



Εθνικό και Καποδιστριακό  
Πανεπιστήμιο Αθηνών

National and Kapodistrian  
University of Athens

## ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

### ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ

Μεταπτυχιακό στη ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ  
ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

“Ανασκόπηση των μεθόδων ανίχνευσης αντισωμάτων  
έναντι του SARS-CoV-2”

### ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

BSc MSc PhD

Αναπληρωτής Καθηγητής Επιδημιολογίας και

Προληπτικής Ιατρικής Σχολής Αθηνών

ΓΕΩΡΓΙΑ ΠΑΠΑΧΑΡΑΛΑΜΠΟΥΣ  
ΙΑΤΡΟΣ ΒΙΟΠΑΘΟΛΟΓΟΣ

ΑΠΡΙΛΙΟΣ 2022, ΑΘΗΝΑ

# ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία αποτελεί διπλωματική εργασία στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Ιατρικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών στη “Μοριακή και Εφαρμοσμένη Φυσιολογία.”

Κατ’ αρχήν θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Μιχάλη Κουτσιλιέρη, Καθηγητή Πειραματικής Φυσιολογίας και τον κ. Γεώργιο Βαϊόπουλο, Ομότιμο Καθηγητή Παθολογίας, που μου έδωσαν την δυνατότητα να συμμετάσχω στο Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών στην Μοριακή και Εφαρμοσμένη Φυσιολογία και στην συνέχεια τον επιβλέποντα Αναπληρωτή Καθηγητή Επιδημιολογίας και Προληπτικής Ιατρικής κύριο Δημήτριο Παρασκευή για την πολύτιμη καθοδήγηση του και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε.

Από το Γ.Ν.Α. “Ιπποκράτειο” θα ήθελα να ευχαριστήσω την Διευθύντρια του Μικροβιολογικού τμήματος κ. Σκανδάμη Βασιλική για την εξαιρετική συνεργασία που είχαμε και την κ. Νίτσα Αλκίπη, MSc Τεχνολόγο του Γ.Ν.Α. “Ιπποκράτειο” για την πολύτιμη βοήθεια της. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Αναστάσιο Φιλίππου, Αναπληρωτή Καθηγητή Πειραματικής Φυσιολογίας, για τις πολύτιμες συμβουλές του και την κ. Καπέλη Αναστασία για την τελειοποίηση της εργασίας .

## Περιεχόμενα

Εισαγωγή.....	5
1.1 Η νόσος Covid-19 .....	5
1.2 Η κατάσταση μέχρι τώρα .....	7
2. Ανίχνευση Αντισωμάτων .....	9
2.1 Αντισώματα .....	9
2.1.1 Ορισμός.....	9
2.1.2 Υποκατηγορίες.....	12
2.2 Ανοσοδοκιμές .....	14
2.3. Κλινική χρήση.....	15
2.4 Μέθοδοι ανίχνευσης αντισωμάτων.....	17
3. Διασταυρούμενη αντίδραση αντισώματος: Η μελέτη των Lv et al (2020).....	20
3.1 Ερευνητικό ερώτημα-Μεθοδολογία.....	20
3.2 Αποτελέσματα της μελέτης .....	23
4. Ανοσοδοκιμές ανίχνευσης αντισωμάτων για τον Covid-19.....	25
4.1 Επιλέγοντας την ανοσοδοκιμή.....	28
5. Μέθοδος LIPS.....	29
5.1 Μεθοδολογία.....	30
5.2 Αποτελέσματα.....	30
5.3 Κριτική αξιολόγηση .....	32
6. Μέθοδοι CLIA-CMIA-ELISA .....	32
6.1.Μέθοδος CLIA.....	32
6.1.1 Περιγραφή.....	32
6.1.2 Πλεονεκτήματα - μειονεκτήματα .....	34
6.2 Μέθοδος ELISA.....	36
6.2.1 Περιγραφή.....	36
6.2.2 Βασικοί τύποι - Μορφή “σάντουιτς” (Sandwich Capture) .....	37
6.2.3 Άμεσες και έμμεσες στρατηγικές ανίχνευσης ELISA.....	38
6.3 CMIA.....	39

7. Οι μέθοδοι εφαρμοσμένοι για τον ιο SARS-CoV-2 .....	40
7.1 SARS-CoV-2 IgG (CMIA).....	40
7.1.1 Ανάλυση της μεθόδου .....	40
7.1.2 Αρχές του τεστ .....	41
7.1.3 Έλεγχος ποιότητας.....	42
7.1.4 Περιορισμοί.....	42
7.1.5 Κλινική απόδοση.....	44
7.2 LIAISON® SARS-CoV-2 S1/S2 IgG.....	45
7.2.1 Μέθοδος.....	45
7.2.2 Περιορισμοί της μεθόδου.....	46
7.2.3 Αξιολόγηση.....	47
7.3 Σύγκριση των κιτ SARS-CoV-2 IgG CMIA Alinity system (Abbott) and LIAISON® SARS-CoV-2 S1/S2 IgG CLIA (DiaSorin).....	48
7.3.1 Η έρευνα .....	48
7.3.2 Αποτελέσματα.....	48
7.3.3 Συζήτηση.....	49
7.4 Anti-SARS-Cov 2 ELISA (IgG) .....	50
7.4.1 Το τεστ της EUROIMMUN.....	50
7.4.2 Αρχή της δοκιμής .....	50
7.4.3 Ακρίβεια του τεστ.....	50
7.4.4 Διασταυρούμενη αντιδραστικότητα.....	51
7.4.5 Παρεμβολή.....	52
7.4.6 Κλινικές επιδόσεις.....	52
7.4.7 Επικύρωση από ανεξάρτητες αρχές .....	53
8. Πως οι διαφορετικές μορφές-μεταλλάξεις του SARS-CoV-2 επηρεάζουν τα τεστ αντισωμάτων .....	56
9. Προβλήματα και συμπεράσματα σε σχέση με τα αποτελέσματα των τεστ αντισωμάτων για τον Covid-19 .....	57
Συζήτηση.....	59



## Εισαγωγή

Ο κόσμος σήμερα έχει συσπειρωθεί όπως ποτέ άλλοτε για να πολεμήσει έναν κοινό εχθρό για τους ανθρώπους: την πανδημία του κορονοϊού. Οι Coronaviruses (CoVs) ανήκουν στην οικογένεια Coronaviridae. Τα CoVs είναι υπεύθυνα για το σοβαρό οξύ αναπνευστικό σύνδρομο (SARS) που είχε πρωτοεμφανιστεί ως επιδημία τον Νοέμβριο του 2003. Σχεδόν δύο δεκαετίες αργότερα, ένας νέος κορονοϊός, ο κορωνοϊός SARS 2 (SARS-CoV-2), που προήλθε από την πόλη Wuhan της Κίνας τον Δεκέμβριο 2019, οδήγησε σε μια άνευ προηγουμένου παγκόσμια πανδημία, αυτή της νόσου του κορωνοϊού 2019 (COVID-19), που έχει αποδειχθεί μια σοβαρή πρόκληση για την υγεία ολόκληρου του πλανήτη (Wu et al, 2020)

Παρά την ίδια οικογένεια ιικής προέλευσης με τον SARS, η μεταδοτικότητα και η σοβαρότητα της νόσου του COVID-19 είναι πολύ υψηλότερες όσον αφορά την εξάπλωση της στην κοινωνία. Αυτή τη στιγμή, μέχρι τις 23 Σεπτεμβρίου 2021, έχουν αναφερθεί πάνω από 230 εκατομμύρια επιβεβαιωμένα κρούσματα COVID-19 με περισσότερους από 4,7 εκατομμύρια θανάτους παγκοσμίως (Covid Update, 2021) και οι αριθμοί αυξάνονται καθημερινά. Μετά την επίτευξη της αναχαίτισης του ιού COVID-19 στην Κίνα, παρατηρείται μια μετατόπιση στο επίκεντρο της νόσου με εκπληκτικό αριθμό νέων κρουσμάτων και θανάτων να σημειώνεται στις Ηνωμένες Πολιτείες, τη Βραζιλία, την Ινδία, τη Ρωσία και σε πολλές άλλες ευρωπαϊκές χώρες.

### 1.1 Η νόσος Covid-19

Πολλά έχουν αναφερθεί για την κλινική εκδήλωση και τα συμπτώματα της νόσου. Ωστόσο, υπάρχουν περιορισμένες πληροφορίες σχετικά με τον παθογόνο μηχανισμό της νόσου. Τα κοινά συμπτώματα του COVID-19 περιλαμβάνουν πυρετό, ξηρό βήχα, κόπωση και χαρακτηριστικά που μοιάζουν με πνευμονία. Ο κορωνοϊός αναφέρεται ότι αλληλοεπιδρά με τον υποδοχέα επιθηλιακών κυττάρων του ξενιστή, (angiotensin converting enzyme 2 - ACE2), που βρίσκεται στις εξωτερικές επιφάνειες των περισσότερων οργάνων του ανθρώπινου σώματος και προκαλεί ενδοκυττάρωση στο κύτταρο ξενιστή (Udugama, 2020) Η σοβαρότητα της νόσου γίνεται έκδηλη όταν ο ιός COVID19 (SARS-CoV-2) εισέρχεται στους πνεύμονες μέσω της στοματικής ή ρινικής κοιλότητας και πολλαπλασιάζεται μέσα στα πνευμονικά κύτταρα και τελικά οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο.

Τα νεκρά κύτταρα μπορεί να προκαλέσουν φλεγμονώδη απόκριση μέσω κυτοκινών όπως η ιντερλευκίνη-6, η ιντερλευκίνη-1 (interleukin-6, interleukin-1,) ο παράγοντας νέκρωσης όγκου-a, (tumor necrosis factor-a) με αποτέλεσμα την παγίωση και πύκνωση του υγρού στους κυψελιδικούς και διάμεσους χώρους και το σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας (ARDS) (Puelles, 2020).

Η συμπτωματική κλινική κατάσταση χωρίς υποβοήθεια οξυγόνου μπορεί να οδηγήσει σε θάνατο λόγω της ανεπάρκειας οξυγόνου στα ζωτικά όργανα και της δυσλειτουργίας πολλαπλών οργάνων (υπολειτουργία νεφρών και καρδιακή ανακοπή). Οι ερευνητές ανέφεραν ότι ο ιός επηρεάζει και άλλα όργανα εκτός από τους πνεύμονες και την αναπνευστική οδό, κυρίως το συκώτι και τα νεφρά, ακόμη και με ήπια επίπεδα μόλυνσης (Puelles, 2020).

Οι πιθανότητες να επηρεάσει τα άτομα μεγαλύτερης ηλικίας είναι περισσότερες ως αποτέλεσμα των ήδη υπαρχουσών συν νοσηροτήτων τους. Το επίκεντρο της καταπολέμησης του SARS-CoV-2 περιστρέφεται γύρω από τον εντοπισμό κρουσμάτων, την παρακολούθηση, την πρόληψη της μόλυνσης, τη διάγνωση και την υποστηρικτική φροντίδα. Μια συγκεκριμένη παγκόσμια προτεινόμενη θεραπεία δεν ήταν μέχρι πρότινος διαθέσιμη (Prompetchara, 2020) ωστόσο, διάφορες στρατηγικές για την καταπολέμηση της πανδημίας εφαρμόζονται σε όλο τον κόσμο και οι συσχετισμοί του SARS με το αναπνευστικό σύνδρομο της Μέσης Ανατολής (MERS) μελετώνται διεξοδικά για να κατανοήσουν οι μελετητές τις δυνατότητες προηγουμένως επιτυχημένων στρατηγικών αντιμετώπισης (Prompetchara, 2020).

Προηγούμενες μελέτες σε πολλές ιογενείς λοιμώξεις υπέδειξαν ότι τα προστατευτικά αντισώματα δεν έχουν απαραίτητα εξουδερωτική δραστηριότητα. Έτσι, το δυναμικό των ανθρώπινων αντισωμάτων στη θεραπεία ή στον εμβολιασμό εξαρτάται από το αν τα αντισώματα έχουν ρόλο στην εξέλιξη της νόσου ή στην προστασία από την ιογενή λοίμωξη, έγραψαν οι μελετητές πριν την κυκλοφορία των πολυσυζητημένων εμβολίων για τη νόσο (Arvin et al, 2020).

Η θεραπεία με πλάσμα έχει δείξει ικανοποιητικά αποτελέσματα τόσο στον SARS όσο και στον MERS, όπου μια ισχυρή απόκριση T-κυττάρων και υψηλότερη ποσότητα εξουδερωτικών αντισωμάτων βρέθηκαν σε θεραπευμένους ασθενείς που εξετάστηκαν σε βάθος χρόνου (Prompetchara, 2020). Με βάση αυτές τις πληροφορίες, το πλάσμα των ασθενών που αναρρώνουν χρησιμοποιείται για τη θεραπεία άλλων ασθενών σε κρίσιμη κατάσταση.

Ακόμα, μελέτες ανέφεραν σημαντική μείωση της θνησιμότητας σε ευάλωτους ασθενείς με COVID-19 και ανέφεραν ενθαρρυντικά αποτελέσματα με μειωμένη φλεγμονώδη απόκριση και βελτίωση της λειτουργίας διαφόρων οργάνων (Shao et al, 2020). Αυτά τα δεδομένα αποκάλυψαν τη βελτίωση των κλινικών συμπτωμάτων όπως είχαν αναφερθεί προηγουμένως μελέτες του SARS.

## **1.2 Η κατάσταση μέχρι τώρα**

Μέχρι μερικούς μήνες πριν, ενώ ένα εμβόλιο δεν ήταν διαθέσιμο για τον COVID-19 και δεν υπάρχει σύντομη και σίγουρη θεραπεία, μόνο η ταχεία και εκτεταμένη διάγνωση θα μπορούσε να είναι ο τρόπος για να σπάσει ο κύκλος αυτού του θανατηφόρου ιού SARS. Η διάγνωση είχε πολύ σημαντικό ρόλο στη διαχείριση της νόσου τόσο πριν την ύπαρξη μίας μεθόδου πρόληψης όπως το εμβόλιο όσο και τώρα μέχρι να δημιουργηθεί πλήρης ανοσία του πληθυσμού.

Όπως τόνισε ο επικεφαλής του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας στις 16 Μαρτίου 2020, μόλις 3 ημέρες μετά την κήρυξη του COVID-19 ως πανδημία, ο δρόμος προς τα εμπρός είναι τα «τεστ, τεστ και τεστ». (Cai et al, 2020). Η ακτινογραφία θώρακα χρησιμοποιήθηκε αρχικά στην Κίνα ως προκαταρκτικό τεστ για τον εντοπισμό θετικών ασθενών με COVID-19. Ωστόσο, λόγω ενός αυξανόμενου αριθμού λανθασμένης διάγνωσης, προτάθηκε να χρησιμοποιηθεί μόνο ως δευτερεύουσα γραμμή διάγνωσης για ασθενείς που έχουν ήδη εισαχθεί και επιβεβαιωθεί θετικοί με μοριακές ή ανοσολογικές εξετάσεις (American College of Radiology, 2020).

Από παγκόσμια προοπτική, η πιο δημοφιλής και χρυσή τυπική τεχνική που χρησιμοποιείται για τη διάγνωση του COVID-19 είναι μια αρχική συμπτωματική ανάλυση που ακολουθείται από ανίχνευση νουκλεϊκού οξέος μοριακής βάσης από πτύελα, ρινικά και στοματικά επιχρίσματα και ορούς. (Cai et al, 2020). Ο COVID-19 φέρει ένα μονόκλωνο γονιδίωμα RNA περίπου 30 000 νουκλεοτιδίων. Ο έλεγχος νουκλεϊκού οξέος του COVID-19 βασίζεται στην τεχνική αντίστροφης μεταγραφής-PCR (RT-PCR) (Zhang et al, 2020). Διάφορες διατηρημένες γονιδιωματικές περιοχές του ιού, όπως το εξαρτώμενο από RNA γονίδιο πολυμεράσης RNA (γονίδιο RdRP), το γονίδιο πρωτεΐνης νουκλεοκασιδίου (γονίδιο N) και το πρωτεϊνικό γονίδιο (γονίδιο E), έχουν στοχοποιηθεί στις μοριακές δοκιμές.

Επειδή αυτή η δοκιμή μπορεί να ενισχύσει ακόμη και χαμηλά επίπεδα ιού και να ανιχνεύσει την ασθένεια σε πρώιμο στάδιο, είναι η πιο χρησιμοποιούμενη και αξιόπιστη μέθοδος ανίχνευσης. Ωστόσο, η απόδοση της RT-PCR εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το επιλεγμένο ιικό RNA-στόχο (target viral RNA) και τους εκκινητές (primers) που



χρησιμοποιούνται (Cai et al, 2020). Συνεπώς, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας δημοσιεύει κατά καιρούς τυποποιημένα πρωτόκολλα για τυχόν αλλαγές.

Παρά τον μεγάλο αριθμό δοκιμών που βασίζονται σε RT-PCR που διεξάγονται σε όλο τον κόσμο, η προσβασιμότητά σε κέντρα διάγνωσης, ειδικότερα σε απομακρυσμένες περιοχές περιορίζει τον μαζικό έλεγχο. Επιπλέον, αυτές οι δοκιμές είναι δαπανηρές, βασισμένες στον εξοπλισμό, απαιτούν χρόνο και απαιτούν βιολογική τεχνογνωσία (Zhang et al, 2020).. Η παράλειψη διάγνωσης μεγάλου αριθμού κλινικά υπόπτων κρουσμάτων μπορεί να προωθήσει την εξάπλωση του ιού κάτι που ίσως τελικά να οδηγήσει σε ταχύτερη εξέλιξη της νόσου. Επιπλέον, σε πολλές περιπτώσεις ο μοριακός έλεγχος απαιτεί συχνά περισσότερες από μία δοκιμές για την επιβεβαίωση της νόσου. Τέλος, η μέθοδος RT-PCR είναι πολύτιμη στην αρχική φάση της μόλυνσης όταν ο ιός υπάρχει στο σώμα (Zhang et al, 2020).

Ωστόσο, αυτή η μέθοδος έχει περιορισμούς στην αναγνώριση παλαιότερων, ανακτημένων και ασυμπτωματικών λοιμώξεων. Οι περισσότερες από τις χώρες βρίσκονται (ή θα έπρεπε να βρίσκονται) υπό μερικό ή πλήρη αποκλεισμό (lockdown) εδώ και πολλούς μήνες, επομένως είναι απαραίτητο να διεξάγονται ισχυρές δοκιμές από πόρτα σε πόρτα για την αντιμετώπιση της πανδημίας (Zhang et al, 2020). Οι δοκιμές που βασίζονται στη μοριακή βιολογία σε τέτοιες περιπτώσεις θα είναι πολύ δύσκολες και θα πρέπει να διευκολυνθούν με απλούστερες και ταχύτερες δοκιμές.

Η ταχεία διάγνωση για δοκιμή όσων περισσότερων μπορούμε σε αυτό το χρονικό σημείο μπορεί να θεωρηθεί η μόνη ελπίδα για την καταπολέμηση της νόσου. Το Ίδρυμα για Καινοτόμα Νέα Διαγνωστικά, Γενεύη, Ελβετία, δημοσίευσε το πρώτο αποτέλεσμα ανεξάρτητης αξιολόγησης και κλινικής απόδοσης πέντε κит μοριακής δοκιμής στις 16 Απριλίου 2020.

Η ευαισθησία (sensitivity) που επιτεύχθηκε από όλα τα κит με 50 δείγματα θετικών για COVID-19 ήταν 100% , και η εξειδίκευση (specificity) που επιτεύχθηκε από αυτά τα κит με 100 αρνητικά δείγματα ήταν 97-100% (FIND, 2020). Ωστόσο, μπορεί να υπάρχουν ασυμπτωματικοί ή μολυσμένοι ασθενείς, οι οποίοι μπορεί να έχουν καθαρίσει από το ιικό φορτίο χωρίς ανίχνευση. Σε τέτοιες περιπτώσεις, ένα RT-PCR δεν θα εντοπίσει τη μόλυνση (Zhang et al, 2020)..

Ως εκ τούτου, ήταν σημαντικό να αναπτυχθεί και να εισαχθεί ένα γρήγορο και άμεσο τεστ φροντίδας για τον εντοπισμό κρουσμάτων και φορέων COVID-19. Η Εθνική Επιτροπή Υγείας της Κίνας στην έβδομη έκδοση του νέου σχεδίου διάγνωσης και θεραπείας

πνευμονίας από κορωνοϊό συνέστησε πρόσφατα τη χρήση δοκιμών αντισωμάτων ανοσοσφαιρίνης (Ig) M/IgG για ύποπτα περιστατικά (Liu et al, 2020).

Με την αλλαγή της δυναμικής της νόσου που καθορίστηκε από την ταχύτητα της εξάπλωσής του, φαίνεται εξαιρετικά σημαντικό να λαμβάνουμε όλες τις πληροφορίες με μια ματιά σχετικά με την εκτέλεση ορολογικών εξετάσεων που αναφέρονται παγκοσμίως για να ρυθμίσουμε τις ανάγκες υγειονομικής περίθαλψης.

Αυτή η ανασκόπηση βιβλιογραφίας θα εστιάσει στις μεθόδους ανίχνευσης αντισωμάτων για τον ιό του COVID-19 που έχουν αναπτυχθεί μέχρι στιγμής.

## **2. Ανίχνευση Αντισωμάτων**

Ο ακριβής και αξιόπιστος προσδιορισμός των βιολογικά ενεργών ενδογενών ενώσεων στο πλάσμα, τα ούρα και άλλα σωματικά υγρά για επιστημονικούς ή διαγνωστικούς σκοπούς ήταν μια πρόκληση για πολλές δεκαετίες (Herman, Ollert, Ring, 2005). Στο παρελθόν, η αξιολόγηση τέτοιων ενώσεων ήταν δύσκολη και κουραστική επειδή δεν ήταν διαθέσιμα ειδικά και πρακτικά εργαλεία ανάλυσης. Τις πρώτες μέρες, καταληκτικά και πειστικά συμπεράσματα σχετικά με τη σημασία ενός βιολογικά ενεργού μορίου στην ασθένεια ή την υγεία θα μπορούσαν να γίνουν μόνο μετά τον καθορισμό και την απομόνωση του αναλύτη και τον προσδιορισμό της χημικής δομής του. Σίγουρη βελτίωση στην ανάλυση βιολογικά ενεργών ενδογενών ενώσεων ήταν η εισαγωγή βιοδοκιμών βασισμένων σε ολόκληρο το ζωικό μοντέλο ή παρασκευάσματα ιστών *in vitro* (Herman, Wollert, Ring, 2005).

