

# Jak anti-SARS-CoV-2 IgG a IgM predikují titr virus neutralizačních protilátek u dárců rekonvalescentní plazmy proti onemocnění COVID-19?

How do anti-SARS-CoV-2 IgG and IgM predict the titre of virus-neutralizing antibodies in donors of convalescent plasma against COVID-19 disease?

Entrová A.<sup>1</sup>, Azeem K.<sup>2</sup>, Vlčková J.<sup>2</sup>, Smital J.<sup>1</sup>, Zatloukalová S.<sup>2</sup>, Ševčíková J.<sup>2</sup>, Kollárová H.<sup>2</sup>, Horáková D.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Transfuzní oddělení, FN Olomouc

<sup>2</sup> Ústav veřejného zdravotnictví, LF UP, Olomouc

**SOUHRN:** Rekonvalescentní plazma byla jednou z léčebných modalit u pacientů s těžkým či středně těžkým průběhem nového akutního respiračního onemocnění COVID-19. Základní podmínkou pro její podání je dostatečný titr virus neutralizačních protilátek  $\geq 160$ . Cílem předkládané studie je analýza dat dárců rekonvalescentní anti-covid plazmy Transfuzního oddělení Fakultní nemocnice Olomouc, konkrétně porovnání korelace sérologických vyšetření protilátek anti-SARS-CoV-2 s výsledky virus neutralizačního testu.

**KLÍČOVÁ SLOVA:** anti-SARS-CoV-2 – COVID-19 – rekonvalescentní plazma – VNT

**SUMMARY:** Convalescent plasma was one of the treatment modalities in patients with severe or moderate course of the new acute respiratory disease COVID-19. The basic condition for its administration is a sufficient virus neutralizing antibody titre  $\geq 160$ . The aim of the present study is the analysis of the data of convalescent anti-covid plasma donors of the Transfusion Department of the Olomouc University Hospital, specifically to compare the correlation of serological tests of anti-SARS-CoV-2 antibodies with the virus neutralization test.

**KEY WORDS:** anti-SARS-CoV-2 – COVID-19 – convalescent plasma – VNT

## ÚVOD

Infekce novým typem koronaviru SARS-CoV-2 vyvolává akutní respirační onemocnění. Klinický průběh nemoci označované jako COVID-19 (coronavirus disease 2019) může být od inaparentního až po život ohrožující [1]. Zejména před zavedením monoklonálních protilátek a specifických antivirotik do léčebného postupu byla jako jedna z terapeutických alternativ používána rekonvalescentní plazma (RP) od dárců, kteří onemocnění COVID-19 prodělali.

Za hlavní aktivní složku RP jsou považovány zejména virus neutralizační protilátky anti-SARS-CoV-2. U každého odběru plazmy pro klinické použití se stanoví titr těchto protilátek nebo je pro toto vyšetření odebrán archivní vzorek. Dle aktuálního mezioborového stanoviska České společnosti anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny (ČSARIM) a Evropské komise (EK) pro odběr a podání RP (s odvoláním na relevantní studie) je za účinnou považována hodnota titru neutralizačních protilátek  $\geq 160$  stanovená virus neut-

ralizačním testem (VNT) [2,3]. Získaná RP může být podána pacientům s prokázaným onemocněním COVID-19 jako profylaxe rozvoje závažného průběhu, a to do 3 dnů od vzniku klinických příznaků [3] a současně při negativním výsledku imunologického testu na stanovení IgG anti-SARS-CoV-2 protilátek [2].

Úskalím získávání RP je nábor vhodných dárců. Dle doporučeného postupu může být dárce RP osoba, která prodělala onemocnění COVID-19, přičemž odběr je možný nejdříve za 14 dní po uzdravení nebo ukončení izolace [2].

Pokyn EK dále uvádí, že dárce RP nemůže být osoba, u níž byla imunitní odpověď navozena pouze očkováním, nikoli proděláním nemoci [3]. Dárci musejí splňovat obecná kritéria pro odběr krve a krevních složek tak, jak jsou stanovena vyhláškou č. 143/2008 Sb., o stanovení bližších požadavků pro zajištění jakosti a bezpečnosti lidské krve a jejích složek ve znění pozdějších předpisů (vyhláška o krvi) [4]. Dárci RP byli zpravidla oslovoováni z řad veřejnosti, např. prostřednictvím webových stránek daných pracovišť. Titry protilátek se u pacientů zvyšují postupně – jejich tvorba začíná zpravidla kolem 2 týdnů od začátku onemocnění a dosahuje maxima kolem 4. týdne. Následuje pokles, kdy během 90 dní dojde ke snížení na polovinu maximálních titrů neutralizačních protilátek [5,6]. Právě období s vysokými titry protilátek je optimální pro odběr RP. Dárce je možno odebrat opakovaně, počet odběrů je limitován postupně klesající neutralizační aktivitou darované plazmy.

Cílem předkládané studie je analýza dat dárců, kteří v období 14 měsíců darovali RP na Transfuzním oddělení Fakultní nemocnice Olomouc (TO FNOL), konkrétně porovnání korelace sérologických vyšetření protilátek anti-SARS-CoV-2 s VNT.

## MATERIÁL A METODIKA

V retrospektivní studii byla analyzována data dárců rekonvalescentní plazmy, kteří podstoupili na TO FNOL odběr RP v období od dubna 2020 do května 2021, kdy byl program odběru RP ukončen.

### Výběr dárců

Dárce RP musel splňovat podmínky dle vyhlášky č. 143/2008 Sb. [4] a kritéria pro snížené riziko akutního poškození plic způsobeného transfuzí (*transfusion related acute lung injury* – TRALI) u příjemce. Vhodným dárce je muž/žena ve věku 18–55 let, s tělesnou hmotností nejméně 60 kg, který/á se dostavil/a ne dříve než 2 týdny po uzdravení, ale ne později než 3 měsíce od úzdravy k odběru. S ohledem na TRALI je nutná negativní

transfuzní anamnéza a u žen dále absence předchozích těhotenství vč. spon-tánních abortů a umělého přerušení těhotenství v anamnéze, případně negativní výsledek vyšetření antileukocytárních protilátek (rutinně se však u dárců neprovádí).

