

COVID-19

Imunoenzymatické soupravy k diagnostice infekce virem SARS-CoV-2 (COVID-19)

ELISA a **Microblot-Array** soupravy jsou určeny ke stanovení specifických protilátek třídy IgA, IgG a IgM v lidském séru nebo plazmě

Úvod

Koronaviry patří do rodiny obalených RNA virů, byly objeveny v 60. letech a patří mezi zoonotické infekce, které vyvolávají onemocnění respiračního a trávicího traktu u lidí a zvířat (ptáci, savci). Způsobují různý klinický obraz, od běžného nachlazení až po závažné respirační syndromy (MERS, SARS a COVID-19). Většina známých koronavirů cirkuluje mezi zvířaty. Alpha- a Beta- koronaviry infikují pouze savce, Gamma- a Delta-koronaviry infikují ptáky i savce. U lidí se vyskytují koronaviry rodu Alpha- a Beta-. Celkově je dosud známo 7 druhů humánních koronavirů – 229E, NL63, OC43, HKU1, MERS, SARS, SARS-2. K přenosu infekce od infikované osoby může docházet 1–3 dny před nástupem onemocnění. Nový koronavirus je respirační virus; primárně se přenáší na člověka po úzkém kontaktu s infikovanou osobou, kdy dochází, zejména při mluvení, kašlání a kýčání, k šíření infekčních kapének do okolí. Přenos je možný také předměty čerstvě kontaminovanými sekrety infikovaného člověka. Virus se podařilo izolovat ze vzorků odebraných z dolních cest dýchacích (bronchoalveolární laváž), virová RNA byla detekována ve stěrech z nosohltanu i hrdla, v séru, krvi, výtěrech z konečníku, ve slinách, moči a stolici.

Virus byl nalezen ve vzorcích z dýchacích cest 1–2 dny před nástupem příznaků a až 8 dní po začátku u mírných průběhů onemocnění, u závažných průběhů déle. Vnímavost je zřejmě všeobecná, podle současných informací je infekce u dětí stejně pravděpodobná jako u dospělých, ale s mírnějšími klinickými projevy. Případná imunita vůči COVID-19 není dosud stanovena. Hlášená mortalita kolísá od 2 do 3 %.

Diagnostika onemocnění

Diagnostika onemocnění je založena na klinickém obrazu, epidemiologické anamnéze a laboratorních testech.