### **2.1 Αντισώματα**

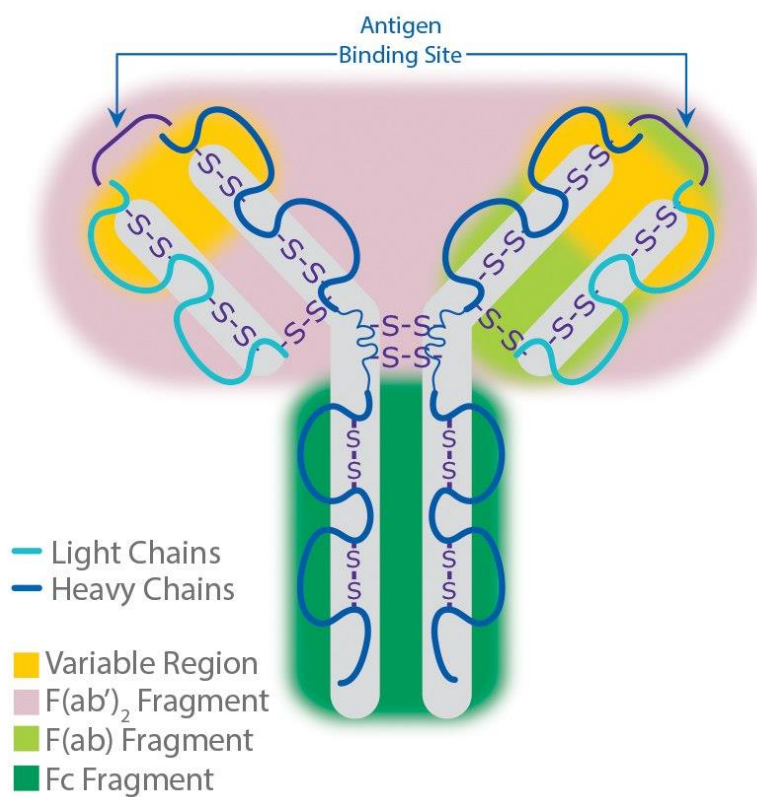
#### **2.1.1 Ορισμός**

Ένα αντίσωμα ορίζεται ως «μια ανοσοσφαιρίνη ικανή να συνδυαστεί συγκεκριμένα με το αντιγόνο που προκάλεσε την παραγωγή του σε ένα ευαίσθητο ζώο». Τα αντισώματα παράγονται από το σώμα ως απάντηση στην εισβολή ξένων μορίων στο σώμα. Ένα αντίσωμα, με συντομογραφία τα γράμματα Ab (από το antibody), αναφέρεται συνήθως ως ανοσοσφαιρίνη ή Ig. Οι ανθρώπινες ανοσοσφαιρίνες είναι μια ομάδα δομικά και λειτουργικά παρόμοιων γλυκοπρωτεϊνών (82-96% πρωτεΐνη και 4-18% υδατάνθρακες) που προσδίδουν χυμική ανοσία (Merck KGAA, 2021).

Τα αντισώματα υπάρχουν ως ένα ή περισσότερα αντίγραφα μιας μονάδας σχήματος Y, που αποτελείται από τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Κάθε Y περιέχει δύο πανομοιότυπα αντίγραφα μιας βαριάς αλυσίδας και δύο πανομοιότυπα αντίγραφα μιας

ελαφριάς αλυσίδας, τα οποία ονομάζονται ως τέτοια από τα σχετικά μοριακά τους βάρη (Merck KGAA, 2021).

Αυτή η μονάδα σχήματος Y αποτελείται από τους δύο μεταβλητούς, ειδικούς για αντιγόνο F(ab) βραχίονες, οι οποίοι είναι κρίσιμοι για την πραγματική δέσμευση αντιγόνου και τη σταθερή «ουρά» (tail) Fc που δεσμεύει τους υποδοχείς Fc των ανοσοκυττάρων και επίσης χρησιμεύει ως χρήσιμη «λαβή». Για χειρισμό του αντισώματος κατά τη διάρκεια των περισσότερων ανοσοχημικών διαδικασιών. Ο αριθμός των περιοχών F(ab) στο αντίσωμα καθορίζει και την υποκατηγορία του και καθορίζει το σθένος του αντισώματος (ο αριθμός των “βραχιόνων” με τους οποίους το αντίσωμα μπορεί να δεσμεύσει το αντιγόνο του) (Thermistor Scientific).



Εικόνα 1 Δομή ενός αντισώματος. Πηγή: ThermoFisher

Αυτές οι τρεις περιοχές μπορούν να διασπαστούν σε δύο θραύσματα (fragments) F(ab) και ένα Fc από το πρωτεολυτικό ένζυμο, παπαΐνη, ή σε δύο μόνο μέρη: ένα F(ab')<sub>2</sub> και ένα Fc στην περιοχή άρθρωσης, με πεψίνη

Τα αντισώματα (ανεξάρτητα από την κατηγορία ή την υποκατηγορία τους) παράγονται και καθορίζονται σε δύο βασικές μορφές για χρήση ως αντιδραστήρια σε ανοσοδοκιμασίες: πολυκλωνικά και μονοκλωνικά. Τυπικά, η ανοσολογική απόκριση σε ένα αντιγόνο είναι ετερογενής, με αποτέλεσμα πολλές διαφορετικές κυτταρικές σειρές B-

λεμφοκυττάρων (πρόδρομοι των πλασματοκυττάρων) να παράγουν αντισώματα στο ίδιο αντιγόνο (ThermoFisher, 2021).

Όλα αυτά τα κύτταρα προέρχονται από κοινά βλαστικά κύτταρα, ωστόσο το καθένα αναπτύσσει την ατομική ικανότητα να παράγει ένα αντίσωμα που αναγνωρίζει έναν συγκεκριμένο προσδιοριστή (επίτοπο) στο ίδιο αντιγόνο. Ως συνέπεια αυτής της ετερογενούς απόκρισης, ο ορός από ένα ανοσοποιημένο ζώο θα περιέχει πολυάριθμους κλώνους αντισωμάτων, ειδικούς για το αντιγόνο, δυνητικά πολλών διαφορετικών κατηγοριών και υποκατηγοριών ανοσοσφαιρίνης που περιλαμβάνουν γενικά από 2 έως 5% της συνολικής ανοσοσφαιρίνης (Alberts, 1983).

Επειδή περιέχει αυτήν την ετερογενή συλλογή ανοσοσφαιρινών που δεσμεύουν το αντιγόνο, ένα αντίσωμα που καθαρίζεται από ένα τέτοιο δείγμα ονομάζεται πολυκλωνικό αντίσωμα. Τα πολυκλωνικά αντισώματα, τα οποία γενικά καθορίζονται (purified) απευθείας από τον ορό, είναι ιδιαίτερα χρήσιμα ως επισημασμένα δευτερογενή αντισώματα σε ανοσοπροσδιορισμούς.

Επειδή ένα μεμονωμένο Β-λεμφοκύτταρο παράγει και εκκρίνει μόνο ένα συγκεκριμένο μόριο αντισώματος, οι κλώνοι των Β-λεμφοκυττάρων παράγουν μονοκλωνικά αντισώματα. Όλα τα αντισώματα που εκκρίνονται από έναν κλώνο Β-κυττάρων είναι πανομοιότυπα, παρέχοντας μια πηγή ομοιογενούς αντισώματος που έχει μια μοναδική καθορισμένη εξειδίκευση (Merck KGaA, 2021).

Ωστόσο, ενώ τα Β-λεμφοκύτταρα μπορούν να απομονωθούν από εναιωρήματα σπλήνας ή λεμφαδένων που αποκόπτονται από ανοσοποιημένα ζώα, έχουν περιορισμένο χρόνο ζωής και δεν μπορούν να καλλιεργηθούν απευθείας για να παράγουν αντίσωμα σε χρήσιμες ποσότητες. Ευτυχώς, αυτός ο περιορισμός έχει ξεπεραστεί με την ανάπτυξη της τεχνολογίας υβριδώματος (hybridoma technology), όπου τα απομονωμένα λεμφοκύτταρα Β σε εναιώρημα συγχωνεύονται με κύτταρα μυελώματος του ίδιου είδους (συνήθως ποντικού) για να δημιουργήσουν μονοκλωνικές υβριδικές κυτταρικές σειρές που είναι ουσιαστικά αθάνατες, διατηρώντας παράλληλα τις ικανότητες τους να παράγουν αντισώματα (ThermoFisher, 2021).

Τέτοια υβριδώματα μπορούν να αποθηκευτούν κατεψυγμένα και να καλλιεργηθούν όπως απαιτείται για την παραγωγή του ειδικού μονοκλωνικού αντισώματος. Τα μονοκλωνικά αντισώματα είναι ιδιαίτερα χρήσιμα ως πρωτογενή αντισώματα σε εφαρμογές που απαιτούν ειδικότητα ενός επιτόπου και αμετάβλητη παροχή για πολλά χρόνια χρήσης.

Οι κλώνοι υβριδώματος μπορούν να αναπτυχθούν σε κυτταρική καλλιέργεια για συλλογή αντισωμάτων από υγρό ασκίτη (ascites fluid).

### 2.1.2 Υποκατηγορίες

Τα αντισώματα μπορούν να χωριστούν σε πέντε κατηγορίες: IgG, IgM, IgA, IgD και IgE, με βάση τον αριθμό των Y και τον τύπο της βαριάς αλυσίδας. Βαριές αλυσίδες IgG, IgM, IgA, IgD και IgE, είναι γνωστές ως g, μ, a, d και e, αντίστοιχα. Οι ελαφρές αλυσίδες οποιουδήποτε αντισώματος μπορούν να ταξινομηθούν είτε ως τύπου κάπα (κ) είτε ως λάμδα (λ) (με βάση τις μικρές δομικές διαφορές πολυπεπτιδίου). Ωστόσο, η βαριά αλυσίδα καθορίζει την υποκατηγορία κάθε αντισώματος (ThermoFisher, 2021).

Οι υποκατηγορίες αντισωμάτων διαφέρουν ως προς τον αριθμό των δισουλφιδικών δεσμών και το μήκος της περιοχής της άρθρωσης (hinge region) της ανοσοσφαιρίνης. Το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο αντίσωμα στις ανοσοχημικές διαδικασίες είναι της κατηγορίας IgG επειδή αυτή είναι η κύρια κατηγορία ανοσοσφαιρίνης που απελευθερώνεται στον ορό.

Για τις κατηγορίες αντισωμάτων κάνει ιδιαίτερη αναφορά η ιστοσελίδα ανοσοδοκιμών της sigma Aldrich.

### IgA

Στο αίμα τα IgA υπάρχουν σε χαμηλά επίπεδα σε μονομερή μορφή. Είναι πιο ενεργά σε βλεννογονικές επιφάνειες όπου υπάρχουν σε διμερή μορφή και παρέχουν την πρωταρχική άμυνα στις βλεννογονικές επιφάνειες. Περισσότερη IgA παράγεται σε βλεννογονικές επενδύσεις από όλους τους άλλους τύπους αντισωμάτων σε συνδυασμό. Η κύρια λειτουργία του είναι να δρα ως εξουδετερωτικό αντίσωμα. Υψηλά επίπεδα IgA υπάρχουν στο σάλιο, στα δάκρυα και στο μητρικό γάλα.

Στους ανθρώπους είναι γνωστό ότι υπάρχουν δύο υπότυποι IgA, ενώ στους ποντικούς αναφέρεται μόνο μία μορφή. Το IgA1 μπορεί να αντιπροσωπεύει έως και το 85% της συνολικής IgA στον ορό. Η εκλεκτική ανεπάρκεια IgA είναι μια από τις πιο κοινές ασθένειες ανοσοανεπάρκειας που αυξάνει την ευαισθησία σε λοιμώξεις. Οι ελλείψεις IgA παρατηρούνται συνήθως σε ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα και αλλεργικές διαταραχές. Ο χρόνος ημίσειας ζωής του IgA είναι περίπου 5 ημέρες.

### IgD

Είναι ένα μονομερές αντίσωμα με δύο θέσεις σύνδεσης επιτόπων (**epitope binding site**) και βρίσκεται στην επιφάνεια των περισσότερων λεμφοκυττάρων B. Η ακριβής λειτουργία του εξακολουθεί να αμφισβητείται, αλλά προτείνεται ότι δρα ως υποδοχέας

αντιγόνου που απαιτείται για την ενεργοποίηση των Β κυττάρων. Το IgD αναφέρεται επίσης ότι συνδέεται με βασεόφιλα και μαστοκύτταρα και τα ενεργοποιεί για την παραγωγή αντιμικροβιακών παραγόντων.

Πιστεύεται επίσης ότι παίζει ρόλο στην εξάλειψη των Β-λεμφοκυττάρων που παράγουν αυτοαντιδραστικά αυτοαντισώματα. Η IgD παράγεται επίσης σε εκκρινόμενη μορφή που βρίσκεται στον ορό σε μικρές ποσότητες και περιέχει δύο βαριές αλυσίδες της κατηγορίας δ και δύο ελαφριές αλυσίδες. Το IgD έχει χρόνο ημίσειας ζωής περίπου 3 ημέρες.

### **IgE**

Αυτή η ομάδα αντισωμάτων δρα στις επιφάνειες των βλεννογόνων, στο αίμα και στους ιστούς. Είναι παρόν ως μονομερές που αποτελείται από δύο βαριές αλυσίδες (ε αλυσίδα) και δύο ελαφρές αλυσίδες. Η ε αλυσίδα ε περιέχει 4 σταθερούς τομείς (**domains**) που μοιάζουν με Ig. Στον ορό, υπάρχει σε χαμηλές συγκεντρώσεις συμβάλλοντας μόνο στο 0,002% περίπου των συνολικών αντισωμάτων ορού.

### **IgG**

Αυτή είναι η πιο άφθονη κατηγορία αντισωμάτων στο αίμα, που περιλαμβάνει έως και το 80% των συνολικών αντισωμάτων στον ορό. Υπάρχει σε μονομερή μορφή. Τέσσερις υποκατηγορίες IgG έχουν περιγραφεί ανάλογα με την αφθονία τους (IgG1> IgG2> IgG3> IgG4) και η υποκατηγορία που παράγεται εξαρτάται από τον τύπο της κυτοκίνης που υπάρχει.

Τα IgG1 και IgG3 παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια για τους υποδοχείς Fc στα φαγοκύτταρα, ενώ το IgG2 παρουσιάζει πολύ χαμηλή συγγένεια και το IgG4 έχει μέτρια συγγένεια για τους υποδοχείς Fc. Τα IgG είναι ικανά να εξέλθουν από το κυκλοφορικό σύστημα και να εισέλθουν στους ιστούς. Τα IgG1, IgG3 και IgG4 μπορούν να διασχίσουν τον φραγμό του πλακούντα για να παρέχουν προστασία στα νεογνήτα. Τα IgG είναι αποτελεσματικά στην ενεργοποίηση του συστήματος συμπληρώματος και είναι πολύ αποτελεσματικά για οψονισμό χρησιμοποιώντας Fc υποδοχείς σε φαγοκύτταρα.

### **IgM**

Αυτή η κατηγορία αντισώματος παράγεται πρώτα ως απάντηση στη μόλυνση και βρίσκεται είτε σε μεμβράνες Β κυττάρων είτε ως μακρομόριο 5 υπομονάδων (5 subunit macromolecule) που εκκρίνεται από τα πλασματοκύτταρα. Είναι επίσης η πρώτη κατηγορία ανοσοσφαιρινών που συντίθεται από τα νεογνά. Η επιφανειακή IgM διαφέρει από την

εκκρινόμενη μορφή στην περιοχή Fc της. Η επιφανειακή IgM συνδέεται άμεσα ως πρωτεΐνη μεμβράνης και όχι με τον υποδοχέα IgM Fc. Το εκκρινόμενο IgM είναι ένα πενταμερές μόριο όπου πολλαπλές ανοσοσφαιρίνες συνδέονται ομοιοπολικά με δισουλφιδικούς δεσμούς. Αυτή η δομή παρέχει πολλαπλές θέσεις σύνδεσης. Κάθε μονομερές αποτελείται από δύο ελαφρές αλυσίδες (είτε κ είτε λ) και δύο βαριές αλυσίδες.

### **2.1.3 Αντισώματα στον έλεγχο αντισωμάτων για τη νόσο Covid-19**

Η έκθεση σε ιούς συχνά έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή αντισωμάτων ειδικά για το συγκεκριμένο ιικό σωματίδιο. Τα αντισώματα είναι ένα σήμα ότι το ανοσοποιητικό σύστημα έχει ενεργοποιηθεί και ορισμένα είναι σε θέση να εξουδετερώσουν τον ιό δημιουργώντας δεσμούς με πρωτεΐνες ή άλλα μόρια στην επιφάνεια του ιικού σωματιδίου, διακόπτοντας τον κύκλο της μόλυνσης (Bailey, 2020).

Αυτό συχνά σημαίνει ότι η επακόλουθη έκθεση στον ίδιο ιό μπορεί να προκαλέσει ανοσολογική μνήμη, με αποτέλεσμα την ταχεία παραγωγή των ίδιων εξουδετερωτικών αντισωμάτων για την επίθεση στον ιό και την ανάκαμψη από τη μόλυνση. Μέχρι στιγμής, η έρευνα έχει εντοπίσει αντισώματα ειδικά για τις επιφανειακές πρωτεΐνες του ιού SARS-CoV2 σε άτομα που βρέθηκαν θετικά στον ιό, αλλά παρά την ταχύτητα της προόδου, δεν έχει αποδειχθεί ακόμη αν αυτά τα αντισώματα είναι ικανά να προσδώσουν ανοσία σε κάποιον που στη συνέχεια εκτέθηκε εκ νέου στον ιό, και αν ναι, για πόσο καιρό θα διαρκέσει αυτή η ανοσία (Bailey, 2020).

Παρ' όλα αυτά, η παρουσία αντισωμάτων στην κυκλοφορία του αίματος μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης του ποσοστού του πληθυσμού που έχει εκτεθεί στον SARS-CoV2. Όσοι δεν εμφανίζουν αντισώματα στην κυκλοφορία του αίματός τους μπορεί να είναι ευάλωτοι σε ένα δεύτερο κύμα του ιού. Διαγνωστικά τεστ, τα οποία μπορούν να εντοπίσουν και να μετρήσουν με ακρίβεια την παρουσία και το επίπεδο αντισωμάτων στα δείγματα αίματος, είναι διαθέσιμα και ορισμένα έχουν εγκριθεί από ρυθμιστικές υπηρεσίες (Bailey, 2020)

### **2.2 Ανοσοδοκιμές**

Αν και οι βιοδοκιμασίες διέθεταν επαρκή ευαισθησία (**sensitivity**), υπήρχαν προβλήματα με την έλλειψη ειδικότητας (**specificity**) (Hermann, Ollert, Ring, 2005). Άλλες αναλυτικές διαδικασίες όπως υγρή χρωματογραφία, ηλεκτροφόρηση ή φωτομετρικές διαδικασίες έχουν επίσης αναπτυχθεί για in vitro διάγνωση. Ωστόσο, αυτές οι προσεγγίσεις είναι είτε κουραστικές και χρονοβόρες είτε απαιτούν ακριβό εξοπλισμό και ειδικά εκπαιδευμένο προσωπικό.

Ορόσημο στη διάγνωση ήταν η εισαγωγή ανοσοδοκιμασιών, οι οποίες είναι φθηνές και εύκολες να εκτελεστούν με υψηλή αναπαραγωγιμότητα (reproducibility), ευαισθησία (sensitivity) και ειδικότητα (specificity)(Herman, Ollert, Ring, 2005).

Οι ανοσοδοκιμασίες βασίζονται σε μια αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος που χρησιμοποιεί την εξαιρετική ικανότητα του ανοσοποιητικού συστήματος να παράγει συγκεκριμένες αντιδράσεις ανάμεσα σε αντιγόνα/αντισώματα που μπορούν να αναγνωρίσουν και να διακρίνουν έναν πρακτικά άπειρο αριθμό ξένων ενώσεων (Peterson et al, 2004). Η βασική απαίτηση για τη δημιουργία μίας ανοσοδοκιμασίας είναι η παραγωγή ενός συγκεκριμένου αντισώματος σε ένα δεδομένο αντιγόνο.

Ενώσεις υψηλού μοριακού βάρους όπως οι πρωτεΐνες είναι συνήθως ανοσογονικές και μπορεί να χρησιμεύσουν ως αντιγόνο το οποίο μπορεί να εγχυθεί απευθείας στο ζώο/ξενιστή για την παραγωγή αντισωμάτων (Petersen et al, 2004). Αντίθετα, ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους όπως φάρμακα, πεπτίδια ή στεροειδή δεν προκαλούν ανοσοαποκρίσεις (Petersen et al, 2004).

Τα αντισώματα που λαμβάνονται από τον ορό μετά από αρκετές επαναληπτικές “αναμνηστικές” ενέσεις με το ανοσογόνο είναι ετερογενή- πολυκλωνικά αντισώματα (pAbs). Μια πιο εξελιγμένη προσέγγιση ήταν η δημιουργία μονοκλωνικών αντισωμάτων (MAbs), η οποία εισήχθη για πρώτη φορά από τους Köhler και Milstein το 1975 (όπως αναφέρεται στους Hermann, Ollert, Ring, 2005). Αυτή η τεχνική επιτρέπει την παραγωγή ομογενών αντισωμάτων σε σχεδόν άπειρες ποσότητες με υψηλή αντιγονική ειδικότητα (specificity) για ένα συγκεκριμένο αντιγόνο.

Η μέθοδος περιλαμβάνει την απομόνωση των σπληνικών κυττάρων από ένα ανοσοποιημένο ζώο που περιέχει Β-κύτταρα που παράγουν αντισώματα. Τα Β-κύτταρα στη συνέχεια συγχωνεύονται με κύτταρα μυελώματος. Μετά την επιλογή και τον έλεγχο της επιθυμητής κυτταρικής σειράς έκκρισης αντισώματος (υβρίδωμα), το αντίσωμα (Ab) μπορεί να συλλεχθεί στο υπερκείμενο (supernatant). Αυτά τα υβριδώματα μπορούν να αναπτυχθούν σε μεγάλους όγκους για την παραγωγή τεράστιων ποσοτήτων του μονοκλωνικού αντισώματος.

### **2.3. Κλινική χρήση**

Βασικό για τον χαρακτηρισμό των παραγόμενων αντισωμάτων είναι η υψηλή συγγένεια, η ειδικότητα και η ευαισθησία. Η συγγένεια είναι ένα μέτρο της ισχύος της δεσμευτικής αλληλεπίδρασης μεταξύ του αντιγόνου και του αντισώματος και μπορεί να προσδιοριστεί πειραματικά (Hamilton, 2003) σύμφωνα με τον νόμο της δράσης/μάζας,



εκφράζεται ως σταθερά ισορροπίας διάστασης,  $K_d$  (mol/L), ή ένωση,  $K_a$  (L/mol). Όσο χαμηλότερη είναι η  $K_d$  τόσο μεγαλύτερη είναι η συγγένεια. Η ειδικότητα εξαρτάται από την αναγνώριση του αναλύτη από το αντίσωμα και την έκταση της διασταυρούμενης αντίδρασης με στενά συνδεδεμένους ή δομικά παρόμοιους αναλύτες (analytes)(Hamilton, 2003).

Όσο μικρότερη είναι η διασταυρούμενη αντίδραση, τόσο μεγαλύτερη είναι η ειδικότητα του αντισώματος. Αυτό με τη σειρά του σχετίζεται στενά με την ικανότητα του αντισώματος να κάνει διάκριση μεταξύ αρνητικών και θετικών δειγμάτων. Η ευαισθησία περιγράφει το όριο ανίχνευσης και ορίζεται από την καμπύλη δόσης-απόκρισης του αντιγόνου στο αντίσωμα. Όσο χαμηλότερο είναι το όριο ανίχνευσης, τόσο μεγαλύτερη είναι η ευαισθησία (Hamilton, 2003).