Potenciální dárce RP kontaktoval TO FNOL vyplněním elektronického dotazníku na internetových stránkách pracoviště nebo telefonicky, dotazník pak s dárce vyplnil pracovník TO, který hovor přijal. Dotazník zahrnoval prioritně otázky směřující ke zjištění, zda je zájemce vhodným dárce RP, vč. plazmy se snížením rizikem TRALI. Dále byl zjišťován klinický průběh onemocnění COVID-19, tedy datum pozitivního výsledku testu provedeného polymerázovou řetězovou reakcí (*polymerase chain reaction* – PCR) a přítomnost jednotlivých symptomů. U žen dotazník zahrnoval otázky na těhotenství. Dotazník byl v průběhu období aktualizován, např. z důvodu měnících se podmínek pro uvolnění z karantény (úvodní požadavek na dva negativní PCR testy). Dotazník potenciálního dárce RP byl následně posouzen lékařem TO, který provedl první triáž a vyřadil dárce, kteří nesplňovali kritéria pro darování RP. Dárci, které lékař vyhodnotil jako potenciálně vhodné k odběru, byli pozváni na TO k provedení plazmaferézy. V rámci jedné návštěvy TO dárce absolvoval kromě interview s lékařem i odběry krevního vzorku na předodběrové a poodběrové vyšetření dárce krve (imunohematologické vyšetření a vyšetření infekčních markerů), odběr vzorku na sérologické vyšetření titru anti-SARS-CoV-2 IgM a IgG, při vyhovujícím výsledku i vyšetření titru virus neutralizačních protilátek a plazmaferézu. Celý postup je přehledně uveden ve schématu 1.

### Sérologická vyšetření

Vyšetření anti-SARS-CoV-2 IgM a IgG prováděl Ústav mikrobiologie LF UP a FN Olomouc testovými soupravami LIAISON® SARS-CoV-2 S1/S2 IgG (REF 311460) a LIAISON® SARS-CoV-2 IgM (REF 311480)

od firmy DiaSorin (Saluggia, Itálie). Principem testů je kvantitativní stanovení specifických IgG (anti-S1 a anti-S2) a IgM pomocí nepřímé chemiluminiscenční imunoanalýzy (CLIA). Vyšetření bylo provedeno na analyzátoru LIAISON XL (DiaSorin, Saluggia, Itálie). Referenční meze jsou stanoveny výrobcem pro anti-SARS-CoV-2 IgG < 12 AU/ml negativní, 12–15 AU/ml hraniční, > 15 AU/ml pozitivní; horní hranice měřitelnosti (limit testu) je 400 AU/ml (v případě, že bylo dosaženo této hodnoty, skutečné titry nebyly dále vyšetřovány). Pro anti-SARS-CoV-2 IgM jsou referenční hodnoty dle výrobce: < 1 (index) negativní, ≥ 1,1 (index) pozitivní. Virus neutralizační testy byly prováděny ve Zdravotním ústavu se sídlem v Ostravě (ZUOVA). Jedná se o biologický pokus s využitím živého viru a vnímavých buněk, jehož principem je zachycení protilátek, které mají neutralizační (tedy ochranný) účinek bez ohledu na jejich třídu. Vzhledem k vysoké pracnosti, časové a finanční náročnosti i zahlcení laboratoře ZUOVA nebyly až na výjimky na VNT odesílány vzorky dárců s negativním či hraničním výsledkem anti-SARS-CoV-2 IgG (tedy titrem < 15 AU/ml). U titrů v rozmezí 15–30 AU/ml byly zasílány přednostně vzorky s anti-SARS-CoV-2 IgM pozitivitou, při titrech > 30 AU/ml pak již všechny vzorky. Dle metodiky VNT na ZUOVA jsou virus neutralizační protilátky stanovovány za použití ředícího panelu od 1 : 10 až 1 : 2 560 [7]. Cut-off hodnotou pro propuštění RP byl titr 320 a vyšší.

### Statistická analýza

Získaná data byla statisticky vyhodnocena pomocí softwaru SW IBM SPSS Statistics verze 23 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). Pro porovnání skupin v kvalitativních parametrech byl použit chí-kvadrát test. Závislost mezi kvantitativními parametry byla vzhledem k výrazné nenormální distribuci posouzena pomocí Spearmanovy korelační analýzy. Pro stanovení optimální cut-off hodnoty anti-SARS-CoV-2 IgG pro predikci

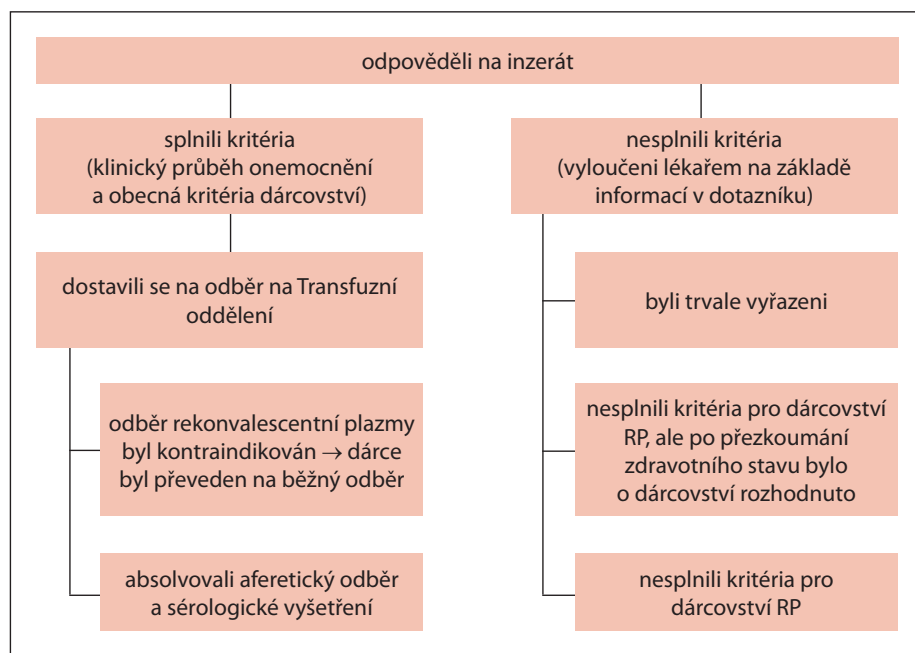
hodnot titrů VNT byla využita ROC (*receiver operating characteristic*) analýza. Všechny testy byly prováděny na hladině statistické významnosti  $p < 0,05$ .

