BioVendor Group CLIA

COVID-19

SARS-CoV-2
Stanovení protilátek

RBD IgA, IgG, IgM
NP IgA, IgG, IgM

Diagnostické panely:
COVID-19
Kontrola po očkování
Respirační nemoci

CE IVD Kity jsou certifikovány a určeny pro profesionální použití.

CLIA kity jsou optimalizovány a validovány pro stanovení protilátek v lidském séru a plasmě

Určeno pro platformu Kleeya®

Kleeya

Úvod

Virus SARS-CoV-2 patří mezi koronaviry, což jsou obalené RNA viry, které vyvolávají onemocnění respiračního a trávicího traktu u lidí a zvířat. Způsobují různý klinický obraz, od běžného nachlazení až po závažné respirační syndromy (MERS, SARS a Covid-19). Celkově je dosud známo 7 druhů humánních koronavirů – 229E, NL63, OC43, HKU1, MERS, SARS, SARS-CoV-2.

Covid-19 je akutní infekční onemocnění způsobené virem SARS-CoV-2, jeho inkubační doba je od 2 do 14 dnů od expozice, průměrně jde o 5–6 dnů. Infekce může probíhat u značného procenta nakažených asymptomaticky. SARS-CoV-2 je respirační virus, primárně se přenáší na člověka po úzkém kontaktu s infikovanou osobou, kdy dochází k šíření infekčních kapének do okolí. Přenos je možný také předměty čerstvě kontaminovanými sekrety infikovaného člověka. K přenosu infekce od infikované osoby může docházet 1–3 dny před nástupem onemocnění. V akutní fázi nemoci převažuje postižení respiračního traktu způsobené primární infekcí nebo sekundární přehnanou reakcí imunitního systému, tzv. „cytokinovou bouří“. Vedle závažných akutních projevů onemocnění jsou pozorovány také možné dlouhodobé následky obvykle označované jako „long- covid“ nebo „post-covidový syndrom“. Nejzávažnější klinické projevy jsou pozánětlivá fibrotizace plic, neuropatie, myopatie, karditida či kardiomyopatie.

SARS-CoV-2 v průběhu pandemie mutuje, mění se jeho nakažlivost, průběh onemocní a riziko závažného průběhu nemoci. Podstatné je, že mutace virových proteinů mohou ovlivnit i účinnost protilátkové obrany po infekci předchozí variantou viru nebo po očkování.

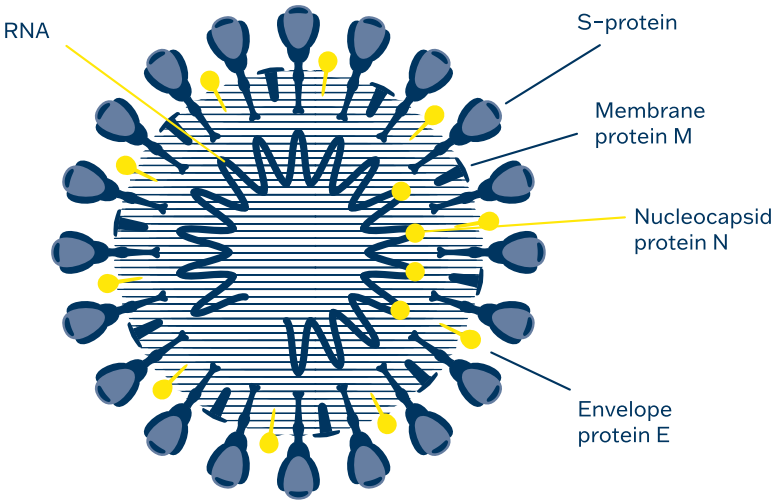
Diagnostika onemocnění

Diagnostika onemocnění COVID-19 je založena na klinickém obrazu, epidemiologické anamnéze a laboratorních testech. Pro průkaz akutní infekce se využívají molekulárně biologické techniky PCR a nověji LAMP. Imunochemické testy pro průkaz virových antigenů mají screeningové využití, pozitivní nález se potvrzuje v PCR. Sérologická vyšetření mají podle doporučení WHO podpůrnou roli.