Αρχικά, ο εντοπισμός και ο χαρακτηρισμός (identification and characterization) συγκεκριμένων αντισωμάτων που σχετίζονται με παθοφυσιολογικές καταστάσεις γενικά περιορίστηκαν στο να εξυπηρετούν μόνο επιστημονικούς σκοπούς (Hamilton, 2003). Ωστόσο, σε πολλές περιπτώσεις η μέτρηση συγκεκριμένων αντισωμάτων εξελίχθηκε σε κλινικά πολύτιμους διαγνωστικούς δείκτες για την υγεία και τις ασθένειες. Ιατρικές περιστάσεις στις οποίες χρησιμοποιείται συνήθως ο προσδιορισμός συγκεκριμένων αντισωμάτων είναι βακτηριακές και ιογενείς λοιμώξεις, μόλυνση από παράσιτα, αυτοάνοσα νοσήματα και αλλεργίες (Hamilton, 2003).

Οι Ollert και Ring (2005) αναφέρουν ότι ο προσδιορισμός των αντισωμάτων σε μολυσματικές ασθένειες είναι γνωστός και χρησιμοποιείται εδώ και πολύ καιρό. Τα ειδικά αντισώματα βακτηρίων της κατηγορίας IgG και IgM ανιχνεύονται συνήθως στον ορό ασθενών που έχουν μολυνθεί με διαφορετικά βακτήρια όπως *Borrelia burgdorferi* (ασθένεια του Lyme), *Chlamydia trachomatis* (σεξουαλικά μεταδιδόμενη λοίμωξη του ουρογεννητικού συστήματος), *Legionella pneumophila*, *Staphylococcus* και *Streptococcus* και *Treponema pallidum*.

Η αξιολόγηση των IgG και IgM Abs είναι επίσης μια πολύτιμη παράμετρος στη διάγνωση των ιογενών λοιμώξεων όπως σε ηπατίτιδα, ιλαρά, επιδημική παρωτίτιδα, λύσσα και σε λοιμώξεις από τον ιό Epstein-Barr (λοιμώδη μονοκυρήνωση), τον ιό έρπητα (απλός έρπης και έρπης ζωστήρας) και arbovirus.

Οι προσβολές από παράσιτα που οδηγούν σε ασθένειες όπως η λειψμανίαση, η αμοιβάδα, η ελονοσία, η τοξοπλάσμωση, η σχιστοσωμίαση, η εχινοκοκκίαση, η τριχινέλλωση, η φιλαρίαση ή άλλα μπορεί να προκαλέσουν τον σχηματισμό αντισωμάτων

διαφορετικών κατηγοριών Ig. Στη διάγνωση της παρασίτωσης, συνιστάται να εξακριβωθεί πρώτα η ταυτότητα του παρασίτου. Επιπλέον, είναι διαθέσιμες ορολογικές μέθοδοι για τον εντοπισμό κυκλοφορούντων αντιγόνων (circulating antigens), συμπλεγμάτων αντιγόνου-αντισώματος ή κυκλοφορούντων αντισωμάτων

## **2.4 Μέθοδοι ανίχνευσης αντισωμάτων**

Η ανίχνευση αντισωμάτων στην κυκλοφορία του αίματος ή σε ιστούς έχει γίνει ένα χρήσιμο αναλυτικό εργαλείο για την in vitro ανοσοδιάγνωση πολλών ασθενειών. Διάφορες ανοσολογικές τεχνικές είναι διαθέσιμες για την τακτική ταυτοποίηση των τάξεων IgA, IgD, IgE, IgG ή IgM Ab στο εργαστήριο κλινικής χημείας. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μέθοδοι συζητούνται εν συντομία παρακάτω (Hamilton, 2003):

### **2.4.1 Ανοσοπροσοφητικές δοκιμές**

Για τις ανοσοπροσοφητικές δοκιμές γράφουν οι Herman, Ollert και Ring (2005): Οι τεχνικές ανοσοπροσοφητικής δοκιμασίας (IAA) χρησιμοποιούνται ευρέως για την ποσοτική μέτρηση των IgE και IgG αντισωμάτων στον ορό. Ένα αντιγόνο, π.χ., εκχύλισμα αλλεργιογόνου από κρέας κοτόπουλου, γύρη γλόης ή δέντρου ή ακάρεα οικιακής σκόνης, προσαρτάται σε αδρανή μήτρα (matrix) όπως το τοίχωμα φιαλιδίου αντίδρασης ή συνδέεται χημικά με χάρτινο δίσκο. Ο ορός ενός αλλεργικού ασθενούς επωάζεται σε αντίδραση πρώτου σταδίου με τη μήτρα επικαλυμμένη με αλλεργιογόνο.

Τα μόρια IgE που αναγνωρίζουν το αλλεργιογόνο είναι δεσμευμένα. Μετά την απομάκρυνση της περίσσειας ορού, προστίθεται ένα δευτερεύον αντίσωμα, στην περίπτωση αυτή ένα IgE αντίσωμα που εκτρέφεται σε ποντίκια, κουνέλια, κατσίκες ή άλογα, το οποίο σχηματίζει ένα σύμπλεγμα αλλεργιογόνου-IgE-αντισώματος (αντίδραση δεύτερου σταδίου). Η περίσσεια του δευτερεύοντος αντισώματος αφαιρείται επίσης με πλύσιμο.

Ο σχηματισμός του συμπλέγματος αλλεργιογόνου-IgE-αντι-IgE-αντίσωμα εξαρτάται από την ποσότητα ειδικής IgE που υπάρχει στο δείγμα ορού. Δεδομένου ότι το δευτερογενές αντίσωμα που ονομάζεται επίσης ανίχνευση αντισώματος, φέρει μία ομοιοπολικός συζευγμένη ετικέτα (covalently coupled tag), ο σχηματισμός του συμπλέγματος αλλεργιογόνου-IgE-anti-IgE Ab, μία δομής που θυμίζει σάντουιτς, μπορεί να παρατηρηθεί.

Χρησιμοποιώντας μια τυπική καμπύλη με αυξανόμενες συγκεντρώσεις των αλλεργιογόνων ή, όπως στις περισσότερες εμπορικές ειδικές δοκιμασίες IgE, με διάφορες ποσότητες της Διεθνούς Προετοιμασίας Αναφοράς του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας για IgE, το σήμα που λαμβάνεται με σύμπλεγμα αλλεργιογόνου-IgE-αντι-IgE Ab στο δείγμα

ορού μπορεί να συγκριθεί με το σήμα της τυπικής καμπύλης, που επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό των IgE αντισωμάτων.

Η ραδιο-αλλεργιο-απορροφητική δοκιμή (RAST) είναι μια ραδιοανοσοπροσδιοριζόμενη (RIA) έκδοση στην οποία τα αλλεργιογόνα συνδέονται χημικά με ένα χάρτινο δίσκο (paper disc) και το δευτερεύον αντίσωμα είναι ραδιενεργά επισημασμένο με I-125. Ομοίως, η δοκιμασία μπορεί να πραγματοποιηθεί ως ενζυμική ανοσοδοκιμή (ΜΠΕ) στην οποία το δευτερογενές αντίσωμα είναι επισημασμένο με το ένζυμο β-γαλακτοσιδάση το οποίο μπορεί να αντιδράσει με ένα άχρωμο υπόδειγμα (substrate) για να σχηματίσει ένα χρωματιστό προϊόν αντίδρασης. Εκτός από το RAST ή το EAST, μπορεί να πραγματοποιηθεί δοκιμασία αναστολής RAST ή EAST για επιβεβαίωση και επικύρωση των αποτελεσμάτων

Τα δείγματα ορού επωάζονται πρώτα in vitro με αυξανόμενες συγκεντρώσεις των αλλεργιογόνων πριν από το RAST ή το EAST. Η δεσμευτική αναστολή (binding inhibition) του αντισώματος μπορεί να απεικονιστεί με μια καμπύλη απόκρισης δόσης που συσχετίζεται αντιστρόφως με τη συγκέντρωση των προστιθέμενων αλλεργιογόνων. Οι χαμηλές συγκεντρώσεις αλλεργιογόνων εξακολουθούν να δίνουν υψηλό σήμα στο RAST ή το EAST, ενώ το σήμα εξαφανίζεται με υψηλές συγκεντρώσεις. Η συγκέντρωση του αλλεργιογόνου σε αναστολή 50% μπορεί να υπολογιστεί από την καμπύλη απόκρισης δόσης

Μια περαιτέρω ανάπτυξη του RAST ή EAST ήταν η εισαγωγή ενός τρισδιάστατου σφουγγαριού κυτταρίνης αντί του δίσκου χαρτιού. Αυτή η προσέγγιση εφαρμόζεται από το σύστημα ImmunoCAP (Pharmacia Uppsala). Η δοκιμασία ImmunoCAP πραγματοποιείται σε πλάκες μικροτιτλοδότησης (microtiter plates) και επιτρέπει τη μερική έως πλήρη αυτοματοποίηση της δοκιμασίας. Τα πλεονεκτήματα είναι η υψηλότερη ικανότητα σύνδεσης των σφουγγαριών κυτταρίνης (CAP) και η χρήση της φωτομετρικής ανίχνευσης του συμπλέγματος αλλεργιογόνου-IgE-αντι-IgE αντισώματος με έναν αναγνώστη μικροπλακών.

Πλήρης αυτοματοποίηση του συστήματος CAP για ανίχνευση IgE επιτεύχθηκε με τις πιο πρόσφατες εξελίξεις (UniCAP250 και 1000). Έχουν γίνει παραλλαγές και τροποποιήσεις αυτής της βασικής μορφής ανάλυσης σε σχέση με τα χαρακτηριστικά των αλλεργιογόνων, π.χ. χρήση αλλεργιογόνων σε υγρή φάση και αντικατάσταση του επισημασμένου με β-γαλακτοσιδάση δευτερογενούς αντισώματος με αντίσωμα που είναι χημικά συνδεδεμένο με ALP. Αυτή η μοναδική ιδέα υλοποιείται σε διάφορες μορφές δοκιμασίας.

Η τεχνολογία AlaSTAT υγρού αλλεργιογόνου [Diagnostic Product Corporation (DPC), Los Angeles, CA, USA (Shami, 2016) βασίζεται σε αντίδραση τεσσάρων βημάτων. Στην πρώτη επώαση, τα βιοτινυλιωμένα αλλεργιογόνα αντιδρούν με την IgE του ορού των ασθενών. Στη δεύτερη επώαση, προστίθεται αβιδίνη που σχηματίζει ένα σύμπλεγμα μεταξύ των βιοτινυλιωμένων αλλεργιογόνων και της IgE. Στην τρίτη επώαση, προστίθεται ένα ενζυμωμένο δευτερεύον αντι-IgE Ab για να σχηματίσει ένα σάντουιτς μεταξύ της βιοτίνης του δοχείου αντίδρασης, αβιδίνης, του βιοτινυλιωμένου αλλεργιογόνου και τα ειδικά για τα αλλεργιογόνα IgE Abs.

Τέλος, ο σχηματισμός του συμπλέγματος τριπλού σάντουιτς μπορεί να παρακολουθείται φωτομετρικά με την ενζυματική μετατροπή του υπό-δείγματος σε χρωματιστό προϊόν. Μια διαφορετική τεχνολογία ανάλυσης πραγματοποιείται στο Διαγνωστικό Σύστημα Αλλεργίας Πρόσβασης (Sanofi Diagnostics Pasteur) (Shami, 2016). Ο προσδιορισμός είναι επίσης ένας προσδιορισμός υγρής φάσης που χρησιμοποιεί παραμαγνητικά σφαιρίδια πολυστυρολίου επικαλυμμένα με αντιβιοτίνη αντισώματος ως ένα αντίσωμα που συλλαμβάνει.

Σε μια αντίδραση πρώτου σταδίου, τα βιοτινυλιωμένα αλλεργιογόνα και τα ειδικά για τα αλλεργιογόνα IgE σχηματίζουν ένα σύμπλεγμα τριπλού ‘‘σάντουιτς’’ μεταξύ των χαντρών πολυστερίνης, αλλεργιογόνου και το IgE. Η δεύτερη αντίδραση είναι η επώαση με ένα αντι-ανθρώπινο IgE Ab (δευτερογενές αντίσωμα) επισημασμένο με ALP, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός τετραπλού σάντουιτς (σφαιρίδια παραμαγνητικής πολυστερίνης, αλλεργιογόνα, IgE και αντι-IgE) (Shami, 2016).

Το δευτερεύον αντίσωμα αφαιρείται επίσης με μαγνητικό πεδίο. Τέλος, προστίθεται διοξετάνιο-φωσφορικό υπόστρωμα το οποίο μετατρέπεται με ALP σε χημειοφωταύγειο προϊόν το οποίο μπορεί να ποσοτικοποιηθεί σε φωτομετρητή. Ελλείπει αναγνωρισμένης μεθόδου αναφοράς για τη μέτρηση in vitro sIgE, η τεχνολογία ImmunoCAP δεύτερης γενιάς της Pharmacia Upsala έγινε πρότυπο λόγω της ευρείας χρήσης, της αναλυτικής αξιοπιστίας και της γενικά επαρκούς αντιστοιχίας των αποτελεσμάτων της-σε θετικό/αρνητικό βάση - με τα αποτελέσματα των δοκιμών δέρματος (Hamilton, 2003).

Από την έναρξή τους, ωστόσο, είναι εμφανείς ορισμένοι περιορισμοί των συστημάτων δοκιμής δεύτερης γενιάς για το sIgE. Είναι δύσκολα σαν δοκιμές και απαιτούν ειδικά εκπαιδευμένο προσωπικό, καθιστώντας τα δαπανηρά για το εργαστήριο και δυνητικά πιο επιρρεπή σε ανθρώπινο λάθος από ένα πλήρως αυτοματοποιημένο σύστημα με barcoding όπως χρησιμοποιείται στα περισσότερα άλλα πεδία της κλινικής χημείας (Shami, 2013).

Επιπλέον, ο χρόνος ανάκαμψης ( $\geq 3$  ώρες) εξακολουθεί να είναι ανεπιθύμητα αργός από την άποψη του ειδικού αλλεργιολόγου. Τα συστήματα «τρίτης γενιάς» για την *in vitro* μέτρηση του sIgE, που αντιμετωπίζουν τους σημαντικότερους περιορισμούς που σχετίζονται με τις δοκιμές δεύτερης γενιάς, έχουν τελικά αναπτυχθεί (Peterson, 2003).. Αυτά βασίζονται σε αποδεδειγμένη τεχνολογία, έχουν σημαντικά μικρότερους χρόνους περιστροφής και χρησιμοποιούν χημειοφωταύγεια. Η πρώτη πλήρως αυτοματοποιημένη δοκιμή τυχαίας προσπέλασης που έγινε διαθέσιμη είναι η IMMULITE® 2000 Allergy (IML) της DPC (Ollert, 2005), η οποία αντιπροσωπεύει την εφαρμογή της διαδικασίας δοκιμών sIgE σε μια οικογένεια συστημάτων που έχουν ήδη εδραιωθεί στην κλινική χημεία για τη διεξαγωγή ανοσοδοκιμασιών και ανοσομετρικών δοκιμασιών, τόσο σε νοσοκομειακές όσο και σε εργαστηριακές ρυθμίσεις αναφοράς.

Η IML έχει εύρος λειτουργίας από 0,10 έως 100 kU/L και χρησιμοποιεί τη χημεία υγρών αλλεργιογόνων του DPC μαζί με την τεχνολογία Immulite bead and wash και ένα ενζυμικά ενισχυμένο σύστημα ανίχνευσης χημειοφωταύγειας (Ollert, 2005).

### **3. Διασταυρούμενη αντίδραση αντισώματος: Η μελέτη των Lv et al (2020)**

#### **3.1 Ερευνητικό ερώτημα-Μεθοδολογία**

Ένα σημαντικό ανοσολογικό ερώτημα αφορά τις αντιγονικές διαφορές μεταξύ του SARS-CoV-2 και του SARS-CoV. Το ερώτημα αντιμετωπίστηκε με ανάλυση πλάσματος από ασθενείς που είχαν μολυνθεί από SARS-CoV-2 ή SARS-CoV και από μολυσμένα ή ανοσοποιημένα ποντίκια σε μια μελέτη που διεξήχθη από τους Lv et al το 2020 και τα αποτελέσματά τους δείχνουν ότι, αν και η διασταυρούμενη αντιδραστικότητα στο αντίσωμα που συνδέεται με την spike πρωτεΐνη είναι κοινή, η διασταυρούμενη εξουδετέρωση των ζωντανών ιών μπορεί να είναι σπάνια, υποδεικνύοντας την παρουσία μιας μη εξουδετερωτικής απόκρισης αντισώματος σε συντηρημένα επιτόπια στην spike.

Το αν μια τέτοια χαμηλή ή μη εξουδετερωτική απόκριση αντισώματος οδηγεί σε ενίσχυση της ασθένειας που εξαρτάται από τα αντισώματα πρέπει να εξεταστεί στο μέλλον. Συνολικά, αυτή η μελέτη όχι μόνο ασχολήθηκε με ένα θεμελιώδες ερώτημα σχετικά με τις διαφορές αντιγονικότητας (antigenicity differences) μεταξύ του SARS-CoV-2 και του SARS-CoV, αλλά έχει επίσης επιπτώσεις στον σχεδιασμό του ανοσογόνου και στην ανάπτυξη εμβολίων.

Η φυλογενετική ανάλυση έδειξε ότι ο SARS-CoV-2 και ο SARS-CoV, ένας κορωνοϊός που προκάλεσε επίσης παγκόσμιο ξέσπασμα το 2003, συνδέονται στενά φυλογενετικά, με γονιδιωματική νουκλεοτιδική αλληλουχία της τάξεως του 80% (Wu et al.,

2020), (Zhou et al., 2020). Επιπλέον, και οι δύο ιοί χρησιμοποιούν το ένζυμο μετατροπής αγγειοτενσίνης 2 (ACE2) ως υποδοχέα εισόδου και μόλυνσης των κυττάρων (Hoffmann et al., 2020).

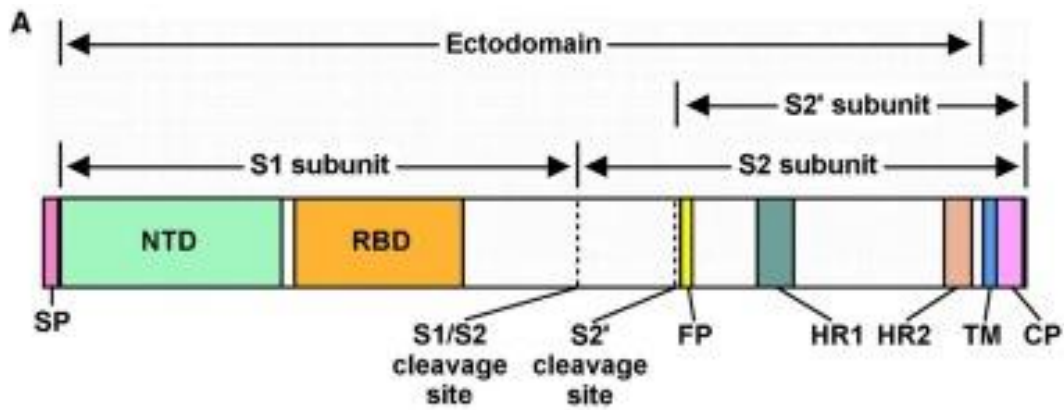
Η γλυκοπρωτεΐνη spike στην επιφάνεια των κορωνοϊών είναι απαραίτητη για την είσοδο του ιού μέσω σύνδεσης Υποδοχέα ACE2 και για ιική σύντηξη με το κύτταρο ξενιστή. Η πρωτεΐνη S σχηματίζει ένα ομοτριμερές (Homotrimer) στο οποίο κάθε πρωτομερές αποτελείται από δύο υπομονάδες, S1 και S2. Η δέσμευση της περιοχής δέσμευσης υποδοχέα (RBD) στην υπομονάδα S1 με τον υποδοχέα ACE2 προκαλεί μια διαμορφωτική αλλαγή στην πρωτεΐνη S που στη συνέχεια ξεκινά γεγονότα σύντηξης (membrane fusion events) μεμβράνης με το κύτταρο ξενιστή (Chen et al, 2005).

Το RBD είναι επίσης ένας πρωταρχικός στόχος της αντίδρασης αντισωμάτων στη χυμική ανοσία και πιστεύεται ότι είναι η κύρια προστατευτική αντιγονική περιοχή στον SARSCoV (Chen et al., 2005).

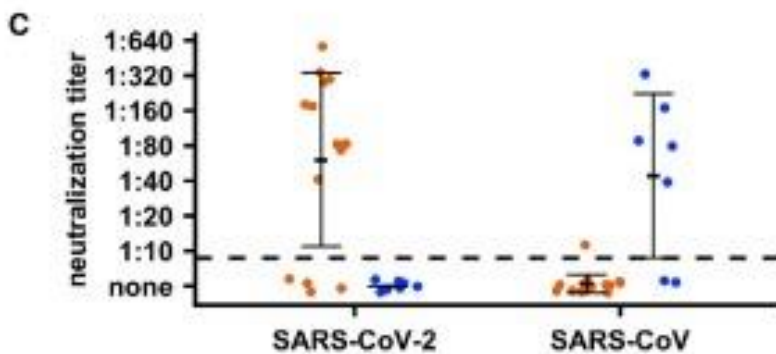
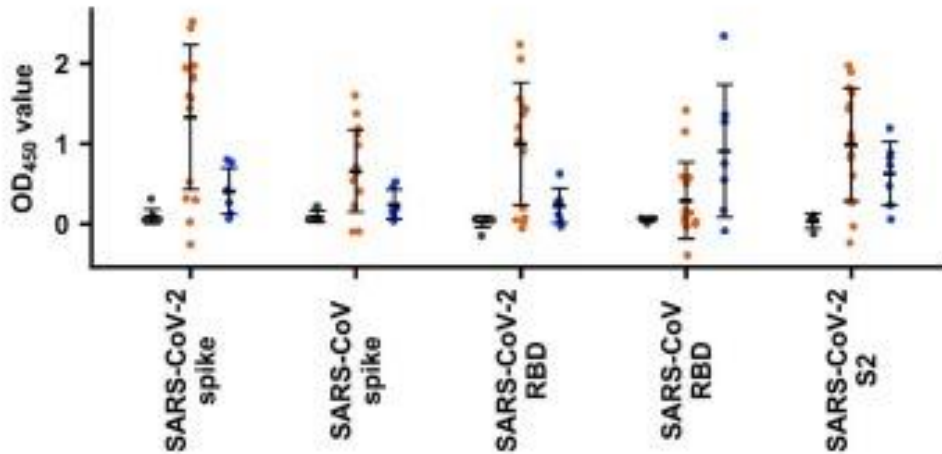
Η δομή πρόπτωσης της πρωτεΐνης S του SARS-CoV-2 προσδιορίστηκε πρόσφατα με κρυογονική ηλεκτρονική μικροσκόπηση (Cryo-EM) (Wrapp et al., 2020) και αποκάλυψε μια συνολική δομική ομοιότητα με εκείνη του SARS-CoV. Ωστόσο, τα περισσότερα μονοκλωνικά αντισώματα που έχουν δοκιμαστεί μέχρι σήμερα και στοχεύουν στο RBD του SARS-CoV δεν έχουν συνδεθεί με το RBD του SARS-CoV-2 (Wrapp et al., 2020), υποδηλώνοντας ότι η αντιγονικότητα αυτών των δύο ιών στο RBD είναι αρκετά διακριτή.

