

COVID-19: подробно про антитела.

Доктор Игорь Соколов

Эта публикация – детальный разбор видов антител, динамики их образования и диагностических подходов в идентификации коронавирусной инфекции. Я хочу отдельно и подробно остановиться на этом важном анализе, поскольку постоянно встречаюсь с неверной (или неглубокой) интерпретацией лабораторных данных.

Дисклеймер: у меня нет конфликта интересов ни с одной из нижеуказанных компаний и лабораторий. Я крайне признателен им в предоставлении детальной информации по их тестам. И да, повторю - использование этого материала в СМИ должно быть согласовано с автором.

Понимание известных сторон антительного ответа, соответствующая интерпретация показателей имеют огромное значение в осознании того, что происходит. Уже устал повторять – не сдавайте анализы на антитела в первые дни болезни, и определение антител класса А тоже не поможет...

Начну с простой характеристики - есть разные антитела, имеющие прямое отношение к инфекционному процессу, включая коронавирус, – антитела класса М, G, А. (в контексте общего представления надо упомянуть об антителах класса Е, тесно связанных с аллергическими реакциями, и антителах D, участвующих в переговорах между клетками и др, но мы сконцентрируемся на первых трех, как имеющих самое важное влияние). Все они представляют из себя белки, это глобулины. Поскольку эти белки задействованы в иммунологических реакциях, то их называют иммуноглобулины, Ig. Учитывая то, что определение уровня антител класса М и G включено даже в противоэпидемические мероприятия (большие показатели антител класса М раньше служили поводом для карантина), то эти буквы знакомы уже всем. Однако, посмотрим на них ближе.

Если организм встречается с инфекцией, то очередность (динамика) продукции антител в классическом варианте выглядит так: IgM -> IgG -> IgA. Это имеет свою логику: в начале заболевания происходит изучение инфекции и то, как ее можно нейтрализовать. Организм подбирает ключики для того, чтобы открыть замки «врага», настраивается точнее и точнее. В иммунологии есть понятие авидности, иными словами – прочности связи антитела с антигеном, с инфекцией (понятно, что чем крепче ты держишь кого-то, тем меньше шансов ему убежать... Но я, к примеру, Федора Емельяненко не удержу, авидность не та). Поэтому организм изначально делает по-другому – вместо точной подстройки антитела к конкретному антигену, а вернее, к конкретному месту (это место молекулярные биологи называют словом ЭПИТОП), он делает антитела с 5-ю парой рук. Впятером держать одного – гораздо выгодней. Это и есть антитела М, они представлены пентамером с 5 активными центрами. Иными словами, антитела М весьма непрочны держат инфекцию, но у них 5 пар «рук». Поэтому общая «связанность» инфекционного агента (далее я буду говорить только про вирус) – неплохая.

Однако, проходит время, и организм начинает подбирать ключик к замочку вируса (к эпипоту вируса) очень точно, сила захвата растет, надобность в маломощных антителах М отпадает. Человек переключается на синтез G. Они точнее и крепче связывают антитело и эпипот (конкретное место) вируса.

Интересная история с антителами класса А. Это секреторные антитела, которые способны выходить на поверхность слизистых оболочек (носа, бронхов, кишечника) и активно противостоять инфекции уже в месте внедрения. Им требуется примерно такое же время, как и антителам G, для настройки. Они также присутствуют и в крови, при этом у них есть одна особенность – они могут проходить через эпителиальную выстилку на поверхность слизистых.

При этом динамика продукции антител А и G различна для разных заболеваний – когда-то раньше начинают продуцироваться А (М → А → G), когда-то G (М → G → А). Однако, антитела класса М появляются все-равно первыми - к 4-5 дню болезни, достигая максимума к 7-10 дню и падая уже с 14-16 дня. Обычно, к 30 дню заболевания их не определяют в крови. В то время как G и А к 7-10-дню только стартуют, к 14-18 должны показать максимум и остаться в крови очень долго, особенно G (в некоторых случаях, мононуклеоз например – антитела класса G останутся пожизненно).

Но с коронавирусом – все не как у людей. И динамика здесь абсолютно другая, в чем я убедился, внимательно изучив работы авторов диагностических систем при разработке своих тестов. Изначально все внимание было приковано к антителам класса М и G, как наиболее значимым в диагностике, и рассмотрению динамики для будущего тестирования: до 7 дня слабое определение IgM, быстрый рост к 12 дню и определение значимых количеств антител G с 14 дня заболевания (все дни указаны относительно первых симптомов болезни).

