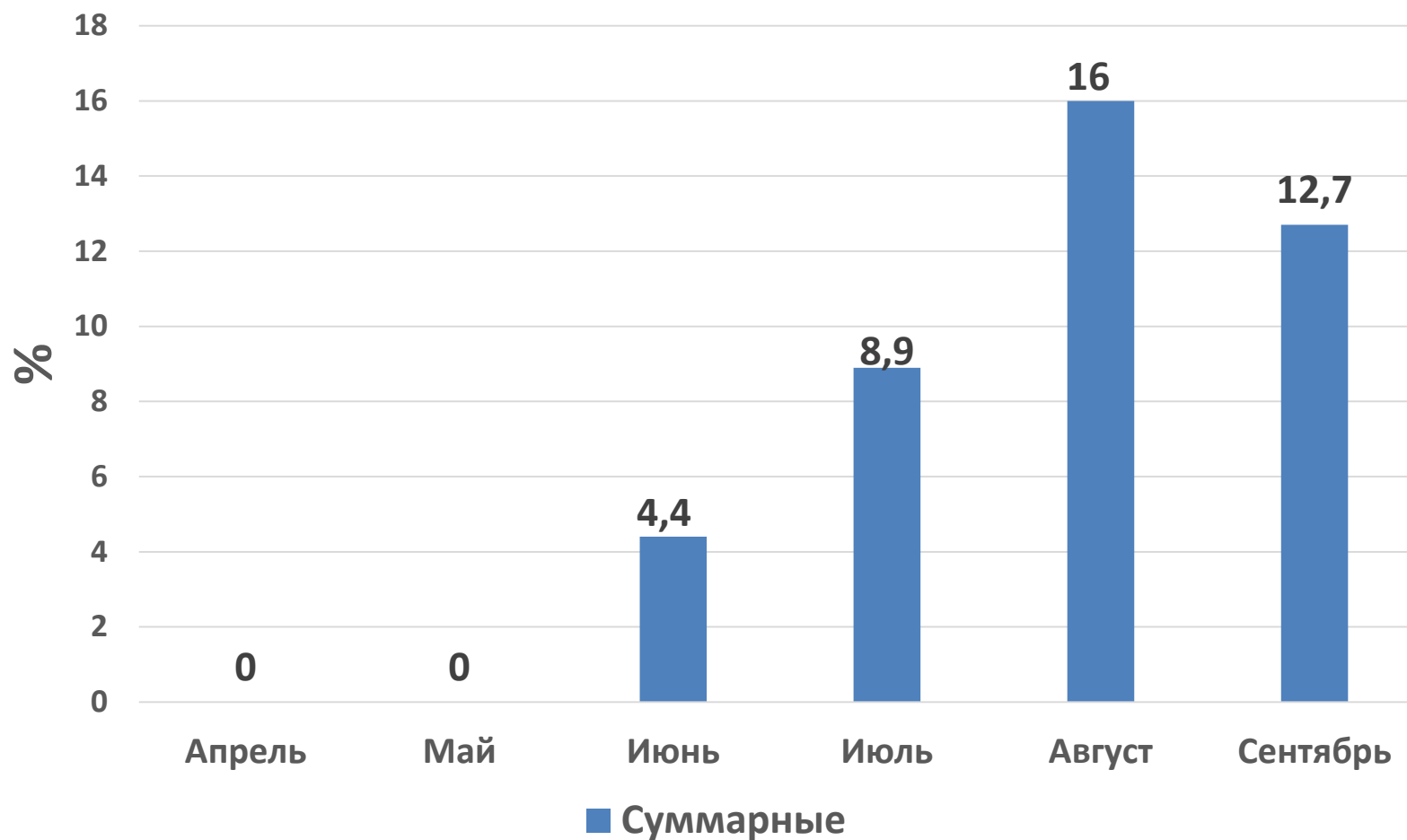


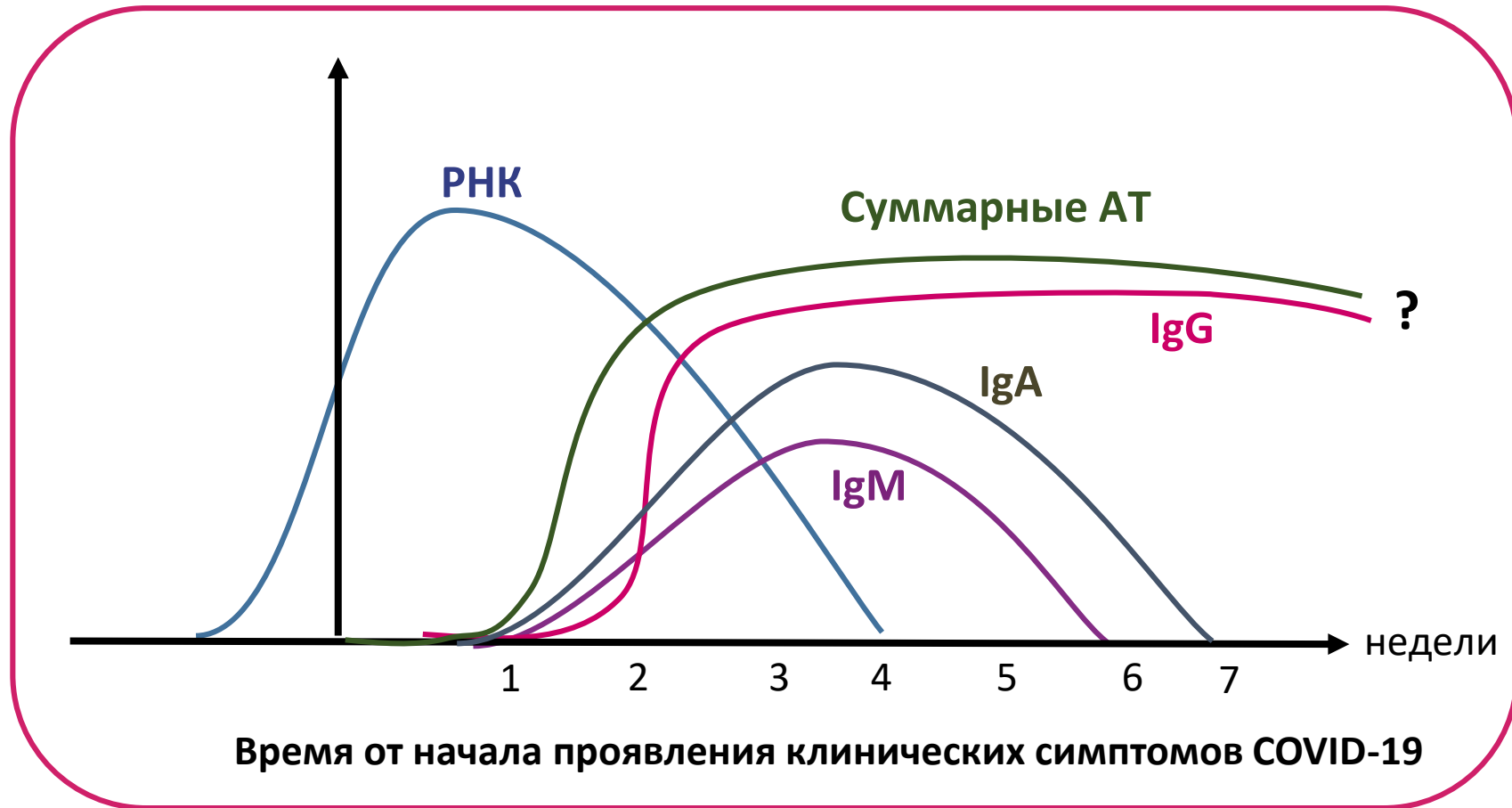
Актуальные аспекты применения
серологических
исследований в комплексной
диагностике COVID-19



Специфические антитела к SARS-CoV-2 у доноров г. Новосибирска в апреле-сентябре 2020 г.



