



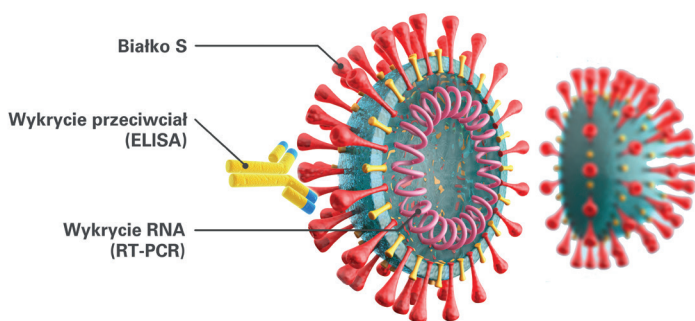
● dr n. med. Barbara Pawłowska  
Specjalista ds. Infekcji  
EUROIMMUN Polska Sp. z o.o.

# DIAGNOSTYKA SEROLOGICZNA COVID-19.

## JAKIE PARAMETRY TESTU MAJĄ WPŁYW NA WIARYGODNOŚĆ WYNIKÓW?

### Diagnostyka COVID-19 zgodna z zaleceniami WHO

COVID-19 [ang. **C**oronavirus **d**isease 2019] to choroba zakaźna wywołana przez koronawirusa SARS-CoV-2, która niespodziewanie zmieniła życie milionów ludzi na całym świecie. Ze względu na brak specyficznych objawów infekcji, zgodnie z zaleceniami Światowej Organizacji Zdrowia [ang. World Health Organization, WHO], rozpoznanie COVID-19 wymaga potwierdzenia obecności materiału genetycznego wirusa w próbce pobranej z dróg oddechowych pacjenta. Służą do tego testy amplifikacji kwasów nukleinowych [ang. *nucleic acid amplification tests*, NAAT], w tym RT-PCR [1].



Rys. 1. SARS-CoV-2 – budowa.

W **późniejszej fazie** zakażenia SARS-CoV-2 istotną rolę zaczyna odgrywać **diagnostyka serologiczna** [2], czyli badania wykrywające **specyficzne przeciwciała anty-SARS-CoV-2**, które zgodnie z zaleceniami WHO mogą być stosowane jako dodatkowe narzędzie diagnostyczne [1]. Testy serologiczne wydają się być idealnym dopełnieniem metody RT-PCR, wydłużając czas umożliwiając przeprowadzenie wiarygodnej diagnostyki COVID-19.

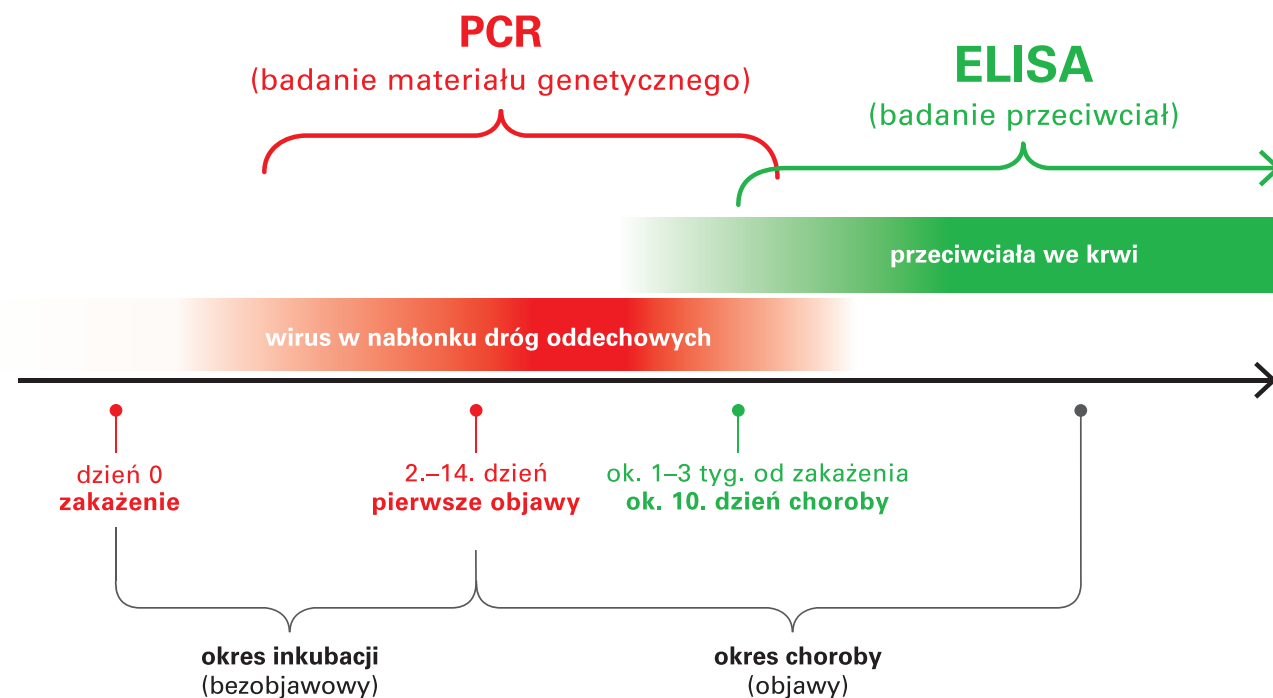
### Jakie jest zastosowanie testów serologicznych w COVID-19?