Μέχρι στιγμής, δεν έχουν ακόμη αναφερθεί δεδομένα από πολυκλωνικούς ανθρώπινους ορούς από ασθενείς για την αξιολόγηση της απόκρισης αντισώματος που προκλήθηκε από τη μόλυνση SARS-CoV-2 και για να καθοριστεί εάν μπορούν να δημιουργηθούν διασταυρούμενες αντιδράσεις αντισωμάτων μεταξύ SARS-CoV-2 και SARS-CoV.

Στην μελέτη των Lv et al (2020) εξετάστηκαν οι αποκρίσεις αντισωμάτων σε 15 ασθενείς από το Χονγκ Κονγκ που είχαν μολυνθεί από SARS-CoV-2 και επτά που είχαν μολυνθεί από SARS-CoV



B • Healthy • SARS-CoV-2-infected • SARS-CoV-infected



Εικόνα 2(A) Σχηματικό διάγραμμα της ακμής του SARS-CoV-2 (A) Σχηματικό διάγραμμα της spike πρωτεΐνης του SARS-CoV-2..

(B και Γ) Η μέτρηση της δέσμευση πλάσματος από υγιείς δότες και ασθενείς μολυσμένους με SARS-CoV-2. SARS-CoV-2 spike πρωτεΐνη,, πρωτεΐνη SARS-CoV-2 RBD, υπομονάδα SARSCoV-2 S2, spike πρωτεΐνη SARS-CoV και πρωτεΐνη SARS-CoV RBD μετρήθηκε με ELISA (B). Οι μέσες τιμές OD450 υπολογίστηκαν μετά τον έλεγχο σε κάθε δείγμα πλάσματος εις τριπλούν. (C) Δραστηριότητες εξουδετέρωσης πλάσματος από ασθενείς που έχουν μολυνθεί από SARS-CoV2 σε SARS-CoV-2 και SARS-CoV. Η διακεκομμένη γραμμή αντιπροσωπεύει το χαμηλότερο όριο ανίχνευσης.

**Οι μαύρες γραμμές υποδεικνύουν μέσα  $\pm$  SD (B και Γ) Οι γκρι γραμμές υποδεικνύουν, δείγματα πλάσματος από υγιή άτομα, οι πορτοκαλί, δείγματα πλάσματος από SARS-CoV-2- μολυσμένους ασθενείς, οι μπλε, δείγματα πλάσματος από ασθενείς μολυσμένους με SARS-CoV. Η τιμή από κάθε τελεία στο ο αριθμός λήφθηκε με τη βοήθεια δύο επαναλήψεων στον ίδιο προσδιορισμό. Πηγή: Lv et al, 2020.**

### **3.2 Αποτελέσματα της μελέτης**

Ποντίκια μολυσμένα ή ανοσοποιημένα με SARS-CoV-2 ή SARS-CoV χρησιμοποιήθηκαν επίσης για να διερευνηθεί η διασταυρούμενη αντιδραστικότητα των αποκρίσεων αντισωμάτων μεταξύ του SARS-CoV-2 και του SARS-CoV.

Δεκαπέντε δείγματα πλάσματος με αντιπηκτική ηπαρίνη (από την 2η έως την 22η ημέρα μετά την έναρξη των συμπτωμάτων) από ασθενείς που είχαν μολυνθεί με SARS-CoV-2 αναλύθηκαν, με δείγματα πλάσματος από υγιείς δότες που συλλέχθηκαν από τον Ερυθρό Σταυρό του Χονγκ Κονγκ. Αυτή η έρευνα έδειξε ότι οι αποκρίσεις αντισωμάτων στην ομάδα ασθενών που έχουν μολυνθεί με SARS-CoV-2 δημιουργούνται τόσο στην πρωτεΐνη S όσο και στην RBD στους περισσότερους ασθενείς.

Επιπλέον, η διασταυρούμενη αντίδραση δέσμευσης αντιγόνου με τον SARS-CoV μπορεί να ανιχνευθεί σε αυτά τα δείγματα πλάσματος καθώς και σε μελέτες σε ποντίκια. Αυτές οι διασταυρώσιμες αντιδράσεις αντισωμάτων στοχεύουν τόσο τις περιοχές RBD όσο και τις μη-RBD περιοχές. Αν και βρέθηκε διατήρηση υψηλότερης αλληλουχίας μεταξύ των S2 υπομονάδων του SARS-CoV-2 και του SARS-CoV (ταυτότητα αλληλουχίας αμινοξέων της τάξης του 90%) σε σύγκριση με εκείνη των RBDs τους (73% ταυτότητα αλληλουχίας αμινοξέων, ορισμένα SARS-CoV -2 μολυσμένοι ασθενείς μπόρεσαν να παράγουν διασταυρούμενα αντιδραστικά αντισώματα που συνδέονται με το SARS-CoV RBD.

Ομοίως, ένα ανθρώπινο αντίσωμα CR3022 που εξουδετερώνει τον SARS-CoV έχει αναφερθεί ότι συνδέεται επίσης με το RBD του SARS-CoV-2 (Tian et al. ... χαρακτηριζόμενο αντίσωμα S309 από τα κύτταρα μνήμης B ενός επιζώντος SARS-CoV που εξουδετερώνει διασταυρωμένα τον SARS-CoV και τον SARS-CoV-2 και στοχεύει σε ένα άλλο διατηρημένο επίτοπο (epitope) που είναι διαφορετικό από το επίτοπο CR3022 (Yuan et al).

Οι πρωτεΐνες SARS-CoV-2 και SARS-CoV S φαίνεται να είναι σχετικά κοινές σε αυτό, οι σταυρο-εξουδετερωτικές απαντήσεις (cross-reactive antibody-binding responses) μπορεί να είναι σπάνιες. Μόνο ένας στους 15 ασθενείς με λοίμωξη από SARS-CoV-2



μπόρεσε να δημιουργήσει μια σταυρο-εξουδετερωτική αντίδραση τόσο στους ιούς SARSCoV-2 όσο και στους SARS-CoV, και αυτή την διασταυρούμενη αντίδραση.

Επειδή τόσο η πρωτεΐνη spike SARS-CoV όσο και η ακίδα SARS-CoV-2 περιείχαν C-τερματικό τομέα διπλώματος (C-terminal foldon domain), η δέσμευση πλάσματος από ποντίκια ανοσοποιημένα με το πλάσμα πρωτεΐνης spike SARS-CoV δεν δοκιμάστηκε έναντι των πρωτεϊνών ακίδων από SARS-CoV και SARS-CoV -2. Μετρήθηκαν οι δραστηριότητες εξουδετέρωσης πλάσματος από ποντίκια μολυσμένα ή ανοσοποιημένα από τον ιό SARS-CoV-2 ή SARS-CoV στον ιό (E) SARS-CoV-2 ή (F) SARSCoV.

Είναι πιθανό ότι μόνο ένα υποσύνολο των επιτόπων δέσμευσης σταυροειδώς είναι αποτελεσματικά εξουδετερωτικά επίτοπα. Αυτή η αντίληψη υποστηρίζεται επίσης από την πρόσφατη μελέτη, η οποία έδειξε ότι το διασταυρούμενο αντιδραστικό αντίσωμα CR3022 δεν μπορούσε να εξουδετερώσει τον SARS-CoV-2, παρά τη σχετικά ισχυρή δέσμευσή του (Wu et al., 2020).

Οι μελλοντικές μελέτες πρέπει να διερευνήσουν εάν αυτές οι μη εξουδετερωτικές αντιδράσεις αντισωμάτων μπορούν να προσφέρουν *in vivo* προστασία παρά την έλλειψη *in vitro* δραστηριότητας εξουδετέρωσης (Wu et al., 2020), που έχουν παρατηρηθεί σε ορισμένα μη εξουδετερωτικά αντισώματα έναντι άλλων ιών (Watanabe et al., 2019).

Αντίθετα, οι μη εξουδετερωτικές αποκρίσεις αντισωμάτων μπορούν επίσης να οδηγήσουν σε αντιοξειδωτική εξάρτηση (ADE) της μόλυνσης όπως αναφέρεται σε άλλους κορωνοϊούς (Wang et al., 2020). Εάν το ADE έχει ρόλο στη μόλυνση SARS-CoV-2 θα πρέπει να εξεταστεί προσεκτικά λόγω των πιθανών αρνητικών επιπτώσεών του στον εμβολιασμό (Wu et al, 2020). Θα είναι επίσης σημαντικό να προσδιοριστεί ο ρόλος των αντισωμάτων RBD και S2, καθώς και άλλων τομέων, στην εξουδετέρωση. Τα πειράματα ανταγωνισμού με προεπώαση του ιού με αυτόλογες και ετερόλογες πρωτεΐνες RBD ή S2 πριν από την επώαση με το πλάσμα σε δοκιμασία εξουδετέρωσης μπορεί να βοηθήσουν στην περαιτέρω κατανόηση μηχανισμών διασταυρούμενης αντιδραστικότητας (crossreactivity).

Ο SARS-CoV-2 είναι ο τρίτος νεοεμφανιζόμενος κορωνοϊός που προκαλεί εστίες (μαζί με τον SARS-CoV και τον MERS-CoV) τις τελευταίες δύο δεκαετίες. Επειδή το ξέσπασμα του κορωνοϊού είναι πιθανό να συνεχίσει να αποτελεί παγκόσμιο κίνδυνο για την υγεία στο μέλλον (Menachery et al., 2016), έχει εξεταστεί η πιθανότητα ανάπτυξης ενός διασταυρωτικού προστατευτικού εμβολίου κατά πολλαπλών κοροναϊών. Ο εντοπισμός διασταυρωτικών προστατευτικών (cross-protective) επιτόπων στην πρωτεΐνη S του

κορονοϊού θα είναι σημαντικός για την ανάπτυξη ενός πιο καθολικού εμβολίου για τον κορονοϊό ανάλογο με αυτά που βρίσκονται σε εξέλιξη για τον ιό της γρίπης (Wu et al, 2020).

Τα ευρήματά των Lv et al (2020), αν και περιορισμένα προς το παρόν, υποδηλώνουν ότι τέτοιου είδους ευρέως διασταυρωτικά επιτόπα για τους κορονοϊούς μπορεί να μην είναι αυτά που στοχεύουν συνήθως στο ανθρώπινο ανοσολογικό ρεπερτόριο. Προχωρώντας, οι συγγραφείς υπογράμμισαν πως η ανακάλυψη και ο χαρακτηρισμός μονοκλωνικών αντισωμάτων θα ήταν ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη ενός εμβολίου SARS-CoV-2 βραχυπρόθεσμα, καθώς και ενός διασταυρωτικού εμβολίου για τον κορονοϊό μακροπρόθεσμα.

#### **4. Ανοσοδοκιμές ανίχνευσης αντισωμάτων για τον Covid-19**

Η συνεχιζόμενη πανδημία της νόσου του κορονοϊού 2019 (COVID-19) όχι μόνο έχει ξεκινήσει μια παγκόσμια κατάσταση έκτακτης ανάγκης για την υγεία αλλά έχει αναδείξει διάφορες πτυχές της ανθρωπότητας. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου κρίσης, ερευνητές σε όλο τον κόσμο έχουν εντείνει τις προσπάθειές τους να περιορίσουν τη νόσο με όλους τους πιθανούς τρόπους, είτε πρόκειται για εμβολιασμό, θεραπεία ή διάγνωση (Ejazi, Ghosh, Ali, 2020).

Επειδή η εξάπλωση της νόσου δεν έχει ακόμη παρέλθει, η ανταλλαγή των συνεχιζόμενων ευρημάτων της έρευνας θα μπορούσε να είναι το κλειδί για τον έλεγχο και τη διαχείριση της νόσου. Μια έγκαιρη και αποτελεσματική διάγνωση θα μπορούσε να αξιοποιήσει το αποτέλεσμα μέχρι να αναπτυχθεί ένα επιτυχές εμβόλιο. Τόσο τα εσωτερικά όσο και τα εμπορικά κιτ είναι οι προτιμώμενες μοριακές δοκιμές που χρησιμοποιούνται παγκοσμίως για τη διάγνωση του COVID-19 (Ejazi, Ghosh, Ali, 2020).

Ωστόσο, ο περιορισμός των υψηλών τιμών και οι μακρές διαδικασίες εμποδίζουν τη χρήση τους για μαζικές δοκιμές. Λαμβάνοντας υπόψη τη συνεχή αύξηση της μόλυνσης, η αναζήτηση μιας εναλλακτικής δοκιμής





που είναι οικονομικά αποδοτική, απλή και κατάλληλη για δοκιμές και παρακολούθηση μεγάλης κλίμακας είναι η ανάγκη της ώρας (Ejazi, Ghosh, Ali, 2020). Μία τέτοια εναλλακτική θα μπορούσε να είναι οι ανοσολογικές εξετάσεις. Τους τελευταίους μήνες, ένας κατακλυσμός ανοσολογικών ταχέων δοκιμών έχει αναπτυχθεί και επικυρωθεί σε όλο τον κόσμο.

#### 4.1 Επιλέγοντας την ανοσοδοκιμή

Παρόλο που οι μοριακές δοκιμές είναι το χρυσό πρότυπο και πολύ σημαντικές στην πρόωμη ανίχνευση του COVID-19, η προσέγγισή τους σε μια διάγνωση μεγάλης κλίμακας είναι περιορισμένη λόγω του κόστους, της σκοπιμότητας και της βραδύτητας τους. Οι ανοσολογικές δοκιμασίες θα μπορούσαν να είναι ένα καλό συμπλήρωμα από αυτή την άποψη. Ωστόσο, όσον αφορά τη διάγνωση, οι ανοσοδοκιμασίες είναι διαφορετικές από τις μοριακές δοκιμασίες επειδή οι ανοσοδοκιμασίες απαιτούν κάποια γνώση της πρωτεΐνης και της απόκρισης αντισώματος που δημιουργείται έναντι αυτής της πρωτεΐνης.

Επομένως, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ανοσοδοκιμασίες για την ανίχνευση είτε ειδικών ικόν πρωτεϊνών (αντιγόνων) είτε των αντισωμάτων που αναπτύσσονται από τα κύτταρα Β ξενιστή σε απόκριση αυτού του αντιγόνου (Ejazi, Ghosh, Ali, 2020).

Το περίπου 30 kb γονιδίωμα SARS-CoV-2 κωδικοποιεί περίπου 27 πρωτεΐνες που περιλαμβάνουν τέσσερις δομικές πρωτεΐνες, οκτώ βοηθητικές πρωτεΐνες και 15 μη δομικές πρωτεΐνες. Οι βοηθητικές πρωτεΐνες εμπλέκονται στην αντιγραφή του ιικού RNA και στη μεταγραφή (Kumar et al, 2020). Οι λειτουργίες των μη δομικών πρωτεϊνών κυμαίνονται από κρίσιμη ιογενή δραστηριότητα όπως η ρεπλικάση, η πρωτεάση και η δεβικουκτινάση.

Οι ικές δομικές πρωτεΐνες περιλαμβάνουν γλυκοπρωτεΐνες ακίδων (S), γλυκοπρωτεΐνες μεμβράνης (M), πρωτεΐνες περιβλήματος (E) και φωσφοπρωτεΐνες νουκλεοκαψιδίων (N) (Jiang, et al, 2020) Η τριμερής πρωτεΐνη S (περίπου 180 kDa μονομερές) υποτίθεται ότι το πρώτο ικό κλάσμα που συνδέεται με υποδοχείς κυττάρων ξενιστών μέσω της περιοχής σύνδεσης υποδοχέα (RBD) της υπομονάδας S1 και βοηθά στη σύντηξη μεμβρανών ιού και ξενιστή μέσω της υπομονάδας S2. Η πρωτεΐνη M παίζει ρόλο στη ιογενή μορφογένεση και την εκκόλαψη μέσω της γλυκοζυλιωμένης N-τερματικής περιοχής της, τριών διαμεμβρανικών τομέων και μιας μακράς C-τερματικής περιοχής. Η πρωτεΐνη E είναι η μικρότερη δομική πρωτεΐνη που αποτελεί την ική συγκέντρωση, απελευθέρωση και παθογένεια. Η πρωτεΐνη N είναι η πιο άφθονη ική πρωτεΐνη (περίπου 40 kDa), και έτσι θα μπορούσε να είναι ένας ιδανικός υποψήφιος για διάγνωση (Kumar et al, 2020)

Έχει βρεθεί μια ισχυρή ανοσοαπόκριση έναντι αυτής της πρωτεΐνης που ανιχνεύτηκε τόσο σε δείγματα αίματος όσο και στα ούρα. Παρά την αφθονία της, οι πρωτεΐνες S έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί στη διάγνωση του COVID-19 λόγω της ιδιαιτερότητάς τους (Vashist 2020). Έχουν αναφερθεί μελέτες για τη χαρτογράφηση των πρωτεϊνών SARS-CoV-2 και της αλληλεπίδρασης των αντισωμάτων τους μέσω μικροσυστοιχιών πρωτεϊνών. (Krishnamurthy et al, 2020) οι οποίες κατέδειξαν την απόκριση αντισώματος έναντι και των τεσσάρων πρωτεϊνών SARS-CoV-2, S1, RBD, S2 και N, με μολυσμένα δείγματα ορού και βρήκαν ευαισθησία 98,1%.

Οι Wang et al (2020) έχουν εντοπίσει συγκεκριμένα αντισώματα στις πρωτεΐνες M, N και Σ του ιού. Πάνω από το 80% των ασθενών με COVID-19 παρουσίασαν αντισώματα έναντι τεσσάρων ανοσοκυρίαρχων επιτόπων υπολειμμάτων N, S και Orf3a (βοηθητική πρωτεΐνη). Είναι ενδιαφέρον ότι δεν ανιχνεύθηκαν αντισώματα στην πρωτεΐνη E. Σε μια άλλη πρωτεϊνική μικροσυστοιχία, 29 δείγματα ορών του COVID-19 χρησιμοποιήθηκαν για να καταδείξουν την απόκριση IgM/IgG έναντι 18 πρωτεϊνικών κατασκευών SARS-CoV-2.

Το αποτέλεσμα έδειξε 100% ανταπόκριση αντισωμάτων κυρίως έναντι των πρωτεϊνών N και S1, όπου το S1 αποδείχθηκε το καλύτερο στη διαφοροποίηση των ασθενών με COVID-19 από τους ελέγχους (Jiang et al, 2020) κυρίως ανοσοπροσδιορισμοί χημειοφωταύγειας (CLIA), ELISA και γρήγορες διαγνωστικές εξετάσεις όπως ανοσοπροσδιορισμοί πλευρικής ροής (LFIA). Αυτά ανιχνεύουν κυρίως τις ικές δομικές πρωτεΐνες ή ορομετασχηματισμένα αντισώματα IgM και IgG στο αίμα ή στον ορό.

Στις 13 Μαρτίου 2020, το Ίδρυμα Καινοτόμων Νέων Διαγνωστικών είχε ζητήσει την εκδήλωση ενδιαφέροντος για την αξιολόγηση ανοσοπροσδιορισμού αντιγόνου και αντισωμάτων από τους κατασκευαστές δοκιμών COVID-19. Επτά ELISA, πέντε μέθοδοι ανίχνευσης αντιγόνου και 27 γρήγορες διαγνωστικές δοκιμές ανίχνευσης αντισωμάτων επιλέχθηκαν σε πρώτη φάση (ενημέρωση αξιολόγησης FIND)

## **5. Μέθοδος LIPS**

Η ανίχνευση αντισωμάτων σε πρωτεΐνες SARS-CoV-2 μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη ανοσολογικών αποκρίσεων σε ασθενείς με COVID-19 (Petherick, 2020). Το Spike (S) και το nucleocapsid (N) είναι οι κύριες ανοσογονικές πρωτεΐνες στο SARS-CoV-2 (Liet et al, 2020). Διάφορες μέθοδοι βασισμένες στο ELISA που χρησιμοποιούν πρωτεΐνες SARSCoV-2 έχουν αναπτυχθεί για τον εντοπισμό της ορομετατροπής ασθενών με COVID-19, επιβεβαιώνοντας την παρουσία αντισωμάτων στο κυκλοφορούν αίμα πάνω από το 90% των ασθενών με COVID-19 μέχρι την 14η ημέρα (Amanat, 2020).

Οι Paterson et al (2020) ανέπτυξαν μια απλή και ευαίσθητη (sensitive) δοκιμασία IP συστήματος λουσιφεράσης (LIPS) για την ανίχνευση αντισωμάτων σε πρωτεΐνες S και N σε ασθενείς με COVID-19. Το LIPS λειτουργεί ως ανοσοπροσδιορισμός υγρής φάσης, χρησιμοποιεί αντιγόνα-στόχους (target antigens) στη φυσική τους μορφή και είναι κατάλληλο για την ανίχνευση αντισωμάτων που κατευθύνονται κατά γραμμικών και διαμορφωτικών επίτοπων (Fishman et al, 2017).

## 5.1 Μεθοδολογία

Λόγω του χαμηλού φυσικού υποβάθρου της βιοφωταύγειας, διαλυτά ακατέργαστα κυτταρικά λύματα ή μέσα καλλιέργειας του ανασυνδυασμένου πρωτεϊνούχου ενζύμου λουσιφεράσης μπορούν να εξαχθούν από επιμολυσμένα κύτταρα και να χρησιμοποιηθούν άμεσα, καθιστώντας την μία εύκολη και γρήγορη μέθοδο παραγωγής αντιγόνων. Επιπλέον, το αποτέλεσμα της μέτρησης LIPS είναι ποσοτικό και επιτρέπει τη μέτρηση των επιπέδων αντισωμάτων με την πάροδο του χρόνου κατά τη διάρκεια της νόσου ή ως απάντηση σε θεραπείες.

Ο Peterson (2020) χρησιμοποίησε το ένζυμο NanoLuc που παράγει φως και είναι μια μικρή πρωτεΐνη ca 20-kDa που επιτρέπει την έκκριση πρωτεϊνών σύντηξης σε μέσα κυτταρικής καλλιέργειας, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση αντισωμάτων στις πρωτεΐνες SARS-CoV2 S και N σε COVID-19 ασθενείς (Fishman et al 2020). Ο Peterson εξέφρασε (expressed) S και N πρωτεϊνικά θραύσματα του SARS-CoV-2 σε σύντηξη με NanoLuc λουσιφεράση σε κύτταρα HEK293 και επιβεβαίωσε την έκφραση των πρωτεϊνών με στύπωμα Western.

Μετά τη διαμόλυνση για 72 ώρες, τα κυτταρικά λύματα που περιέχουν αντιγόνα χρησιμοποιήθηκαν στη δοκιμασία LIPS με ασθενείς με COVID19. Δοκίμασε δείγματα πλάσματος που συλλέχθηκαν 8-37 ημέρες μετά τη μόλυνση από 26 ασθενείς με COVID-19 (ηλικία εύρους 33-91 ετών). Η διάγνωση του COVID-19 επιβεβαιώθηκε με ανάλυση PCR για τον ιό SARS-CoV-2. Επιπλέον, μελέτησε 26 υγιείς υποψήφιους (ηλικίας 23-54 ετών) χωρίς πρόσφατη μόλυνση ή συμπτώματα COVID-19 (πυρετός ή βήχας) τον προηγούμενο μήνα.

