

## 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 kýchání, 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

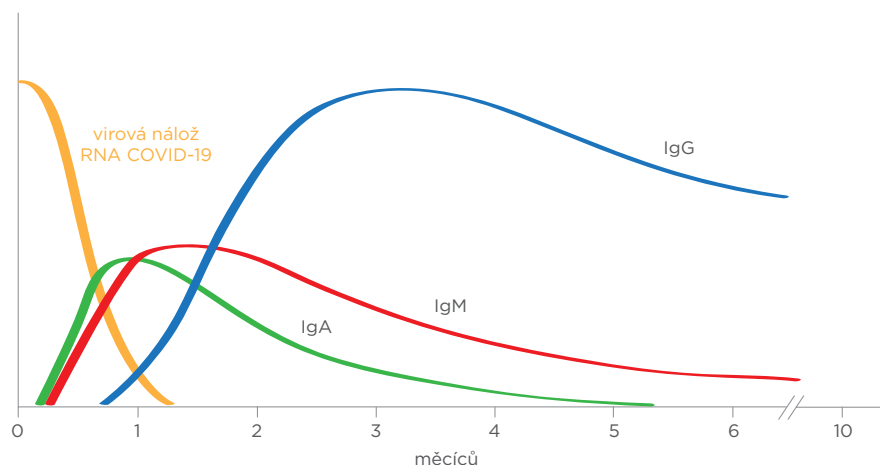
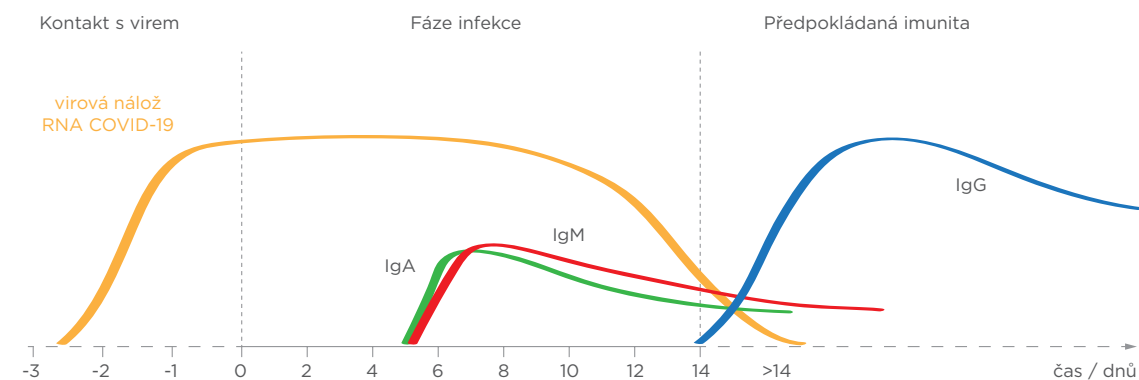
Diagnostika onemocnění je založena na klinickém obrazu, epidemiologické anamnéze a laboratorních testech.

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 studiích a dále jejich negativní výsledek umožňuje ukončení karantény. Vývoj protilátek a jejich přetrvávání po přirozené infekci je předmětem dalšího výzkumu.

## PROTILÁTKOVÁ ODPOVĚĎ

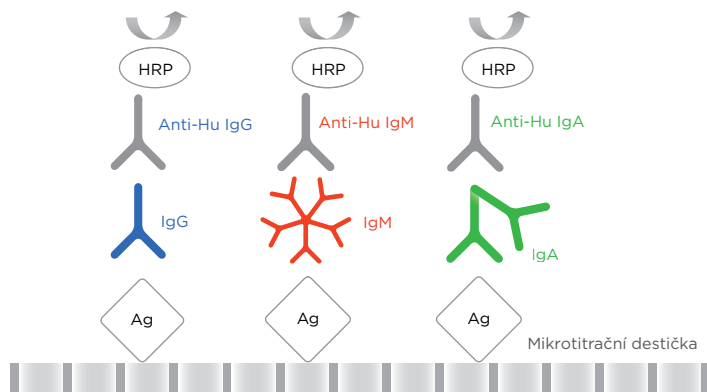


# ELISA

## 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 30 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), podjednotka proteinu Spike S1