Specyficzne przeciwciała pojawiają się w organizmie z pewnym opóźnieniem po kontakcie z patogenem. Detekcja przeciwciał anty-SARS-CoV-2 w klasie **IgG** we krwi pacjenta jest możliwa od **około 10. dnia od czasu wystąpienia pierwszych objawów** klinicznych, natomiast specyficzne przeciwciała w klasie **IgA** oraz **IgM** są zwykle wykrywalne **nawet kilka dni wcześniej** [3].

Wykrycie specyficznych przeciwciał przeciwko SARS-CoV-2 umożliwia **potwierdzenie kontaktu z nowym koronawirusem**, co ma istotne znaczenie m.in. przy:

- **badaniach osób szczególnie narażonych na SARS-CoV-2** (np. personel szpitali), które ze względu na wykonywany zawód mogą być źródłem zakażenia dla ludzi starszych i schorowanych, oraz **badaniach osób mających kontakt z wieloma ludźmi** (np. policja, personel sklepów, aptek),
- diagnozowaniu pacjentów z powikłaniami **po niedawnym przebiegu infekcji grypopodobnej**, którzy nie mieli przeprowadzonej diagnostyki w kierunku infekcji SARS-CoV-2,
- **badaniach epidemiologicznych**, mających na celu ustalenie rozpowszechnienia zakażenia w populacji,
- identyfikowaniu **ozdrowieńców z wysokim poziomem IgG** w celu pobrania od nich osocza do stosowania w **terapii najcięższych przypadków COVID-19**,
- opracowywaniu nowych **leków** czy **szczepionki** przeciwko COVID-19.

Ponadto testy serologiczne **wykonywane w interwałach czasu** pozwalają wychwycić ewentualną **serokonwersję** u bezobjawowych nosicieli SARS-CoV-2 lub chorych na łagodną postać COVID-19 przypominającą przeziębienie.



Rys. 2. Przebieg infekcji SARS-CoV-2.

### Jakie znaczenie ma różnicowanie klas przeciwciał anty-SARS-CoV-2?

Dzięki różnicowaniu klas przeciwciał wykrywanych w przebiegu zakażeń można z dużym prawdopodobieństwem określić fazę infekcji. **Przeciwciała klasy IgA** uważane są za pierwszą linię obrony przed patogenami w błonach śluzowych organizmu. Odpowiadają m.in. za **neutralizację wirusów** wywołujących infekcje dróg oddechowych. We krwi przeciwciała IgA pełnią rolę uzupełniającą, biorą udział m.in. w neutralizowaniu tych antygenów, które przekroczyły barierę śluzówkową i przedostały się do krwioobiegu [4]. Przeciwciała te są wykrywane w wysokich mianach w przypadku **wielu zakażeń układu oddechowego** i są uznawane za cenny marker diagnostyczny. Intensywna synteza przeciwciał klasy IgA u chorych na COVID-19 została już opisana [5]. Co więcej, wykazano, że w odpowiedzi na SARS-CoV-2 produkcja przeciwciał klasy IgA jest znacznie bardziej nasiloną i przeciwciała tej klasy utrzymują się dłużej niż przeciwciała klasy IgM [6]. Detekcja swoistych przeciwciał anty-SARS-CoV-2 w klasie IgA może być **dotatkowym narzędziem diagnostycznym już we wczesnej fazie infekcji** wywołanej przez SARS-CoV-2, ponieważ przeciwciała te produkowane są wcześniej niż immunoglobuliny klasy G [7] [6]. Diagnostyka serologiczna **większości świeżych** zakażeń opiera się na oznaczaniu **przeciwciał klasy IgM**. Przeciwciała IgM stanowią około 5–10% całej puli immunoglobulin u dorosłych i występują niemal wyłącznie **w odpowiedzi pierwotnej na patogen** [8]. W przypadku infekcji wywołanych przez koronawirusy, przeciwciała w klasie IgM są w większości skierowane przeciwko białku N. U chorych na COVID-19 zarówno przeciwciała klasy IgM, jak i IgA są wykrywalne od około 6.–8. dnia od wystąpienia pierwszych objawów klinicznych [6].