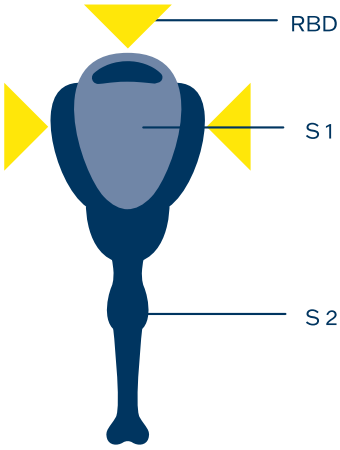
Stanovení protilátek

Virus SARS-CoV-2 obsahuje čtyři strukturní proteiny: spike (S), nukleokapsid (N), envelope (E) a membránový (M) protein. Dva z nich jsou vysoce antigenní, a proto mají diagnostické využití. Nukleokapsidový protein (NP) zapouzdřuje virovou genomovou RNA a tvoří hlavní součást struktury viru. NP je vysoce antigenní a je spojen s několika interakcemi mezi virem a hostitelem. Receptor-binding domain (RBD), podjednotka proteinu Spike S1, se specificky váže na angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) na povrchu hostitelské buňky. Tato vazba vysoce koreluje se vznikem neutralizačních protilátek.

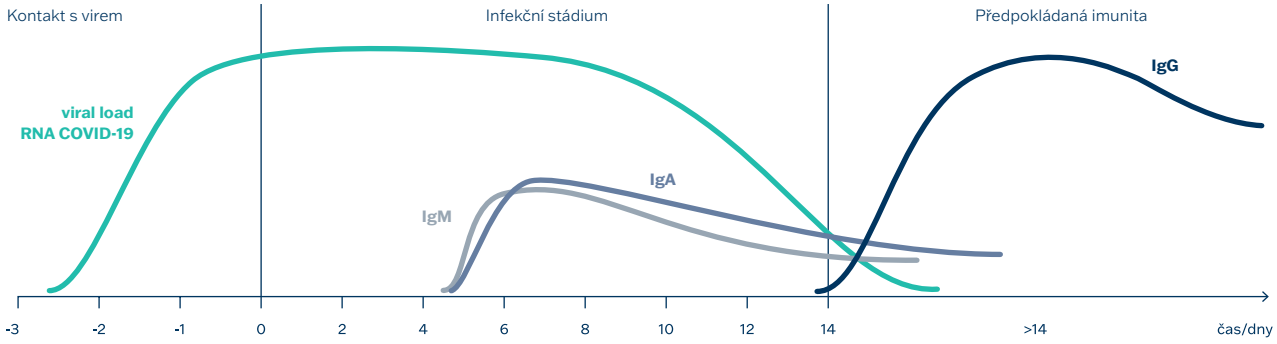
SARS-CoV-2

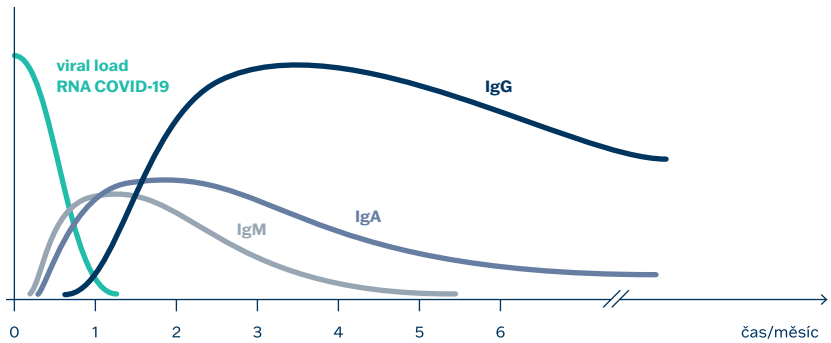


SPIKE



Sérologická vyšetření se u COVIDu-19 neprovádějí k průkazu akutní infekce. Protilátky proti SARS- CoV-2 se objevují v 1.–3. týdnu nemoci. Pozitivita protilátek třídy IgA a IgM bývá detekována 3.-6. den, u IgG protilátek 10.–18. den nemoci. U COVIDu-19 se ale IgM, IgA a IgG protilátky mohou tvořit zároveň. Výjimečně, osoby s asymptomatickou infekcí či s mírnými příznaky nemusejí protilátky vytvořit vůbec.