Сероконверсия при COVID-19



Особенности сероконверсии при COVID-19

- Среднее время начала выявления антител

IgM – 5-17 дней IgA – 5-22 дней IgG – 6-14 дней

- Коэффициент сероконверсии (доля лиц с антителами) варьирует в зависимости от исследования и стадии заболевания:

Дни от начала проявления симптомов	IgG	IgM
1-7	4-57%	11-71%
8-14	91-100%	56-97%

Особенности сероконверсии при COVID-19

Результаты анализа 118 парных образцов сыворотки крови от 59 пациентов, взятых для демонстрации сероконверсии специфических антител в динамике: в день взятия мазка из рото-, носоглотки пациентов с симптомами COVID-19 для проведения анализа с целью выявления коронавируса SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР и спустя еще **7-20** дней от тех же пациентов.

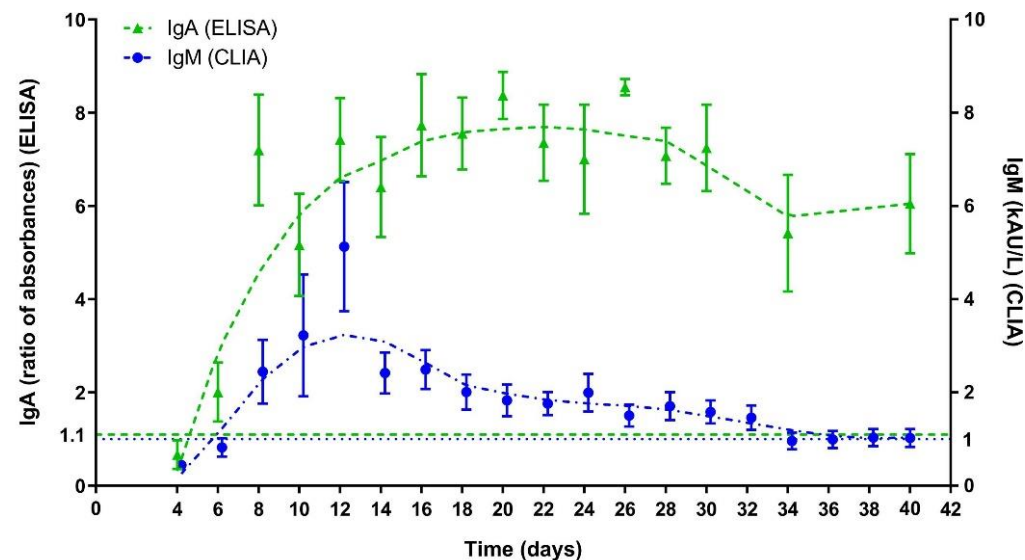
Набор реагентов	Аналит (специфические антитела к SARS-CoV-2)	Результат анализа первого образца (количество образцов, шт.)			Результат анализа второго образца (количество образцов, шт.)		
		Положи- тельный	Отрица- тельный	Погра- ничный	Положи- тельный	Отрица- тельный	Погра- ничный
«SARS-CoV-2-АТ суммарные- ИФА-БЕСТ»*	АТ суммарные	25	29	5	59	0	0
«SARS-CoV-2- IgM- ИФА-БЕСТ»	IgM	7	49	3	56	2	1
«SARS-CoV-2-IgG- ИФА-БЕСТ»	IgG	4	53	2	59	0	0
SARS-CoV-2-IgA- ИФА-БЕСТ»*	IgA	12	44	3	59	0	0
Всего		59			59		

*Наборы проходят государственную регистрацию



Роль IgA в диагностике SARS-CoV-2

- В организме человека IgA существует в двух формах – сывороточной и секреторной
- Секреторный IgA обнаруживается в слизистых оболочках и защищает их от инфекционных агентов
- 80-90 % циркулирующих в крови IgA состоят из сывороточной мономерной формы данного класса антител
- Уровень специфических к SARS-CoV-2 антител IgA выше, чем уровень IgM

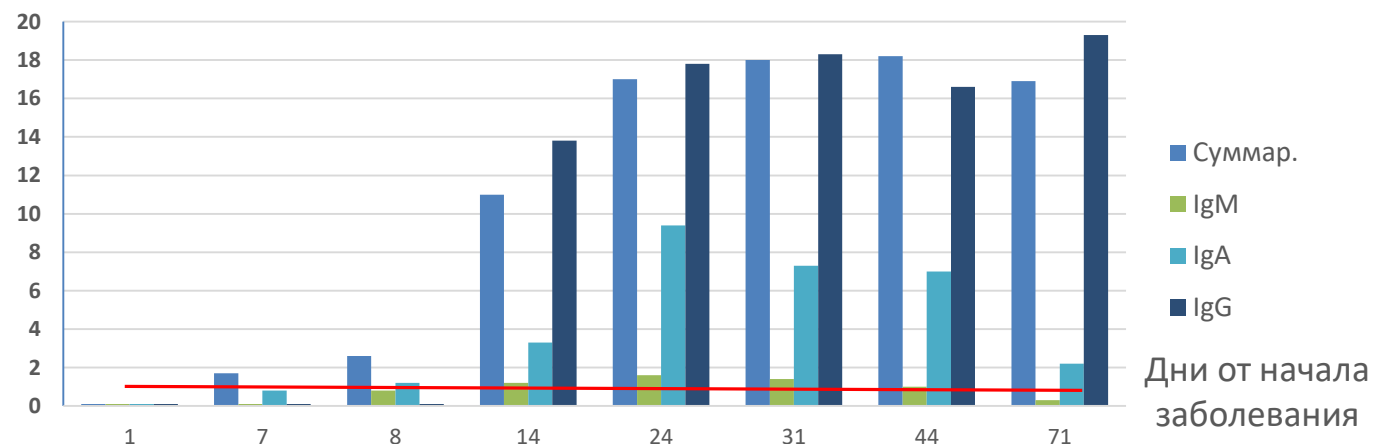


Пример лабораторных исследований

Пациент №1

15 лет, легкая форма ОРВИ

Дата заболевания	Дата взятия образца	РНК (ПЦР)	Сумм. АТ	IgM	IgA	IgG
			КП*	КП*	КП*	КП*
22.06.20	23.06.20	+	0,1	0,1	0,1	0,1
	29.06.20	+	1,7	0,1	0,8	0,1
	30.06.20	+	2,6	0,8	1,2	0,1
	06.07.20	+	11,0	1,2	3,3	13,8
	16.07.20	+	17,9	1,6	9,4	17,8
	23.07.20	-	18,0	1,4	7,3	18,3
	04.08.20	-	18,2	1,0	7,0	16,6
	01.09.20		16,9	-	2,2	19,3

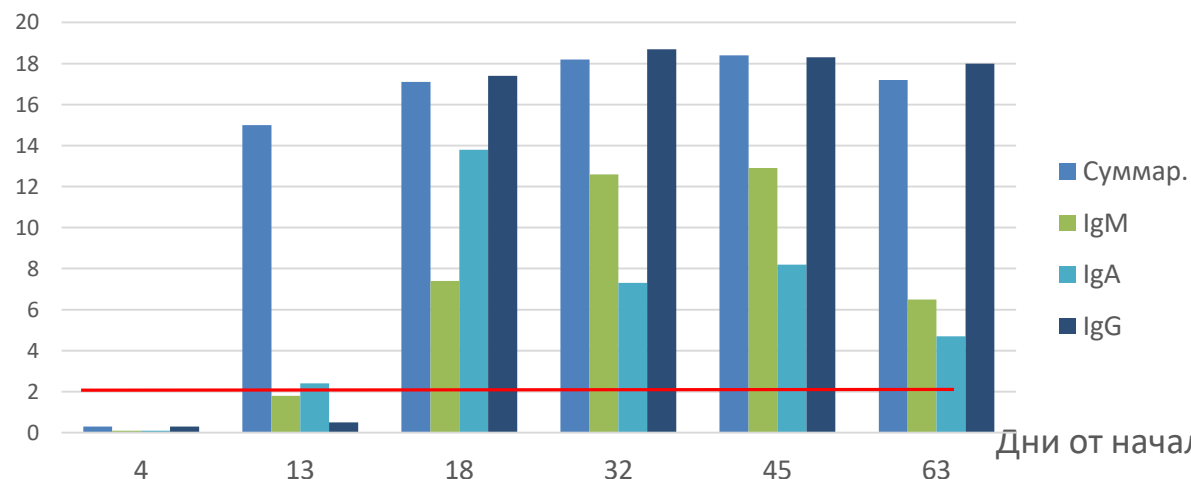


Примеры лабораторных исследований

Пациент №2

47 лет, средней степени тяжести ОРВИ,
внебольничная левосторонняя пневмония

Дата заболева ния	Дата взятия образца	РНК (ПЦР)	Сумм. АТ	IgM	IgA	IgG
			КП*	КП*	КП*	КП*
19.06.20	23.06.20	+	0,3	0,1	0,1	0,1
	02.07.20		15,0	1,8	2,4	0,5
	07.07.20		17,1	7,4	13,8	17,4
	21.07.20		18,2	12,6	7,3	18,7
	03.08.20		18,4	12,9	8,2	18,3
	21.08.20		17,2	6,5	4,7	18,0