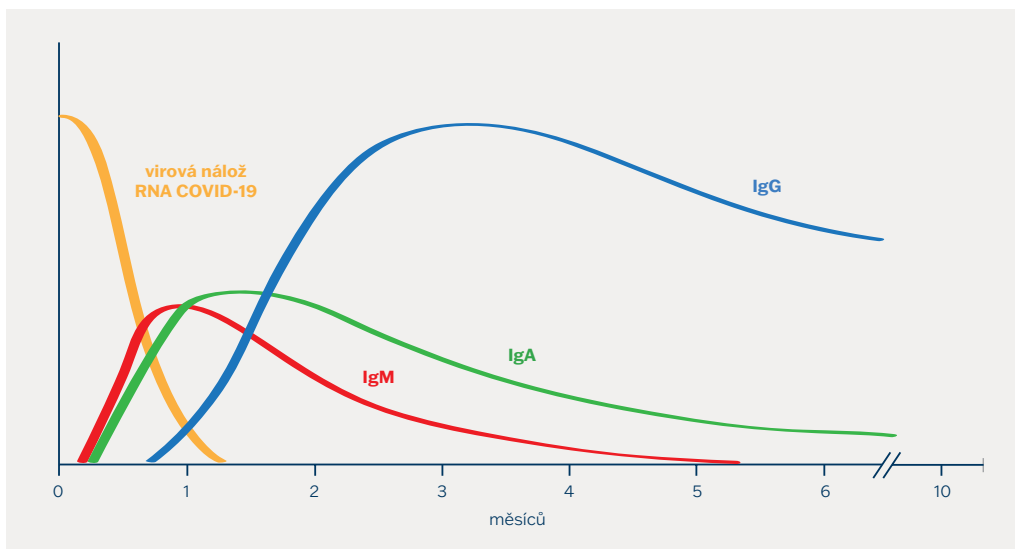
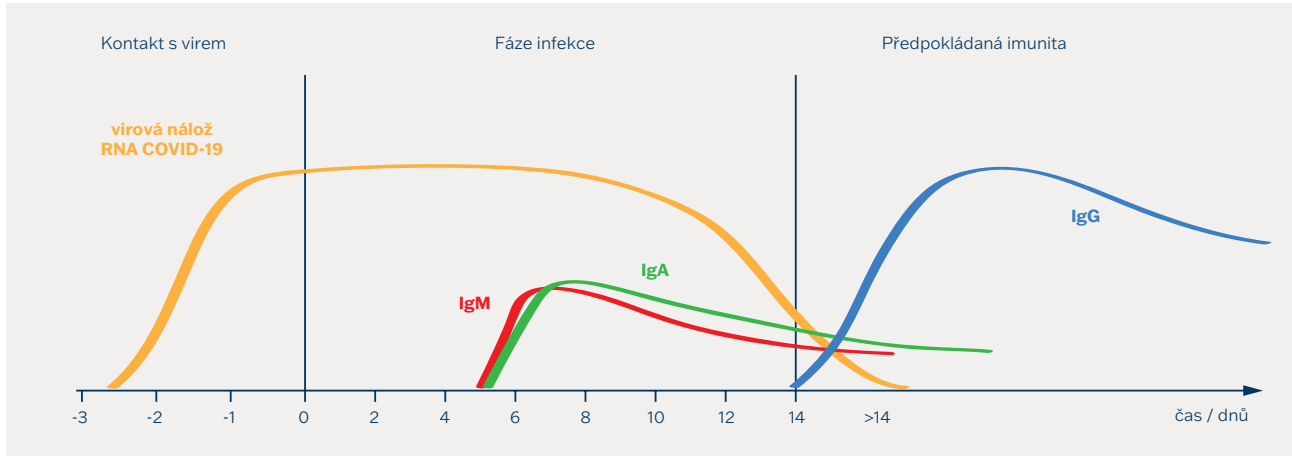
Sérologické testy vzhledem k několikadennímu intervalu od prvních příznaků do nástupu protilátkové odpovědi (takzvané imunologické okno) mají dle doporučení WHO pouze podpůrnou roli a výsledky takových testů je třeba pro stanovení diagnózy akutního onemocnění COVID-19 vždy ověřit přímým průkazem viru.

K vzestupu hladin protilátek dochází u většiny pacientů ve 2. týdnu po nástupu příznaků. Pozitivita protilátek třídy IgA a IgM bývá detekována 3.–6. den, protilátky třídy IgG následně 10.–18. den po nástupu příznaků.

Sérologické testy jsou rovněž využívány v prevalenčních a postvakcinačních studiích. Vývoj protilátek a jejich přetrvávání po přirozené infekci je předmětem dalšího výzkumu.

V současnosti jsou předmětem vědecké diskuze především neutralizační protilátky získané po očkování, které by měli být schopné ochránit buňky hostitele před rozšířením viru v organizmu. Bylo prokázáno, že neutralizační schopnost vykazují především protilátky IgG a IgA specifické proti receptor vázící doméně spike proteinu.