Proč je důležité testovat protilátky proti SARS-CoV-2

Průkaz protilátek poskytuje podstatnou část z komplexního hodnocení stavu imunity po prodělané nemoci nebo po očkování. Druhou částí je vyšetření buněčné imunity, které je ale mnohem časově náročnější a je omezené na specializované laboratoře.

Detekce protilátek proti SARS-CoV-2 může pomoci potvrdit nebo vyvrátit předchozí infekci a odhalit, zda je vyšetřovaná osoba náchylná vůči infekci nebo má vytvořenou určitou obranu, zvláště proti závažnému průběhu nemoci s nutnou hospitalizací. Je také nezastupitelná pro screening a identifikaci dárců rekonvalescentní plasmy. Vyšetřování protilátek je zahrnuto v mnoha probíhajících nebo plánovaných epidemiologických studiích.

Podle třídy protilátek lze rozlišit, v jaké fázi po infekci se osoba nachází. Důležité je sledování dynamiky protilátek, dosažení maximálních hodnot a kdy a jak rychle dochází k jejich poklesu; ať už u jednotlivce nebo v populaci.

Podle specifity protilátek vůči proteinu S (RBD) nebo NP lze rozlišit infekční a vakcinační imunitu.

RBD IgG

Mají největší zaastoupení v séru osob, které prodělaly infekci nebo očkování proti COVID- 19 a dosahují zde nejvyšších koncentrací. Anti-RBD (nebo Spike) IgG přetrvávají několik měsíců ve vysokých hladinách a plní v krvi neutralizační funkci, podobně jako IgA na sliznicích. Hodnoty RBD IgG naměřené v CLIA korelují s titry virus neutralizačních protilátek v testu VNT.

NP IgG

Vyskytují se u vysokého procenta osob, které prodělaly infekci COVID-19. Jsou specifickým markerem prodělání nemoci, netvoří se po očkování. Očkované osoby, které COVID-19 neprodělaly, vytvářejí protilátky pouze proti S-proteinu. I u očkovaných osob to umožní ověřit, zda neprodělaly infekci virem, zvláště při podezření na některou zdravotní komplikaci spojovanou s post-covidovým syndromem.

RBD IgA

Indikují především vytvořenou slizniční imunitu proti COVID-19. Jsou znakem nedávné infekce. Mohou také vznikat po opakované infekci osoby, která už získala imunitu.

NP IgA

Mají podobný význam jako RBD IgA, ale prevalence tvorby NP IgA je výrazně nižší.

RBD IgM

Jsou znakem nedávné infekce s krátkodobou persistencí v cirkulaci.

NP IgM

Také jsou znakem nedávné infekce, jejich prevalence je mnohem nižší než u RBD IgM.

Je třeba brát v úvahu, že protilátková odpověď u jednotlivců vykazuje značnou variabilitu a mohou být pozorovány výrazné odchylky od obecných pravidel.

Klinická aplikace

- Diagnostika onemocnění (doplňkové vyšetření)
- Prevalenční studie
- Detekce post-vakcinačních protilátek (RBD)
- Důkaz klesající imunity, možnost doporučení boostrovací dávky, obzvláště u starších a imunodeficientních osob
- Identifikace osob s asymptomatickou infekcí
- Detekce protilátek také u mutace Omicron

Charakteristiky

Antigeny

CLIA COVID-19 NP IgA, IgG a IgM	CLIA COVID-19 RBD IgA, IgG a IgM
Rekombinantní nukleokapsidový protein (NP)	Rekombinantní RBD doména proteinu Spike S1