Особенности сероконверсии при COVID-19

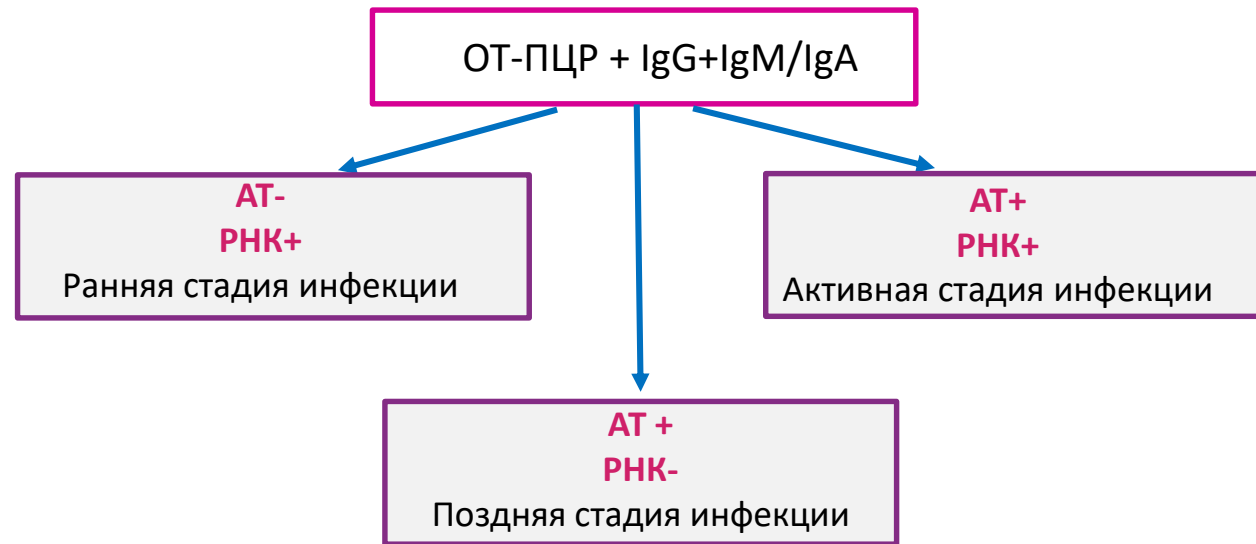
Динамика развития иммунного ответа может иметь индивидуальные особенности

- IgG могут выявляться раньше IgM
- IgM могут не выявляться на всем протяжении заболевания
- Ответ IgG может быть поздним или очень низким
- IgA чаще определяются в сыворотке крови раньше и дольше, чем IgM, а их уровень выше
- На ранних сроках заболевания наиболее эффективно определение суммарных антител методом «сэндвич»-ИФА

Для наиболее эффективной диагностики COVID-19 важен комплексный подход, включающий определение антител классов IgG, IgM и IgA



Подозрение на COVID-19



В случае подозрения на COVID-19, при клинических проявлениях или в случае установленного контакта, наилучшие результаты дает **комплексное лабораторное исследование, включающее ОТ-ПЦР и серологический тест**

ОТ-ПЦР при подозрении на COVID-19 (симптомы, контакт)

Диагностическая (в меньшей степени аналитическая) чувствительность варьирует в зависимости от типа биоматериала, стадии и характера протекания заболевания и техники взятия пробы

Проба	Чувствительность 1я неделя	Чувствительность 2я неделя
Носоглоточный мазок	63-73%	↓
Ротоглоточный мазок	60%	↓
Мокрота		72-89%
БАЛ		93-100%

Вирусная нагрузка в образцах из верхнего респираторного тракта максимальна за день до и несколько дней после развития симптомов. В образцах из нижнего респираторного тракта диагностическая чувствительность результата ПЦР выше и он остается положительным дольше, но пик нагрузки наступает позже



COVID-19

Семья из 4 человек

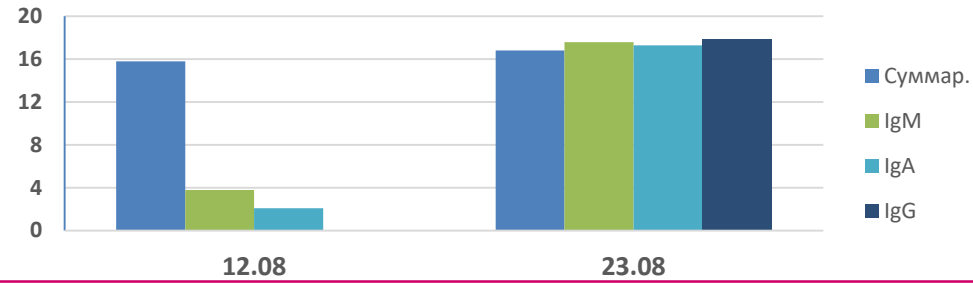
Пациент	Период заболевания	Симптомы
С., 42 г.	04.08 - 20.08	Темп. 38°C, потеря обоняния, одышка, слабость, КТ-16% пораж. легких
Л., 7 л.	09.08 - 13.08	Темп. 39° С – 3 дня, боль в горле. Назначен ПЦР на 20.08 (контакт).
Г., 6 л.	13.08 - 15.08	Темп. 38°C – 2 дня, боль в горле. Назначен ПЦР на 20.08 (контакт).
И., 38 л.	17.08-03.09	Темп. 37-39°C, боль в горле, заложенность носа, потеря обоняния, одышка, сухой кашель. Назначен ПЦР на 20.08 (контакт).