## 5.2 Αποτελέσματα

Το προφίλ LIPS ανίχνευσε μια ισχυρή οροθετική απόκριση σε θραύσματα ιικής πρωτεΐνης. Η χρήση πλασμιδίου NanoLuc χωρίς τα ένθετα γονιδίου SARSCoV-2 δεν έδωσε κανένα ειδικό σήμα στον προσδιορισμό. Η στατιστική ανάλυση έδειξε εξαιρετικά σημαντικές αντιδράσεις στα αντιγόνα S1, S2 και N στους ασθενείς. Οι Peterson et al (2020)

βρήκαν αντισώματα έναντι S1 και S2 σε 21 και 23 από 26 ασθενείς, αντίστοιχα, ενώ και οι 26 ασθενείς είχαν αντισώματα στο αντιγόνο N.

Η πειραματική αντιγραφή των δοκιμασιών έδωσε 100% συμφωνία της θετικότητας του ασθενούς με υψηλό συντελεστή συσχέτισης σε τιμές λουσιφεράσης ( $r = 0,98$  για S1,  $r = 0,97$  για S2 και  $r = 0,91$  για N). Συνολικά, οι αποκρίσεις αντισωμάτων ήταν παρούσες και στις τρεις πρωτεΐνες σε ασθενείς με COVID-19, υποδηλώνοντας ότι η αντιδραστικότητα δεν περιορίζεται σε ένα μόνο ιικό επίτοπο ή αντιγόνο. Είναι ενδιαφέρον ότι δεν βρήκαν καμία σημαντική συσχέτιση μεταξύ των τιμών S1 και S2, αλλά η συσχέτιση ήταν παρούσα μεταξύ S1 και N και S2 και N, πιθανότατα λόγω της υψηλότερης οροθετικότητας για N πρωτεΐνη.

Η ανάλυση δειγμάτων αίματος COVID-19 με PCR έχει εγείρει ανησυχίες ότι οι ασθενείς με σοβαρή νόσο μπορεί να έχουν ιογενή RNA αναιμία στη φάση της οξείας λοίμωξης. Ως εκ τούτου, δοκίμασαν εάν το μη ιονικό επιφανειοδραστικό, όπως το 1% Triton X, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εξουδετέρωση δυνητικά μολυσματικών δειγμάτων πλάσματος για συνηθισμένο εργαστηριακό χειρισμό, έχει αντίκτυπο στην ανίχνευση ικών αντιγόνων στη δοκιμασία LIPS.

Η θεραπεία των δειγμάτων ασθενών με Triton X δεν επηρέασε τα αποτελέσματα καθώς είδαν υψηλή αντιστοιχία των αποτελεσμάτων μεταξύ δειγμάτων, υποδεικνύοντας ότι η χαμηλή συγκέντρωση ήπιου απορρυπαντικού δεν έχει αρνητικές επιπτώσεις στην απόδοση της δοκιμασίας Τα LIPS είναι μια αρκετά βολική μέθοδος καθώς επιτρέπει τη συγκέντρωση πολλών αντιγόνων σε μία μόνο αντίδραση για σκοπούς συλλογής.

Για να δουν αν η ανάμειξη τριών αντιγόνων μαζί δίνει αυξημένες τιμές σήματος, συνδύασαν λύματα S1, S2 και N κυττάρων και μελέτησαν την αντιδραστικότητα αντισωμάτων COVID-19. Ο συνδυασμός τριών ικών αντιγόνων έδωσε συνολικά αυξημένα σήματα και 100% ευαισθησία στη δοκιμασία με 26 ασθενείς και συσχετίστηκε πολύ ( $r = 0,90$ ) με το άθροισμα των επιμέρους τιμών αντιγόνου που ελέγχθηκε ξεχωριστά. Αυτό το αποτέλεσμα δείχνει ότι ένας σχετικά απλός συνδυασμός αντιγόνων στη δοκιμασία LIPS δίνει την υψηλότερη απόδοση στην ανίχνευση αντισωμάτων SARS-CoV-2.

Τέλος, σύγκριναν τα αποτελέσματά τους με τη δοκιμή βασισμένη σε ELISA που μετρά αντισώματα στην πρωτεΐνη S και βρήκαν μια καλή συσχέτιση με τη δοκιμασία LIPS, όπου συνδυάστηκαν τρία αντιγόνα μαζί. Όταν σύγκριναν περαιτέρω τη δοκιμή ELISA για κάθε μεμονωμένο αντιγόνο στη μέθοδο LIPS, βρήκαν μια πολύ σημαντική συσχέτιση με το



S1, αλλά όχι με το S2, ή το N, υποδηλώνοντας ότι το ELISA ανιχνεύει κυρίως θραύσματα S1 του SARS-CoV-2.

### **5.3 Κριτική αξιολόγηση**

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι το μέγεθος του δείγματος των ελέγχων ήταν σχετικά μικρό και η ανάλυση περισσότερων ατόμων θα παρείχε πρόσθετες πληροφορίες σχετικά με τη χρησιμότητα των LIPS για τη διαφοροποίηση των ατόμων με προηγούμενο κορωνοϊό από τα θετικά αποτελέσματα στον SARS-CoV-2.

Τα αποτελέσματά επιβεβαιώνουν την πρόσφατη μελέτη που χρησιμοποίησε τη μέθοδο LIPS (Peterson et al, 2020) για τον εντοπισμό αντισωμάτων σε πρωτεΐνες S και N σε ασθενείς με COVID-19 και έδειξε ότι τα αντισώματα στην πρωτεΐνη N είναι πιο ευαίσθητα για τον εντοπισμό πρώιμης μόλυνσης. Για να αντιμετωπιστεί η ασφάλεια των δειγμάτων αίματος COVID-19, η μελέτη δεν βρήκε σημαντική διαφορά στα επίπεδα αντισωμάτων μεταξύ θερμαινόμενων και μη θερμαινόμενων δειγμάτων πλάσματος. Έτσι, η μέθοδος LIPS είναι χρήσιμη για τη μελέτη των επιπέδων αντισώματος SARS-CoV-2 σε δείγματα αίματος COVID-19 που έχουν υποστεί θερμότητα ή επεξεργάζονται με Triton X. Συμπερασματικά, η ευαίσθητη και ειδική μέθοδος LIPS συνδυάζει διαφορετικά αντιγόνα SARS-CoV-2 για ερευνητικούς σκοπούς. Η δοκιμασία LIPS με θραύσματα αντιγόνου S και N μπορεί να δώσει χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με την ανοσοαπόκριση σε ασθενείς με COVID-19.

## **6. Μέθοδοι CLIA-CMIA-ELISA**

### **6.1.Μέθοδος CLIA**

#### **6.1.1 Περιγραφή**

Ο προσδιορισμός των αυτοαντισωμάτων είναι ζωτικής σημασίας για τη διάγνωση πολλών αυτοάνοσων νοσημάτων, και των δύο συστηματικών- όπως ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος (ΣΕΛ), η ρευματοειδής αρθρίτιδα (ΡΑ), το σύνδρομο Sjögren, η συστηματική σκλήρυνση και το σύνδρομο αντιφωσφολιπιδίων- και ειδικά για τα όργανα,

όπως η κοιλιοκάκη, αυτοάνοσες ασθένειες του θυρεοειδούς, πρωτοπαθής χολική κίρρωση και αυτοάνοση ηπατίτιδα.

Συγκεκριμένα, ο προσδιορισμός των αυτοαντισωμάτων περιλαμβάνεται στα κριτήρια ταξινόμησης ή/και διάγνωσης για ορισμένες αυτοάνοσες ασθένειες (Liberal et al, 2013) και λαμβάνει σχετική προγνωστική αξία σε άλλες, καθώς τα αυτοαντισώματα μπορεί να εμφανιστούν χρόνια πριν από την κλινική εκδήλωση της νόσου (Bizzaro, 2008)

Ο ανοσοπροσδιορισμός χημειοφωταύγειας (CLIA) είναι μια τεχνική ανοσοπροσδιορισμού όπου η ετικέτα, δηλαδή ο πραγματικός «δείκτης» της αναλυτικής αντίδρασης, είναι ένα φωτεινό μόριο. Σε γενικές γραμμές, η φωταύγεια είναι η εκπομπή ορατής ή σχεδόν ορατής ακτινοβολίας ( $\lambda = 300\text{--}800\text{ nm}$ ) που παράγεται όταν ένα ηλεκτρόνιο μεταβαίνει από διεγερμένη κατάσταση στη βασική κατάσταση (Hennes et al, 2008).

Η προκύπτουσα δυνητική ενέργεια στο άτομο απελευθερώνεται με τη μορφή φωτός. Στη φασματοφωτομετρία, η φωταύγεια έχει ένα πλεονέκτημα έναντι της απορρόφησης στο ότι το πρώτο είναι ένα απόλυτο μέτρο ενώ το δεύτερο είναι σχετικό. Υπάρχει αναφορά στη χημειοφωταύγεια, επειδή ο τύπος φωταύγειας που εφαρμόζεται στις τεχνικές ανοσοδοκιμασίας προσδιορίζει γενικά τις εξω-εργονομικές χημικές αντιδράσεις ως την καταλληλότερη πηγή ενέργειας για την παραγωγή της ηλεκτρονικής διεγερμένης κατάστασης (Hennes et al, 2008).

Η ετερογενής μέθοδος είναι ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος προσδιορισμός χημειοφωταύγειας. Οι μέθοδοι χημειοφωταύγειας μπορούν να είναι άμεσες - με τη χρήση δεικτών φωταύγειας - ή έμμεσες - με τη χρήση ενζυμικών δεικτών. Οποιαδήποτε μέθοδος μπορεί να είναι ανταγωνιστική ή μη (Bizzaro, 2008).

Σε μεθόδους απευθείας χημειοφωταύγειας, οι φωτεινοί δείκτες που χρησιμοποιούνται είναι εστέρες ακριδινίου και ρουθηνίου, ενώ οι ενζυματικοί δείκτες που χρησιμοποιούνται σε έμμεσες μεθόδους είναι η αλκαλική φωσφατάση με υπόστρωμα αδαμαντυλ 1, 2-διοξετανο αρυλοφωσφορικού (AMPPD) και υπεροξειδάση χρένου με λουμινόλη ή παράγωγα αυτής (Bizzaro, 2007).

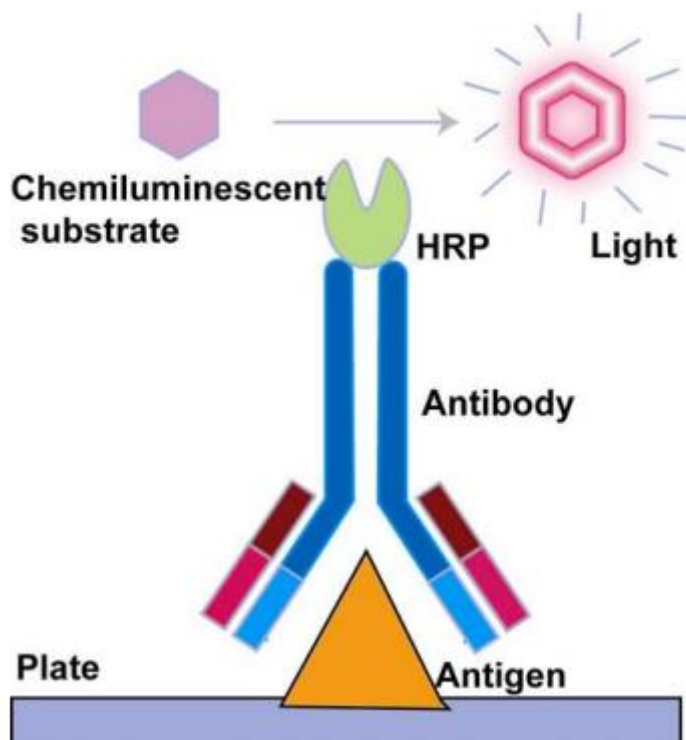


Figure 1 Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου CLIA. Πηγή: Novatein Biosciences

Τα μόρια σύνθεσης όπως το AMPPD και τα παράγωγα μορίων βάσης ισολουμινόλης είναι πιο σταθερά σε σύγκριση με άλλους φωτεινούς δείκτες και έχουν ως αποτέλεσμα την εκπομπή φωτός με μια χαρακτηριστικά αυξημένη κβαντική απόδοση (Hennes et al, 2008). Η ενεργοποίηση αυτών των υποστρωμάτων απαιτεί χημικές ή ενζυματικές αντιδράσεις που σχετίζονται με την ανοσολογική αντίδραση. Για παράδειγμα, η χρήση της λουμινόλης και των παραγώγων της ισολουμινόλης ως ετικέτες χημειοφωταύγειας εξαρτάται από τη σύζευξη του ανοσοπροσδιορισμού με ενζυματικές αντιδράσεις που καταλύονται με υπεροξειδάση.

Η προσθήκη ενός ενισχυτή (π.χ. σιδηροκυανιούχο, μεταλλικά ιόντα) ενισχύει περαιτέρω την ηλεκτρονική ενεργοποίηση, οδηγώντας τελικά σε εξαιρετικά αυξημένη αναλυτική ευαισθησία ( $10^{-16}$  ανά λίτρο), σίγουρα ανώτερη από αυτές που επιτυγχάνονται με άλλες μεθόδους ανοσοπροσδιορισμού όπως η RIA, η ανοσοενζυματική (ELISA) και μεθόδους φθοροανοσοενζυματικής (FEIA), κλπ (Hennes et al, 2008).

### 6.1.2 Πλεονεκτήματα - μειονεκτήματα

Τα βασικά πλεονεκτήματα των χημειοφωταύγειων αναλυτικών μεθόδων είναι τα εξής (όπως αναφέρονται στον Wild, 2013):

1)το δυναμικό εύρος τους, υψηλή ένταση σήματος και απουσία παρεμβολών εκπομπών (δηλαδή υψηλή εξειδίκευση)

2) γρήγορη απόκτηση του αναλυτικού σήματος

3) υψηλή σταθερότητα αντιδραστηρίων και των ζευγών τους,

4) χαμηλή κατανάλωση αντιδραστηρίων

5) τυχαία πρόσβαση (random access)

6) μειωμένος χρόνος επώασης

7) πλήρης συμβατότητα με πρωτόκολλα ανάλυσης ανοσολογίας (ομοιογενή ή μη)

Πρέπει επίσης να ληφθούν υπόψη ορισμένοι περιορισμοί. Τα μειονεκτήματα του CLIA είναι τα παρακάτω (Wilde et al, 2013):

1) Περιορισμένη ανίχνευση Ag

2) Υψηλό κόστος

3) Περιορισμένα πάνελ ελέγχου

4) Κλειστά συστήματα ανάλυσης.

Επιπλέον, για πολλά συστήματα χημειοφωταύγειας (CL), υπάρχει χαμηλό επίπεδο εκπομπών υπό την απουσία αναλύτη. Ως εκ τούτου, τα σήματα CL στα συστήματα ροής, που αυξάνονται αναλογικά με τη συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας, εμφανίζονται ως αιχμηρές κορυφές που τοποθετούνται σε ένα χαμηλό σταθερό κενό σήμα, που μετριέται όπως φαίνεται από το χρονικό παράθυρο όταν το μίγμα αναλύτη και αντιδραστηρίου περνά μέσα από το κύτταρο ανιχνευτή ( Wild, 2013).

Λόγω του μικρού τμήματος της εκπομπής CL που μετριέται μόνο από αυτό το χρονικό προφίλ, οι αντιδράσεις με πολύπλοκη κινητική μπορούν να δώσουν μη γραμμικές γραφικές παραστάσεις αντίδρασης έναντι συγκέντρωσης αναλυόμενου (Wild, 2013).

## 6.2 Μέθοδος ELISA

### 6.2.1 Περιγραφή

Η ενζυμικά συνδεδεμένη ανοσοπροσοφορική δοκιμασία (ELISA) είναι μια ισχυρή μέθοδος για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης σε ένα πολύπλοκο μίγμα. Αρχικά περιγράφηκε από τους Engvall και Perlmann (1971), η μέθοδος επιτρέπει την ανάλυση δειγμάτων πρωτεΐνης ακινητοποιημένων σε φρεάτια μικροπλακών (microplate wells) χρησιμοποιώντας ειδικά αντισώματα (Crowther, 2009).

Τα τεστ ELISA εκτελούνται τυπικά σε πλάκες πολυστυρολίου 96 φρεατίων ή 384 φρεατίων, οι οποίες δεσμεύουν παθητικά αντισώματα και πρωτεΐνες. Είναι αυτή η δέσμευση και η ακινητοποίηση αντιδραστηρίων που καθιστά το ELISA εύκολο στο σχεδιασμό και την εκτέλεση. Η ακινητοποίηση των αντιδρώντων της ELISA στην επιφάνεια της μικροπλάκας καθιστά εύκολο τον διαχωρισμό του δεσμευμένου από το μη δεσμευμένο υλικό κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας.

Αυτή η ικανότητα χρήσης αντισωμάτων υψηλής συγγένειας και πλύσης μη ειδικών συνδεδεμένων υλικών καθιστά το ELISA ένα ισχυρό εργαλείο για τη μέτρηση συγκεκριμένων αναλυτών εντός ενός ακατέργαστου παρασκευάσματος (Crowther, 2009).

Αν και πολλές παραλλαγές του ELISA έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιηθεί σε διαφορετικές καταστάσεις, όλες εξαρτώνται από τα ίδια βασικά στοιχεία (όπως αναφέρονται στο [thermofisher.com](http://thermofisher.com) – μία από τις εταιρίες παρασκευής του τεστ):

1. Επίστρωση/σύλληψη - άμεση ή έμμεση ακινητοποίηση αντιγόνων στην επιφάνεια των φρεατίων μικροπλάκας πολυστυρολίου.
2. Αποκλεισμός πλάκας-προσθήκη πρωτεΐνης ή άλλου μορίου για την κάλυψη όλων των ακόρεστων θέσεων σύνδεσης επιφάνειας των φρεατίων της μικροπλάκας.
3. Ανίχνευση/ανίχνευση-επώαση με εξειδικευμένα στο συγκεκριμένο αντιγόνο αντισώματα που συνδέονται με τα αντιγόνα.
4. Μέτρηση σήματος - ανίχνευση του σήματος που παράγεται μέσω της άμεσης ή δευτερεύουσας ετικέτας (tag) στο συγκεκριμένο αντίσωμα.

Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες ετικέτες ενζύμων είναι η υπεροξειδάση χρένου (HRP) και η αλκαλική φωσφατάση (AP). Έχουν χρησιμοποιηθεί και άλλα ένζυμα. αυτά περιλαμβάνουν β-γαλακτοσιδάση, ακετυλοχολινεστεράση και καταλάση. Διατίθεται εμπορικά μια μεγάλη ποικιλία υποστρωμάτων για την εκτέλεση ELISA με συζυγές HRP ή

AP. Η επιλογή του υποστρώματος εξαρτάται από την απαιτούμενη ευαισθησία της δοκιμασίας και τα διαθέσιμα όργανα για την ανίχνευση σήματος (φασματοφωτόμετρο, φθορόμετρο ή φωτισόμετρο) (Crowther, 2009).

Υπάρχουν διάφορες μορφές του ELISA που χρησιμοποιούνται, ανάλογα την περίπτωση. Αυτά εμπίπτουν είτε σε άμεσες, έμμεσες είτε σε μεθόδους σύλληψης και ανίχνευσης “σάντουιτς” (όπως αναλύεται στον ιστότοπο του κατασκευαστή ThermoFisher)

Το βασικό βήμα είναι η ακινητοποίηση του αντιγόνου που μας ενδιαφέρει, που επιτυγχάνεται είτε με άμεση προσρόφηση στην πλάκα δοκιμασίας είτε έμμεσα μέσω ενός αντισώματος σύλληψης που έχει προσαρτηθεί στην πλάκα. Το αντιγόνο στη συνέχεια ανιχνεύεται είτε άμεσα (πρωτεύον αντίσωμα) είτε έμμεσα (δευτερεύον αντίσωμα).

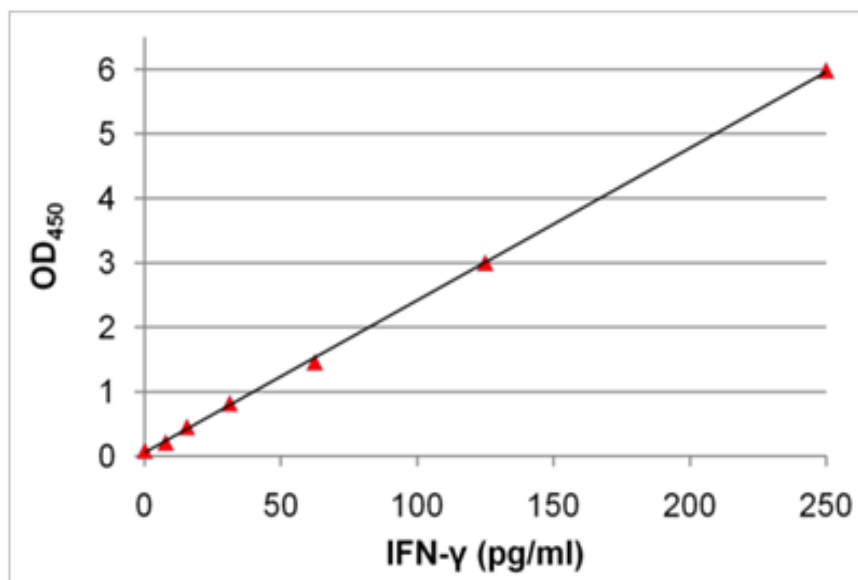


Figure 2 Τυπική καμπύλη του ELISA, χρησιμοποιώντας αντιγόνα σε γνωστή συγκέντρωση. Πηγή: Horlock, n.d.

### 6.2.2 Βασικοί τύποι - Μορφή “σάντουιτς” (Sandwich Capture)

Η πιο διαδεδομένη μορφή δοκιμασίας ELISA είναι η δοκιμή ELISA σάντουιτς, η οποία ακινητοποιεί έμμεσα και εντοπίζει έμμεσα την παρουσία του αντιγόνου -στόχου. Αυτός ο τύπος δοκιμασίας σύλληψης ονομάζεται δοκιμασία «σάντουιτς» επειδή η προς μέτρηση αναλυόμενη ουσία συνδέεται μεταξύ δύο πρωτογενών αντισωμάτων, το καθένα ανιχνεύοντας διαφορετικό επίτοπο του αντιγόνου - το αντίσωμα σύλληψης και το αντίσωμα ανίχνευσης (Horlock, n.d.). Το σχήμα σάντουιτς ELISA χρησιμοποιείται ιδιαίτερα λόγω της ευαισθησίας και της ιδιαιτερότητάς του.