## POUŽITÍ SOUPRAV

- ▶ Diagnostika onemocnění (doplňkové vyšetření)
- ▶ Negativní výsledek umožňuje ukončení karantény
- ▶ Prevalenční studie

## UŽIVATELSKÝ KOMFORT

- ▶ Komponenty v pracovním ředění
- ▶ Barevně odlišené reagensie
- ▶ Zaměnitelnost komponent
- ▶ Barevně značené stripky s odlamovacími jamkami
- ▶ CUT-OFF kontrola a kalibrátory (IgG)
- ▶ Semikvantitativní či kvantitativní (IgG) hodnocení výsledků (Index pozitivity-IP, IgG U/ml)

## 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

ELISA	Diagnostická citlivost	Diagnostická specifita
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 %

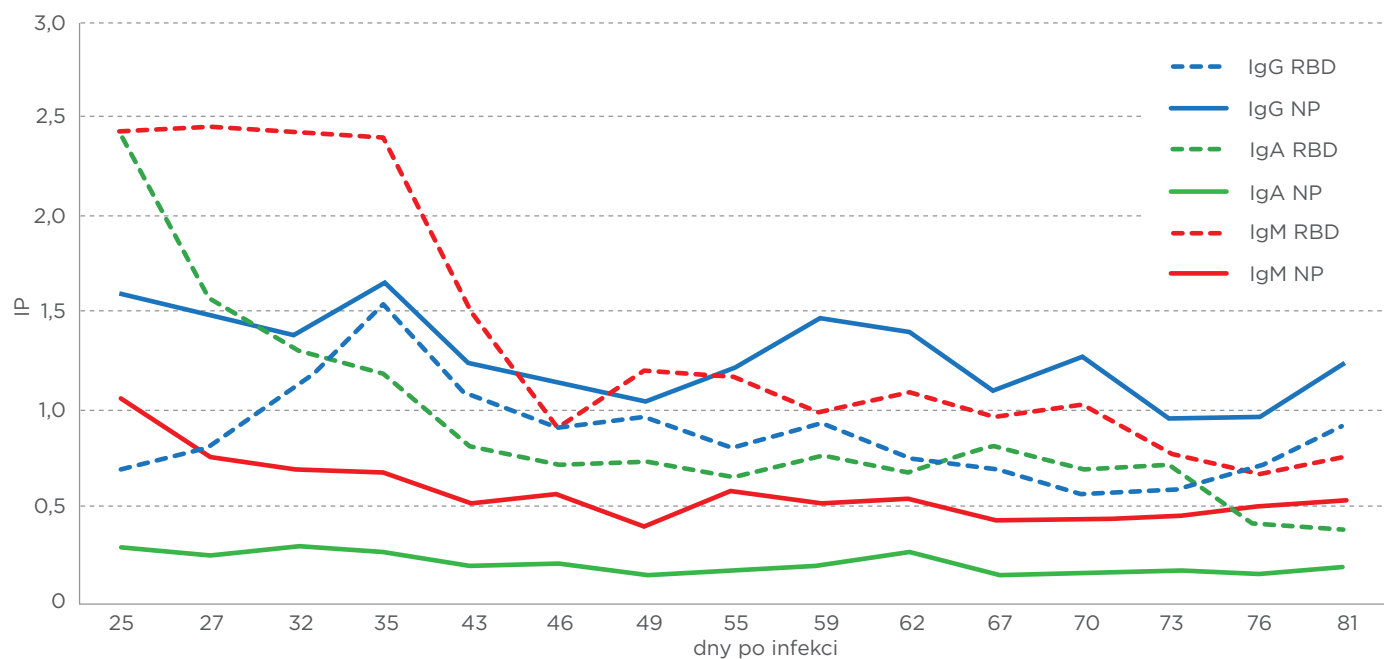
## PŘEHLED REAKTIVITY ELISA SOUPRAV TESTLINE NA DEFINOVANÉM VZORKU

Žena, 27 let,  
pozitivní PCR

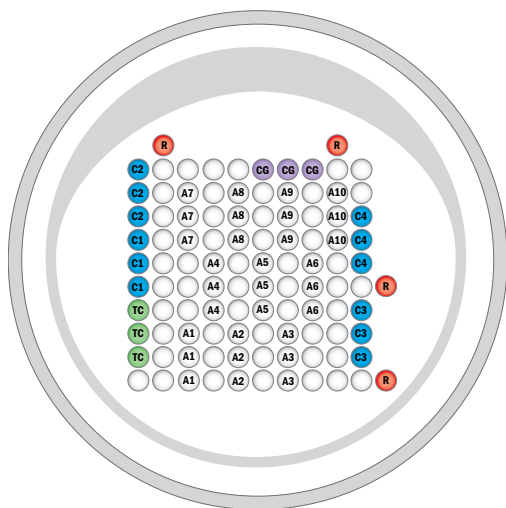
Den po infekci	EIA COVID-19 RBD			EIA COVID-19 NP		
	IgA	IgG	IgM	IgA	IgG	IgM
25	<b>2,40</b>	0,69	<b>2,42</b>	0,29	<b>1,58</b>	1,04
27	<b>1,58</b>	0,79	<b>2,45</b>	0,25	<b>1,48</b>	0,75
32	<b>1,31</b>	<b>1,10</b>	<b>2,43</b>	0,28	<b>1,38</b>	0,69
35	<b>1,16</b>	<b>1,55</b>	<b>2,40</b>	0,25	<b>1,65</b>	0,66
43	0,82	1,07	<b>1,49</b>	0,18	<b>1,23</b>	0,51
46	0,71	0,90	0,90	0,19	<b>1,14</b>	0,55
49	0,72	0,94	<b>1,19</b>	0,15	1,05	0,39
55	0,66	0,80	<b>1,16</b>	0,19	<b>1,20</b>	0,56
59	0,75	0,93	0,99	0,19	<b>1,45</b>	0,52
62	0,67	0,74	1,08	0,25	<b>1,39</b>	0,52
67	0,81	0,68	0,96	0,13	1,08	0,43
70	0,69	0,58	1,02	0,15	<b>1,26</b>	0,43
73	0,71	0,57	0,75	0,16	0,95	0,45
76	0,40	0,70	0,66	0,15	0,96	0,50
81	0,36	0,91	0,74	0,18	<b>1,22</b>	0,53

■ pozitivní   
 ■ cut off   
 ■ negativní

## DYNAMIKA TVORBY JEDNOTLIVÝCH PROTILÁTEK



## ROZLOŽENÍ ANTIGENŮ A KONTROLNÍCH SPOTŮ



### Popis antigenů

A1 - Nucleocapsid NP	A6 - PLPro protein
A2 - RBD	A7 - MERS-CoV
A3 - Spike S2	A8 - SARS - CoV
A4 - Envelope protein (E)	A9 - HCoV 229E Np