ДИАГНОЗ

COVID-19

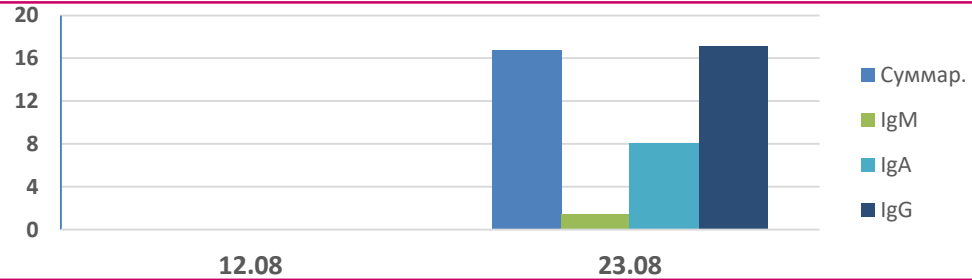
С

ПЦР
11.08. +
20.08. –
21.08. –



Л

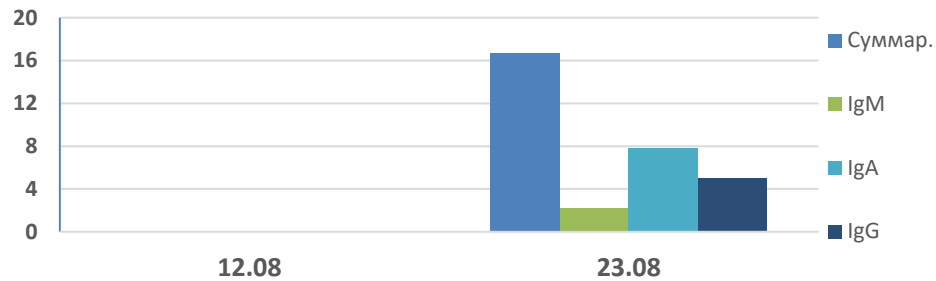
ПЦР
20.08. –



ОРВИ

Г

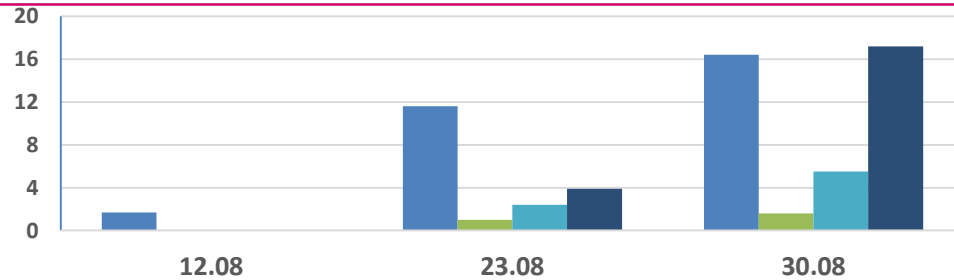
ПЦР
20.08. –



ОРВИ

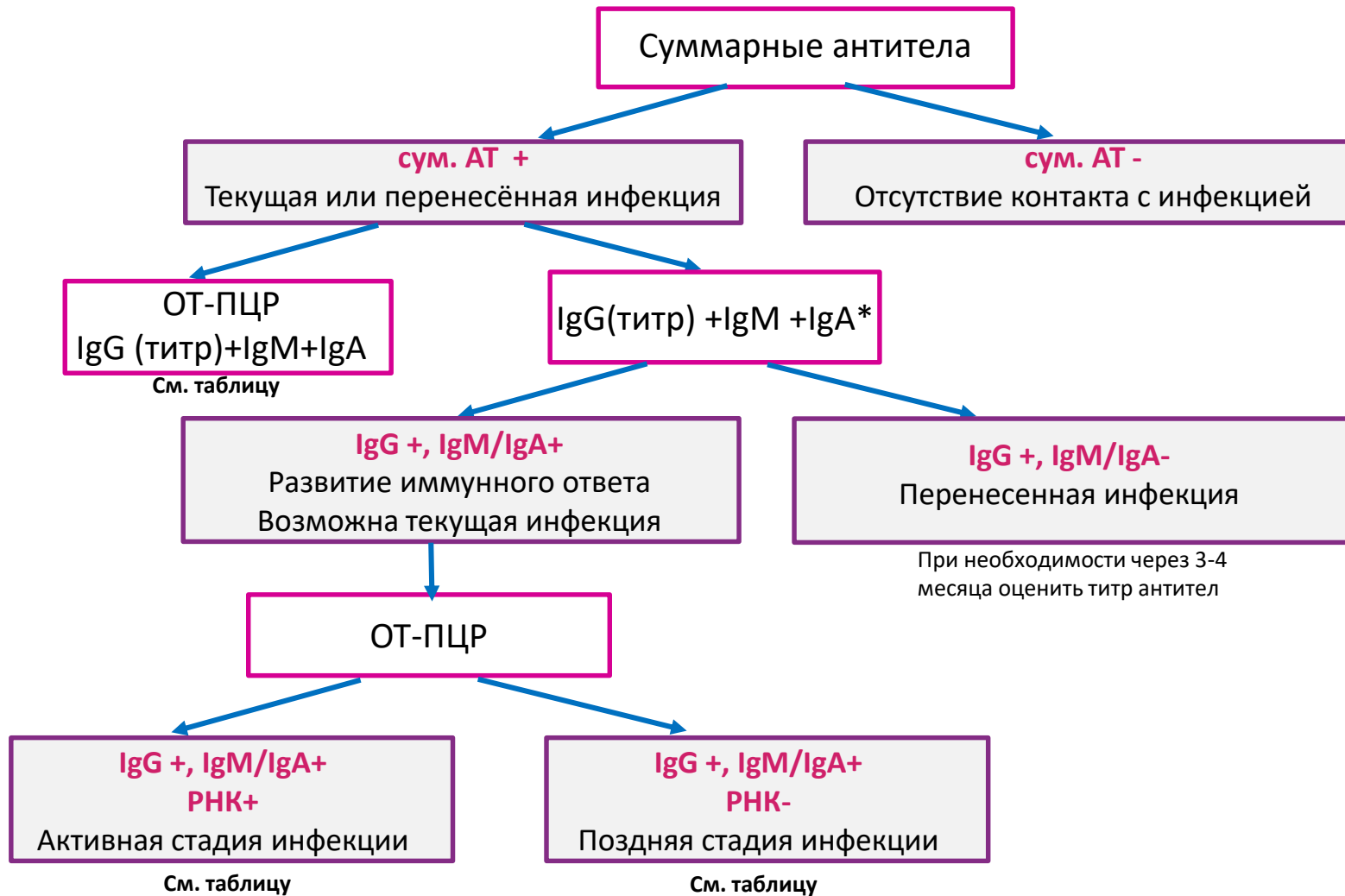
И

ПЦР
20.08. –



ОРВИ

Скрининговые исследования, тестирование групп риска



Интерпретация результатов комплексного лабораторного исследования

РНК	IgM/IgA	IgG	Интерпретация	
-	-	-	1. Отсутствие инфекции 2. Инкубационный период	2. Повторное тестирование на РНК через 3-5 дней
+	-	-	Серонегативное окно	Повторное исследование на IgG/IgM/IgA через 5-7 дней
+	+	-	Активная фаза инфекции, возможен слабый ответ IgG	Повторное исследование на IgG через 5-7 дней
+	+	+	Активная фаза инфекции	Наблюдение в динамике РНК (до двух отрицательных результатов) и IgG (через 3-4 месяца после выздоровления)
+	-	+	Активная фаза инфекции, возможен слабый ответ IgM	Наблюдение в динамике РНК и IgG (парные сыворотки с определением титра)
-	+	+	Поздняя стадия заболевания. Ложноотрицательный результат ОТ-ПЦР (РНК не выявляется в верхних дыхательных путях)	Повторное тестирование на IgM, IgA и IgG через 1-2 недели, Титр IgG
-	+	-	Ложноположительный результат IgM (особенно при низких значениях КП), если IgA отрицательный Ложноотрицательный результат ОТ-ПЦР	Повторное тестирование на IgM, IgA и IgG через 5-7 дней: 1. КП IgM остается низким, IgA и IgG отрицательный – ложноположительный результат IgM 2. КП IgM повышается и IgG/IgA становится положительным - повторное тестирование на РНК
-	-	+	Выздоровление, перенесённая инфекция	При необходимости через 3-4 месяца оценить титр антител

Интерпретация результатов комплексного лабораторного исследования

РНК	IgM	IgG	Интерпретация	
-	+	-	Ложноположительный результат IgM (особенно при низких значениях КП), если IgA отрицательный Ложноотрицательный результат ОТ-ПЦР	Повторное тестирование на IgM, IgA и IgG через 5-7 дней: 1.КП IgM остается низким, IgA и IgG отрицательный – ложноположительный результат IgM 2. КП IgM повышается и IgG/IgA становится положительным - повторное тестирование на РНК