Wykrycie wyłącznie **przeciwciał klasy IgG** pozwala przypuszczać, że pacjent **przeżył infekcję** w przeszłości. Przeciwciała tej klasy są elementami pamięci immunologicznej i w przypadku wielu zakażeń pełnią funkcję ochronną przed ponowną infekcją [9]. Wstępne badania nad odpowiedzią układu immunologicznego na SARS-CoV-2 wykazały, że obecność przeciwciał wytworzonych w wyniku pierwotnego zakażenia może pełnić funkcję ochronną w przypadku reinfekcji [10]. Korzyści płynące z oznaczania specyficznych przeciwciał w tej klasie jest znacznie więcej, m.in. umożliwiają identyfikację osób o wysokim stężeniu przeciwciał anty-SARS-CoV-2 (**potencjalni dawcy osocza**). Zarówno w Polsce, jak i w wielu innych krajach w leczeniu chorych na COVID-19 w ciężkim stanie klinicznym stosuje się już osocze pozyskane od ozdrowieńców [11] [12].

Testy wykrywające równolegle przeciwciała wielu klas wydają się mieć ograniczone zastosowanie. Wynik takiego badania świadczy jedynie o kontakcie z nowym koronawirusem, ale nie może już być podstawą do oceny potencjalnej odporności pacjenta na SARS-CoV-2 czy identyfikacji dawców osocza, jak w przypadku wyników testów wykrywających wyłącznie przeciwciała klasy IgG. Ponadto powszechnie wiadomo, że przeciwciała należące do poszczególnych klas różnią się między sobą siłą wiązania antygeny. Immunoglobuliny, które pojawiają się na wczesnym etapie zakażenia (IgM, IgA), cechuje niższe powinowactwo do antygeny w porównaniu do syntezowanych w późniejszej fazie infekcji przeciwciał klasy IgG. Z tego względu testy wykrywające wyłącznie przeciwciała klasy IgG są bardziej swoiste niż testy służące do jednoczesnej detekcji przeciwciał różnych klas.

### Od czego zależy specyficzność testu do wykrywania przeciwciał?

Przy wyborze testu serologicznego do diagnostyki zakażeń koronawirusem SARS-CoV-2 należy zwrócić uwagę na zastosowany antygen, ponieważ determinuje on czułość i specyficzność badania.

Koronawirusy zbudowane są z czterech białek strukturalnych, ale wyłącznie białka S oraz N posiadają właściwości immunomodulujące [13]. Analiza genomu SARS-CoV-2 wykazała, że **podjednostka S1 białka S SARS-CoV-2 cechuje się najniższą homologią** z analogicznymi regionami innych patogennych dla człowieka koronawirusów. Wynika z niej, że pełnej długości białka N oraz S i podjednostka S2 białka S są regionami konserwatywnymi. Może to powodować wysoki odsetek reakcji krzyżowych w testach serologicznych [7] [14]. Szczegółowe dane dotyczące homologii immunogennych białek strukturalnych w obrębie chorobotwórczych dla człowieka koronawirusów przedstawiono w tabeli 1 [7]. Zastosowanie jako antygeny wyłącznie podjednostki S1 białka S skutkuje wysoką specyficznością testu serologicznego.

		N	S	S1	S2
Beta-CoV	SARS-CoV	90	77	66	90
	MERS-CoV	49	33	24	43
	HCoV-OC43	34	33	25	42
	HCoV-HKU1	34	32	25	40
Alpha-CoV	HCoV-229E	28	30	24	35
	HCoV-NL63	29	28	21	36

Tab. 1. Porównanie podobieństwa sekwencji aminokwasowych (%) wybranych białek SARS-CoV-2 z analogicznymi regionami innych koronawirusów [7].