## VÝSLEDKY

V retrospektivní analýze byla vyhodnocena data dárců, kteří ve sledovaném období 14 měsíců od dubna 2020 do května 2021 odpověděli na inzerát a kontaktovali TO FNOL, a to buď prostřednictvím webového dotazníku, či telefonicky. Studovaná populace zahrnovala celkem 1 640 osob, které se přihlásily a vyplnily dotazník (online či po telefonu s pracovníkem TO). Po vyhodnocení lékařem bylo ze studie vyřazeno 656 osob nesplňujících kritéria pro darování RP nebo podmínky pro snížení rizika TRALI – nejčastěji se jednalo o graviditu, akutně probíhající onemocnění, dlouhý interval od onemocnění COVID-19, nepotvrzení diagnózy COVID-19 vyšetřením PCR (pacienti měli pouze klinické příznaky), nevyhovující věk či nižší tělesná hmotnost, přítomnost onemocnění kontraindikujícího dárce RP. Část zájemců poskytla neúplné anamnestické údaje a o jejich dárce bylo dodatečně rozhodnuto až po doplnění dat, ev. po doložení lékařských zpráv. Kritéria dárce na základě dotazníku nakonec takto splnilo 984 zájemců, z nichž se 743 dostavilo k odběru na TO FNOL. Po pohovoru s lékařem bylo vyřazeno dalších 142 dárců. Výsledkem bylo 620 dárců, z toho 92,3 % mužů a 7,7 % žen (tab. 1).

## Sérologické vyšetření

Od vybraných 620 dárců bylo získáno celkem 962 aferetických odběrů. U všech odběrů byly vyšetřeny IgM a IgG protilátky. Průměrné naměřené titry anti-SARS-CoV-2 IgG byly 69,8 AU/ml (SD 62,3; min. = 0, max. = 400; medián 56,5). Hodnoty měřitelnosti (400 AU/ml) dosáhlo 8 dárců (1,3 %) – skutečné titry zde nebyly dovyšetřeny. Anti-SARS-CoV-2 IgM byly pozitivní u poloviny odběrů (498; 50,1 %). Výsledky titrů VNT



**Schéma 1. Nábor dárců rekonvalescentní plazmy na TO FNOL.**  
RP – rekonvalescentní plazma

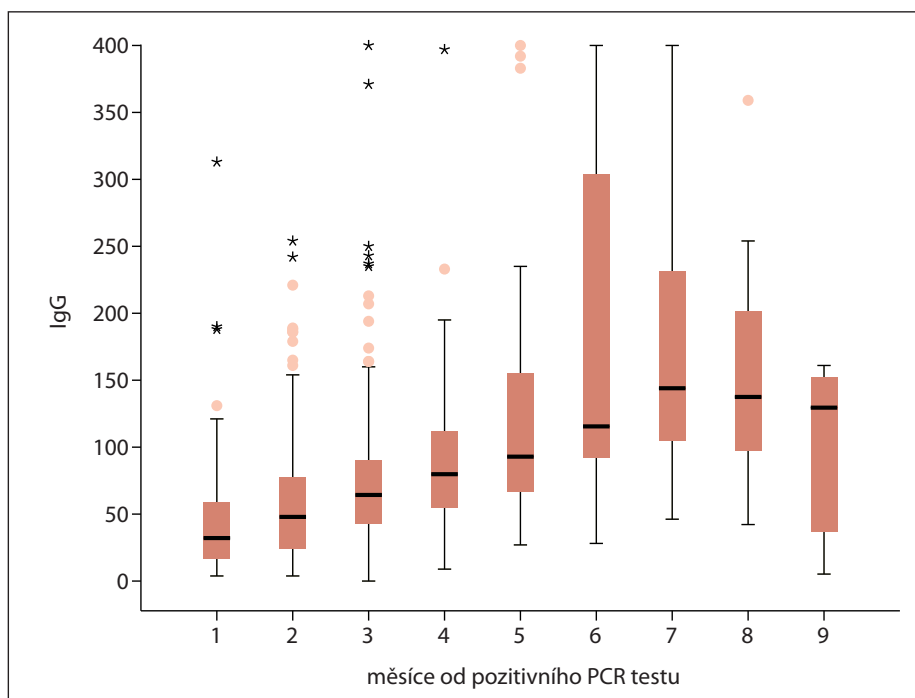
**Tab. 1. Účastníci studie a provedené odběry plazmy.**

| Skupina |                                                                                     | počet |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Dárci   | odpověděli na inzerát                                                               | 1 640 |
|         | nesplnili kritéria darování                                                         | 656   |
|         | byli trvale vyřazeni                                                                | 297   |
|         | nesplnili kritéria, ale po přezkoumání zdravotního stavu byli<br>připuštěni k dárce | 198   |
|         | nesplnili kritéria                                                                  | 161   |
|         | splnili kritéria darování                                                           | 984   |
|         | dostavili se na odběr                                                               | 763   |
|         | odběr byl kontraindikován (běžný odběr)                                             | 143   |
|         | odběr byl proveden                                                                  | 620   |
|         | byly provedeny odběry                                                               | 962   |
| Odběry  | hodnoty IgG byly nedostatečné (neproveden VNT)                                      | 126   |
|         | hodnoty IgG byly dostatečné (proveden VNT)                                          | 836   |
|         | titry virus neutralizačních protilátek byly dostatečné                              | 546   |
|         | titry virus neutralizačních protilátek nebyly dostatečné                            | 290   |