Пример

25.08.20

IgG -

IgM: ОПкрит = 0,251; ОП = 0,231; **КП=0,92**

03.09.20

IgG -

IgM: ОПкрит= 0,220; ОП = 0,243; **КП=1,1**

Пациент Онкодиспансера
Рак желудка



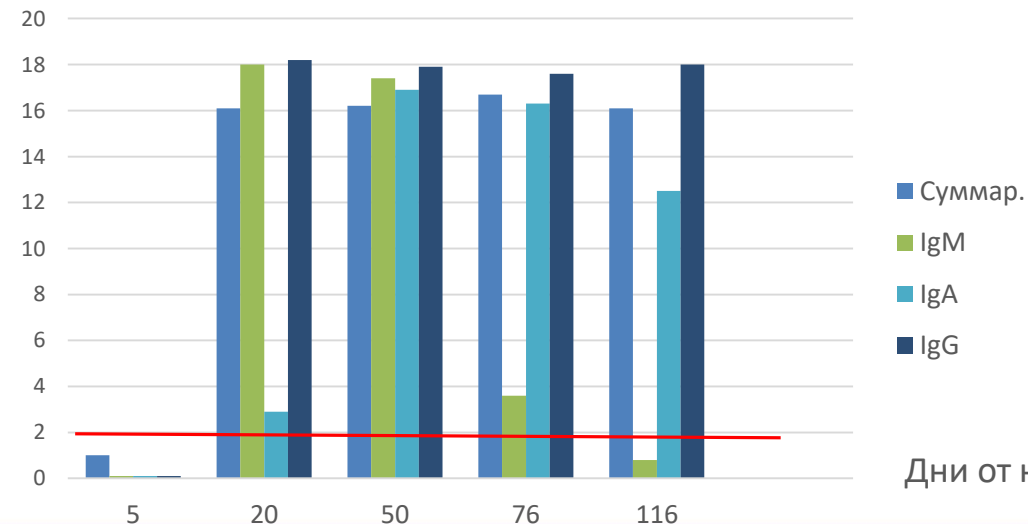
Примеры лабораторных исследований

Пациент №3

46 лет, средней степени тяжести,

внебольничная правосторонняя S9-S10 пневмония

Дата заболева ния	Дата взятия образца	РНК (ПЦР)	Сумм. АТ	IgM	IgA	IgG
			КП	КП	КП	КП
25.03.20	30.03.20	+	1,0	0,3	0,4	0,1
	15.04.20	-	16,1	18,0	2,9	18,2
	15.05.20		16,2	17,4	16,9	17,9
	10.06.20		16,7	3,6	16,3	17,6
	20.07.20		16,1	0,8	12,5	18,0



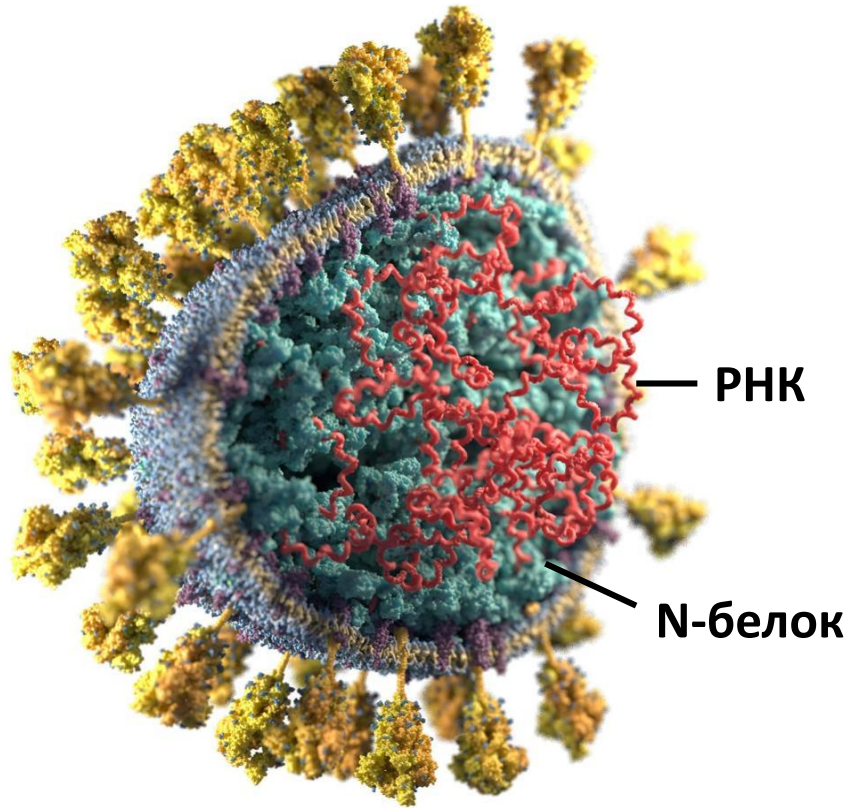
Дни от начала заболевания **БЕСТ**

Нуклеокапсидный белок

N-белок (ядерный)

Функции

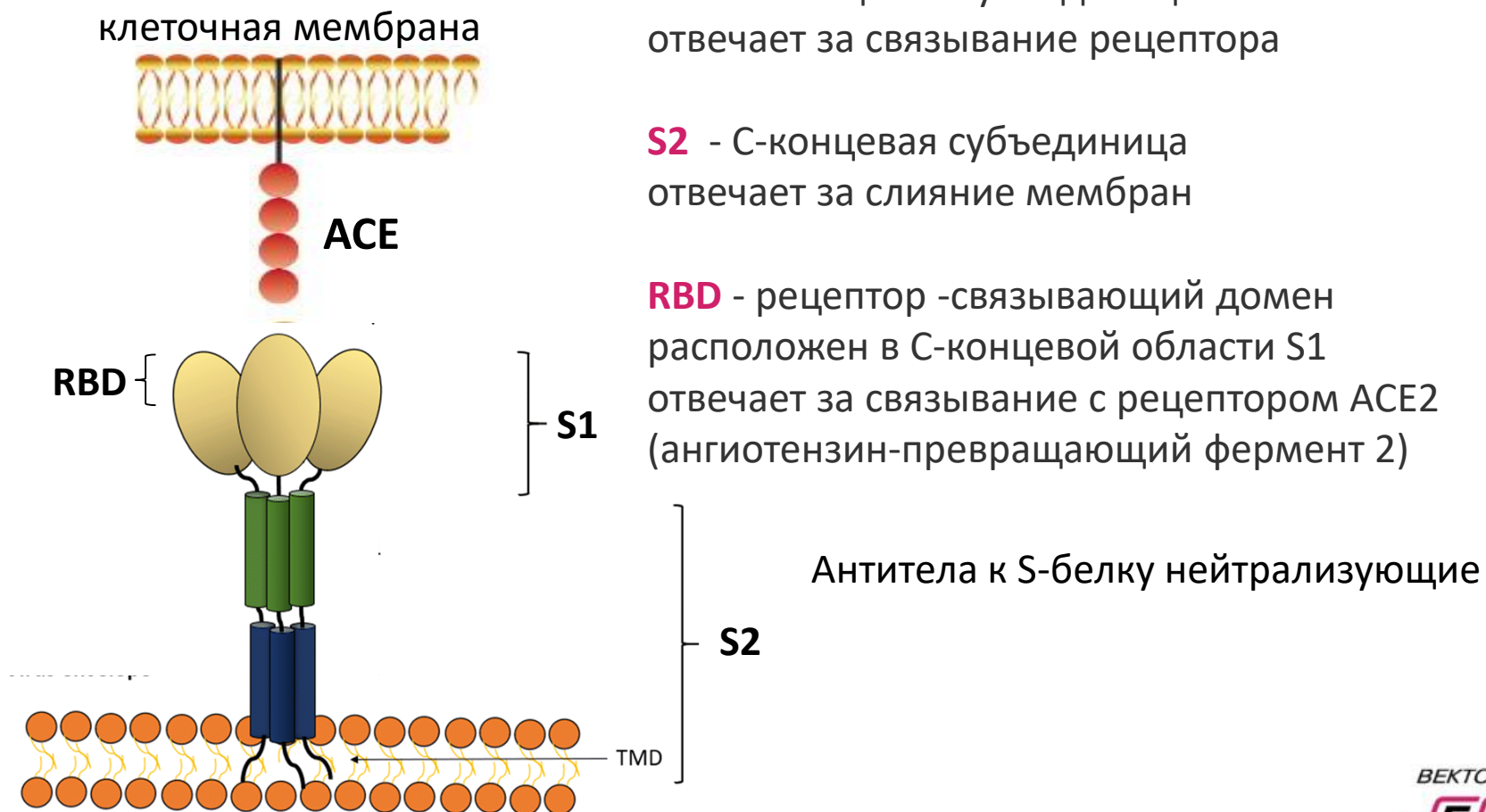
- Регуляция транскрипции
- Формирование спирального рибонуклеопротеина во время упаковки вирусной РНК
- Сборка вириона
- Моделирование сигнальных путей клетки-хозяина
- Антитела к N-белку не являются нейтрализующими
- Репрезентативный антиген для Т-клеточного ответа