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7118534/>

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32213337/>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7188146/>

<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.03.02.20030189v1.full.pdf>

К примеру, компания АББОТТ (США) еще в июне вывела на рынок очень достоверные тесты на IgG, с 17 дня показывающие 100% чувствительность. Это – прекрасный результат. Но с 17 дня:

<https://vademec.ru/news/2020/06/02/abbott-vyvel-na-rossiyskiy-rynok-vysokochuvstvitelnye-testy-na-antitela-k-koronavirusu/>

Казалось бы – никаких сюрпризов. Но вот дальнейший анализ дает интересные детали. Все антитела при коронавирусной инфекции, независимо от класса, и М, и G, и А начинают синтезироваться почти одновременно(!), на 4-5 день болезни. И оказалось, что уровень антител А рос значительно быстрее ранних М и на 6 день (!) становится положительным при тестировании, значительно превышая концентрацию антител М класса. Первичные выводы, которые можно делать по результатам исследований:

1. До 6-го дня болезни вероятность положительного результата ЛЮБОГО теста на антитела призрачно мала. Поэтому в качестве диагностики должны применяться ПЦР и антигенные тесты. Не надо до 6 дня болезни анализировать кровь на антитела...

2. С 6-го дня прогрессивно растет вероятность определения антител класса А (! и это важно), антитела класса М тоже растут, но значительно в меньшем титре. Вероятность положительного результат в промежуток 6-12

дней от начала болезни выше по тесту на антитела А. Поэтому, если вы хотите подтвердить болезнь ранним анализом крови, то Ваш выбор – антитела А, которые на 7 сутки заболевания дает правильную оценку у 75% заболевших, увеличиваясь к 100% на 10-12 день.

3. С 12 по 21 день болезни будут определяться и М, и А, и G, но тут есть особенности, на которых остановлюсь подробнее чуть позже.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7331804/>
http://euroimmun.ru/doc/Padoan-Plebani_082020_IgA-Ab-response-to-spike-glycoprotein-of-SARS-CoV-2_Summary_rus.pdf
<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.11.03.367391v1.full>
http://www.analytica.ru/new_pdf/analytica-covid19-diagnost.pdf

Далее, антитела класса М при коронавирусе могут оставаться в крови до 2 месяцев (!), и это зарегистрировано. Более того, данные из практической деятельности и сбор информации по лабораториям говорят о циркуляции до 4 и более месяцев. Поэтому не удивляйтесь, что у некоторых (не у всех) антитела этого класса определяются весьма продолжительное время. Это не является никаким признаком болезни или основанием для карантина.

И теперь несколько критически важных понятий. Для большинства людей антитела в крови – это некий конгломерат. Он есть или нет. Определить антитела можно или качественными анализами, т.е. ответ лаборатории будет выглядеть: «обнаружено» / «не обнаружено», или полуколичественными методиками, там есть некоторые цифры сравнения (например, 1.1 или 10). Выше этой цифры – результат положительный, ниже – отрицательный (часто есть и переходная, сомнительная зона). Многие пациенты даже хотят сравнить воображаемый уровень антител между различными тест-системами. Этого нельзя сделать в принципе. И вот почему.

Приходя в лабораторию, мы мало обращаем внимание на конкретную тест систему проверки антител. Сейчас большинство лабораторий в Москве работают на анализаторах ВЕКТОР-БЕСТ (Новосибирск), АББОТТ (США, Нидерланды), EUROIMMUN (Германия) и некоторых других системах. И даже единицы измерения там разные: КП – коэффициент позитивности, ОЕ – относительные единицы и тд. Дело в том, что границу полуколичественного анализа каждый производитель определяет самостоятельно: тест-систему апробируют на заведомо положительных носителях антител и заведомо тех, кто их не имеет. При этом, как определяют порог срабатывания – по прохождению светового потока, разведением раствора, интенсивностью свечения – это личное дело разработчика. Поэтому, к примеру, уровень антител 5 в тесте ВЕКТОР-БЕСТ и 5 в тесте EUROIMMUN – это абсолютно разные уровни... Это, как килограммы и метры (первые могут быть получены на просвет и 5 - это величина темного фильтра, а вторые, к примеру, разведением и 5 - это величина разведения). Не переводите единицы измерения между системами.

Хотите сравнить? Тогда делайте анализ на одной и той же системе. Существует объективное мнение, что полуколичественный анализ, относительная цифра, полученная в нем - не может отражать даже сравнительную оценку уровня антител в одной и той же системе, например Abbott Architect. Поскольку существует разброс показателей от анализа к анализу, даже для одного забора крови. Тем не менее, четкого подтверждения этому я не нашел. В сертификационных документах

многих ИФА отражено - что число полуколичественного анализа косвенно отражает количество антител в исследуемом материале.