Co więcej, wykazano, że w przypadku zakażeń SARS-CoV-2 wniknięcie wirusa do komórki docelowej odbywa się poprzez domenę wiążącą receptor obecną na podjednostce S1 białka S, która łączy się z receptorem ACE2 [ang. *angiotensin-converting enzyme 2*] znajdującym się na komórkach nabłonka pęcherzyków płucnych [12]. Wydaje się więc, że **przeciwciała skierowane przeciwko białku S mogą pełnić kluczową rolę w mechanizmach odporności przeciwko COVID-19** [6] [15]. Wykazano również ścisłą korelację pomiędzy testem EUROIMMUN Anty-SARS-CoV-2 ELISA opartym o wysokospecyficzną podjednostkę S1 białka S SARS-CoV-2 a testem neutralizacji PRNT [ang. *plaque reduction neutralization test*] [5] [7]. Niedawno przedstawiono wyniki badań naukowców z Uniwersytetu w Bonn, w których potwierdzono **bardzo dobrą korelację** testu EUROIMMUN z testem neutralizacji **na poziomie 91%** [16]. Test PRNT uważa się za „złoty standard” pomiaru skuteczności przeciwciał w neutralizowaniu wirusów chorobotwórczych [17].

### Co może wpływać na wynik badania przeciwciał?

Wpływ na wynik badania laboratoryjnego mają również niektóre właściwości materiału pobranego od pacjenta, traktowane jako czynniki interferujące. Podczas interpretacji wyników testów labo-

ratoryjnych należy rozważyć możliwość uzyskania nieprawidłowych rezultatów spowodowanych m.in. przez hiperlipamię, hiperbilirubinemię czy hemolizę próbki. Wykazano, że w testach EUROIMMUN Anty-SARS-CoV-2 ELISA wpływ tych czynników na wynik badania jest znikomy (brak interferencji aż do stężenia 10 mg/ml hemoglobiny, 20 mg/ml trójglicerydów i 0,4 mg/ml bilirubiny).

Ponadto nieprawidłowości w wynikach badań diagnostycznych mogą być skutkiem właściwości farmakologicznych wielu leków czy suplementów diety. Przykładowo, w powszechnie stosowanych systemach testowych, wykorzystujących układ streptawidyna–biotyna, może dochodzić do **interferencji na skutek spożywanego przez pacjenta suplementów zawierających biotynę**, co skutkuje wzrostem jej stężenia w surowicy. Egzogenna biotyna obecna w analizowanej próbce może powodować wysycenie miejsc wiążących na streptawidynie, prowadząc do otrzymania wyników fałszywie ujemnych. Suplementacja biotyną nie wpływa natomiast na wynik testu ELISA wykorzystującego koniugat enzymatyczny oparty o peroksydazę (np. test EUROIMMUN Anty-SARS-CoV-2 ELISA).

### Zalety testów EUROIMMUN Anty-SARS-CoV-2 ELISA (IgA, IgM, IgG)

- **Swoisty antygen.** Zapewnienie precyzyjnej detekcji przeciwciał w diagnostyce COVID-19 było głównym celem niemieckich ekspertów, którzy stworzyli zestaw testowy EUROIMMUN Anty-SARS-CoV-2 ELISA (IgA, IgG). Testy umożliwiają **wykospecyficzne, półilościowe** oznaczenie przeciwciał przeciwko SARS-CoV-2. Jako antygeny użyto **podjednostki S1 białka S** nowego koronawirusa. Nowością na rynku diagnostycznym są testy EUROIMMUN Anty-SARS-CoV-2-NCP ELISA (IgM, IgG) oparte o **modyfikowane białko nukleokapsydu** [ang. *nucleocapsid protein, NCP*], które jest unikalnym antygenem. W celu zapewnienia wysokiej specyficzności testów naukowcy z firmy EUROIMMUN usunęli fragmenty białka N, które mogą skutkować wysoką reaktywnością krzyżową przeciwciał przeciwko powszechnie występującym koronawirusom.



Rys. 3. Zestaw testowy EUROIMMUN Anty-SARS-CoV-2 ELISA (IgA).