IgG – imunoglobulin G; VTN – virus neutralizační test

byly dostupné u 836 vzorků – k vyřazení vzorku docházelo nejčastěji z důvodu nevyhovujícího titru anti-SARS-CoV-2 IgG, nemožnosti použití plazmy kvůli chylozitě či nevyhovujících výsledků podobných vyšetření. Průměrné naměřené titry VNT dosahovaly hodnoty 247 (SD 309; min. = 10, max. = 2 560;

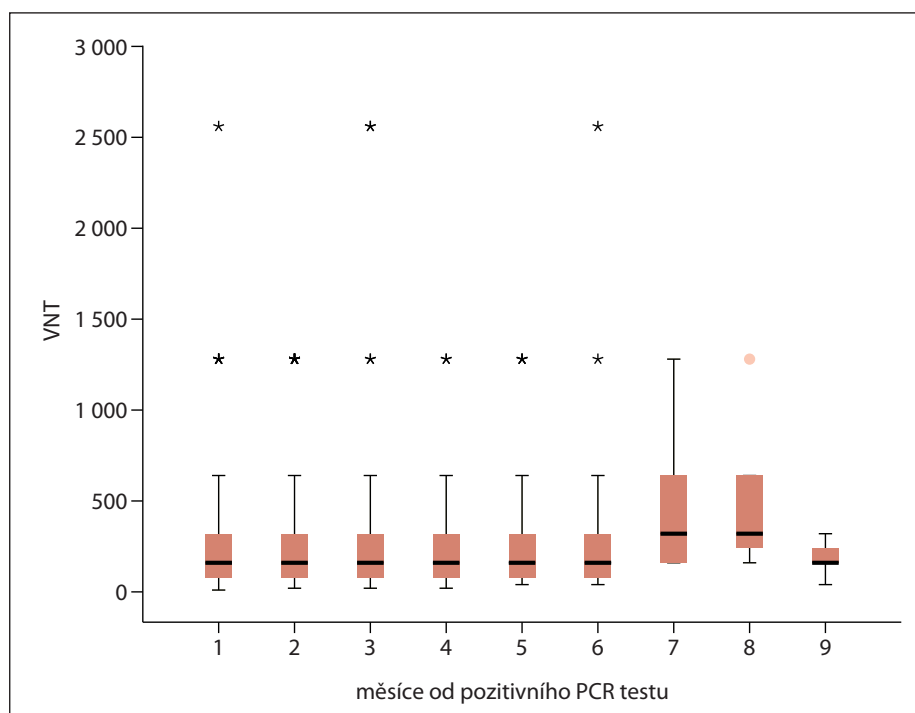
medián 160). U 263 (31,7 %) dárců s titrem VNT  $\geq 160$  (tj. hraniční hodnota pro umožnění využití plazmy jako rekonvalescentní) bylo provedeno celkem 546 odběrů (65,3 %). Z toho vyplývá, že poměrně velká část zájemců nebyla do programu výroby RP zapojena, nebo z něj byla záhy vyřazena – k možnosti



**Graf 1. Distribuce hodnot anti-SARS-CoV-2 IgG v závislosti na uplynulé době od pozitivního PCR testu.**

Legenda: kvartilový boxgraf – ve středu je medián a box je ohraničen 1. a 3. kvartilem, svorky tvoří minimální a maximální hodnota. Kroužek (●) značí

odlehle hodnoty (outliers), hvězdička (\*) značí extrémní hodnoty. PCR test – test provedený polymerázovou řetězovou reakcí; IgG – imunoglobulin G



**Graf 2. Distribuce hodnot titru VTN v závislosti na době uplynulé od pozitivního PCR testu.**

Legenda: kvartilový boxgraf – ve středu je medián a box je ohraničen 1. a 3. kvartilem, svorky tvoří minimální a maximální hodnota. Kroužek (●) značí

odlehle hodnoty (outliers), hvězdička (\*) značí extrémní hodnoty. PCR test – test provedený polymerázovou řetězovou reakcí; VTN – virus neutralizační test

darovat RP byla po aplikaci všech požadovaných kritérií propuštěna pouze přibližně třetina přihlášených dárců.

Hodnoty protilátek se mění v čase, což může ovlivnit i možnost provedení opakovaného odběru (dárce byli na odběr zváni na základě poslední získaných hodnot). Čas se vypočítává od objevu prvních symptomů, pro objektivizaci ode dne výsledku pozitivního PCR vyšetření. Z 962 uskutečněných odběrů bylo známo datum PCR testu u dárce v 931 případech (u 31 datum chybělo a výpočet u nich nebylo možné provést). Titry anti-SARS-CoV-2 IgG u dárců ve studii do sedmého měsíce od pozitivního PCR testu signifikantně rostly, od 7. měsíce klesaly (graf 1). Podobný trend vykazovaly i hodnoty VNT (graf 2), kdy se titry do 6. měsíce od pozitivního PCR testu téměř neměnily, od 6. měsíce se zvýšily, od 8. měsíce došlo opět k poklesu.

### Statistická analýza

Statistická analýza se zaměřila na stanovení možné korelace mezi titrem anti-SARS-CoV-2 IgG a VNT, dále také na vztah anti-SARS-CoV-2 IgM pozitivitu či negativitu a výsledků titru VNT. Spearmanovou korelační analýzou byla prokázána středně silná pozitivní korelace titrů anti-SARS-CoV-2 IgG s dobou od pozitivního PCR testu do odběru. Fenomén byl pozorován u celkového počtu dní (Spearmanův korelační koeficient  $r = 0,413$ ;  $p < 0,0001$ ) i v období do 7. měsíce ( $r = 0,404$ ;  $p < 0,0001$ ). Dále byla prokázána středně silná pozitivní korelace mezi titrem anti-SARS-CoV-2 IgG a VNT ( $r = 0,583$ ;  $p < 0,0001$ ), výsledky uvádí graf 3.

V případě positivity anti-SARS-CoV-2 IgM byl prokázán statisticky významný posun distribuce titrů anti-SARS-CoV-2 IgG a VNT k vyšším hodnotám ( $p < 0,0001$ ) (tab. 2).