Самый распространенный белок вируса

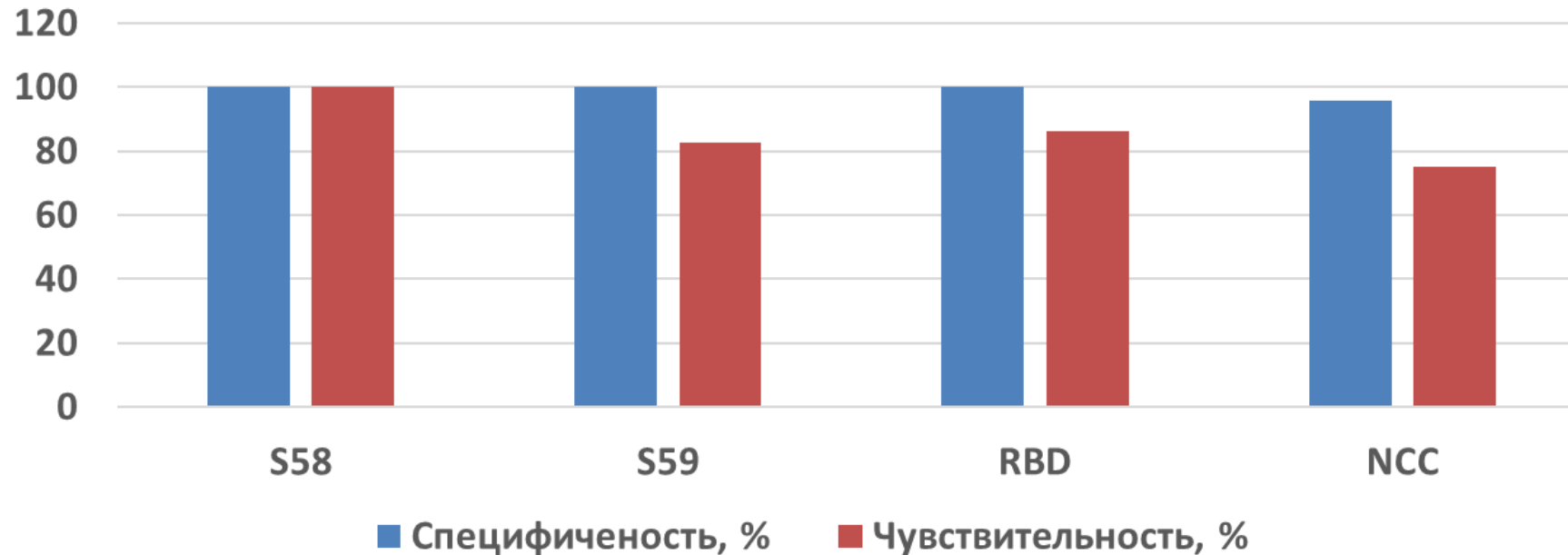
Spike-белок

S-белок расщепляется протеазой-хозяином на две субъединицы



Белки для иммуносорбента

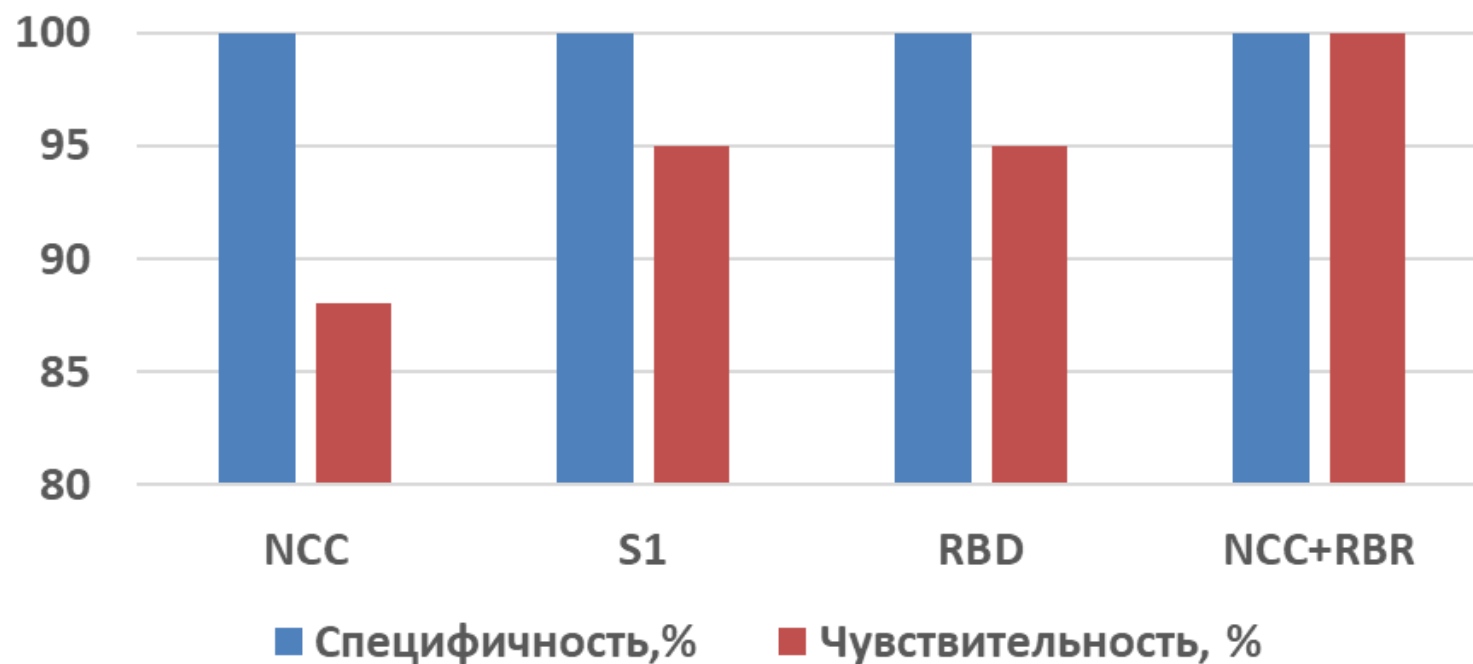
Специфичность и чувствительность наборов реагентов на различных белках, выявляющих SARS-CoV-2-IgG



- S58 – полноразмерный Spike
- S59 - белок S1
- RBD (рецептор-связывающий домен)
- NCC (нуклеокапсид)

Белки для конъюгата (IgM)

Специфичность и чувствительность
различных конъюгатов для SARS-CoV-2-IgM



IgM нарабатываются к разным белкам вырабатываются в разные стадии инфекции. Совместное применение этих белков приводит к более полному выявлению IgM к SARS-Cov-2-IgM

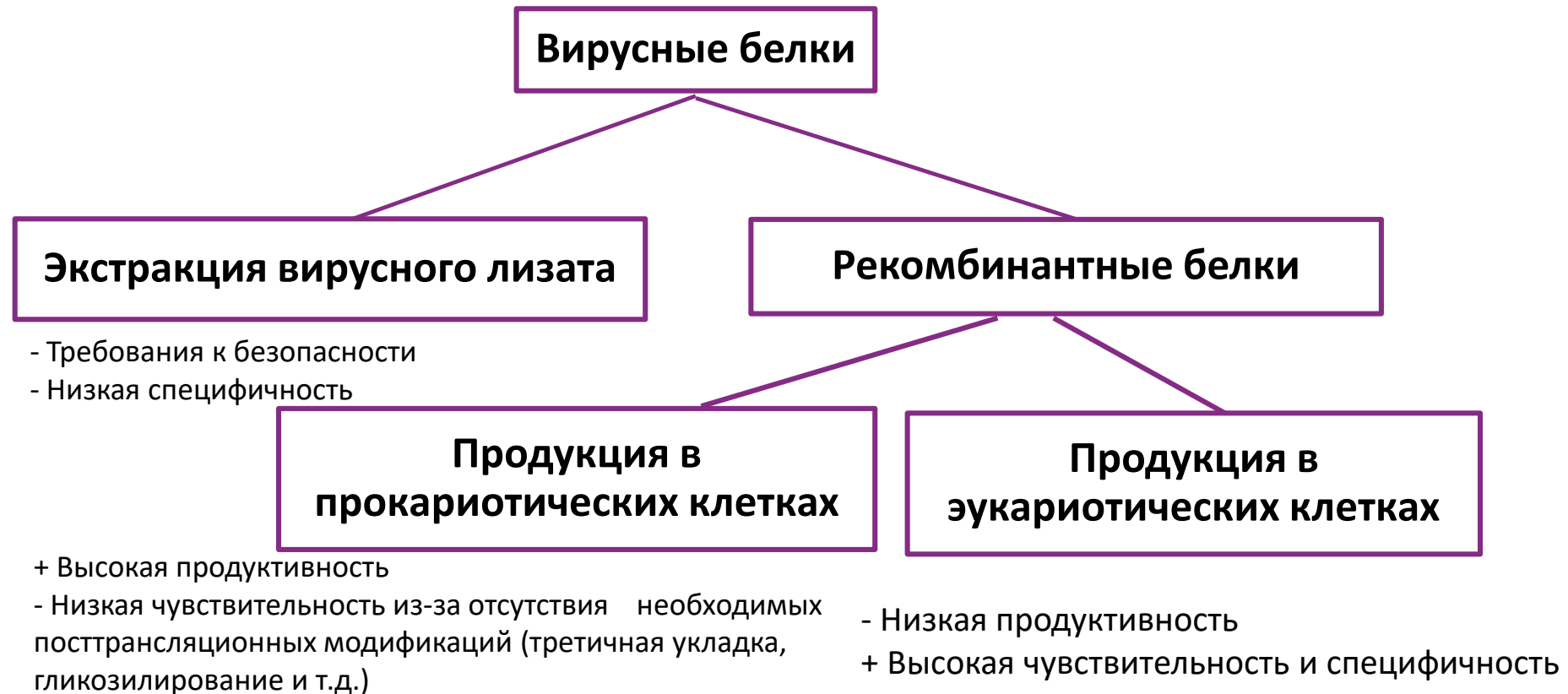
Белки SARS-CoV-2 в составе наборов для выявления антител