- **Kompletny zestaw testowy.** Wszystkie odczynniki wraz z kalibratorem cut-off oraz kontrolą negatywną, jak również pozytywną są zawarte w zestawach testowych przeznaczonych do detekcji przeciwciał. **Zawarte w zestawie surowice kontrolne** pozwalają na weryfikację przebiegu procesu inkubacji bez ponoszenia dodatkowych kosztów i bez konieczności samodzielnego przygotowywania materiałów kontrolnych.



Rys. 4. EUROIMMUN Analyzer I.

- **Automatyzacja – powszechnie dostępne w polskich laboratoriach urzędzenia.** Niewątpliwą zaletą testów firmy EUROIMMUN jest **możliwość automatyzacji badań** dostosowanej do potrzeb laboratorium: małe laboratoria mogą stosować **czytnik do mikropłytek** i wykonywać inkubację manualną bądź wykorzystywać automaty do inkubacji 16–32 próbek (**ELISIA**). Manualna procedura inkubacji testów ELISA jest prosta i intuicyjna, a badanie jest łatwe do wdrożenia. Większe laboratoria mają do dyspozycji urządzenia **ANALYZER I-2P** (1–3 mikropłytki), **ANALYZER I** (1–4 mikropłytki) lub **EUROLabWorkstation** (15 mikropłytek).
- **Długi termin ważności testów (6 miesięcy).** Po otwarciu testu płytka reakcyjna opłaszczona antygenem jest trwała 4 miesiące, a pozostałe reagenty są stabilne do wskazanej na opakowaniu daty ważności (6 miesięcy), jeśli są przechowywane w temperaturze od +2°C do +8°C. Dzięki długiemu terminowi ważności oraz możliwości optymalnego wykorzystania płytki mikrotitracyjnej z oddzielnymi odłamywanymi studzienkami **ryzyko strat związanych z niewykorzystaniem odczynników jest minimalne** nawet w małym laboratorium medycznym.
- **Charakterystyka testu opracowana w oparciu o solidne i rozległe dane.** Czułość i specyficzność testów EUROIMMUN Anty-SARS-CoV-2 ELISA (IgA, IgG) zostały określone na podstawie badań licznych serii szczegółowo scharakteryzowanych surowic. W celu określenia specyficzności obu testów

wykorzystano blisko **1250 surowic** uzyskanych **od różnych grup badanych**, w tym zarówno zdrowych dawców krwi, kobiet w ciąży, dzieci, jak i osób poddawanych szczepieniom na gripę lub z infekcjami wirusowymi. **Specyficzność testu EUROIMMUN, opartego o antygen S1, który jest przeznaczony do oznaczania przeciwciał anty-SARS-CoV-2 w klasie IgA, wynosi 92,4%, natomiast w klasie IgG – 99,6%.**

- **Certyfikaty.** Testy EUROIMMUN Anty-SARS-CoV-2 ELISA (IgA, IgG) jako jedne z pierwszych w Unii Europejskiej otrzymały **certyfikat CE-IVD**, dzięki czemu są już **od kilku miesięcy z powodzeniem wykorzystywane w diagnostyce medycznej** w wielu krajach na całym świecie, także w Polsce. Testy EUROIMMUN są również pierwszymi testami serologicznymi na rynku amerykańskim, które otrzymały **certyfikat EUA-FDA** po niezależnej i rygorystycznej ocenie.

### Podsumowanie

Według wybitnych, światowych ekspertów, m.in. Redaktora Naczelnego „Science”, H. Holdena Thorpa, **testy serologiczne prowadzone na szeroką skalę są niezbędne do zrozumienia COVID-19** oraz stworzenia skutecznej metody walki z nowym koronawirusem [18]. Ze względu na bezobjawowy przebieg zakażenia, dzięki badaniom serologicznym możliwe będzie **określenie rzeczywistego rozpowszechnienia epidemii w Polsce** oraz przygotowanie strategii na ewentualną kolejną falę zakażeń. Poznanie **obecnego statusu serologicznego** poszczególnych osób umożliwi w przyszłości ich obserwację oraz potwierdzenie przypuszczeń dotyczących **zjawiska odporności** i jej utrzymywania się w czasie. Ta wiedza z kolei jest konieczna **do oceny skuteczności szczepień**, na które tak bardzo liczymy. Prowadząc szeroko zakrojone badania serologiczne dziś – za rok będziemy dysponować bezcennymi danymi, dzięki którym możliwe będzie podejmowanie racjonalnych decyzji w obliczu powracającej pandemii. ●