Charakteristika testů

Kit	Kalibrační rozsah	Diagnostická citlivost	Diagnostická specifita
CLIA COVID-19 NP IgA	5–100 U/ml	92,86 %	99,99 %
CLIA COVID-19 NP IgG	5–320 U/ml	99,99 %	99,99 %
CLIA COVID-19 NP IgM	5–100 U/ml	99,99 %	99,99 %
CLIA COVID-19 RBD IgA	5–100 U/ml	92,86 %	99,99 %
CLIA COVID-19 RBD IgG	5–1000 U/ml	99,99 %	99,99 %
CLIA COVID-19 RBD IgM	5–100 U/ml	96,55 %	99,99 %

Návaznost na mezinárodní WHO standard

Všechny BioVendor Group CLIA kity pro stanovení anti-SARS-CoV-2 protilátek byly standardizovány pomocí mezinárodního standardu WHO 20/136. Pro CLIA COVID-19 RBD IgG platí 1 U/ml = 1 BAU/ml.

Korelace metod

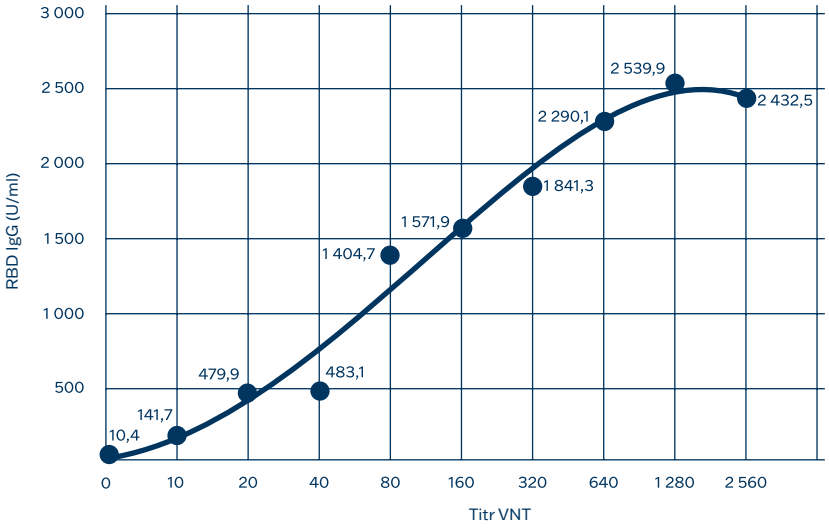
Korelace s VNT

Diagnostické soupravy CLIA COVID-19 RBD, byly porovnávány s metodou VNT. U soupravy CLIA COVID-19 RBD IgG byla zjištěna významná shoda.

		CLIA RBD IgG	
		pos	neg
VNT	pos	77	0
	neg	5	28
Shoda		95 %	

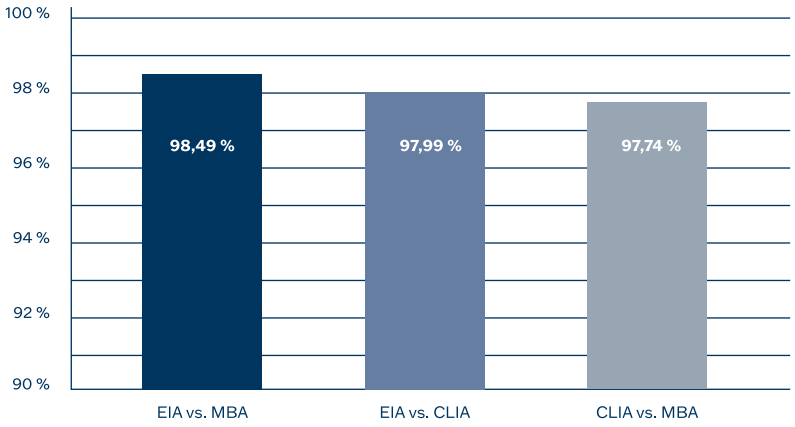
CLIA Covid-19 RBD IgG vs. VNT titr

Koncentrace RBD IgG protilátek naměřené kitem CLIA COVID-19 RBD IgG velmi dobře korespondují s hladinami virus neutralizačních protilátek změřených jako titr VNT.