Protilátková postinfekční odpověď

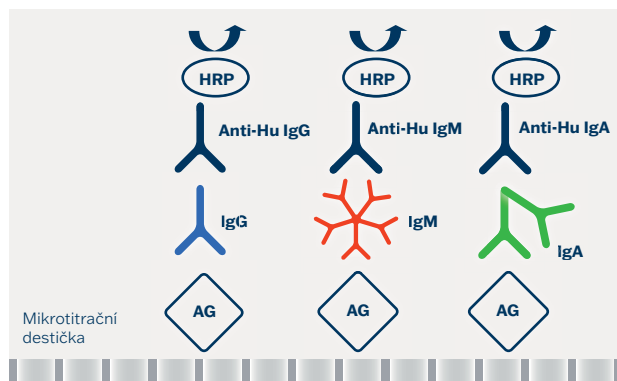


ELISA

Princip testu

Soupravy jsou založeny na sendvičovém typu ELISA metody

Sandwich ELISA



Pracovní postup

Krok	Kroky testu
	1. Ředění vzorků – séra/plazmy 1:101 (10 µl + 1 ml)
	2. Dávkování kontrol a ředěných vzorků 100 µl – blank = prázdná jamka
	3. Inkubace 30 min. při 37 °C
	4. Odsátí a promytí jamek 5 krát
	5. Dávkování Konjugátu 100 µl – blank = prázdná jamka
	6. Inkubace 30 min. při 37 °C
	7. Odsátí a promytí jamek 5 krát
	8. Dávkování substrátu 100 µl (TMB-Complete) – včetně blanku
	9. Inkubace 15 min. při 37 °C
	10. Dávkování Zastavovacího roztoku 100 µl – včetně blanku
	11. Fotometrické měření při 450 nm

Antigeny

EIA COVID-19 NP

Rekombinantní antigen Nucleokapsid (Nucleocapsid Protein)

EIA COVID-19 RBD

Rekombinantní antigen Receptor-binding domain (RBD) a kombinace S1 Spike relevantních mutací SARS-CoV-2

Použití souprav

- Diagnostika onemocnění (doplňkové vyšetření)
- Prevalenční studie
- Detekce postvakcinačních protilátek (RBD)

Uživatelský komfort

- Komponenty v pracovním ředění
- Barevně odlišené reagencie
- Zaměnitelnost komponent
- Barevně značené stripky s odlamovacími jamkami
- CUT-OFF kontrola a kalibrátory
- Semikvantitativní či kvantitativní hodnocení výsledků (Index pozitivity – IP, U/ml)
- U = BAU, ověřeno titrací mezinárodního standardu WHO

Výhody souprav

- Vysoká diagnostická účinnost
- Dobrá reprodukovatelnost
- Vysoká dynamika testů
- Identický pracovní postup
- Celková doba vyšetření 1,5 hodiny
- Vhodné pro otevřené automatické systémy
- Komplexní zákaznický servis

Charakteristiky souprav

<u>Elisa</u>	<u>Diagnostická citlivost</u>	<u>Diagnostická specifita</u>
EIA COVID-19 NP IgA	97,4 %	97,7 %
EIA COVID-19 NP IgG	95,1 %	99,0 %
EIA COVID-19 NP IgM	95,7 %	97,7 %
EIA COVID-19 RBD IgA	96,6 %	98,9 %
EIA COVID-19 RBD IgG	99,9 %	99,1 %
EIA COVID-19 RBD IgM	97,5 %	95,1 %

Typy souprav

Soupravy SmartEIA jsou navrženy pro automatizované zpracování pomocí analyzátoru Agility®.