A5 - ACE2	A10 - 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	Význam, funkce
NP	Nucleocapsid NP	Silný imunodominantní antigen koronaviřů, který obsahuje diagnosticky významné epitopy pro diagnostiku SARS-CoV-2 citlivá detekce anti-SARS-CoV-2 IgG protilátek
RBD	Receptor-binding domain S1 podjednotky spike (S) proteinu SARS-CoV-2	Anti-RBD SARS-CoV-2 protilátky jsou vysoce subtypově specifické a mají protektivní charakter Přítomnost anti-RBD protilátek významně koreluje s tvorbou neutralizujících protilátek IgA - pro sledování imunitní odpovědi po pozitivní PCR reakci; indikátor počátku imunitní reakce IgM, IgG - detekce protilátek od 2 do 4 týdnu po infekci
Spike S2	S2 podjednotka spike proteinu SARS-CoV-2	hraje významnou roli při fúzi viru s buněčnou membránou
Envelope protein (E)	nejmenší hlavní strukturální protein	důležitý pro různá stadia virové infekce a replikace, významná role v životním cyklu viru
ACE2	Angiotensin Converting Enzyme (transmembránový glykoprotein)	klíčová komponenta systému renin-angiotensin exprimován v cévních endotelových buňkách v srdci, ledvinách, ale i varlatech, játrech, střevech, plicích a také mozku účastní se regulace kardiovaskulárních a renálních funkcí
PLpro	Papain-like proteáza	jeden ze základních proteinů SARS-CoV-2, zásadní pro replikaci viru; deubikvitinační aktivita nezbytný pro proteolýzu virového polyproteinu
MERS-CoV S1	Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus S1 protein	vyloučení zkřížených reaktivit s jinými endemickými koronaviry
SARS-CoV Np	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Nucleocapsid protein	vyloučení zkřížených reaktivit s jinými endemickými koronaviry
HCoV 229E Np	Human coronavirus 229E Nucleocapsid protein	vyloučení zkřížených reaktivit s jinými endemickými koronaviry
HCoV NL63 Np	Human coronavirus NL63 Nucleocapsid protein	vyloučení zkřížených reaktivit s jinými endemickými koronaviry