- N-белок наиболее консервативный, вероятность перекрестных реакций с антителами к другим коронавирусам выше, чем для S-белка

Вирусы	% а.к. идентичности		
	N	S1	RBD
SARS-коронавирус	89	63	75
MEPC-коронавирус	45	17	14
OC43	30	17	16
229E	22	10	10
NL63	23	9	9
HKU1	28	17	14

В наборах Вектор-Бест для выявления суммарных антител, IgG и IgA использован полноразмерный S-белок, в наборе для определения IgM – RBD и N-белок

Белки SARS-CoV-2 в составе наборов для выявления антител

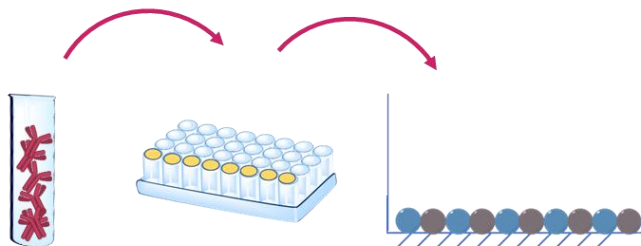


Во всех наборах для выявления антител к SARS-CoV-2 Вектор-Бест используются рекомбинантные белки, S-белок в эукариотической системе, N-белок – в E. coli

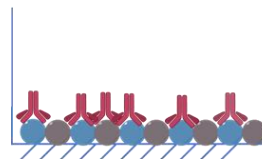


Схема проведения реакции определения IgG, IgA

I. Предварительное разведение образца (1:100)



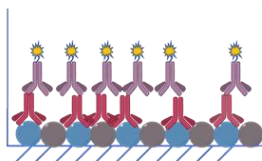
II. Инкубация 30 мин, 37°C, 700 об/мин



Отмывка
5х, 400мкл



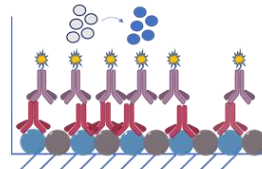
III. Инкубация 30 мин, 37°C, 700 об/мин



Конъюгат



IV. Инкубация 25 мин, 18-26°C



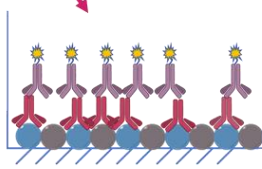
Стоп-реагент



V. Измерение ОП
450/620 нм



ТМБ
Отмывка
5х, 400мкл



IgG или IgA образца



Рекомбинантный белок SARS-CoV-2

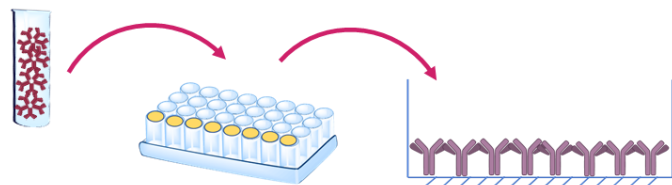


Конъюгат антитела к IgG или IgA человека с пероксидазой хрена

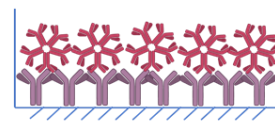
БЕКТОР
БЕСТ

Схема проведения реакции определения IgM методом ИФА («захват»)