Pomocí ROC analýzy byla zjišťována optimální cut-off hodnota anti-SARS-CoV-2 IgG pro predikci titru VNT, tzn. byla hledána hodnota anti-SARS-CoV-2 IgG rozlišující vzorky, u nichž bude s vysokou pravděpodobností následně naměřen

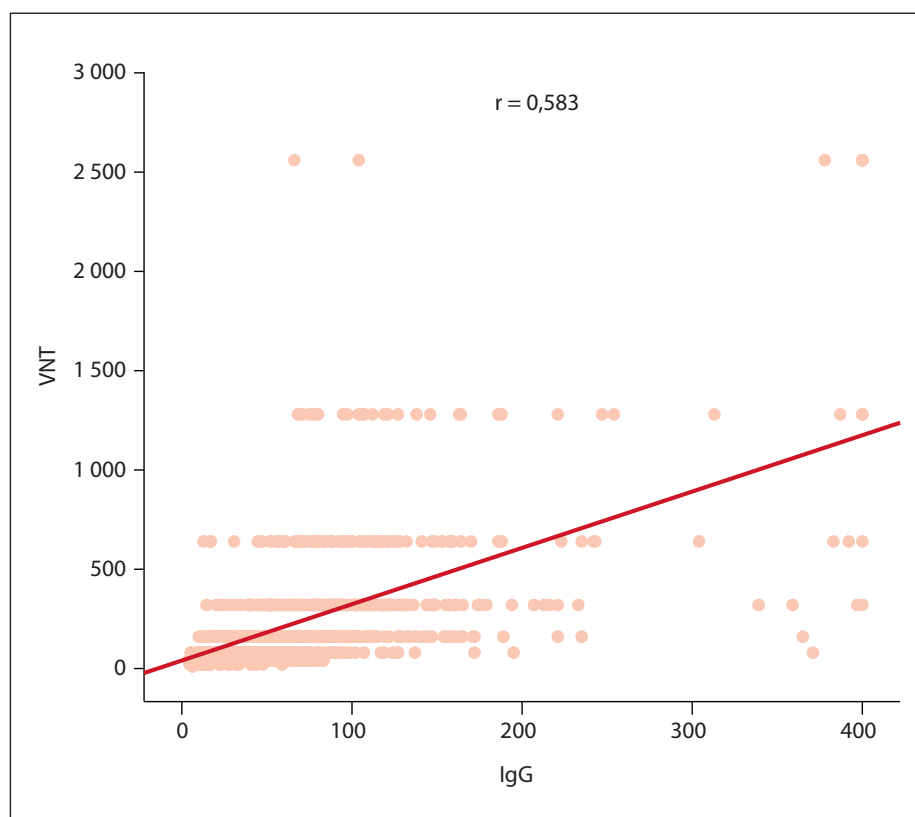
titr VNT > 160 a  $\geq 160$  (tj. kritérium pro umožnění podání jako RP [2,3]). Hodnoty anti-SARS-CoV-2 IgG vyšší nebo rovny cut-off hodnotě 74,2 predikují naměření zpřísněných titrů VNT > 160 se senzitivitou 68,8 % a specifitou 74,2 %. Hodnoty anti-SARS-CoV-2 IgG vyšší nebo rovny cut-off hodnotě 65,3 predikují naměření titrů VNT  $\geq 160$  se senzitivitou 62,4 % a specifitou 81,8 %. Celkové výsledky jsou uvedeny v tab. 3.

Průměrně naměřené anti-SARS-CoV-2 IgG při hodnotách titru VNT  $\geq 160$  dosahovaly 71,8 AU/ml (SD 42,9; min. = 9,9 a max. = 365; medián 67,0). V případě positivity anti-SARS-CoV-2 IgM byl prokázán statisticky významnější podíl výsledků titru VNT > 160, resp.  $\geq 160$  ( $p < 0,0001$ ). Výsledky jsou uvedeny v tab. 4.

## DISKUZE

Transfuzní oddělení FNOL se do programu výroby RP zapojilo mezi prvními zařízeními transfuzní služby v ČR, a to již 28. dubna 2020. Prvních 26 plazem bylo odebráno pro zpracovatele plazmy Takeda Pharmaceuticals Czech Republic, s.r.o. a kritéria pro výběr dárců se řídila podmínkami zpracovatele; ostatní plazmy již byly určeny pro klinické použití k léčbě pacientů s onemocněním COVID-19. Celkově byla v ČR použita RP v léčbě 5,4 % (7 100 z celkových 131 000) hospitalizovaných pacientů s onemocněním COVID-19 [8]. Pro léčbu tohoto virového respiračního onemocnění bylo v ČR v období od dubna 2020 do dubna 2021 vydáno celkem 14 197 transfuzních jednotek (T.U.) RP, podíl TO FNOL činil 9,7 % (1 377 T.U.) z celkového výdeje v ČR v uvedeném období [8]. Kromě několika málo T.U. v úvodu pandemie byly všechny RP vydávány až na základě titrů VNT.

Většina zájemců se do dárcovství RP vzhledem ke kritériím výběru a výsledkům vyšetření neměla možnost zapojit. To odpovídá i jiným studiím, které hodnotily dostupnost dárců – např. dle Carter et al. bylo dárcovství umožněno 40,1 % z původně přihlášených dobro-



**Graf 3. Bodový korelační graf závislosti mezi titrem anti-SARS-CoV-2 IgG a VNT.** IgG – imunoglobulin G; VTN – virus neutralizační test

**Tab. 2. Hodnoty IgG a VNT v případě positivity či negativity IgM.**

|     |         | IgM pozitivní |           | p        |
|-----|---------|---------------|-----------|----------|
|     |         | negativní     | pozitivní |          |
| IgG | průměr  | 62,7          | 76,5      | < 0,0001 |
|     | SD      | 58,7          | 63,5      |          |
|     | medián  | 48,5          | 63,3      |          |
|     | minimum | 0             | 4,7       |          |
|     | maximum | 400,0         | 400,0     |          |
| VNT | průměr  | 172,2         | 313,8     | < 0,0001 |
|     | SD      | 242,3         | 345,8     |          |
|     | medián  | 160,0         | 160,0     |          |
|     | minimum | 10,0          | 20,0      |          |
|     | maximum | 2560,0        | 2560,0    |          |