Korelace s ELISA a MBA

Vedle CLIA, vyrábí společnost TestLine ze skupiny BioVendor Group také enzymatické imunostanovení (EIA) a microblot-array (MBA) pro stanovení anti-SARS-CoV-2 protilátek. Přirozeným cílem je shoda mezi metodami a návaznost získaných výsledků.

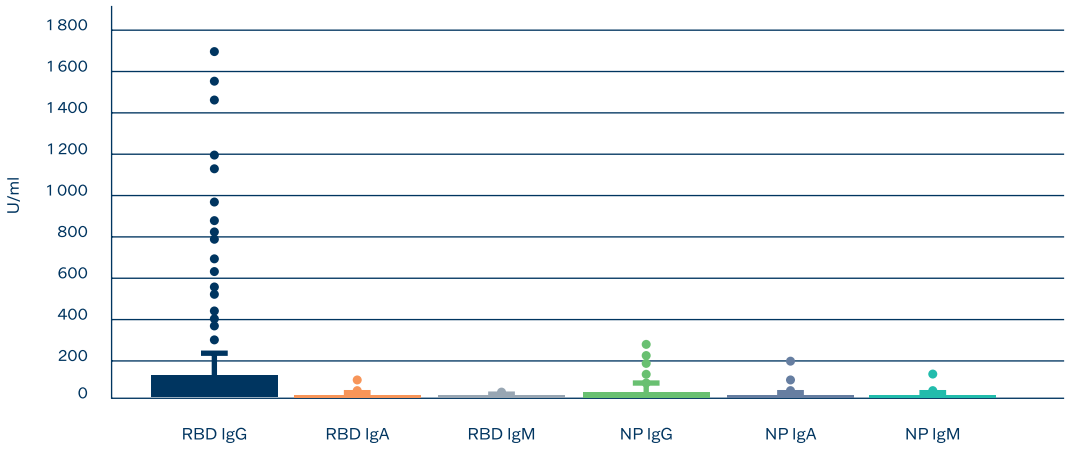


Příklady aplikace

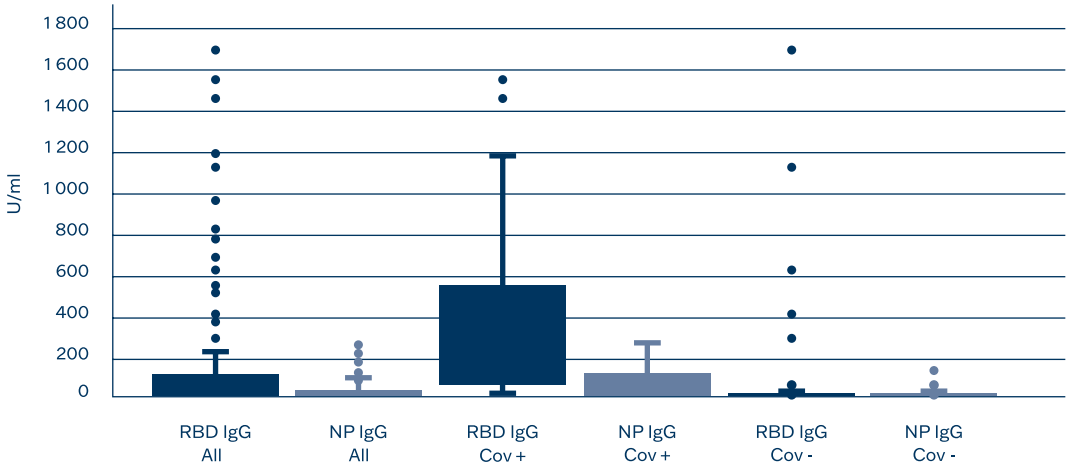
Hladiny protilátek – Neočkovaní

179 neočkovaných osob bylo vyšetřeno pomocí CLIA kitů. 80 z nich prodělalo COVID-19 v rozmezí 4–10 měsíců před odběrem.