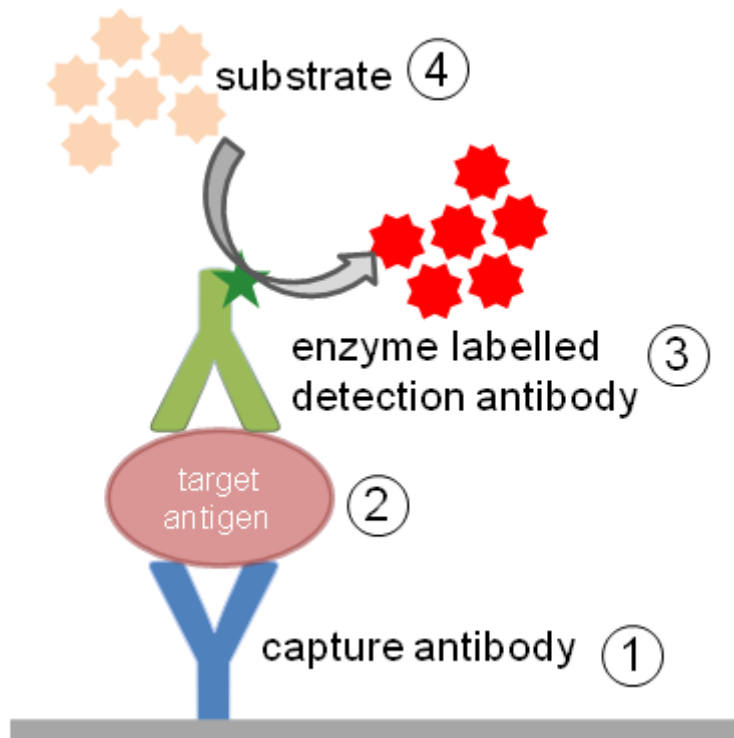


Figure 3 Συνηθισμένη μορφή Σάντουιτς. Πηγή: Horlock, n.d.

### 6.2.3 Άμεσες και έμμεσες στρατηγικές ανίχνευσης ELISA

Μεταξύ των τυπικών μορφών ανάλυσης που συζητήθηκαν και απεικονίστηκαν παραπάνω, όπου οι διαφορές τόσο στη σύλληψη όσο και στην ανίχνευση ήταν το ζητούμενο του τεστ, είναι σημαντικό να γίνει διάκριση μεταξύ των συγκεκριμένων στρατηγικών που υπάρχουν ειδικά για το βήμα της ανίχνευσης (Horlock n.d.).

Ανεξάρτητα από τη μέθοδο με την οποία ένα αντιγόνο συλλαμβάνεται στην πλάκα (με άμεση προσρόφηση στην επιφάνεια ή μέσω ενός προ-επικαλυμμένου αντισώματος "σύλληψης", όπως στη μέθοδο σάντουιτς ELISA), είναι το βήμα ανίχνευσης (ως άμεση ή έμμεση ανίχνευση) που καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την ευαισθησία ενός τεστ ELISA (Crowther, 2009).

#### Άμεση ανίχνευση

Η μέθοδος άμεσης ανίχνευσης χρησιμοποιεί ένα πρωτεύον αντίσωμα επισημασμένο (labeled) με ένα ένζυμο αναφοράς ή μια ετικέτα (tag) που αντιδρά απευθείας με το αντιγόνο. Η άμεση ανίχνευση μπορεί να πραγματοποιηθεί με ένα αντιγόνο που ακινητοποιείται απευθείας στην πλάκα ανάλυσης ή με τη μορφή της δοκιμασίας σύλληψης. Η άμεση ανίχνευση, αν και δεν χρησιμοποιείται ευρέως στην ELISA, είναι αρκετά κοινή για ανοσοϊστοχημική χρώση ιστών και κυττάρων (Crowther, 2009).

## Έμμεση αντίγνευση

Η έμμεση μέθοδος αντίγνευσης χρησιμοποιεί επισημασμένο δευτερεύον αντίσωμα ή σύμπλεγμα βιοτίνης-στρεπταβιδίνης για ενίσχυση και είναι η πιο δημοφιλής μορφή για ELISA. Το δευτερογενές αντίσωμα έχει εξειδίκευση για το πρωτεύον αντίσωμα. Σε ένα σάντουιτς του τεστ ELISA, είναι κρίσιμο το δευτερεύον αντίσωμα να είναι ειδικό για την αντίγνευση του πρωτογενούς αντισώματος μόνο (και όχι το αντίσωμα σύλληψης) ή η δοκιμασία να μην είναι ειδική για το αντιγόνο (Horlock, n.d.).

Γενικά, αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση σύλληψης πρωτογενών αντισωμάτων από διαφορετικά είδη ξενιστών (π.χ. IgG ποντικού και IgG κουνελιού, αντίστοιχα). Για δοκιμασίες σάντουιτς, είναι επωφελής η χρήση δευτερογενών αντισωμάτων που έχουν διασταυρωθεί για την απομάκρυνση τυχόν δευτερογενών αντισωμάτων που θα μπορούσαν να έχουν συγγένεια με το αντίσωμα σύλληψης (Horlock, n.d.).

## Ανταγωνιστική στρατηγική

Η ανταγωνιστική ELISA (Competitive ELISA) είναι μια στρατηγική που χρησιμοποιείται συνήθως όταν το αντιγόνο είναι μικρό και έχει μόνο έναν επίτοπο ή μία θέση σύνδεσης αντισώματος. Μια παραλλαγή αυτής της μεθόδου συνίσταται στην επισήμανση του καθαρισμένου αντιγόνου αντί του αντισώματος. Το μη επισημασμένο αντιγόνο από τα δείγματα και το επισημασμένο αντιγόνο ανταγωνίζονται για τη σύνδεση με το αντίσωμα σύλληψης. Η μείωση σήματος από το καθαρισμένο (purified) αντιγόνο υποδηλώνει την παρουσία του αντιγόνου στα δείγματα σε σύγκριση με φρεάτια δοκιμασίας (assay wells) με επισημασμένο αντιγόνο μόνο.

Οι παραπάνω μέθοδοι εξηγούνται λεπτομερέστερα στο εγχειρίδιο τεχνικού οδηγού και πρωτοκόλλου ELISA, διαθέσιμο από τη ThermoScientific, διαθέσιμο μέσο [thermoscientific.com](http://thermoscientific.com)

## 6.3 CMIA

Οι MIA (ανοσοπροσδιορισμοί χημειοφωταύγειας μικροσωματιδίων) είναι μια άλλη μέθοδος για ορολογικές δοκιμές. Σε αυτόν τον προσδιορισμό, ο παράγοντας σύλληψης συνδέεται με ένα παραμαγνητικό μικροσωματίδιο αντί να επικαλύπτεται σε μια πλάκα. Μετά το πλύσιμο, προστίθεται ο παράγοντας αντίγνευσης με συζυγές χημειοφωταύγειας. Μετά το σχηματισμό του ανοσοσυμπλέγματος και την πλύση, προστίθεται το άλλο συστατικό του συζυγούς χημειοφωταύγειας και το προκύπτον σήμα διαβάζεται και χρησιμοποιείται για ποσοτικοποίηση (Wild, 2013).



Δυστυχώς, καθώς αυξάνεται η ευαισθησία, αυξάνεται η πιθανότητα ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων και αυτό μπορεί να αποτελέσει πρόβλημα με αυτήν τη μέθοδο σε ορισμένες περιπτώσεις.

## **7. Οι μέθοδοι εφαρμοσμένοι για τον ιο SARS-CoV-2**

### **7.1 SARS-CoV-2 IgG (CMIA)**

Αυτή η μέθοδος αναπτύχθηκε από την Abbott Laboratories, το 2020.

Ο προσδιορισμός SARS-CoV-2 IgG είναι ένας ανοσοπροσδιορισμός μικροσωματιδίων χημειοφωταύγειας (CMIA) που προορίζεται για την ποιοτική ανίχνευση αντισωμάτων IgG έναντι του SARS-CoV-2 σε ανθρώπινο ορό, σωλήνα διαχωρισμού ορού και πλάσμα (ACD, CPD, CPDA-1, δι-κάλιο EDTA, τριποκάλιο EDTA, ηπαρίνη λιθίου, σωλήνας διαχωρισμού ηπαρίνης λιθίου, κιτρικό νάτριο, ηπαρίνη νατρίου).

Η δοκιμασία SARS-CoV-2 IgG προορίζεται για χρήση ως βοήθημα στην ανίχνευση ατόμων με προσαρμοστική ανοσοαπόκριση στον SARS-CoV-2, υποδεικνύοντας πρόσφατη ή προηγούμενη μόλυνση. Προς το παρόν, είναι άγνωστο για πόσο καιρό τα αντισώματα επιμένουν μετά τη μόλυνση και εάν η παρουσία αντισωμάτων παρέχει προστατευτική ανοσία. Η δοκιμασία SARSCoV-2 IgG δεν πρέπει να χρησιμοποιείται για τη διάγνωση οξείας λοίμωξης SARS-CoV-2 (Abbott, 2021). Τα αποτελέσματα είναι για την ανίχνευση αντισωμάτων SARS CoV-2.

Τα αντισώματα IgG έναντι του SARS-CoV-2 είναι γενικά ανιχνεύσιμα στο αίμα αρκετές ημέρες μετά την αρχική μόλυνση, αν και η διάρκεια κατά την οποία παραμένουν στο σώμα είναι ακόμα ασαφής στη βιβλιογραφία (Manalac et al, 2020). Τα άτομα μπορεί να έχουν ανιχνεύσιμο ιό για αρκετές εβδομάδες μετά την ορομετατροπή.

Ψευδώς θετικά αποτελέσματα για τον προσδιορισμό IgG SARS-CoV-2 μπορεί να προκύψουν λόγω διασταυρούμενης αντιδραστικότητας (cross-reactivity) από προϋπάρχοντα αντισώματα ή άλλες πιθανές αιτίες. Λόγω του κινδύνου ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων, η επιβεβαίωση των θετικών αποτελεσμάτων θα πρέπει να εξετάζεται με τη χρήση μιας δεύτερης, διαφορετικής δοκιμασίας IgG (Abbott, 2021).

#### **7.1.1 Ανάλυση της μεθόδου**

Η ακριβής μέθοδος περιγράφεται στις εργαστηριακές οδηγίες, που εκδόθηκαν από την Abbott το 2020 και στη συνέχεια αναθεωρήθηκαν το 2021.

Η δοκιμασία SARS-CoV-2 IgG έχει σχεδιαστεί για να ανιχνεύει αντισώματα ανοσοσφαιρίνης κατηγορίας G (IgG) στην πρωτεΐνη νουκλεοκαψιδίου του SARS-CoV-2 σε ορό και πλάσμα από άτομα που υποψιάζονται ότι είχαν ασθένεια κορωνοϊού (COVID-19) ή ορού και πλάσματος ατόμων που μπορεί να έχουν μολυνθεί από SARS-CoV-2.

Το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή αντιδρά στη μόλυνση από τον SARS-CoV-2 παράγοντας ειδικά αντισώματα. Αυτά τα αντισώματα έχουν αναφερθεί ότι εμφανίζονται στον ορό ή στο πλάσμα των μολυσμένων ατόμων μετά την ανίχνευση του ιικού ριβονουκλεϊκού οξέος (RNA) σε επιχρίσματα (Zhao et al, 2020) ήδη από λίγες ημέρες έως 2 εβδομάδες μετά την εμφάνιση των συμπτωμάτων.

Ειδικά αντισώματα IgG προς τον SARS-CoV-2 μπορεί να ανιχνευθούν σε ασθενείς με COVID-19 κατά τη διάρκεια της συμπτωματικής φάσης της νόσου αφού το RNA δεν είναι πλέον ανιχνεύσιμο. (Zhao et al, 2020). Η επιμονή των αντισωμάτων IgG επιτρέπει την ταυτοποίηση των ατόμων που έχουν μολυνθεί στο παρελθόν και πιθανότατα έχουν αναρρώσει από την ασθένεια (Shen et al, 2020) Είναι άγνωστο εάν τα αντισώματα IgG στον SARS-CoV-2 προσφέρουν ανοσία στη συνέχεια. Η ανίχνευση IgG και άλλες ορολογικές δοκιμασίες πιθανότατα θα διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στην έρευνα και την επιτήρηση (WHO, 2020)

### **7.1.2 Αρχές του τεστ**

(όπως αναφέρεται στο εγχειρίδιο εργαστηρίων Abbott, αναθεωρημένο 2021):

Αυτός ο προσδιορισμός είναι ένας αυτοματοποιημένος, ανοσοπροσδιορισμός δύο σταδίων για την ποιοτική ανίχνευση αντισωμάτων IgG έναντι του SARS-CoV-2 σε ανθρώπινο ορό και πλάσμα χρησιμοποιώντας τεχνολογία χημειοφωταύγειας μικροσωματιδικής ανοσοπροσδιορισμού (CMIA). Δείγματα, επικαλυμμένα με αντιγόνο SARS-CoV-2, παραμαγνητικά μικροσωματίδια και αραιωτικό δοκιμασίας συνδυάζονται και επωάζονται.

Τα αντισώματα IgG προς τον SARS-CoV-2 που υπάρχουν στο δείγμα συνδέονται με τα μικροσωματίδια επικαλυμμένα με αντιγόνο SARS-CoV-2. Το μίγμα πλένεται. Προστίθεται αντι-ανθρώπινη συζυγής επισημασμένο με ακρυδίνιο IgG για να δημιουργηθεί ένα μίγμα αντίδρασης και επωάζεται. Μετά από έναν κύκλο πλύσης, προστίθενται λύσεις προ-ενεργοποίησης και ενεργοποίησης. Η προκύπτουσα αντίδραση χημειοφωταύγειας μετριέται ως σχετική μονάδα φωτός (RLU).

Η παρουσία ή απουσία αντισωμάτων IgG έναντι του SARS-CoV-2 στο δείγμα προσδιορίζεται με σύγκριση της χημειοφωταύγειας RLU στην αντίδραση με το βαθμονομητή RLU, η οποία υπολογίζεται από το σύστημα Δείκτη (S/C)

### 7.1.3 Έλεγχος ποιότητας

Η συνιστώμενη απαίτηση ελέγχου για τη δοκιμασία SARS-CoV-2 IgG από τα εργαστήρια Abbott (2021) είναι να δοκιμάζεται ένα μόνο δείγμα κάθε επιπέδου ελέγχου μία φορά κάθε 24 ώρες, κάθε μέρα χρήσης. Οι πρόσθετοι έλεγχοι ενδέχεται να δοκιμαστούν σύμφωνα με τους τοπικούς, κρατικούς ή/και ομοσπονδιακούς κανονισμούς ή απαιτήσεις διαπίστευσης και την πολιτική ποιοτικού ελέγχου του εκάστοτε εργαστηρίου.

Για να καθοριστούν στατιστικά βασισμένα όρια ελέγχου, κάθε εργαστήριο θα πρέπει να καθορίσει το δικό του στόχο συγκέντρωσης και εύρη για νέες παρτίδες ελέγχου σε κάθε κλινικά σχετικό επίπεδο ελέγχου. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με δοκιμασία τουλάχιστον 20 επαναλήψεων σε αρκετές (3-5) ημέρες και χρησιμοποιώντας τα αναφερόμενα αποτελέσματα για τον καθορισμό του αναμενόμενου μέσου όρου (στόχου) και μεταβλητότητας για αυτόν τον μέσο όρο (εύρος) για το εργαστήριο.

Πηγές παραλλαγής που θα πρέπει να συμπεριληφθούν σε αυτή τη μελέτη για να είναι αντιπροσωπευτικές της μελλοντικής απόδοσης του συστήματος περιλαμβάνουν (όπως αναφέρεται στο εγχειρίδιο της Abbott):

- Πολλαπλές αποθηκευμένες βαθμονομήσεις
- Πολλαπλές παρτίδες αντιδραστηρίων (reagent lots)
- Πολλαπλές παρτίδες βαθμονομητή (calibrator lots)
- Πολλαπλές μονάδες επεξεργασίας ( processing modules)(εάν υπάρχουν)
- Σημεία δεδομένων που συλλέγονται σε διαφορετικούς χρόνους της ημέρας κ.α.

### 7.1.4 Περιορισμοί

Όπως φαίνεται στο εργαστηριακό εγχειρίδιο της δοκιμής Abbott: (αναθεωρημένο 2021) το κιτ προορίζεται:

- για χρήση μόνο με άδεια χρήσης έκτακτης ανάγκης
- για in vitro διαγνωστική χρήση μόνο υπό την έγκριση έκτακτης ανάγκης του FDA (Food Drug Administration)

- μόνο για κλινική εργαστηριακή χρήση. Δεν είναι για οικιακή χρήση, χρήση από μη εξειδικευμένο προσωπικό
- Τα αποτελέσματα πρέπει να χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με άλλα δεδομένα. π.χ. συμπτώματα, αποτελέσματα άλλων δοκιμών και κλινικές εντυπώσεις και όχι μόνο τους
- Ανοσοκατασταλαμένοι ασθενείς που έχουν COVID-19 μπορεί να έχουν καθυστερημένη απόκριση αντισωμάτων και να παράγουν επίπεδα αντισωμάτων τα οποία ενδέχεται να μην ανιχνευθούν ως θετικά από τον προσδιορισμό.
- Ένα θετικό αποτέλεσμα μπορεί να μην υποδεικνύει προηγούμενη λοίμωξη SARS-CoV-2.
- Τα αρνητικά αποτελέσματα δεν αποκλείουν τη μόλυνση από SARS-CoV-2, ιδιαίτερα σε εκείνους που έχουν έρθει σε επαφή με τον ιό. Θα πρέπει να εξεταστεί η εξέταση με μοριακό διαγνωστικό για την αξιολόγηση της ενεργού μόλυνσης σε αυτά τα άτομα.
- Τα αποτελέσματα των δοκιμών αντισωμάτων δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ως μόνη βάση για τη διάγνωση ή τον αποκλεισμό της μόλυνσης από SARS-CoV-2 ή για την ενημέρωση της κατάστασης της λοίμωξης.
- Δείγματα γενεαλογικής προέλευσης με άμεσες ενδείξεις αντισωμάτων σε στελέχη του κορωνοϊού nonSARS-CoV-2 (κοινό κρυολόγημα) όπως τα HKU1, NL63, OC43 ή 229E δεν έχουν αξιολογηθεί με αυτόν τον προσδιορισμό.
- Να μην χρησιμοποιείται για τον έλεγχο μονάδων αίματος για λοίμωξη SARS-CoV-2.
- Δείγματα ασθενών που έλαβαν παρασκευάσματα μονοκλωνικών αντισωμάτων ποντικού για διάγνωση ή θεραπεία μπορεί να περιέχουν ανθρώπινα αντισώματα κατά του ποντικού (HAMA). Τέτοια δείγματα μπορεί να εμφανίζουν είτε ψευδώς αυξημένες είτε μειωμένες τιμές όταν ελέγχονται με κιτ δοκιμασίας όπως το SARS-CoV-2 IgG που χρησιμοποιούν μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού.
- Ετερόφιλα αντισώματα στον ανθρώπινο ορό μπορούν να αντιδράσουν με ανοσοσφαιρίνες αντιδραστήριου, παρεμβαίνοντας στους in vitro ανοσοπροσδιορισμούς. Οι ασθενείς που εκτίθενται συνήθως σε ζώα ή σε προϊόντα ορού ζώων μπορεί να είναι επιρρεπείς σε αυτήν την παρέμβαση και μπορεί να παρατηρηθούν ανώμαλες τιμές.

• Ο ρευματοειδής παράγοντας (RF) στον ανθρώπινο ορό μπορεί να αντιδράσει με αντιδραστήρια ανοσοσφαιρίνες, παρεμβαίνοντας σε *in vitro* ανοσοπροσδιορισμούς (όπως συμβαίνει με όλα τα *kit* δοκιμής CMIA, που αναφέρονται στο Boscato et al, 1988)

### 7.1.5 Κλινική απόδοση

Πραγματοποιήθηκε σε επόμενα στάδια μια μελέτη από τα Abbott Laboratories (2021) για τον προσδιορισμό της κλινικής απόδοσης της δοκιμασίας SARS-CoV-2 IgG. Για την εκτίμηση της θετικής ποσοστιαίας συμφωνίας (PPA), μεταξύ της δοκιμασίας SARS-CoV-2 IgG και του PCR, συλλέχθηκαν 122 δείγματα ορού και πλάσματος σε διαφορετικούς χρόνους από 31 άτομα που βρέθηκαν θετικά στον SARS-CoV-2 από PCR και παρουσίασαν επίσης συμπτώματα του COVID-19.

Κάθε δείγμα δοκιμάστηκε χρησιμοποιώντας τον προσδιορισμό SARS-CoV-2 IgG. Υπολογίστηκε ο Ολικός Percentage Agreement (Ολική Ποσοστιαία Συμφωνία) και το διάστημα εμπιστοσύνης (confidence interval) 95% (CI). Για να εκτιμηθεί η συμφωνία αρνητικού ποσοστού (NPA), δοκιμάστηκαν 1070 δείγματα ορού και πλάσματος από άτομα που θεωρήθηκαν αρνητικά για τον SARS-CoV-2. Από τα 1070 δείγματα, 997 δείγματα συλλέχθηκαν πριν από τον Σεπτέμβριο του 2019 (πριν από την έξαρση του COVID-19).

Επιπρόσθετα 73 δείγματα συλλέχθηκαν το 2020 από άτομα που εμφάνιζαν σημάδια αναπνευστικής ασθένειας αλλά βρέθηκαν αρνητικά για SARS-CoV-2 με μέθοδο PCR. Και τα 1070 δείγματα δοκιμάστηκαν χρησιμοποιώντας τον προσδιορισμό SARS-CoV-2 IgG. Υπολογίστηκε το NPA και το 95% CI.

#### Positive Agreement by Days Post-Symptom Onset

Days Post-Symptom Onset	n	Positive	Negative	PPA (95% CI)
< 3	4	0	4	0.00% (0.00, 60.24)
3 - 7	8	2	6	25.00% (3.19, 65.09)
8 - 13	22	19	3	86.36% (65.09, 97.09)
≥ 14	88 <sup>a</sup>	88	0	100.00% (95.89, 100.00)

Figure 4 Συμφωνία αποτελεσμάτων. Πηγή: Abbott Laboratories, 2021

## 7.2 LIAISON® SARS-CoV-2 S1/S2 IgG

Το LIAISON® SARS-CoV-2 S1/S2 IgG είναι ένας ανοσοπροσδιορισμός χημειοφωταύγειας (CLIA) που χρησιμοποιείται για την ποιοτική ανίχνευση των IgG αντισωμάτων στον SARS-CoV-2 στον ανθρώπινο ορό και στο πλάσμα (ηπαρίνη νατρίου, λίθιο heparin, και EDTA καλίου).

Το LIAISON® SARS-CoV-2 S1/S2 IgG τείνει να χρησιμοποιηθεί ως βοήθημα για να ανακαλύψει τα άτομα με μια προσαρμοστική ανοσοαπόκριση στον SARS-CoV-2, υποδεικνύοντας πρόσφατη ή προηγούμενη προσβολή από την ασθένεια (Diasorin, 2021).

. Το LIAISON® SARS- CoV-2 S1/S2 IgG δεν πρέπει να χρησιμοποιείται για την διάγνωση ή τον αποκλεισμό οξείας λοίμωξης SARS-CoV-2. Οι δοκιμές περιορίζονται σε δοκιμαστικά σε εργαστήρια που έχουν πιστοποιηθεί σύμφωνα με τις τροπολογίες Clinical Laboratory Improvement του 1988 (CLIA), 42 U.S.C 263a, που πληρούν τις απαιτήσεις για τη διενέργεια δοκιμών απόδοσης ή υψηλής πολυπλοκότητας (Diasorin, 2021).