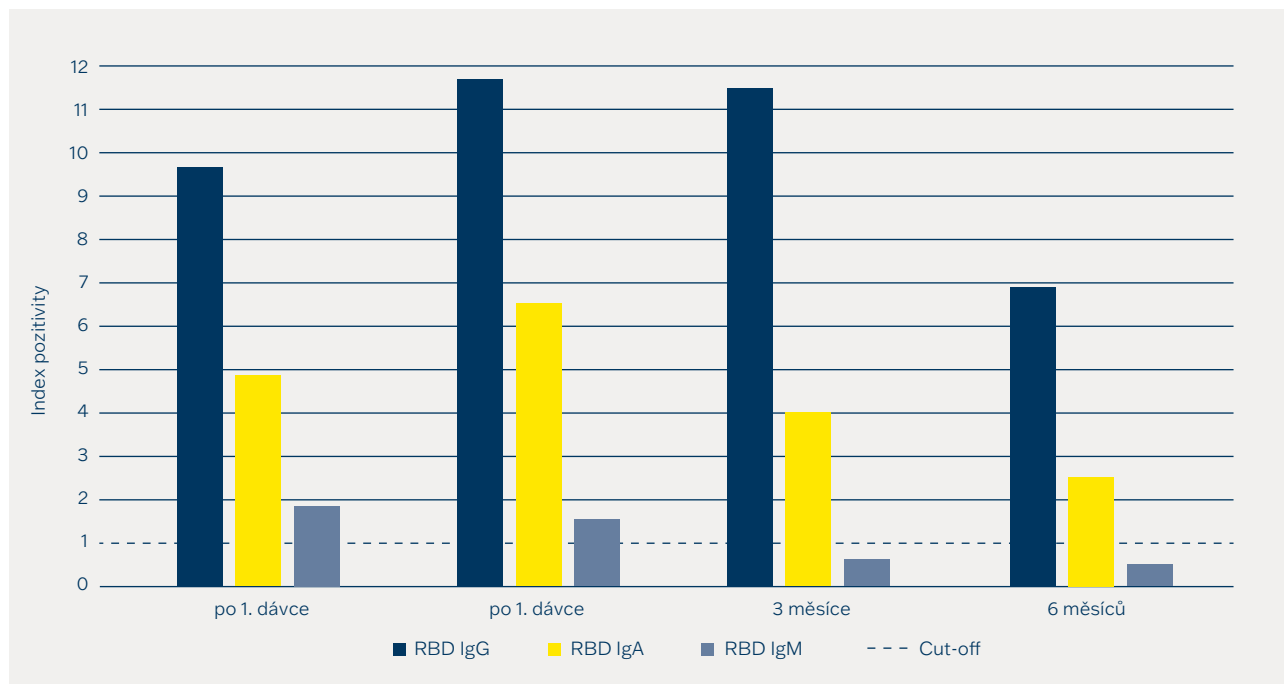
EIA



SmartEIA



Přehled postvakcinační reaktivity souprav ELISA



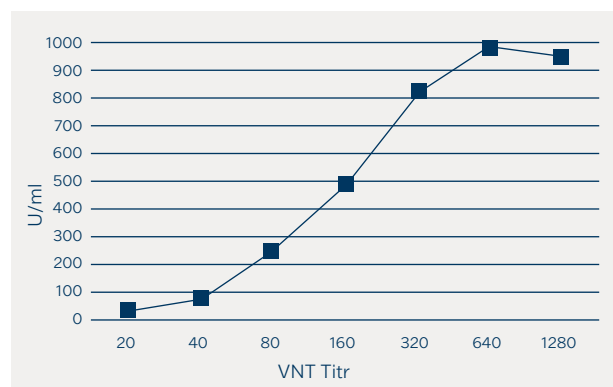
Testováno bylo 40 osob, po 1. dávce 2. vakcíny a dále po 3 měsících a 6 měsících po ukončení očkování. Hodnoty v grafu jsou aritmetickým průměrem získaných hodnot.

Korelace výsledků VNT a ELISA souprav

VNT vs EIA TestLine IgG

		EIA	
		poz.	neg.
VNT	poz.	99	1
	neg.	0	0
shoda		99 %	

Průměrné hodnoty U/ml IgG anti-RBD protilátek (TestLine) ve vztahu k jednotlivým titrům VNT