Komplexní vyšetření protilátek



RBD IgG a NP IgG vs. diagnóza



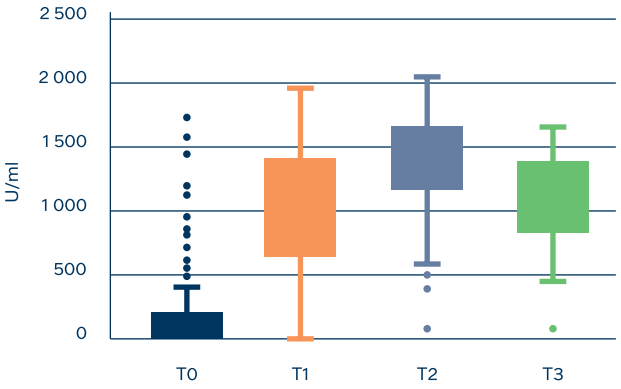
Z 80 osob s diagnostikovaným onemocněním u 70 byly detekovány protilátky RBD IgG; u 51 byly detekovány protilátky NP IgG.

Z 99 osob bez diagnózy u 18 byly detekovány protilátky RBD IgG (max. 1708 U/ml); u 5 byly kromě RBD IgG detekovány také protilátky NP IgG (max. 156 U/ml); 1 osoba měla pouze NP IgG (bez RBD IgG). Dá se usuzovat, že tyto osoby bez potvrzené diagnózy také prodělaly COVID-19.

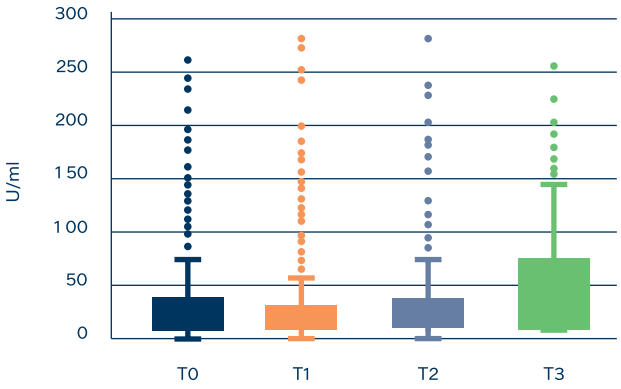
Dynamika protilátkové odpovědi na očkování

Séra získaná od 167 osob (73 prodělalo COVID-19) očkovaných 2 dávkami vakcíny Comirnaty (Pfizer/BioNTech) byla specifickými kity CLIA COVID-19 vyšetřena na přítomnost protilátek anti-RBD (IgA, IgG) a anti-NP (IgA, IgG). Vzorky byly odebrány 4x v rozmezí 12 týdnů:

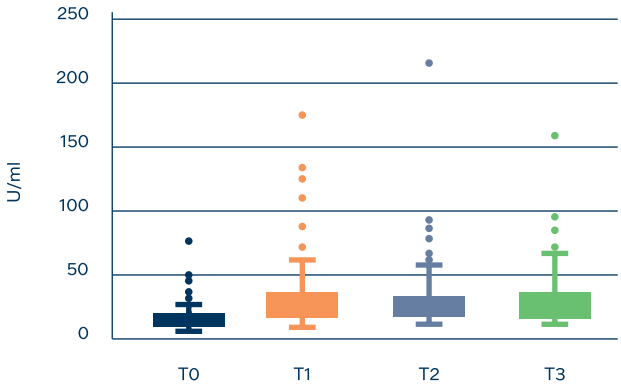
RBD IgG



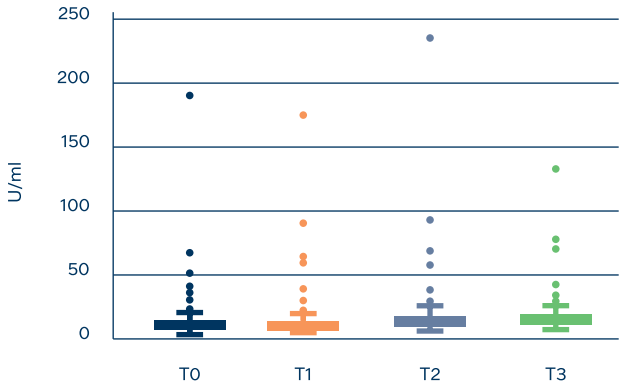
NP IgG



RBD IgA



NP IgA



T0: 1. dávka / **T1**: T0 + 3 týdny (2. dávka) / **T2**: T1 + 3 týdny / **T3**: T2 + 6 týdnů.