Τα αποτελέσματα αφορούν την ανίχνευση των σωμάτων SARS CoV-2. Τα αντισώματα IgG έναντι του SARS-CoV-2 είναι ενδογενώς ενέσιμα στο αίμα αρκετές ημέρες μετά την αρχική μόλυνση, αν και ο χρόνος που υπάρχουν τα αντισώματα μετά τη μόλυνση δεν χαρακτηρίζεται καλά. Τα άτομα μπορεί να έχουν αποστειρωμένο ιό για αρκετές εβδομάδες για την υποβολή της ορομετατροπής (Diasorin, 2021).

### 7.2.1 Μέθοδος

Τα ειδικά ανασυνδυασμένα S1 και S2 αντιγόνα χρησιμοποιούνται για την επάλειψη μαγνητικών μορίων (στερεά φάση) και τα μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού σε ανθρώπινη IgG συνδέονται με μια isoluminol παράγωγο (derivative).

Κατά τη διάρκεια της πρώτης επώασης, το SARS-CoV-2 IgG ένα αντίσωμα που υπάρχει σε βαθμονομητές (calibrators), δείγματα συζεύγονται με τη στερεή φάση μέσα από τα ανασυνδυασμένα S1 και S2 αντιγόνα (Diasorin, 2021). Κατά τη δεύτερη επώαση το συζευγμένο αντίσωμα αντιδρά με το IgG στο SARS-CoV-2 που είναι ήδη συνδεδεμένο στη στερεή φάση.

Μετά από κάθε επώαση ότι δεν είναι συζευγμένο αφαιρείται με έναν κύκλο πλύσης. Στη συνέχεια, προστίθενται τα αντιδραστήρια εκκίνησης (starter reagents) και έτσι δημιουργείται μια άμεση αντίδραση χημειοφωταύγειας. Το φωτεινό σήμα, και συνεπώς η ποσότητα του συζυγούς isoluminol-αντιγόνου, μετριέται με φωτοπολλαπλασιαστή ως

συναφείς μονάδες φωτός (RLU) και είναι σε απόδειξη της παρουσίας του IgG σε SARS-CoV2 (Diasorin, 2021).

### 7.2.2 Περιορισμοί της μεθόδου

(όπως αυτές αναφέρονται στο εγχειρίδιο χρήσης της Liaison, 2021)

- Η βακτηριακή μόλυνση ή η θερμική αδρανοποίηση των δειγμάτων μπορεί να επηρεάσει τα αποτελέσματα της δοκιμής.
- Δείγματα από ασθενείς που λαμβάνουν θεραπευτικές δόσεις από Βιταμίνη Η, Β7 ή Β8 ενδέχεται να παρεμβαίνουν σε ανοσολογικές δοκιμασίες
- Η χρήση του LIAISON® SARS-CoV-2 S1/S2 IgG περιορίζεται στο εργαστηριακό προσωπικό που έχει εκπαιδευτεί. Όχι για οικιακή χρήση.
- Η απόδοση έχει τεκμηριωθεί μόνο με τους τύπους δειγμάτων που αναφέρονται στην προοριζόμενη χρήση. Άλλοι τύποι δειγμάτων δεν έχουν αξιολογηθεί και δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται με αυτόν τον προσδιορισμό.
- Τα αρνητικά αποτελέσματα δεν αποκλείουν τη μόλυνση από SARS-CoV2 και δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ως μοναδική βάση για αποφάσεις διαχείρισης ασθενών. Ψευδώς θετικά αποτελέσματα για αντισώματα IgG μπορεί να προκύψουν λόγω διασταυρούμενης αντιδραστικότητας από προϋπάρχοντα αντισώματα ή άλλες πιθανές αιτίες.
- Ένα αρνητικό αποτέλεσμα μπορεί να προκύψει εάν η ποσότητα αντισωμάτων για τον ιό SARS-CoV-2 που υπάρχει στο δείγμα είναι κάτω από το όριο ανίχνευσης της ανάλυσης, ή τα αντισώματα που ανιχνεύονται δεν υπάρχουν κατά το στάδιο της νόσου στο οποίο συλλέγεται δείγμα.
- Τα αποτελέσματα των δοκιμών αντισωμάτων δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται για τη διάγνωση ή τον αποκλεισμό οξείας λοίμωξης από SARS-CoV-2 ή για τον προσδιορισμό της κατάστασης της λοίμωξης.
- Η ανίχνευση αντισωμάτων IgG έναντι του SARS-CoV-2 προς το παρόν δεν έχει ακόμη τεκμηριωθεί για τον προσδιορισμό της μακροχρόνιας ανοσίας στον ιό ή για την προστασία του ασθενούς από την εκ νέου μόλυνση από τον ιό.
- Τα θετικά αποτελέσματα ενδέχεται να μην υποδεικνύουν προηγούμενη μόλυνση από SARS-CoV-2. Εξετάστε άλλες πληροφορίες, συμπεριλαμβανομένου του κλινικού και ένα δεύτερο αλλά διαφορετικό ορολογικό τεστ για να επιβεβαιώσετε μια ανοσολογική απάντηση.

- Τα αποτελέσματα που λαμβάνονται με αυτήν τη δοκιμή θα πρέπει να ερμηνεύονται μόνο σε συνδυασμό με κλινικά ευρήματα και τα αποτελέσματα από άλλες δοκιμές και αξιολογήσεις. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό εάν ο ασθενής είχε πρόσφατη έκθεση στον COVID-19 ή η κλινική εικόνα υποδεικνύει ότι ο COVID-19 είναι πιθανός και οι διαγνωστικές εξετάσεις για άλλες αιτίες ασθένειας (π.χ. άλλες αναπνευστικές ασθένειες) είναι αρνητικές. Σε αυτή την περίπτωση, θα πρέπει να γίνει άλλη δοκιμή για τον ιό SARS-CoV-2 (π.χ. δοκιμή PCR).
- Αυτή η εξέταση δεν πρέπει να χρησιμοποιείται για τον έλεγχο αιμοδοσίας.
- Τα θετικά αποτελέσματα μπορεί να οφείλονται σε παλαιότερη ή παρούσα μόλυνση με στελέχη του κορωνοϊού μη SARS-CoV-2, όπως ο κορωνοϊός HKU1, NL63, OC43 ή 229

### 7.2.3 Αξιολόγηση

Η συμφωνία θετικού ποσοστού (PPA) μεταξύ της δοκιμασίας LIAISON® SARS-CoV-2 S1/S2 IgG και του συγκριτικού τεστ PCR προσδιορίστηκε με έρευνα 135 δειγμάτων που συλλέχθηκαν με την πάροδο του χρόνου από 76 Ευρωπαίους ασθενείς, από την Diasorin το 2021. Η μόλυνση με SARS-CoV-2 επιβεβαιώθηκε με δοκιμή RT-PCR κατά τη στιγμή της διάγνωσης.

Η δοκιμή LIAISON® SARS-CoV-2 S1/S2 IgG πραγματοποιήθηκε σε δείγματα που συλλέχθηκαν κατά την εισαγωγή και στη συνέχεια έως και 36 ημέρες για 44 ασθενείς που νοσηλεύτηκαν με μέτρια συμπτώματα και 11 εισήχθησαν στη ΜΕΘ με σοβαρά συμπτώματα. Είκοσι ένα δείγματα προέρχονταν από ασθενείς με Covid-19 επιβεβαιωμένους με RT-PCR, οι οποίοι τοποθετήθηκαν στη ΜΕΘ με ημερομηνίες συλλογής δειγμάτων σχετικά με τη διάγνωση PCR (Diasorin, 2021).

Χίλια ενενήντα (n = 1090) υποτιθέμενα αρνητικά δείγματα SARS-CoV-2 από μια ευρωπαϊκή εργαστηριακή ρουτίνα (n = 90) και d Ευρωπαίοι αιμοδότες (n = 1000) συλλέχθηκαν πριν από τον COVID-19 και δοκιμάστηκαν με το LIAISON® SARS - CoV-2 S1/S2 IgG. Από τα δείγματα που δοκιμάστηκαν, 1082 από τα 1090 ήταν αρνητικά με αποτέλεσμα NPA 99,3% (95% CI: 98,6 - 99,6%)



## 7.3 Σύγκριση των κιτ SARS-CoV-2 IgG CMIA Alinity system (Abbott) and LIAISON® SARS-CoV-2 S1/S2 IgG CLIA (DiaSorin)

### 7.3.1 Η έρευνα

Συνολικά, 127 ασθενείς που εκτέθηκαν στον SARS-CoV-2 συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη που διεξήχθη από τους Moniuszko et al το 2021. Μεταξύ αυτών, 68 (53,54%) ήταν ασθενείς που νοσηλεύονταν στο Τμήμα Λοιμωδών Νοσημάτων και Νεύρο λοιμώξεων του Ιατρικού Πανεπιστημίου του Μπιάλιστοκ, Πολωνία και 59 (46,46%) ήταν εργαζόμενοι στον τομέα της υγειονομικής περίθαλψης που εκτέθηκαν στον ιό αλλά δεν είχαν συμπτώματα λοίμωξης.

Η ομάδα των εργαζομένων στον τομέα της υγειονομικής περίθαλψης αποτελείται από προσωπικό που συνεργάστηκε με ασθενείς με COVID-19 στο τμήμα λοιμωδών ασθενειών από την αρχή της πανδημίας. Ήρθαν σε στενή επαφή με θετικούς ασθενείς με SARS-CoV-2 αλλά φορούσαν πάντα ΜΑΠ (Μέτρα ατομικής Προστασίας). Η διάγνωση της λοίμωξης SARS-CoV-2 επιβεβαιώθηκε με δοκιμή αντίστροφης μεταγραφής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (RT-PCR) χρησιμοποιώντας το σύστημα πραγματικού χρόνου CFX96 (Bio-Rad) από ρινοφαρυγγικά επιχρίσματα. Δείγματα αίματος για ανοσο-ορολογική διάγνωση συλλέχθηκαν από όλους τους ασθενείς στη μελέτη ένα μήνα μετά την έκθεση.

Χρησιμοποιήθηκαν δύο ορολογικές δοκιμές: 1. Ο ανοσοπροσδιορισμός χημειοφωταγούς μικροσωματιδίου SARS-CoV-2 IgG (CMIA) που χρησιμοποιήθηκε για την ποιοτική ανίχνευση αντισωμάτων αντι-N πρωτεΐνης IgG προς SARS-CoV-2 σε ανθρώπινο πλάσμα ή ορό στο σύστημα Alinity (Abbott) 2. Η τεχνολογία ανοσοπροσδιορισμού χημειοφωταύγειας LIAISON® SARS-CoV-2 S1/S2 IgG (CLIA) για τον ποσοτικό προσδιορισμό αντισωμάτων αντι-S1 και αντι-S2 IgG έναντι του SARS-CoV-2 (DiaSorin, 2021) (Moniuszko et al, 2021)

### 7.3.2 Αποτελέσματα

Τα αντισώματα αντι-SARS-CoV-2 IgG ταίριαζαν κατά την ανίχνευση πρωτεΐνης N και S σε 123 από 127 ασθενείς (96,85%). Τα αποτελέσματα διέφεραν μόνο σε 4 από τις 127 περιπτώσεις. Σε δύο περιπτώσεις, τα θετικά αποτελέσματα στη δοκιμή με βάση το N ήταν αρνητικά στη δοκιμή με βάση το S και σε δύο περιπτώσεις, τα αρνητικά αποτελέσματα στη δοκιμή με βάση το S ήταν θετικά στη δοκιμή με βάση το N ( $p = NS$ ). Και οι τέσσερις ασθενείς είχαν ήπια πορεία της νόσου και ανάρρωσαν εντελώς.

Σε 56 από τους 127 ασθενείς (44,09%), ανιχνεύθηκαν αντισώματα αντι-SARS-CoV-2 IgG. 55 από αυτούς τους 56 ασθενείς (98,2%) ήταν συμπτωματικοί. Κανένας από τους

εργαζόμενους στον τομέα της υγείας δεν ήταν θετικός. Ο μέσος τίτλος αντισωμάτων αντι-SARS-CoV-2 IgG κατά την ανίχνευση N πρωτεΐνης ήταν  $2,75 \pm 3,34$  (μέγιστο: 9,75 S/C), ενώ ο μέσος τίτλος αντισωμάτων IgG αντι-SARS-CoV-2 κατά την ανίχνευση της πρωτεΐνης S ήταν  $90,64 \cdot 68,97$  (μέγιστο: 330 AU/MI)

### 7.3.3 Συζήτηση

Η μελέτη τους δείχνει ότι και τα δύο τεστ έχουν συγκρίσιμες τιμές στην εκτίμηση της ανοσίας μετά τη μόλυνση, καθώς οι δοκιμασίες έδειξαν 96,85% συνολική συμβατότητα. Τα αποτελέσματα της μελέτης έρχονται σε αντίθεση με μια μελέτη των Burbelo et al (2020) που κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα αντισώματα κατά της νουκλεοκαψιδικής πρωτεΐνης του SARS-CoV-2 ήταν πιο ευαίσθητα (sensitive) από τα αντισώματα πρωτεϊνικής ακμής για τον εντοπισμό πρώιμης μόλυνσης.

Επιπλέον, οι Charlton et al (2020) παρατήρησαν ότι το CMIA που ανιχνεύει αντισώματα IgG έναντι ανασυνδυασμένης νουκλεοκαψιδικής πρωτεΐνης (όπως το τεστ των Abbott) είχε υψηλότερη ευαισθησία από την ανίχνευση αντισωμάτων πρωτεϊνικής αντίστασης (DiaSorin, 2021) τόσο σε αρνητικά όσο και σε θετικά δείγματα.

Από την άλλη πλευρά, οι Honemann et al. παρατήρησε ότι η απόδοση της ανάλυσης ήταν ανεξάρτητη από τη χρήση είτε των νουκλεοκαψιδίων είτε των spike πρωτεϊνών (Honerman et al, 2021). Οι Cerino et al (2021) ανέφεραν καλή συμφωνία για τον Abbott (συντελεστής κάπα Cohen: 0,69) και μέτρια συμφωνία για το Liaison (συντελεστής κάπα Cohen: 0,58). Ωστόσο, η μελέτη τους έδειξε ότι οι Abbott και Liaison SARS-CoV-2 CLIA IgG είχαν καλή συμφωνία στην εκτίμηση της οροπλάσης (seroplasm) (Cerino et al, 2021).

Αν και οι δοκιμές που βασίζονται σε αντισώματα κατά της πρωτεΐνης N φαίνεται να είναι πιο ευαίσθητες από αυτές που βασίζονται σε αντισώματα αντι-S, θα πρέπει να τονιστεί ότι οι δοκιμές με βάση το S είναι πιο συγκεκριμένες λόγω της χαμηλότερης πιθανότητας διασταυρούμενης αντιδραστικότητας. Επιπλέον, η ανοσοαπόκριση έναντι του αντιγόνου S φαίνεται να εμφανίζεται νωρίτερα σε σύγκριση με την απάντηση στο αντιγόνο N (Cerino et al, 2021).

Η μελέτη των Moniuszko το 2021 δείχνει τη χρησιμότητα και των δύο δοκιμών, ειδικά για επιδημιολογικούς σκοπούς. Στην πλειοψηφία των συμπτωματικών ασθενών, η μόλυνση με SARS-CoV-2 οδηγεί σε ανοσοποίηση και των δύο πρωτεϊνών. Επομένως, είναι σημαντικό να ανιχνευθούν αντισώματα με kit υψηλής ποιότητας. Περιορισμός της μελέτης τους ήταν το μικρό μέγεθος δείγματος, επομένως χρειάζονται περαιτέρω μελέτες.

## **7.4 Anti-SARS-CoV 2 ELISA (IgG)**

### **7.4.1 Το τεστ της EUROIMMUN**

Τα κιτ δοκιμής EUROIMMUN Anti-SARS-CoV-2 IgA και IgG (EUROIMMUN Medizinische Labor diagnostika AG, Lübeck, Γερμανία) (Euroimmun.com, 2020) είναι ενζυμικά συνδεδεμένες ανοσοπροσροφητικές δοκιμασίες (ELISA) που παρέχουν ημιποσοτικά ορολογικά αποτελέσματα έναντι του τομέα S1 της ακτινικής πρωτεΐνης του SARS-CoV-2 σε ορό ή πλάσμα (EDTA, ηπαρίνη λιθίου ή κιτρικό νάτριο πλάσμα).

Το RBD εντός του τομέα S1 έχει προσδιοριστεί ως ο στόχος εξουδετέρωσης αντισωμάτων με δυνατότητα προστατευτικής ανοσίας και εξουδετερώσεων αντισωμάτων που προκύπτουν κατά τον εμβολιασμό (Okba et al, 2020). Σε πολλές μελέτες έχει αποδειχθεί συσχέτιση μεταξύ αντισωμάτων anti-S και εξουδετέρωσης πλάσματος (Harvala et al, 2020).

Οι προσδιορισμοί EUROIMMUN Anti-SARS-CoV-2 IgA και IgG μπορούν να αυτοματοποιηθούν επιτρέποντας σχετικά υψηλή απόδοση των δοκιμών. Τόσο οι δοκιμασίες IgA όσο και οι IgG έχουν επικυρωθεί σε πολλές μελέτες σε όλο τον κόσμο και έχουν δείξει μεταβλητή απόδοση.

### **7.4.2 Αρχή της δοκιμής**

(Όπως φαίνεται στο εγχειρίδιο οδηγιών Euroimmun, 2020)

Τα φρεάτια αντιδραστηρίου της ELISA επικαλύφθηκαν με μια περιοχή S1 της spike πρωτεΐνης του SARS-CoV-2 εκφρασμένη ανασυνδυαστικά στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά HEK 293. Το κιτ δοκιμής περιέχει λωρίδες μικροπλάκας το καθένα με 8 φρεάτια αντιδραστηρίου αποκοπής (break off agent wells) επικαλυμμένα με ανασυνδυασμένη δομική πρωτεΐνη του SARS-CoV-2.

Στο πρώτο στάδιο αντίδρασης, αραιωμένα δείγματα ασθενών επωάζονται στα φρεάτια. Στην περίπτωση θετικών δειγμάτων, συγκεκριμένα αντισώματα IgG (επίσης IgA και IgM) θα συνδεθούν με τα αντιγόνα. Για την ανίχνευση των δεσμευμένων αντισωμάτων, πραγματοποιείται μια δεύτερη επώαση χρησιμοποιώντας ένα ένζυμο με την ετικέτα αντι-ανθρώπινο IgG (σύζευξη ενζύμου) που καταλύει μια χρωματική αντίδραση.

### **7.4.3 Ακρίβεια του τεστ**

Μελέτες για την ενδοεργαστηριακή ακρίβεια πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με την οδηγία CLSI EP05-A3 από την Euroimmun το 2020. Μετρήθηκαν τέσσερα δείγματα (αντιδραστικότητα κατανεμημένη σε ολόκληρο το εύρος μέτρησης). Η ακρίβεια δίνεται ως τυπική απόκλιση (SD) και συντελεστής διακύμανσης (CV).

n= 30	Sample 1		Sample 2		Sample 3		Sample 4	
<b>Mean ratio</b>	0.07		1.12		2.37		5.23	
<b>Range of ratio values</b>	0.04 – 0.09		1.00 – 1.32		2.00 – 2.71		4.59 – 6.02	
<b>Overall result</b>	negative		borderline/positive		positive		positive	
<b>% positive</b>	0.0%		56.7%		100.0%		100.0%	
<b>% borderline</b>	0.0%		43.3%		0.0%		0.0%	
<b>% negative</b>	100.0%		0.0%		0.0%		0.0%	
	<b>SD</b>	<b>%CV</b>	<b>SD</b>	<b>%CV</b>	<b>SD</b>	<b>%CV</b>	<b>SD</b>	<b>%CV</b>
<b>Repeatability</b>	0.012	16.0	0.060	5.4	0.091	3.9	0.231	4.4
<b>Between run</b>	0.000	0.0	0.021	1.9	0.058	2.4	0.168	3.2
<b>Within day</b>	0.012	16.0	0.063	5.7	0.108	4.6	0.285	5.5
<b>Between day</b>	0.002	2.3	0.060	5.4	0.174	7.4	0.089	1.7
<b>Within lab</b>	0.012	16.2	0.087	7.8	0.205	8.7	0.299	5.7

**Figure 2** Αξιολόγηση της ακρίβειας του κιτ Πηγή: Euroimmun handbook, 2020

#### 7.4.4. Διασταυρούμενη αντιδραστικότητα

Λόγω των χαμηλών ομολογιών της πρωτεΐνης S1 στην οικογένεια του κορωνοϊού, οι διασταυρούμενες αντιδράσεις στους περισσότερους ανθρώπινους παθογόνους εκπροσώπους αυτής της οικογένειας ιών ουσιαστικά αποκλείονται. Ωστόσο, λόγω της στενής σχέσης του SARS-CoV (-1) και του SARS-CoV-2, είναι πιθανές οι διασταυρούμενες αντιδράσεις μεταξύ αυτών των δύο ιών.

Οροί από ασθενείς με SARS-CoV (-1), MERS-CoV, HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-HKU1 ή HCoV-OC43 εξετάστηκαν για να το εξετάσουν περαιτέρω. Οι έντονες διασταυρούμενες αντιδράσεις εμφανίζονται κυρίως με αντισώματα IgG Anti-SARS-CoV (-1). Δεν παρατηρήθηκαν διασταυρούμενες αντιδράσεις σε άλλους ανθρώπινους παθογόνους κορωνοϊούς.

Μια επιπρόσθετη μελέτη διασταυρούμενης αντιδραστικότητας πραγματοποιήθηκε από ένα εθνικό εργαστήριο αναφοράς στις ΗΠΑ στα δυτικά χρησιμοποιώντας κλινικά δείγματα από ανθρώπινους παθογόνους εκπροσώπους αυτής της οικογένειας ιών και ορισμένους πληθυσμούς μη κορωνοϊών με ομοιότητες με αυτήν την οικογένεια ιών. Χαμηλή διασταυρούμενη αντιδραστικότητα παρατηρήθηκε σε ορισμένα είδη πνευμονίας

και στον αναπνευστικό συγκυτιακό ιό, αλλά αυτό είναι συνηθισμένο. Δεν παρατηρήθηκαν διασταυρούμενες αντιδράσεις σε άλλους παθογόνους στον άνθρωπο ιούς.

#### **7.4.5 Παρεμβολή**

Εκτιμήθηκε η πιθανή παρεμβολή από υψηλά επίπεδα αιμοσφαιρίνης, τριγλυκεριδίων και χολερυθρίνης. Δείγματα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αντισώματος αντι-SARS-CoV-2 IgG σε όλο το εύρος μέτρησης της δοκιμασίας εμβολιάστηκαν με πιθανές παρεμβολείς ουσίες και επώαστηκαν με το σύστημα δοκιμής σύμφωνα με το ένθετο της συσκευασίας. Τα αιμολυτικά, λιπαιμικά και εικονικά δείγματα δεν έδειξαν καμία επίδραση στο αποτέλεσμα έως τις συγκεντρώσεις 10 mg/ml αιμοσφαιρίνης, 20 mg/ml τριγλυκεριδίων και 0,4 mg/ml χολερυθρίνης στην μέθοδο ELISA.

