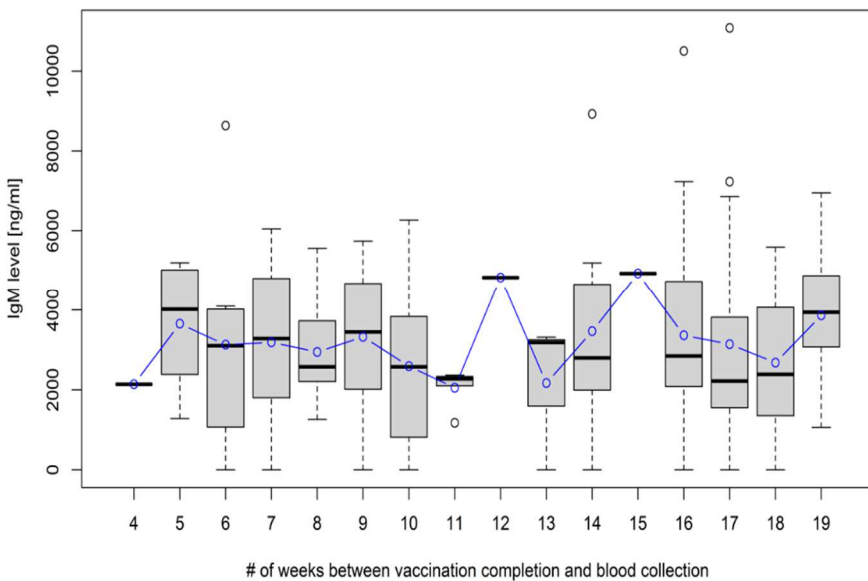
Výsledky

Z naší pilotní studie zahrnující očkované zdravé jedince jsme byli schopni detekovat silnou produkci protilátek přetrvávající po dobu 19 týdnů od druhé dávky mRNA vakcíny od PfizerBioNTech, (Obrázek 1). Titr protilátek IgM je překvapivě během sledovaného období poměrně stabilní. Koncentrace protilátek je naprosto stejná s podobnou interindividuální

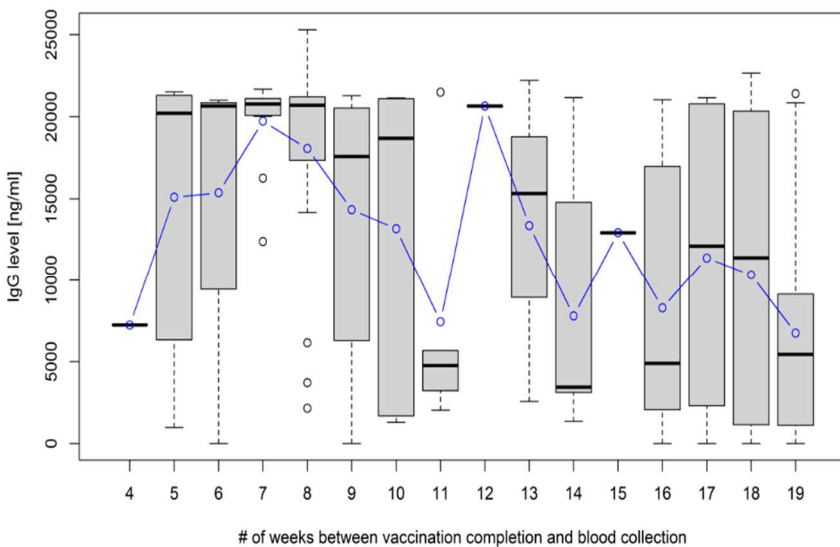
variabilitou od 4. týdne po vakcinaci do 19. týdne po vakcinaci, (obrázek 2). V případě SARS-CoV-2 specifických IgG jsou hladiny specifických IgG protilátek celkem stabilní na horní hranice detekčního limitu do 10 týdnů s následným pomalým postupným poklesem až do 19. týdne po vakcinaci, (obrázek 3). Tato pilotní data jsou ovlivněna proměnlivým počtem jedinců navštěvujících pravidelné časové intervaly odběrů krve. Rozšíření sledované kohorty bylo výsoce žádoucí. Nicméně schopnost mRNA vakcín od PfizerBioNech indukovat specifické IgM a IgG je zcela evidentní.



Obrázek 1. Dynamika SARS-CoV-2 specifických IgM a IgG protilátek u očkových zdravých jedinců detekovaná komerčně dostupnou soupravou ELISA od Matriks Biotek.



Obrázek 2. Detekce SARS-CoV-2 specifického IgM u očkových zdravých jedinců v séru periferní krve pomocí ELISA. Celkem bylo zařazeno 173 jedinců.



Obrázek 3. Detekce SARS-CoV-2 specifického IgG u očkovaných zdravých jedinců v séru periferní krve pomocí ELISA. Celkem bylo zařazeno 173 jedinců.

Závěr

Celou studii jsme uzavřeli jako velmi důležitou a úspěšnou. Bylo prokázáno, že samotné očkování chrání člověka před onemocněním Covid -19 do určité míry. Je nutné zdůraznit, že je zcela jasné, aby se lidé nechávali očkovat, ale také aby specialisté ve vývojových centrech pro vývoj vakcín stále vyvíjeli nové, lépe reagující vakcíny na různé druhy mutantů, které se vyskytují, a vyskytovat se velmi pravděpodobně budou. Samotné prodělání nemoci COVID-19 není dostatečnou ochranou před opětovnou nákazou. Kombinace očkování a prodělání onemocnění se ukázalo i podle výsledků protilátek, jako velmi efektivní, neboť jejich hladiny byly i mnohokrát až neměřitelné, jak byly vysoké.

Ukázalo se, že spolupráce týmů je nesmírně podstatná, bez ní by nebylo možno provádět nejen studie, ale i přicházet na nová fakta, týkající se nemocí, možností léčby apod.

Tímto bych chtěla velmi poděkovat svému týmu, se kterým jsme na studii pracovali, ale také a to především našim dobrovolníkům, neboť bez nich by se nikdy nic nemohlo uskutečnit.

Zdroje

Panigrahy, D., Gilligan, M. M., Huang, S. *et al.* Inflammation resolution: a dual-pronged approach to averting cytokine storms in COVID-19?. *Cancer Metastasis Rev* 39, 337–340 (2020). <https://doi.org/10.1007/s10555-020-09889-4>

WHO, World Health Organization, Coronavirus (COVID-19) data <https://www.who.int/data>

Paul A Kristiansen, Mark Page, Valentina Bernasconi, Giada Mattiuzzo, Peter Dull, Karen Makar, Stanley Plotkin, Ivana Knezevic, WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin, *The Lancet*, Volume 397, Issue 10282, 2021, Pages 1347-1348, ISSN 0140-6736, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00527-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00527-4).

(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673621005274>)

Carlo Iavarone, Derek T. O'hagan, Dong Yu, Nicolas F. Delahaye & Jeffrey B. Ulmer (2017) Mechanism of action of mRNA-based vaccines, *Expert Review of Vaccines*, 16:9, 871-881, DOI: 10.1080/14760584.2017.1355245

Bettini, E.; Locci, M. SARS-CoV-2 mRNA Vaccines: Immunological Mechanism and Beyond. *Vaccines* 2021, 9, 147. <https://doi.org/10.3390/vaccines9020147>

Anand, P., Stahel, V. P. The safety of Covid-19 mRNA vaccines: a review. *Patient Saf Surg* 15, 20 (2021). <https://doi.org/10.1186/s13037-021-00291-9>