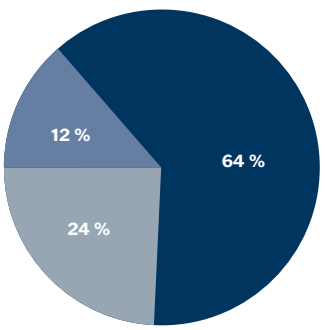
Vysoké hladiny RBD IgG byly u jedinců, kteří prodělali COVID-19 a zvláště velký byl nárust po očkování. Také hladiny NP IgG u jedinců po COVIDu-19 byly vysoké.

Na rozdíl od RBD IgG protilátek nejsou NP IgG překryty vakcinačními protilátkami.

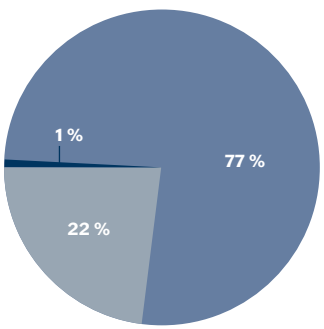
Stabilita protilátek u seniorů

Protilátky proti RBD (IgG a IgA) byly testovány u 201 seniorů ~8 měsíců po očkování. U 88 % z nich byly naměřeny RBD IgG protilátky nad cut-off hodnotou; pro RBD IgA to bylo u 23 % z nich.