IgG – imunoglobulin G; IgM – imunoglobulin M; SD – směrodatná odchylka; VTN – virus neutralizační test

volníků [9]. Frekvence darování se odvíjela od dostupnosti dárců, titrů protilátek a od všeobecných podmínek darování krve a krevních složek. Na opakované odběry byli zváni jen dárce s vyhovujícím titrem protilátek (sérologicky, ev. až po znalosti VNT). Na další odběr

již nebyli zváni dárce s hraniční hodnotou ( $VNT \leq 160$ ), u nichž byl předpoklad, že následný titr protilátek nebude vyhovující. Většina dárců tak absolvovala pouze jeden (73,5 %) či dva odběry (13,3 %), dalších 12,2 % dárců absolvovalo mezi 3–8 odběry. Nejvyšší počet od-



**Tab. 3. Výsledek ROC analýzy – hledání optimální cut-off hodnoty anti-SARS-CoV-2 IgG pro predikci titru VNT > 160 a ≥ 160.**

|           | AUC   | 95% interval<br>spolehlivosti pro AUC | Cut-off value off<br>anti-SARS-CoV-2 IgG | Senzitivita | Specifická |
|-----------|-------|---------------------------------------|------------------------------------------|-------------|------------|
| VNT > 160 | 0,772 | 0,739–0,805                           | 74,2                                     | 68,8 %      | 74,2 %     |
| VNT ≥ 160 | 0,767 | 0,734–0,800                           | 65,3                                     | 62,4 %      | 81,8 %     |

AUC – plocha pod křivkou; IgG – imunoglobulin G; VTN – virus neutralizační test

**Tab. 4. Pozitivita anti-SARS-CoV-2 IgM a titry VNT.**

|           | anti-SARS-CoV-2 IgM negativní |        | anti-SARS-CoV-2 IgM pozitivní |        | p        |
|-----------|-------------------------------|--------|-------------------------------|--------|----------|
|           | n                             | %      | n                             | %      |          |
| VNT ≤ 160 | 313                           | 80,1 % | 243                           | 54,6 % | < 0,0001 |
| VNT > 160 | 78                            | 19,9 % | 202                           | 45,4 % |          |
| VNT < 160 | 180                           | 46,0 % | 110                           | 24,7 % | < 0,0001 |
| VNT ≥ 160 | 211                           | 54,0 % | 335                           | 75,3 % |          |

IgM – imunoglobulin M; VTN – virus neutralizační test

běhů byl 13 od jediného dárce. Podíl žen, které absolvovaly pouze jeden odběr, činil 87,5 %; u mužů se jednalo o 72,4 % dárců. Ženy absolvovaly maximálně 3 odběry (2 odběry 8,3 % a 3 odběry 4,2 % žen). Metodikou požadované titry VNT ≥ 160 splňovalo jen 64 % odběrů dárců, což znamená, že více než 1/3 odběrů vedla k získání plazmy, která nemohla být využita jako rekonvalescentní.

Výsledky některých studií ukazují, že protilátková odpověď je statisticky silnější u mužů než u žen [10] a u pacientů se závažným a kritickým průběhem onemocnění [10–13]. Soubor v této studii obsahoval především muže (kvůli obavám ze vzniku TRALI) a osoby, u nichž COVID-19 proběhl pouze jako lehčí či středně závažné onemocnění (vzhledem k intervalu mezi uzdravením a darováním, resp. k případné dočasné nezpůsobilosti k darování). Proto se studie těmito aspekty nezabývala.

Vzhledem ke krátkému období, kdy jsou titry protilátek v těle pacienta po prodělání COVID-19 nejvyšší, bylo nezbytné získat a odebrat dárce relativně záhy po uzdravení. K odběru ve studovaném souboru docházelo v průměru 30 dní (medián 28 dnů, od 14 dne

do 118 dnů) od pozitivního PCR testu, a lze tedy předpokládat, že data získaná v této studii představují právě toto „zlaté období“ s maximálními titry protilátek.

Titry VNT byly vyšetřeny u 836 odběrů. Asi u třetiny z nich byly > 160 (280 odběrů; 33,5 %), při zahrnutí výsledků ≥ 160 pak u dvou třetin (546; 65,3 %). Výsledky studie ukazují, že významným prediktorem titru VNT ≥ 160 je pozitivita anti-SARS-CoV-2 IgM protilátek (p < 0,0001). Kromě toho byla pozorována středně silná pozitivní korelace mezi titrem anti SARS-CoV-2 IgG a VNT. K podobným výsledkům dospěly i některé další studie, které využívaly pro stanovení hladiny IgG protilátek testy na stejném (CLIA) či rozdílném principu. Harvala et al. na kohortě 52 dárců RP uvádějí silnou korelaci (Spearmanův koeficient 0,88; p < 0,001) mezi hladinou IgG stanovených enzymatickou imunoanalýzou – ELISA (EUROimmun, PerkinElmer, Londýn, Velká Británie) a hladinou virus neutralizačních protilátek [14]. Enzymatická imunoanalýza (EUROimmun) byla rovněž využita ve studii Benner et al., do níž se zapojilo 13 dárců RP a kde byla opět prokázána silná pozitivní korelace (Spearmanův korelační

koeficient 0,722; p < 0,001) [15]. Tiwari et al. na kohortě 139 dárců RP uvádějí rovněž silnou korelaci (Spearmanův korelační koeficient 0,922; p < 0,001) mezi těmito dvěma sérologickými parametry, pro stanovení hladiny IgG byla využita metoda CLIA (Vitros, OCD) [16]. Výsledky studie Mendrone-Junior et al. s 214 dárci RP naopak uvádějí střední korelaci VNT s hladinou protilátek IgG stanovených pomocí CLIA soupravou firmy Abbott (R<sup>2</sup> 0,617; p < 0,001) a hladiny IgG stanovených pomocí ELISA soupravou firmy EUROimmun (R<sup>2</sup> 0,526; p < 0,001) [17].