MICROBLOT-ARRAY

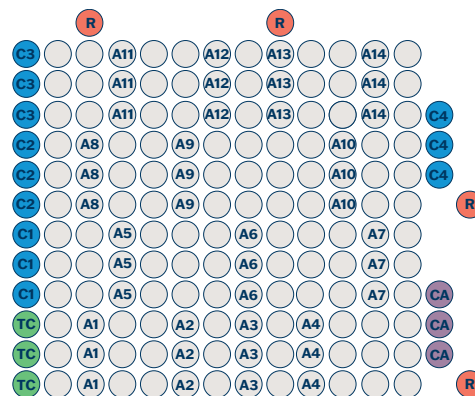
Rozložení antigenů a kontrolních spotů

Popis antigenů

- A1** – Nucleocapsid NCP
- A2** – RBD
- A3** – Spike S1
- A4** – Spike S2
- A5** – Spike S1 α -variant (UK)
- A6** – Spike S1 γ -variant (Brazil)
- A7** – Spike S1 δ -variant (Indian)
- A8** – Envelope protein (E)
- A9** – ACE2
- A10** – PLPro protein
- A11** – MERS-CoV
- A12** – SARS – CoV
- A13** – HCoV 229E Np
- A14** – HCoV NL63 Np

Popis kontrolních spotů





- **R** – Reference
- **TC** – Test control
- **CA** – Conjugate control IgA
- **CG** – Conjugate control IgG
- **CM** – Conjugate control IgM
- **C1** – Calibration 1
- **C2** – Calibration 2
- **C3** – Calibration 3
- **C4** – Calibration 4



Přehled specifických antigenů

Antigen	Popis	Funkce
Nucleocapsid NP	Nucleocapsid NP	<p>Silný imunodominantní antigen koronaviřů, který obsahuje diagnosticky významné epitopy pro diagnostiku SARS-CoV-2</p> <p>Citlivá detekce anti-SARS-CoV-2 IgG protilátek</p>
RBD	Receptor-binding domain S1 podjednotky spike (S) proteinu SARS-CoV-2	<p>Anti-RBD SARS-CoV-2 protilátky jsou vysoce subtypově specifické a mají protektivní charakter</p> <p>Přítomnost anti-RBD protilátek významně koreluje s tvorbou neutralizujících protilátek</p> <p>IgA – pro sledování imunitní odpovědi po pozitivní PCR reakci; indikátor počátku imunitní reakce</p>
Spike S1	Spike Glycoprotein S1 (Wuhan-Hu-1)	<p>S1 podjednotka spike proteinu SARS-CoV-2, obsahuje receptor-vázací doménu (RBD), jejímž prostřednictvím se virus váže na povrch hostitelské buňky</p> <p>Protilátky proti S1 jsou vysoce subtypově specifické, vykazují vysokou citlivost vůči SARS-CoV-2 a mají protektivní charakter</p>
Spike S2	S2 podjednotka spike proteinu SARS-CoV-2	Hraje významnou roli při fúzi viru s buněčnou membránou
Spike S1 α -varianta	britská mutace	Spike Glycoprotein S1 (B.1.1.7)
Spike S1 γ -varianta	brazílská mutace	Spike Glycoprotein S1 (P.1)
Spike S1 δ -varianta	indická mutace	Spike Glycoprotein S1 (B.1.617.2)
Envelope protein (E)	nejmenší hlavní strukturní protein	Důležitý pro různá stádia virové infekce a replikace, významná role v životním cyklu viru
ACE2	Angiotensin Converting Enzyme (transmembránový glykoprotein)	<p>Klíčová komponenta systému renin-angiotensin</p> <p>Expresován v cévních endotelových buňkách v srdci, ledvinách, ale i varlatech, játrech, střevech, plicích a také mozku</p> <p>Účastní se regulace kardiovaskulárních a renálních funkcí</p>
PLpro	Papain-like proteáza	<p>Jeden ze základních proteinů SARS-CoV-2, zásadní pro replikaci viru; deubikvitinační aktivita</p> <p>Nezbytný pro proteolýzu virového polyproteinu</p>
MERS-CoV S1	Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus S1 protein	Vyloučení zkřížených reaktivit s jinými endemickými koronaviři
SARS-CoV Np	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Nucleocapsid protein	Vyloučení zkřížených reaktivit s jinými endemickými koronaviři
HCoV 229E Np	Human coronavirus 229E Nucleocapsid protein	Vyloučení zkřížených reaktivit s jinými endemickými koronaviři
HCoV NL63 Np	Human coronavirus NL63 Nucleocapsid protein	Vyloučení zkřížených reaktivit s jinými endemickými koronaviři