RBD IgG



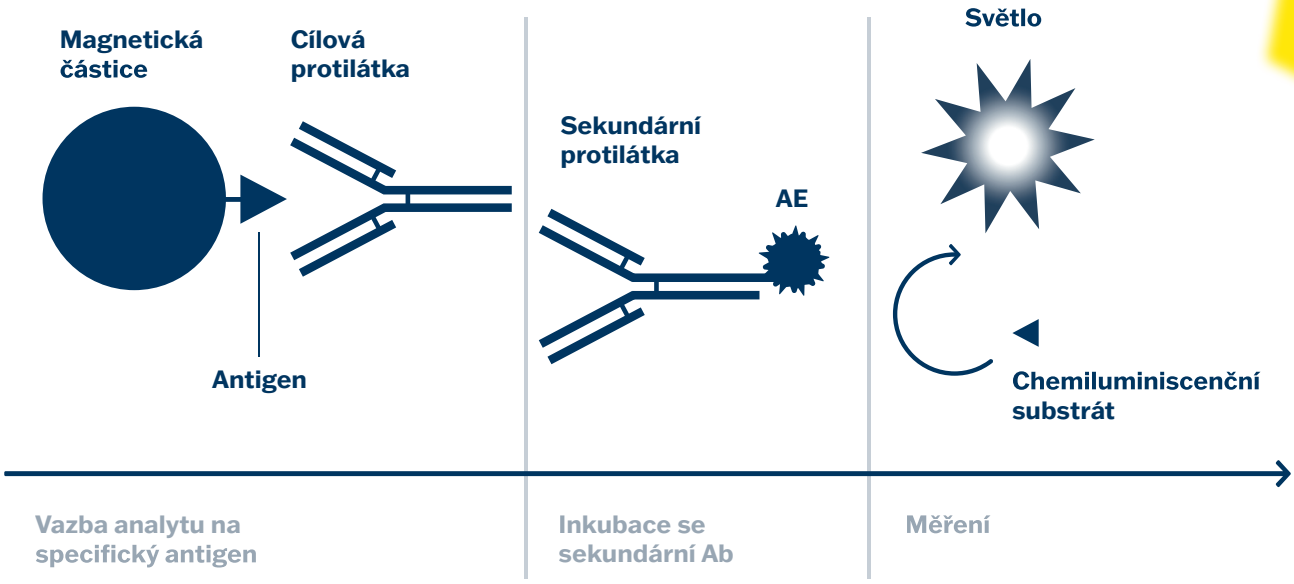
RBD IgA



● >200 U/ml ● 22–200 U/ml ● <22 U/ml

Princip CLIA metody

CLIA je plně automatizovaná, velmi rychlá, specifická a citlivá metoda. Kombinuje využití magnetických částic pro separaci imunokomplexu antigenu a protilátky s flash chemiluminiscencí pro citlivou detekci. Použití suspenze magnetických částic usnadňuje automatizaci, výrazně zkracuje reakční časy a zlepšuje specifitu stanovení. Flash chemiluminiscence akridinium esteru poskytuje intenzivní světelný signál i při velmi nízkých koncentracích, jeho intenzita se měří v relativních jednotkách světla (RLU). CLIA kity jsou určeny pro automatickou platformu KleeYa®.



CLIA kity

Diagnostické CLIA kity jsou určeny pro měření hladiny anti-SARS-CoV-2 protilátek v pacientském séru nebo plasmě na analyzátoru KleeYa®. Výsledky jsou uváděny v U/ml.

Sady kontrolních sér

Kontrolní séra jsou určena k ověření správnosti výsledků dosažených při analýzách soupravami CLIA.

Uživatelský komfort

- Plně automatická metoda
- Kity obsahují všechny reagencie, vč. kalibrátorů
- Reagenční kazety s roztoky v pracovním ředění
- Kontrolní séra dostupná v samostatném setu
- Výsledky v U/ml – odpovídají jednotkám BAU/ml (CLIA COVID-19 RBD IgG)

Výhody

- Vysoká diagnostická citlivost a specifita
- Nízká spotřeba vzorků a reagencií
- Krátká doba testu (30 min)
- Široký dynamický rozsah
- Reagencie jsou označeny RFID tagy, kromě jejich identifikace se také zapisuje spotřeba reagencie a počet dostupných testů
- Napojení na LIS
- Nadstandardní zákaznická podpora
- Možnost komplexní diagnostiky díky dostupnosti specifických testů ve všech protilátkových třídách

FOLLOW US

Objednací údaje

CLIA kity

Diagnostické kity jsou určeny pro měření hladiny anti-SARS-CoV-2 protilátek v pacientském séru nebo plasmě na analyzátoru KleeYa®.

Kit	Katalogové číslo	Počet testů
CLIA COVID-19 NP IgA	CL-CoNA100	100
CLIA COVID-19 NP IgG	CL-CoNG100	100
CLIA COVID-19 NP IgM	CL-CoNM100	100
CLIA COVID-19 RBD IgA	CL-CoRA100	100
CLIA COVID-19 RBD IgG	CL-CoRG100	100
CLIA COVID-19 RBD IgM	CL-CoRM100	100

Sady kontrolních sér

Každá sada obsahuje dvě lahvičky pozitivní a dvě lahvičky negativní kontroly s deklarovaným rozmezím příslušných protilátek. Jsou určeny k ověření správnosti výsledků dosažených při analýzách soupravami CLIA.

Kontrolní sada	Katalogové číslo	Počet testů
Control set CLIA COVID-19 NP IgA	CL-CoNACON	2 x 20
Control set CLIA COVID-19 NP IgG	CL-CoNGCON	2 x 20
Control set CLIA COVID-19 NP IgM	CL-CoNMCON	2 x 20
Control set CLIA COVID-19 RBD IgA	CL-CoRACON	2 x 20
Control set CLIA COVID-19 RBD IgG	CL-CoRGCON	2 x 20
Control set CLIA COVID-19 RBD IgM	CL-CoRMCON	2 x 20

Kontaktujte nás

clia@biovendor.group

nebo navštivte náš web

clia.biovendor.group

BioVendor Group CLIA

CZIP0101

BIOVENDOR.GROUP