ROC analýza ukázala, že cut-off hodnota anti-SARS-CoV-2 IgG pro rozlišení vzorků plazmy, kde bude hodnota VNT ≥ 160, jak udává české i evropské doporučení, by měla dosahovat 66,3 AU/ml (odpovídá hodnotě ředění a tím titru 80). Nevýhodou je poměrně nízká senzitivita dosahující pouze 64,0 %. Při zpřísnění kritérií na hodnoty VNT pouze vyšší než 160 je odpovídající hodnota anti-SARS-CoV-2 IgG 66,3 AU/ml (opět odpovídá ředění 80), ale senzitivita se zvyšuje minimálně na 70,6 %. Další zpřísnění kritérií pozbývá smyslu, protože při navýšení na titr VNT ≥ 320 by podíl vhodných dárců klesl na 33 %. To se již jeví jako ve-

lice neefektivní, především při zhodnocení celkového kontextu situace v ČR v průběhu epidemie COVID-19, kdy požadavky na výdej RP byly četné.

Výhodou vydávání plazmy na základě pozitivních výsledků VNT  $\geq 160$  je samotný VNT. Je považován za zlatý standard v detekci specifických protilátek proti virům, proto slouží jako konfirmační test (také s ohledem na značnou variabilitu senzitivity a specifity komerčních testů a rychlost testů postavených principu imunoanalýzy). Ačkoli VNT nerozliší třídy protilátek, zachytí ty, které mají neutralizační účinek. Nevýhodami VNT jsou ovšem jeho nízká dostupnost (test je prováděn pouze v několika laboratořích v ČR), déletrvající provedení, tj. 5–7 dní, a finanční náročnost [7]. Z těchto důvodů se jeví jako klíčová znalost možných prediktivních markerů titrů VNT, která by případně mohla pomoci při aktualizaci či zefektivnění metodiky výběru dárců vhodných pro dárce RP. Příkladem by mohl být postup omezení množství prováděných VNT, kdy dle prediktivních markerů budou vyselektovány pouze odběry s vysokou pravděpodobností žádoucího titru VNT.

V současné době se situace kolem onemocnění COVID-19 diametrálně změnila – od užívání RP se ustoupilo, k dispozici jsou antivirotika či monoklonální protilátky pro léčbu COVID-19, kromě toho je na trhu hned několik očkovacích látek zabraňujících rozvoji onemocnění či významně snižujících pravděpodobnost těžkého průběhu; aktuálně v populaci prevaluje varianta SARS-CoV-2 omikron. Pandemie onemocnění nicméně ještě neskončila a nelze jednoznačně predikovat, neobjeví-li se další varianta viru, u níž léčebné možnosti selžou a u níž bude RP opět využívána jako možný léčebný postup.

Tato studie má své limity:

- 1) K datům je nutné přistupovat s vědomím retrospektivního způsobu získání a analýzy, kdy v průběhu programu byla měněna kritéria a celkový provoz TO. Požadavky na RP byly také zcela podřizovány aktuální epidemio-

logické situaci a požadavkům na RP z klinických pracovišť a jednotek intenzivní péče, kde byla pacientům plazma podávána.

- 2) Hodnocení klinického stavu pacientů zapojených do studie mohlo být ovlivněno rozdílným přístupem ve sběru dat (dotazníky vyplňovali dárce online buď bez asistence, nebo s pracovníkem TO, přičemž tito se střídali).
- 3) Z objektivních, výše popsaných důvodů studovaný soubor vykazuje významnou nekonzistentnost z pohledu pohlaví a věku.
- 4) Na opakované odběry byli zváni pouze dárce s vyhovující hodnotou protilátek.

## ZÁVĚR

Zajištění dostatečného počtu transfuzních jednotek RP patří mezi hlavní úkoly transfuzní služby. V průběhu nejtěžších fází pandemie COVID-19 byl tento úkol neobvykle ztížen, protože poptávka z klinických pracovišť po RP byla významně vysoká. Oproti tomu personálu TO chyběly osobní zkušenosti a dostupné doporučené postupy vycházely z dat získaných užíváním RP proti jiným onemocněním, např. chřipce.

Výsledky této studie ukázaly středně silnou pozitivní korelaci titrů anti-SARS-CoV-2 IgG s dobou od pozitivního PCR testu do odběru a taktéž mezi titrem anti-SARS-CoV-2 IgG a VNT.

Dále byly prokázány významně vyšší hodnoty VNT a anti-SARS-CoV-2 IgG při současné pozitivitě IgM a byla stanovena senzitivita a specifita hodnot anti-SARS-CoV-2 IgG pro výsledek titru VNT  $\geq 160$ , tedy hodnotu stanovenou doporučeným postupem jako klíčovou pro hodnocení plazmy jako rekonvalescentní. Tyto výsledky jsou velice cenné pro další praxi, neboť mohou posloužit pracovníkům transfuzní služby jako vodítko pro zefektivnění výběru dárců RP a jejího vydávání.

## Literatura

1. Státní zdravotní ústav. Onemocnění novým koronavirem 2019-nCoV, nově pojmenova-

ným jako „COVID-19“ (coronavirus disease 2019). Praha: 2019. Dostupné z: [http://www.szu.cz/uploads/Epidemiologie/Coronavirus/Zakladni\\_info/20200212\\_Onemocneni\\_novym\\_koronavirem\\_2019.pdf](http://www.szu.cz/uploads/Epidemiologie/Coronavirus/Zakladni_info/20200212_Onemocneni_novym_koronavirem_2019.pdf).