Pracovní postup

<u>Krok</u>	<u>Kroky testu</u>
	1. Dávkování Univerzálního roztoku 150 µl
	2. Smáčení 10 min při laboratorní teplotě
	3. Inkubace 30 min. při 37 °C
	4. Ředění vzorků – séra/plazmy 1:51 (10 µl + 500 µl)
	5. Dávkování kontrol a ředěných vzorků 100 µl
	6. Inkubace 30 min při laboratorní teplotě
	7. Odsátí a promytí v Univerzálním roztoku 3 krát 150 µl po 5 min
	8. Dávkování Konjugátu 100 µl
	9. Inkubace 30 min při laboratorní teplotě
	10. Odsátí a promytí v Univerzálním roztoku 3 krát 150 µl po 5 min
	11. Dávkování Substrátového roztoku (BCIP/NBT) 100 µl
	12. Inkubace 15 min při laboratorní teplotě
	13. Odsátí a promytí v destilované vodě 2 krát 200 µl po 5 min
	14. Vysušení a vyhodnocení

Zpracování souprav Microblot-Array je identické se standardním provedením ostatních imunoenzymatických testů s možností využití přístrojové techniky ELISA (automatický analyzátor, promývačka).

Výhody souprav

Efektivita

- Analýza až 96 vzorků najednou
- Nízká spotřeba vzorku
- Paralelní testování více markerů současně
- Úspora času a nákladů

Automatizace

- Možnost automatizovaného zpracování ELISA analyzátozem
- Intuitivní software pro vyhodnocení testu
- Vzdálené odstraňování problémů
- Oboustranná komunikace s LIS

Uživatelský komfort

- Komponenty připravené k použití
- Barevně odlišené stripy
- Stejný pracovní postup (30/30/15 min.)
- Antigeny spotovány v tripletu – minimalizace chyby
- Kontrolní a kalibrační spoty v každé jamce

Charakteristiky souprav

<u>Microblot-Array</u>	<u>Diagnostická citlivost</u>	<u>Diagnostická specifita</u>
COVID-19 IgA	98,3 %	99,2 %
COVID-19 IgG	98,7 %	99,3 %
COVID-19 IgM	97,7 %	99,3 %



Prevalence protilátek v průběhu infekce

MBA COVID-19 IgA (n=207)

Dny od počátečních symptomů

		<u>< 14</u>	<u>15-25</u>	<u>> 25</u>
pozitivní	RBD	14	10	110
	NP	14	9	43
negativní	RBD	9	3	62
	NP	9	4	130
prevalence protilátek	RBD	60,87 %	76,92 %	63,95 %
	NP	60,87 %	69,23 %	24,86 %
MBA COVID-19 IgA		69,57 %	84,62 %	66,67 %

MBA COVID-19 IgG (n=208)

Dny od počátečních symptomů

		<u>< 14</u>	<u>15-25</u>	<u>> 25</u>
pozitivní	RBD	11	10	145
	NP	15	12	164
negativní	RBD	10	3	9
	NP	6	1	8
prevalence protilátek	RBD	52,38 %	94,16 %	94,16 %
	NP	71,43 %	95,35 %	95,35 %
MBA COVID-19 IgG		71,43 %	98,28 %	98,28 %

MBA COVID-19 IgM (n=188)