И наконец – самое сложное. Антитела одного и того же класса (к примеру, G) – это не единый конгломерат. Антитела вырабатываются на разные участки вируса – антитела к шиповидному белку S, антитела к нуклеопротеиду N, антитела к матриксу и тд. Нам важно понять, какие из них наиболее важные и полезные. И все исследования сейчас сосредоточены на 2 существенных разновидностях антител – к шиповидному белку S и нуклеопротеиду N. Объясняется это просто:

1. Если антитела вырабатываются к шиповидному белку S (а там есть 3 разновидности антител: к эпитопам S1 / S2 / и главной области шипа РСД: Рецептор связывающему домену, собственно которым вирус и цепляется за клетку человека), то они приведут к нейтрализации вируса. Результат их действия очень нам нужен – любые антитела к S1-S2-PCD (по –английски RBD, receptor binding domen) сделают так, что вирус вроде есть, но он крепко связан, ничего сделать не может и ждет своей очереди на растворение... И вот этот иммунитет, в виде нейтрализующих антител, собственно нас сразу и защищает. Сразу.

2. Если антитела вырабатываются к нуклеопротеиду N (а он расположен внутри вируса), то возникает парадоксальная ситуация. Эти антитела выглядят бесполезными, ведь чтобы атаковать вирус им надо добраться до его «внутренностей», а это, при целом вирусе, невозможно. Тем не менее, организм продуцирует много анти-N антител, зачем? Недавние исследования проливают свет: оказывается, что уровень этих антител может косвенно указывать на активацию клеточного иммунитета. И, хоть сами эти антитела не столь полезны, как нейтрализующие RBD к примеру, но они сообщают, что курок клеточного иммунитета взведен, а там защита на годы...

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074761320304477>

Не правда ли – запутано получается: разные классы антител, по разному во времени продуцируются, да они еще и разные даже в пределах одного класса. IgA, к примеру сделанный для RDM, это совсем не то, что IgA для S1 эпитопа, а IgA к нуклеопротеину N – так это... как сравнить Эйфелеву башню и ледокол. Но они все IgA... А лаборатории работают с конкретными антителами, конкретными классами, а пациент сдает тест в определенную фазу болезни. Все 3 фактора могут привести к тому, что хоть болезнь и прошла достаточно сложно, а антитела – не определяются... А у человека со слабыми симптомами болезни – уровень каких-то антител зашкаливает.

Как же так? Теперь становится понятным – лаборатория, которая работает с конкретным аппаратом тестирования и определением конкретного антитела, совсем просто может не определить то, что есть у человека в крови на данный момент. К примеру:

Вы сдаете тест на антитела M и G на системе ВЕКТОР-БЕСТ. На... 21 день заболевания средней тяжести. Ожидая получить малюсенькие M и хорошую концентрацию G. А в ответ получаете: большие M и отсутствие G, или отсутствие обоих. Удивлены? Все это спокойно объясняется -смотрим на что именно (на какие антитела) настроена Вектор-Бест.

Из характеристик, предоставленных компанией: «В наборе для выявления IgM, основанным на методе «захвата», используется смесь меченных пероксидазой белков — нуклеокапсида и RBD-участка Spike.» Переведем на уже понятный нам язык — компания определяет смесь антител М к РецепторСвязывающему Домену и N-белку. (смесь — для повышения достоверности, или те, или те антитела должны быть). Но(!) ситуация может развиваться совсем иначе: организм начал продуцировать антитела к S1 эпитопу, или S2 эпитопу — тогда... М будет отрицательным. А если к N-белку, то в ряде случаев М будут и 2 месяца положительны, тогда на 21 день они просто зашкалят... Хорошо, с М понятно, а почему G отрицательные после болезни?

Возвращаемся к ВЕКТОР-БЕСТ: «Для наборов, предназначенных для выявления IgG, IgA ... был выбран полноразмерный белок S, так как он содержит большее число иммунодоминантных эпитопов». А если полноценный ответ на N-белок? Ведь АББОТТ, к примеру, использует только N-белок для анализа антител, только... и с 17 дня дает 100% чувствительность. Понятно, что если в крови СЕЙЧАС вертятся только антитела к N, то Вектор просто даст 0, не соответствующий действительности... Иными словами — мы в Африке пытаемся найти китайца... Они есть, только дадут «минус» по конкретному результату. Но через неделю-две, человек окажется в Китае и поиск китайца — не составит труда.