I. Предварительное разведение образца (1:100)

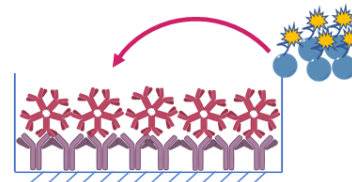


II. Инкубация 30 мин,
37°C, 700 об/мин

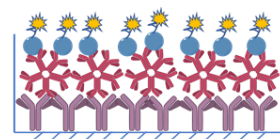


Отмывка
5х, 400мкл

Конъюгат

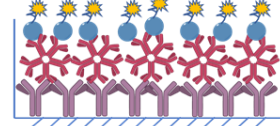


III. Инкубация 30 мин,
37°C, 700 об/мин

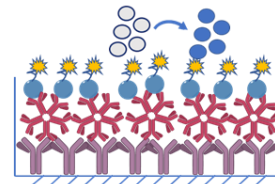


Отмывка
5х, 400мкл

ТМБ

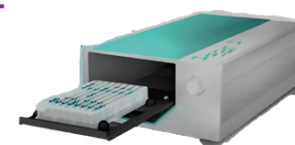


IV. Инкубация 25 мин,
18-26°C



Стоп-реагент

V. Измерение ОП
450/620 нм



БЕКТОР
БЕСТ



IgM образца



Антитела к IgM человека

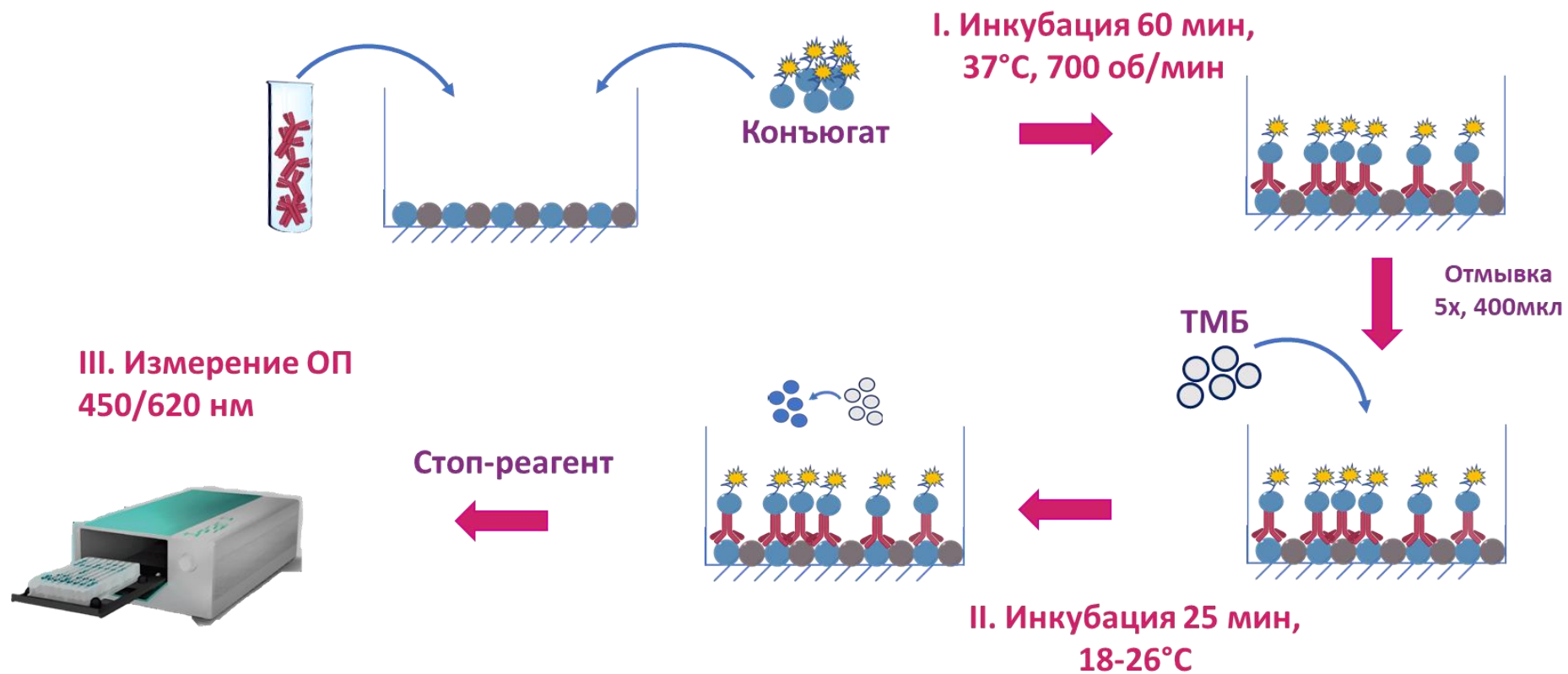


Конъюгат рекомбинантного белка
SARS-CoV-2 с пероксидазой хрена

Преимущества определения IgM методом «захвата»

- **Более высокая специфичность**, особенно для образцов, содержащих ревматоидный фактора класса M
- **Более высокая чувствительность**, так как на результат не влияет избыток специфических IgG
- Не требуется предварительного удаления IgG антител из образца

Схема проведения реакции определения суммарных антител методом ИФА («сэндвич»)



Преимущества определения суммарных антител методом ИФА «сэндвич»-вариант

Высокая специфичность

- Использованы только рекомбинантные белки вируса SARS-CoV-2
- Отсутствует перекрестное взаимодействие с ревматоидным фактором класса M

Высокая чувствительность

- Выявляются все классы антител (G, M, A)
- Более раннее определение антительного ответа (2-3 дня)

Возможность определять антитела у животных

Набор «SARS-CoV-2-АТ-ИФА-БЕСТ» для определения суммарных антител является наиболее чувствительным и специфичным



Специфичность наборов для определения разных классов антител

2816 образцов сывороток крови доноров и пациентов с различными инфекционными и неинфекционными заболеваниями, а также беременных, **отобранных до декабря 2019 г.**

Всего	«SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ»		«SARS-CoV-2-IgM-ИФА-БЕСТ»		«SARS-CoV-2-IgA-ИФА-БЕСТ»*		«SARS-CoV-2-АТ суммарные-ИФА-БЕСТ»*	
	+	Специфичность %	+	Специфичность %	+	Специфичность %	+	Специфичность %
2816	7	99,75 %	8	99,72 %	7	99,75 %	2	99,93 %
95 % CI		99,46 – 99,89 %		99,42 – 99,87 %)		99,46 – 99,89 %)		99,72 – 99,99 %)

*Наборы проходят государственную регистрацию

- Из **1296** образцов сывороток крови **доноров** получены ЛП результаты на IgG – 5 образцов, IgM и IgA – по 6, на суммарные АТ - 2 образца
- В группах образцов сывороток крови от пациентов с **респираторными заболеваниями** (ОРВИ, коронавирусные инфекции HKU1, NL63, 229E, OC43, SARS-CoV, MERS-CoV; бактериальные инфекции и бронхиты – всего **277** образцов) положительных результатов не выявлено



Чувствительность наборов для определения разных классов антител

960 пациентов с диагнозом COVID-19 (клинический диагноз подтвержден наличием РНК SARS-CoV-2 в назофарингеальном мазке и/или мазке из ротоглотки) **спустя 6-17 дней от появления клинических симптомов инфекции**

Набор реагентов	«SARS-CoV-2-АТ суммарные-ИФА-БЕСТ»*	«SARS-CoV-2-IgM-ИФА-БЕСТ»	«SARS-CoV-2-IgA-ИФА-БЕСТ»*	«SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ»
Аналит (специфические антитела к SARS-CoV-2)	Суммарные антитела	IgM	IgA	IgG
Число образцов с положительным результатом	958 из 960 (99,8 %)	788 из 960 (82,1 %)	816 из 960 (85 %)	692 из 960 (72,1 %)

*Наборы проходят государственную регистрацию



Чувствительность наборов в разные сроки заболевания

6-12 дней с начала проявления симптомов – 594 образца

13-20 дней - 427 образцов

Набор	«SARS-CoV-2-АТ суммарные- ИФА-БЕСТ»		«SARS-CoV-2- IgM-ИФА-БЕСТ»		«SARS-CoV-2- IgA-ИФА-БЕСТ»*		«SARS-CoV-2- IgG-ИФА- БЕСТ»*	
Аналит	Суммарные		IgM		IgA		IgG	
Дни	6-12	13-20	6-12	13-20	6-12	13-20	6-12	13-20
Положительные	590	427	487	407	501	427	425	427
Чувствительность	99,3%	100%	82%	95,4%	84,3%	100%	71,6%	100%
95 % CI	98,2- 99,8%	99,5- 100%	78,6-85%	93,9- 96,6%	81,1- 87,1%	99,5 - 100%	69,1 - 74,9%	99,5 - 100%



Кувшинова И.Н., Некрасов Б.Г., Ливицкая Н.И., Молодых С.В., Рукавишников М.Ю.

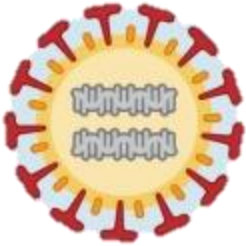
Чувствительность и специфичность наборов реагентов АО «Вектор-Бест» для выявления иммуноглобулинов разных классов к SARS-CoV-2.

Справочник заведующего КДЛ. № 10 - 2020 – С. 27-32

Варианты вакцин против COVID-19

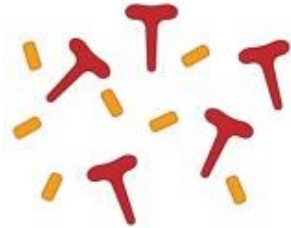
213 кандидатов, 36 – проходят клинические испытания

Инактивированная



14

Белки, пептиды



71

Векторная



60

Живая аттенуированная



4

ДНК или РНК



45

Другое

17

Варианты вакцин против COVID-19

Белки, пептиды



Векторная



ДНК или РНК



S-белок, субъединицы или RBD

«Спутник V»

НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи

аденовирусные векторы Ad26-S и rAd5-S

«EpiVacCorona»

ГНЦ ВБ «Вектор»

двухкомпонентная пептидная вакцина

Набор реагентов SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ выявляет пул IgG ко всем антигенным детерминантам S-белка, включая RBD



Наборы реагентов для диагностики COVID-19 пр-ва «Вектор-Бест»

D-5501 SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ

CE РУ № РЗН 2020/10388

D-5502 SARS-CoV-2-IgM-ИФА-БЕСТ

CE РУ № РЗН 2020/10389

D-5503 SARS-CoV-2-IgA-ИФА-БЕСТ

D-5504 SARS-CoV-2-AT-ИФА-БЕСТ



Определение IgM методом «захвата»



Готовые к использованию контроли, растворы конъюгата и хромогена



«Сэндвич» варианте ИФА для определение суммарных антител IgG, IgM, IgA



Общее время анализа 1 час 25 минут



Определение титров IgG



Хранение всех компонентов набора осуществляется при 2-8 °C



Образцы – сыворотка или плазма крови



Транспортирование при температуре до 25°C не более 10 суток



Чувствительность и специфичность наборов реагентов АО «Вектор-Бест» для выявления иммуноглобулинов разных классов к SARS-CoV-2.

Кувшинова И.Н., Некрасов Б.Г., Ливицкая Н.И., Молодых С.В., Рукавишников М.Ю.

Справочник заведующего КДЛ. № 10 - 2020 – С. 27-32

<https://e.zavkdl.ru/843516>



Людмила Мостович
Mostovich@vector-best.ru
+7 383 332 81 34