Dny od počátečních symptomů

		<u>< 14</u>	<u>15-25</u>	<u>> 25</u>
pozitivní	RBD	8	9	75
	NP	11	8	40
negativní	RBD	14	3	78
	NP	11	4	108
prevalence protilátek	RBD	36,36 %	75,00 %	49,02 %
	NP	50,00 %	66,67 %	27,03 %
MBA COVID-19 IgM		50,00 %	75,00 %	51,30 %



Specifita na panelech s možnou zkříženou reaktivitou

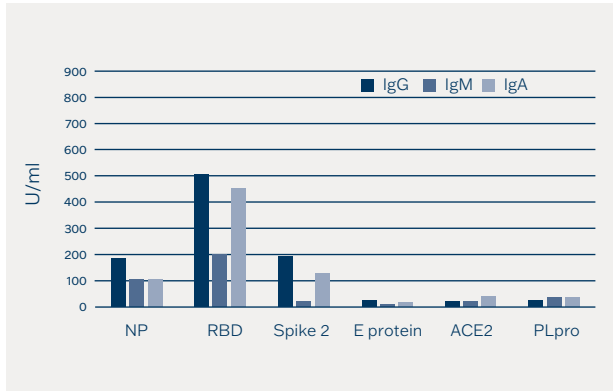
		Panel		
		Krevní dárce (n=593)	Potenciálně zkřížené reaktivitu (n=196)	Endemické koronaviry (n=56)
pozitivní	RBD	1	0	0
	NP	4	5	1
negativní	RBD	592	196	56
	NP	589	191	55
specifita	RBD	99,83 %	100,00 %	100,00 %
	NP	99,33 %	97,45 %	98,21 %
		MBA COVID-19 IgA	99,16 %	97,45 %
			97,45 %	98,21 %

		Panel		
		Krevní dárce (n=600)	Potenciálně zkřížené reaktivitu (n=198)	Endemické koronaviry (n=62)
pozitivní	RBD	0	2	0
	NP	4	6	1
negativní	RBD	600	196	62
	NP	596	192	61
specifita	RBD	100,00 %	98,99 %	100,00 %
	NP	99,33 %	96,97 %	98,39 %
		MBA COVID-19 IgG	99,33 %	98,39 %
			96,46 %	98,39 %

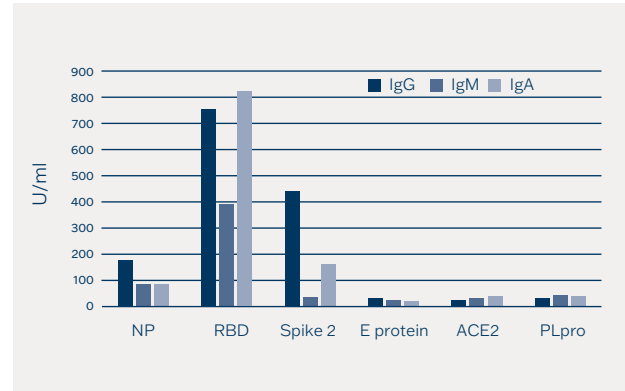
		Panel		
		Krevní dárce (n=598)	Potenciálně zkřížené reaktivitu (n=197)	Endemické koronaviry (n=57)
pozitivní	RBD	0	2	0
	NP	4	2	0
negativní	RBD	598	195	57
	NP	594	195	57
specifita	RBD	100,00 %	98,98 %	100,00 %
	NP	99,33 %	98,98 %	100,00 %
		MBA COVID-19 IgM	99,33 %	100,00 %
			97,97 %	100,00 %