Тут вот и оказывается, что ДАЛЕКО недостаточно знать про М и G, надо еще понимать с какими антителами работают ведущие лаборатории, какой у меня день болезни и что я получу в результате. Я проанализировал 5 ведущих производителей (все ведущие лаборатории работают с ними: Инвитро, Гемотест, KDL, CMD и тд), вот они:

1. Система ВЕКТОР-БЕСТ (Новосибирск): IgM > работают на анализ антител к RBD и N-белку. IgA и G > полноразмерный S белок. (тест системы от ВЕКТОР-БЕСТ на IgA не представлены на коммерческом рынке использования, мне это объяснить сложно, но в документах их характеристики заявлены. Повсеместно используются их тесты на IgM и IgG.)

2. Система АББОТТ (США): IgG > определяют и работают только с N-белком.

3. Система EUROIMMUN (Германия): IgM > смесь антигенов S и N-белок . IgG и IgA > эпитоп S1.

4. Система DiaSorin LIAISON (Италия): IgG > эпитопы S1 и S2.

5. Поликлиники - система Mindray (Китай) IgM + IgG на нуклеокапсид и полноразмерный S (? информацию проверить сложно, как собственно и отличия М от G)

Вы видите, что все анализы настроены на разные антитела не только по классу, но и по виду внутри класса. Поэтому вы запросто можете получить РАЗНЫЕ ответы на анализ, сданный в один день в разных лабораториях.

Попробую дать максимально полезные советы.

1. С огромной вероятностью в первые 6 дней результат ЛЮБОГО теста будет отрицательный. Не сдавайте кровь на тестирование к антителам в промежутке 1-6 дней заболевания.

2. Если Вы хотите убедиться в наличии антител в ранний период (8-21 день) — ваш выбор система EUROIMMUN (Германия) и конкретно антитела А (IgA).

3. Если Вы хотите убедиться в продукции антител на 21 день и ДАЛЕЕ – ваш выбор система ВЕКТОР-БЕСТ (Новосибирск): IgG. Их количество очень коррелирует с напряженностью защиты антителами на 4-6 мес. В случае отрицательных анализов обязательна передача на системе АББОТТ (США): IgG.

4. Если вы хотите понять, как долго у вас будет защита (клеточный иммунитет включился?) - это система АББОТТ (США): IgG. Это – косвенный признак его активации, причем уровень антител при этом – совсем не важен. (но тест должен быть положительным!)

5. Если вы тестируетесь, а вдруг УЖЕ переболел? - рекомендую использовать максимальную СМЕСЬ эпитопов, а это одновременный анализ на системах ВЕКТОР-БЕСТ (или DiaSorin Liaison) и АББОТТ: IgG. Можно так же использовать комплексные анализы, предлагаемые рядом компаний, например МЕДСИ:

<https://medsi.ru/lands/summarnyy-test-na-antitela-iga-igm-i-igg-k-covid-19.php>

6. Если вы хотите посмотреть «остаточную напряженность» иммунитета после болезни: система EUROIMMUN (Германия): IgG или LIAISON (Италия): IgG или ВЕКТОР-БЕСТ: IgG.

7. Участники 3-фазы вакцинации Спутником-V: в вашей вакцине заложен S-белок (шип коронавируса), поэтому для вас выбор: IgG на тест системах LIAISON, EUROIMMUN и ВЕКТОР-БЕСТ. Но не АББОТТ! и по отзывам участников ПК система Mindray плохо показывает результат...

Это оптимальные выборы, но абсолютно не значит, что других вариантов нет... (система LIAISON уверенно конкурирует с ВЕКТОР-БЕСТ). И наконец, последнее и важное. Наш организм весьма умное творение, появляются данные, что в некоторых случаях, он может оставить вирус у себя. Непонятно для чего, непонятно это персистенция или что-то иное, но есть 2 удивительных факта.

1. Вирус обнаружен в кишечнике человека, спустя длительное время (несколько месяцев) после инфицирования. Он не размножается, «жив» он или нет – вопрос философский, но выглядит, как целые вирионы. В тюрьме ли он – пока непонятно.

2. В динамике наблюдается изменение и оттачивание устойчивости иммунного ответа у людей, где такая персистенция имеет место. Иными словами, организм не просто держит вирус, он изменяет и варьирует форму своего ответа по нему (!)

<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.11.03.367391v1.full>

Для чего я это пишу? Напряженность ответа «сейчас» определяется нейтрализующими антителами - к эпитопам S белка и RBD. Понятно, что они падают в течение 3-6-8 месяцев. Ну не могут все антитела в огромных количествах присутствовать постоянно. Но уже ясно, что организм делает все возможное, чтобы включить клеточный иммунитет на длительный (6-11 лет) срок. И пока показатель этого ответа – IgG к N-белку, и это – только система АББОТТ.

И я искренне надеюсь, что ДАЖЕ БЕЗ вакцинации эпидемия уйдет в срок 2, максимум 3 года. Но это – длительный и тернистый путь. Все... тему закрыл.