## PRACOVNÍ POSTUP

Krok	Kroky testu
1	➊ Dávkování Univerzálního roztoku 150 µl
2	➋ Smáčení 10 min při laboratorní teplotě
3	➌ Odsátí
4	➍ Ředění vzorků • séra/plazmy 1:51 (10 µl + 500 µl)
5	➎ Dávkování kontrol a ředěných vzorků 100 µl
6	➏ Inkubace 30 min při laboratorní teplotě
7	➐ Odsátí a promytí v Univerzálním roztoku 3 krát 150 µl po 5 min
8	➑ Dávkování Konjugátu 100 µl
9	➒ Inkubace 30 min při laboratorní teplotě
10	➓ 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
- ▶ Hodnocení jednotlivých antigenů a jejich asociace s chorobami
- ▶ Vzdálené odstraňování problémů

### 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

Microblot-Array	Diagnostická citlivost	Diagnostická specifita
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		
		< 14	15-25	> 25
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 %
<b>MBA COVID-19</b>		<b>69,57 %</b>	<b>84,62 %</b>	<b>66,67 %</b>

### MBA COVID-19 IgG (n=208)

		Dny od počátečních symptomů		
		< 14	15-25	> 25
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 %
<b>MBA COVID-19</b>		<b>71,43 %</b>	<b>98,28 %</b>	<b>98,28 %</b>

### MBA COVID-19 IgM (n=188)

		Dny od počátečních symptomů		
		< 14	15-25	> 25
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 %
<b>MBA COVID-19</b>		<b>50,00 %</b>	<b>75,00 %</b>	<b>51,30 %</b>

## SPECIFITA NA PANELECH S MOŽNOU ZKŘÍŽENOU REAKTIVITOU

### MBA COVID-19 IgA

		Panel		
		Krevní dárce (n=593)	Potenciálně zkřížené reaktivity (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%
<b>MBA COVID-19</b>		<b>99,16%</b>	<b>97,45%</b>	<b>98,21%</b>

### MBA COVID-19 IgG

		Panel		
		krevní dárce (n=600)	Potenciálně zkřížené reaktivity (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 %
<b>MBA COVID-19</b>		<b>99,33 %</b>	<b>96,46 %</b>	<b>98,39%</b>

### MBA COVID-19 IgM

		Panel		
		krevní dárce (n=598)	Potenciálně zkřížené reaktivity (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 %
<b>MBA COVID-19</b>		<b>99,33 %</b>	<b>97,97 %</b>	<b>100,00 %</b>



## 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 (PŘIPRAVUJEME)

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

## KONTAKT

### TestLine Clinical Diagnostics s.r.o.

Křižíkova 68, 612 00 Brno, Česká republika

Tel.: +420 549 121 205 (209, 238)

Fax: +420 541 243 390

E-mail: [trade@testlinecd.com](mailto:trade@testlinecd.com)

[www.testlinecd.cz](http://www.testlinecd.cz)



TestLine Clinical Diagnostics s.r.o. je držitelem certifikátů ISO 9001:2008 a ISO 13485:2003