2. Mezioborové stanovisko k podávání rekonvalescentní plazmy u pacientů s covid-19 (evidenční číslo ČSARIM: 18/2021).
3. European Commission Directorate-General For Health And Food Safety: An EU programme of COVID-19 convalescent plasma collection and transfusion: Guidance on collection, testing, processing, storage, distribution and monitored use. Brussels, 2021. Dostupné z: [https://ec.europa.eu/health/system/files/2021-03/guidance\\_plasma\\_covid19\\_en\\_0.pdf](https://ec.europa.eu/health/system/files/2021-03/guidance_plasma_covid19_en_0.pdf).
4. Vyhláška č. 143/2008 Sb. Vyhláška o stanovení bližších požadavků pro zajištění jakosti a bezpečnosti lidské krve a jejích složek (vyhláška o lidské krvi)
5. Wendel S, Kutner JM, Machado R, et al. Screening for SARS-CoV-2 antibodies in convalescent plasma in Brazil: Preliminary lessons from a voluntary convalescent donor program. *Transfusion*. 2021;60(12):2938–2951.
6. Wendel S, Fontao-Wendel R, Fachini R, et al. A longitudinal study of convalescent plasma (CCP) donors and correlation of ABO group, initial neutralizing antibodies (nAb), and body mass index (BMI) with nAb and anti-nucleocapsid (NP) SARS-CoV-2 antibody kinetics: Proposals for better quality of CCP collections. *Transfusion*. 2021;61(5):1447–1460.
7. Zelená H. Testování neutralizačních protilátek proti SARS-CoV-2. Ostrava: 2020. Dostupné z: <https://zuova.cz/Home/Clanek/testovani-neutralizacnich-proti-latek-proti-covid>.
8. Bohoněk M. Výroba a použití rekonvalescentní plazmy pro léčbu onemocnění COVID-19 v ČR – stručná informace. *Transfúze Hematol Dnes*. 2021;27(2):189–190.
9. Carter JA, Freedenberg AT, Romeiser JL, et al. Impact of serological and PCR testing requirements on the selection of COVID-19 convalescent plasma donors. *Transfusion*. 2021;61(5):1461–1470.
10. Klein S, Pekosz A, Park HS, et al. Sex, age, and hospitalization drive antibody responses in a COVID-19 convalescent plasma donor population. *J Clin Invest*. 2020;130(11):6141–6150.
11. Chvatal-Medina M, Mendez-Cortina Y, Patino PJ, Velilla PA, Rugeles MT. Antibody Responses in COVID-19: A Review. *Front Immunol*. 2021;12:633184.
12. Kallaste A, Kisand K, Aart A, Kisand K, Peterson P, Lember M. Antibody levels remain high to one-year's follow-up after moderate and severe COVID-19, but not after mild cases. *Infect Dis (Lond)*. 2021;1–11.
13. Bläckberg A, Fernström N, Sarbrant E, Rasmussen M, Sunnerhagen T. Antibody kinetics and clinical course of COVID-19 a prospective observational study. *PLoS One*. 2021;16(3):e0248918.
14. Harvala H, Robb ML, Watkins N et al. Convalescent plasma therapy for the treatment of pa-

tients with COVID-19: Assessment of methods available for antibody detection and their correlation with neutralising antibody levels. *Transfus Med.* 2021;31(3):167–175.

15. Benner SE, Patel EU, Laeyendecker O et al. SARS-CoV-2 Antibody Avidity Responses in COVID-19 Patients and Convalescent Plasma Donors. *J Infect Dis.* 2020;222(12):1974–1984.

16. Tiwari AK, Negi G, Jaiswal RM et al. Correlation of sample-to-cut-off ratio of anti-SARS-CoV-2 IgG antibody chemiluminescent assay with neutralization activity: a prospective multi-centric study in India. *ISBT Sci Ser.* 2021;16:269–275.

17. Mendrone-Junior A, Dinardo CL, Ferreira SC, et al. Correlation between SARS-COV-2 antibody screening by immunoassay and

neutralizing antibody testing. *Transfusion.* 2021;61(4):1181–1190.

### PODÍL AUTORŮ NA PUBLIKACI

EA – příprava studie, příprava publikace

SZ – koordinace studie, vyhodnocení výsledků, příprava publikace

AK – příprava a koordinace studie, literární rešerše

VJ, SJ, ŠJ, HK, DH – konzultace výsledků a revize textu

### PODĚKOVÁNÍ

Práce byla podpořena projektem Univerzity Palackého v Olomouci IGA\_LF\_2021\_036 Změna metodiky výběru dárců pro odběr rekonvalescentní plazmy na pracovišti Transfuzního oddělení Fakultní nemocnice Olomouc.

### KONFLIKT ZÁJMŮ

Autoři práce prohlašují, že v souvislosti s tématem, vznikem a publikací tohoto článku nejsou ve střetu zájmů a vznik ani publikace článku nebyly podpořeny žádnou farmaceutickou firmou.

*Do redakce doručeno dne: 5. 3. 2022.*

*Přijato po recenzi dne: 27. 6. 2022.*

*Mgr. Simona Zatloukalová, Ph.D.*

*Ústav veřejného zdravotnictví*

*LF UP*

*Hněvotínská 3*

*779 00 Olomouc*

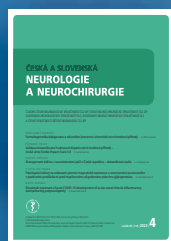
*e-mail: simona.zatloukalova@upol.cz*

Care Comm s.r.o. nabízí předplatné následujících odborných titulů:



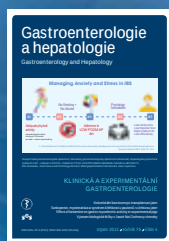
Florence

450 Kč/rok (6 čísel)



Cesk Slov Neurol N

875 Kč/rok (6 čísel)



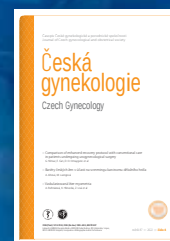
Gastroent Hepatol

600 Kč/rok (6 čísel)



Klin Onkol

540 Kč/rok (6 čísel)



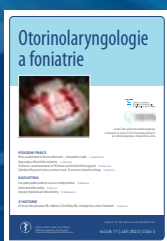
Ceska Gynekol

550 Kč/rok (6 čísel)



Transfuzie  
Hematol Dnes

550 Kč/rok (4 čísla)



Otorinolaryngol  
Foniatr

825 Kč/rok (4 čísla)



Acta Chir Plast

957 Kč/rok (4 čísla)



Rehabil Fyz Lek

600 Kč/rok (4 čísla)

Předplatné objednávejte na [predplatne@carecomm.cz](mailto:predplatne@carecomm.cz).  
Více informací naleznete na [www.carecomm.cz](http://www.carecomm.cz).



Care Comm  
we care...