Přehled postvakcinační reaktivity MBA souprav

Průměrné hodnoty po první dávce očkování proti SARS-CoV-2



Průměrné hodnoty po druhé dávce očkování proti SARS-CoV-2



Míra korelace získaných výsledků s VNT metodikou

VNT vs MBA TL IgG

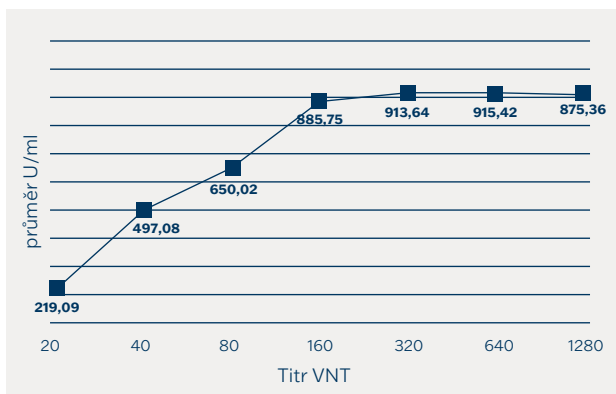
		TL	
		poz	neg
VNT	poz	100	0
	neg	0	0
shoda		100 %	

VNT vs všechny třídy protilátek MBA TL

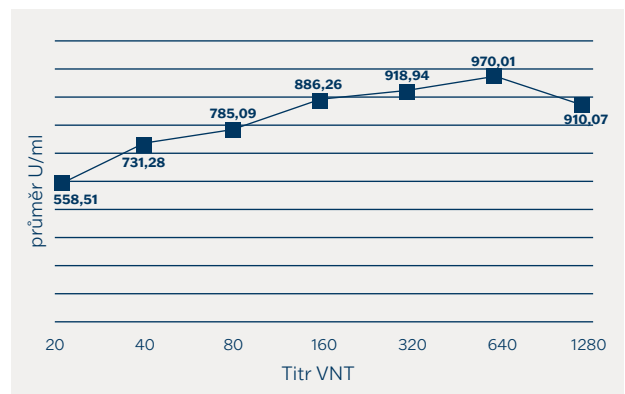
		TL	
		poz	neg
VNT	poz	100	0
	neg	0	0
shoda		100 %	

Průměrné hodnoty jednotek (U/ml) IgG anti-RBD a IgG anti-NP protilátek (TestLine) ve vztahu k jednotlivým titrům VNT

Průměrné hodnoty jednotek (U/ml) IgG anti-RBD protilátek (TestLine) ve vztahu k jednotlivým titrům VNT



Průměrné hodnoty jednotek (U/ml) IgG anti-NP protilátek (TestLine) ve vztahu k jednotlivým titrům VNT



Objednací údaje

ELISA

Kód	Název soupravy	Počet testů
CoNA96	EIA COVID-19 NP IgA	96
CoNG96	EIA COVID-19 NP IgG	96
CoNM96	EIA COVID-19 NP IgM	96
CoRA96	EIA COVID-19 RBD IgA	96
CoRG96	EIA COVID-19 RBD IgG	96
CoRM96	EIA COVID-19 RBD IgM	96
SK-CoNA96	SmartEIA COVID-19 NP IgA	96
SK-CoNG96	SmartEIA COVID-19 NP IgG	96
SK-CoNM96	SmartEIA COVID-19 NP IgM	96
SK-CoRA96	SmartEIA COVID-19 RBD IgA	96
SK-CoRG96	SmartEIA COVID-19 RBD IgG	96
SK-CoRM96	SmartEIA COVID-19 RBD IgM	96

Soupravy SmartEIA jsou koncipovány pro automatické zpracování na přístroji Agility.

MICROBLOT-ARRAY

Kód	Název soupravy	Počet testů
CoVAMA96	Microblot-Array COVID-19 IgA	96
CoVGMA96	Microblot-Array COVID-19 IgG	96
CoVMMA96	Microblot-Array COVID-19 IgM	96



TestLine Clinical Diagnostics s.r.o.

Křižíkova 68, 612 00 Brno, Česká republika
 +420 549 121 205 (209, 238)
 trade@testlinecd.com
 www.testlinecd.cz



TestLine Clinical Diagnostics s.r.o.
 je držitelem certifikátů
 ISO 9001 a ISO 13485