## Piśmiennictwo

1. World Health Organization, *Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in suspected human cases: interim guidance*, 19 March 2020, <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331501>.
2. Zhao J. i wsp., *Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019*, *Clinical Infectious Diseases*, 28 March 2020, <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa344>.
3. Liu L. i wsp., *A preliminary study on serological assay for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in 238 admitted hospital patients*, medRxiv (Preprint), 8 March 2020, <https://doi.org/10.1101/2020.03.06.20031856>.
4. Cunningham-Rundles C., *Physiology of IgA and IgA deficiency*, *Journal of Clinical Immunology*, 2001, 21 (5): 303–309, <https://doi.org/10.1023/a:1012241117984>.
5. Amanat F. i wsp., *A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans*, *Nature Medicine*, 2020, <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0913-5>.
6. Padoan A. i wsp., *IgA-Ab response to spike glycoprotein of SARS-CoV-2 in patients with COVID-19: A longitudinal study*, *Clinica Chimica Acta*, 2020, 507: 164–166, <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.04.026>.
7. Okba N.M.A. i wsp., *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 – Specific Antibody Responses in Coronavirus Disease 2019 Patients*, *Emerging Infectious Diseases*, 2020, 26 (7), <https://doi.org/10.3201/eid2607.200841>.
8. *Mikrobiologia*, red. P. Murray i wsp., Edra Urban & Partner, 2018, 9: 78–81.
9. Furst D.E., *Serum Immunoglobulins and Risk of Infection: How Low Can You Go?*, *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 2009, 39 (1): 18–29, <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2008.05.002>.
10. Bao L. i wsp., *Lack of Reinfection in Rhesus Macaques Infected with SARS-CoV-2*, bioRxiv (Preprint), 1 May 2020, <https://doi.org/10.1101/2020.03.13.990226>.
11. Jiang S. i wsp., *Neutralizing Antibodies against SARS-CoV-2 and Other Human Coronaviruses*, *Trends in Immunology*, 2020, 41 (5): 355–359, <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.03.007>.
12. Zhou G., Zhao Q., *Perspectives on therapeutic neutralizing antibodies against the Novel Coronavirus SARS-CoV-2*, *International Journal of Biological Sciences*, 2020, 16 (10): 1718–1723.
13. Lu R. i wsp., *Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding*, *Lancet*, 2020, 395 (10224): 565–574.
14. Kevin Ng. i wsp., *Pre-existing and de novo humoral immunity to SARS-CoV-2 in humans*, medRxiv (Preprint), 15 May 2020, <https://doi.org/10.1101/2020.05.14.095414>.
15. Yu S. i wsp., *Retrospective Serological Investigation of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Antibodies in Recruits from Mainland China*, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 2005, 12 (4): 552–554, <https://doi.org/10.1128/CDLI.12.4.552-554.2005>.
16. Streeck H. i wsp., *Infection fatality rate of SARS-CoV-2 infection in a German community with a super-spreading event*, medRxiv (Preprint), 8 May 2020, <https://doi.org/10.1101/2020.05.04.20090076>.
17. Thomas S.J. i wsp., *Dengue plaque reduction neutralization test (PRNT) in primary and secondary dengue virus infections: How alterations in assay conditions impact performance*, *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2009, 81 (5): 825–833, <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2009.08-0625>.
18. Vogel G., *These are answers we need. WHO plans global study to discover true extent of coronavirus infections*, *American Association for the Advancement of Science*, 2 April 2020, <https://doi.org/10.1126/science.abc0458>.

REKLAMA

## Testy EUROIMMUN Anty-SARS-CoV-2 ELISA (IgA, IgM, IgG)



### Precyzyjna detekcja przeciwciał w diagnostyce COVID-19

**Wysokospecyficzne oznaczenie:** detekcja przeciwciał przeciwko podjednostce **S1 białka strukturalnego S SARS-CoV-2** (IgA, IgG)

**Niezawodność i zaufanie:** badanie wykonywane w wielu laboratoriach na całym świecie

**Ocena fazy choroby:** badanie przeciwciał klasy IgA, IgM (wczesne stadium) lub IgG (pamięć immunologiczna)

**Wysoka przepustowość** dzięki pełnej automatyzacji badania

**Bezpłatna promocja** laboratorium w wyszukiwarce oraz ulotki dla pacjentów



CoV-2.PL