Η εξειδίκευση της κατηγορίας αξιολογήθηκε μέσω της ευρωστίας της αντίδρασης δέσμευσης IgG αντισώματος ειδικού για τον SARS-CoV-2 παρουσία υψηλών επιπέδων ανθρώπινης ολικής IgG, IgM και IgA. Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα με spike σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αντισώματος antiSARS-CoV-2 IgG σε όλο το εύρος μέτρησης της δοκιμασίας. Δεν παρατηρήθηκε σημαντική επίδραση για συγκεντρώσεις έως 10,4 mg/ml για ανθρώπινη IgG, 1,4 mg/ml για ανθρώπινη IgM και 2,1 mg/ml για ανθρώπινη IgA.

#### **7.4.6 Κλινικές επιδόσεις**

##### **Θετική συμφωνία με την PCR**

Η θετική συμφωνία με την PCR αξιολογήθηκε για την ELISA Anti-SARS-CoV-2 (IgG) σε 4 διαφορετικές μελέτες. Η μία μελέτη πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με 5 διαφορετικά κλινικά νοσοκομεία και εργαστήρια από τη Γερμανία και οι άλλες 3 μελέτες πραγματοποιήθηκαν σε διάφορα ερευνητικά ιδρύματα/εργαστήρια αναφοράς στις Ηνωμένες Πολιτείες (Beavis et al, 2020 και Laasuniere et al, 2020). Δοκιμάστηκαν δείγματα ορού και πλάσματος .

Τα δείγματα ομαδοποιήθηκαν για ανάλυση σε δύο σύνολα με βάση τις διαθέσιμες πληροφορίες για την εκτίμηση του σταδίου της νόσου κατά τη συλλογή δείγματος ορολογίας: Το σετ 1 περιελάμβανε πληροφορίες για τις ημέρες μετά την εμφάνιση των συμπτωμάτων (n = 78 από 47 διαφορετικούς ασθενείς) και το Σετ 2 περιλάμβανε πληροφορίες για τις ημέρες μετά την επιβεβαίωση της PCR (n = 519) (Beavis et al, 2020).

Μετρώντας τα οριακά αποτελέσματα ως αρνητικά, το EUROIMMUN Anti-SARS-CoV-2 ELISA (IgG) εμφάνισε θετική συμφωνία 13,9% με την PCR πριν από 10 ημέρες

μετά την έναρξη των συμπτωμάτων (n = 36), από 11 έως 20 ημέρες μετά την έναρξη των συμπτωμάτων, η θετική συμφωνία φάνηκε να είναι 61,1% (n = 36) και μετά από 21 ημέρες μετά την έναρξη των συμπτωμάτων η θετική συμφωνία με PCR ήταν 100,0% (n = 6) (Beavis et al, 2020)

Μετρώντας τα οριακά αποτελέσματα ως αρνητικά, το EUROIMMUN Anti-SARS-CoV-2 Η ELISA (IgG) εμφάνισε θετική συμφωνία 21,7% με την PCR πριν από 5 ημέρες μετά την επιβεβαίωση της PCR (n = 240), από 5 έως 10 ημέρες μετά την επιβεβαίωση της PCR, η θετική συμφωνία φάνηκε να είναι 69,4% (n = 242) και μετά από 11 ημέρες μετά την επιβεβαίωση της PCR, η θετική συμφωνία με την PCR ήταν 81,1% (n = 37) (Beavis et al, 2020)

#### **7.4.7 Επικύρωση από ανεξάρτητες αρχές**

Το EUROIMMUN SARS-COV-2 ELISA (IgG) δοκιμάστηκε βάσει αυτού του προγράμματος επικύρωσης στις 2020-04-21 στο Εθνικό Εργαστήριο Frederick for Cancer Research (FNLCR), ένα Κέντρο Έρευνας και Ανάπτυξης (FFRDC ) το οποίο χρηματοδοτείται από το Εθνικό Ινστιτούτο Καρκίνου (NCI) (FNLCR, 2020).

Η δοκιμή επικυρώθηκε έναντι μιας ομάδας προηγουμένως κατεψυγμένων δειγμάτων που αποτελούνταν από 30 δείγματα ορού θετικών αντισωμάτων SARS-CoV-2 και 80 δείγματα ορού και πλάσματος αρνητικών αντισωμάτων. Κάθε ένα από τα 30 θετικά δείγματα επιβεβαιώθηκε με δοκιμή ενίσχυσης νουκλεϊκού οξέος (NAAT) και αμφότερα τα αντισώματα IgM και IgG επιβεβαιώθηκαν ότι υπάρχουν και στα 30 δείγματα.

Η παρουσία αντισωμάτων στα δείγματα επιβεβαιώθηκε με διάφορες ορθογώνιες μεθόδους πριν από τη δοκιμή με το ELISA EUROIMMUN Anti-SARS-CoV-2 (IgG). Η παρουσία αντισωμάτων IgM και IgG επιβεβαιώθηκε ειδικά με μία ή περισσότερες μεθόδους σύγκρισης. Τα θετικά αντισώματα δείγματα επιλέχθηκαν σε διαφορετικούς τίτλους αντισωμάτων. Όλα τα αρνητικά αντισωματικά δείγματα συλλέχθηκαν πριν από το 2020 και περιλαμβάνουν

- i) Εβδομήντα (70) δείγματα που επιλέχθηκαν χωρίς να ληφθεί υπόψη η κλινική κατάσταση, "Αρνητικά" και
- ii) Δέκα (10) δείγματα που επιλέχθηκαν από τον ορό τράπεζας από ασθενείς με HIV+, "HIV+".

Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε από έναν χειριστή χρησιμοποιώντας μία παρτίδα της ELISA EUROIMMUN Anti-SARS-CoV-2 (IgG). Τα διαστήματα εμπιστοσύνης για την

ευαισθησία και την ειδικότητα υπολογίστηκαν ανά μέθοδο βαθμολογίας που περιγράφεται στο CLSI EP12-A2 (2008).

Για την αξιολόγηση της διασταυρούμενης αντιδραστικότητας με τον HIV+, αξιολογήθηκε εάν ένας αυξημένος ψευδώς θετικός δείκτης μεταξύ των αρνητικών σε αντισώματα δείγματα με HIV ήταν στατιστικά υψηλότερος από τον ψευδώς θετικό δείγμα μεταξύ των αρνητικών αντισωμάτων χωρίς HIV (για αυτό, ένα διάστημα εμπιστοσύνης για τη διαφορά σε ψευδώς θετικά ποσοστά υπολογίστηκε ανά μέθοδο βαθμολογίας που περιγράφεται από τον Altman).

Τα αποτελέσματα και η ανάλυση δεδομένων παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες. Το EUROIMMUN Anti-SARS-CoV-2 ELISA (IgG) παρουσίασε θετική συμφωνία 90% (95% C.I. 73,5%-97,9%),

SARS-COV-2 ELISA (IgG)	Comparator Method			Collected pre-2020		Total
	Antibody Positive			Antibody Negative		
	IgM+, IgG+	IgM+, IgG-	IgM-, IgG+	Negative	HIV+	
IgG+	27					27
Equivocal	2					2
IgG-	1			70	10	81
Total	30			70	10	110

Table 2: Summary Statistics

Measure	Estimate	Confidence Interval
IgG Sensitivity	90.0% (27/30)	(74.4%; 96.5%)
IgG Specificity	100% (80/80)	(95.4%; 100%)
Combined Sensitivity	90.0% (27/30)	(74.4%; 96.5%)
Combined Specificity	100% (80/80)	(95.4%; 100%)
Combined PPV for prevalence = 5.0%	100%	(46.1%; 100%)
Combined NPV for prevalence = 5.0%	99.5%	(98.6%; 99.8%)
Cross-reactivity with HIV+	0.0% (0/10), not detected	

### Figure 5 Συνοπτικά αποτελέσματα της ανεξάρτητης έρευνας

Συνοψίζοντας τους περιορισμούς του τεστ (όπως αυτοί αναφέρονται στο Euroimmun 2020 handbook):

- Τα αρνητικά αποτελέσματα δεν αποκλείουν τη μόλυνση από SARS-CoV-2 και δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ως μοναδική βάση για αποφάσεις διαχείρισης ασθενών.
- Η ευαισθησία του τεστ αμέσως μετά τη μόλυνση είναι άγνωστη.
- Ψευδώς θετικά αποτελέσματα για αντισώματα IgG μπορεί να προκύψουν λόγω διασταυρούμενης αντιδραστικότητας από προϋπάρχοντα αντισώματα ή άλλες πιθανές αιτίες.
- Δείγματα με θετικά αποτελέσματα θα πρέπει να επιβεβαιώνονται με εναλλακτικές μεθόδους (εξ) δοκιμής και κλινικά ευρήματα πριν γίνει διαγνωστικός προσδιορισμός.
- Παρατηρήθηκε διασταυρούμενη αντιδραστικότητα με αντισώματα αντι-SARS-CoV-1 IgG.
- Ένα αρνητικό αποτέλεσμα μπορεί να προκύψει εάν η ποσότητα των αντισωμάτων για τον ιό SARS-CoV-2 που υπάρχει στο δείγμα είναι κάτω από το όριο ανίχνευσης της ανάλυσης ή εάν ο ιός έχει υποστεί δευτερεύουσες μεταλλάξεις αμινοξέων στον επίτοπο που αναγνωρίζεται από το αντίσωμα που χρησιμοποιείται στη δοκιμή.
- Ένα θετικό αποτέλεσμα μπορεί να μην υποδεικνύει προηγούμενη λοίμωξη SARS-CoV-2. Εξετάστε άλλες πληροφορίες, συμπεριλαμβανομένου του κλινικού ιστορικού και του επιπολασμού τοπικής νόσου, στην εκτίμηση της ανάγκης για ένα δεύτερο αλλά διαφορετικό ορολογικό τεστ για να επιβεβαιώσετε μια ανοσολογική απάντηση.
- Δεν μπορούν τα τεστ αυτά να χρησιμοποιηθούν για τον έλεγχο αιμοδοσίας.
- Προς το παρόν δεν είναι γνωστό εάν η παρουσία αντισωμάτων στον SARS-CoV-2 προσδίδει ανοσία στην επαναμόλυνση.
- Η σωστή απόδοση της συλλογής και αποθήκευσης του δείγματος είναι ζωτικής σημασίας για τα αποτελέσματα των δοκιμών.
- Το σύστημα δοκιμής είναι επικυρωμένο για τον ποιοτικό προσδιορισμό της αντι-SARS-CoV-2 IgG μόνο σε ανθρώπινο ορό ή πλάσμα.
- Η δεσμευτική δράση των αντισωμάτων και η δραστηριότητα του ενζύμου που χρησιμοποιείται εξαρτώνται από τη θερμοκρασία. Συνεπώς, συνιστάται η χρήση θερμοστατικά ρυθμισμένου επωαστή ELISA σε όλα τα στάδια επώασης.



- Όσο υψηλότερη είναι η θερμοκρασία δωματίου κατά τη διάρκεια των σταδίων επώασης, τόσο μεγαλύτερη θα είναι η OD. Οι ίδιες παραλλαγές ισχύουν επίσης για τους χρόνους επώασης. Ωστόσο, οι βαθμονομητές υπόκεινται στις ίδιες επιρροές, με αποτέλεσμα τέτοιες παραλλαγές να αντισταθμίζονται σε μεγάλο βαθμό στον υπολογισμό του αποτελέσματος.
- • Ανεπαρκής πλύση (π.χ. λιγότερο από 3 κύκλοι πλύσης, πολύ μικρές ποσότητες ρυθμιστικού πλύσης ή πολύ σύντομοι χρόνοι παραμονής) μπορεί να οδηγήσει σε ψευδείς υψηλές ενδείξεις OD.
- • Υπόλοιπο υγρού (> 10 μl) στα φρεάτια αντιδραστήριου μετά το πλύσιμο μπορεί να επηρεάσει το υπόστρωμα και να οδηγήσει σε ψευδώς χαμηλές ενδείξεις OD.
- • Η μερική ή πλήρης προσαρμογή του συστήματος δοκιμής στη χρήση οργάνων για αυτοματοποιημένη επεξεργασία δείγματος ή άλλες συσκευές χειρισμού υγρών μπορεί να οδηγήσει σε διαφορές μεταξύ των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται με την αυτοματοποιημένη επεξεργασία και εκείνων που λαμβάνονται με χειροκίνητη διαδικασία. Είναι ευθύνη του χρήστη να επικυρώσει τα χρησιμοποιούμενα όργανα έτσι ώστε να αποδώσουν το αποτέλεσμα της δοκιμής εντός του αξιόπιστου εύρους.

## **8. Πως οι διαφορετικές μορφές-μεταλλάξεις του SARS-CoV-2 επηρεάζουν τα τεστ αντισωμάτων**

Από τα τέλη του 2020, διάφορες παραλλαγές του SARS-CoV-2 έχουν εμφανιστεί παγκοσμίως-άλφα (B.1.1.7), βήτα (B.1.351), γάμμα (P.1/B.1.1.128) και δέλτα (B.1.617.2) - τα οποία είναι εν μέρει πιο μεταδοτικά από τον αρχικό τύπο ιού και ως εκ τούτου εξαπλώνονται πιο γρήγορα στους πληθυσμούς (Sholz, 2021).

Αυτές οι παραλλαγές αποκαλύπτουν γενετικές αλλαγές (μεταλλάξεις) στη λεγόμενη περιοχή δέσμευσης υποδοχέα (RBD), η οποία είναι κρίσιμη για την είσοδο του ιού στα ανθρώπινα κύτταρα-ξενιστές. Επίσης, το RBD είναι ένα σημαντικό συστατικό του

αντιγόνου που εφαρμόζεται στα περισσότερα από τα συστήματα δοκιμής αντισωμάτων, δηλαδή στον τομέα S1 της ακτινικής πρωτεΐνης SARS-CoV-2.

Παρά τις μεταλλάξεις αυτές, δεν αναμένονται επιδράσεις στις επιδόσεις των δοκιμών αντισώματος επειδή οι μεμονωμένες μεταλλάξεις ενός αντιγόνου συνήθως δεν έχουν καμία επίδραση στα χαρακτηριστικά σύνδεσης του αντίστοιχου αντισώματος (Taubel, 2021).

Αυτό τώρα επιβεβαιώθηκε επίσης πειραματικά από μια εσωτερική μελέτη που χρησιμοποίησε δείγματα ασθενών που είχαν μολυνθεί με παραλλαγές SARS-CoV-2. Συνολικά 27 δείγματα από ασθενείς που είχαν μολυνθεί με την παραλλαγή άλφα, βήτα ή γάμμα του SARS-CoV-2 αναλύθηκαν με νέα συστήματα δοκιμής Anti-SARS-CoV-2 ELISA (IgA) και Anti-SARS-CoV-2 QuantiVac ELISA (IgG) (Taubel, 2021) (μελέτη της Autoimmun για το 2021).

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι τα αντισώματα έναντι των παραλλαγών SARS-CoV-2 άλφα, βήτα και γάμμα μπορούν επίσης να ανιχνευθούν αξιόπιστα με τα συστήματα δοκιμής που βασίζονται σε S1. (Sholz, 2021)

## **9. Προβλήματα και συμπεράσματα σε σχέση με τα αποτελέσματα των τεστ αντισωμάτων για τον Covid-19**

Μια μελέτη από τους Taubel et al το 2020 εισήγαγε μια διαχρονική ανάλυση των ποσοστών μόλυνσης από COVID-19 χρησιμοποιώντας διαγνωστικά τεστ PCR, ανοσοδοκιμασίας μεμβράνης και ανοσοδοκιμασίας μικροσωματιδίων χημειοφωταύγειας (CMIA). Τα δεδομένα τους επιβεβαιώνουν ότι τα επίπεδα αντισωμάτων μειώνονται τους τρεις μήνες μετά την εμφάνιση των συμπτωμάτων. Η σύγκριση των τριών μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν υποδηλώνει ότι η ποσοτική δοκιμή CMIA μπορεί να υπερβάλλει στα αποτελέσματα της τον αριθμό αρνητικών ατόμων COVID-19.

Για την καλύτερη κατανόηση της διάρκειας της ανοσίας, ποσοτικοποίησαν τα επίπεδα IgG 21 ατόμων μετά τη μόλυνσή τους με SARS-CoV-2 χρησιμοποιώντας την ανοσοπροσδιορισμό χημειοφωταύγειας μικροσωματιδίων Abbott Laboratories (Illinois, USA) (CMIA). Το τεστ λειτουργεί δεσμεύοντας σε αντισώματα IgG ειδικά για τον SARS-CoV-2 σε δείγμα αίματος. Κατά τη σύνδεση, το υπόστρωμα της αντίδρασης δημιουργεί φωταύγεια, η οποία μετρείται με το σύστημα Abbott Architect. Αυτή η φωταύγεια είναι

ευθέως ανάλογη με τη συγκέντρωση IgG ειδικού αντισώματος SARS-CoV-2 και ποσοτικοποιείται με μονάδες σήματος/διακοπής (S/CO) (Bryan et al, 2020).

Το Abbott CMIA είναι τεχνικά μια ποιοτική ανάλυση, με τιμές πάνω από 1,4 μονάδες S/CO που αναφέρονται ως θετικές στον SARS-CoV-2. Αυτή η τιμή αποκοπής (cut-off value) έχει υπολογιστεί για να μεγιστοποιήσει τις θετικές προβλέψεις (PPV) και να ελαχιστοποιήσει τα ψευδώς θετικά, σύμφωνα με τον κατασκευαστή. Η αρχή για τη Δημόσια Υγεία της Αγγλίας διαπίστωσε ότι η ειδικότητα ήταν 100%, αλλά η ευαισθησία ήταν 93% (Public Health England, 2020). Κατ' αρχήν, η δοκιμή CMIA θα πρέπει να μπορεί να ποσοτικοποιήσει τους ειδικούς για τον SARS-CoV-2 τίτλους αντισωμάτων IgG, κάτι που θα ήταν πιο χρήσιμη χρήση του συστήματος.

Τα δεδομένα κατέδειξαν μια συνολική τάση μείωσης των τίτλων(tites) IgG (Εικόνα 6). Μετά από δύο μήνες, οι τίτλοι ήταν κατά μέσο όρο τρεις φορές μικρότεροι από ό, τι στο αποκορύφωμά τους. Η πλειονότητα των εθελοντών παρουσίασε μείωση στους τίτλους αντισωμάτων τις 90 ημέρες μετά την έναρξη των συμπτωμάτων, και αυτή παρέμεινε χαμηλή.

Οι ερευνητές παρατήρησαν αυξανόμενους τίτλους σε ένα άτομο και καμία αλλαγή στους τίτλους για άλλα δύο άτομα. Για πέντε άτομα, ήταν διαθέσιμο μόνο ένα σημείο δεδομένων. Λόγω του μικρού μεγέθους του δείγματος, εφαρμόσαν ένα γενικευμένο μοντέλο εξίσωσης εκτίμησης (Odueyungbo et al, 2008) για να εκτιμήσουν τον χρόνο ημιζωής αντισώματος σε αριθμό 70,4 ημερών. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν καταγραφεί από άλλες διαχρονικές μελέτες, στις οποίες παρατηρήθηκε κορυφή στον τίτλο IgG μετά από 10-15 ημέρες (Cervia et al, 2020), ακολουθούμενη από μια φθίνουσα απόκριση IgG τους επόμενους δύο έως τρεις μήνες (Long et al, 2020)

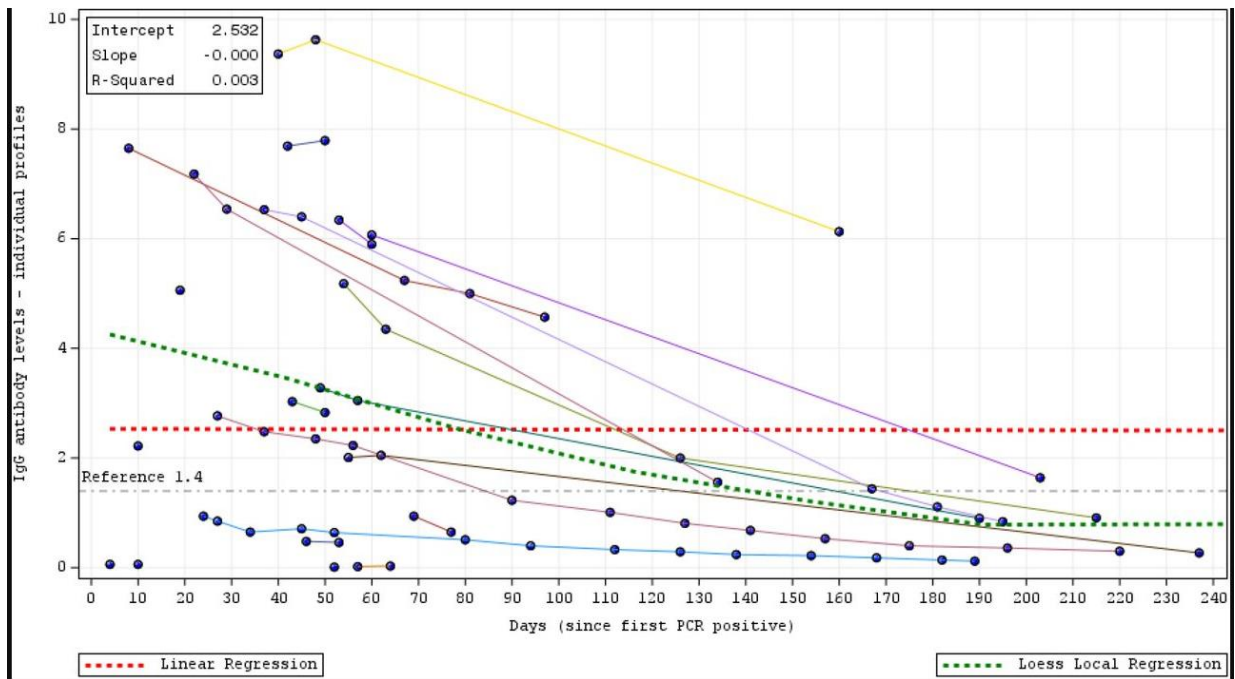


Figure 6 Τάση μείωσης των τίτλων IgG.

Τα άτομα που επιβεβαιώθηκαν θετικά για μόλυνση SARS-CoV-2 με PCR, ανοσοπροσδιορισμό μεμβράνης και μέσω διάγνωσης από γιατρό σύμφωνα με τα συμπτώματά τους, είχαν τιμές S/CO κάτω από 1,4. Οι ασθενείς που επιβεβαιώθηκαν αρνητικοί για τον SARS-CoV-2 με αυτές τις μεθόδους είχαν τιμές S/CO 0,01 ή λιγότερες. η υψηλότερη τιμή S/CO για ένα άτομο με αρνητικό έλεγχο ήταν 1,22. Σύμφωνα με τις ποιοτικές οδηγίες της Abbott, αυτοί οι ασθενείς θα δηλωθούν αρνητικοί για SARS-CoV-2 IgG.

## Συζήτηση

Αυτό που προκύπτει από την τελευταία μελέτη που παρουσιάστηκε είναι η ανάγκη να είναι δυνατή η σωστή διάκριση μεταξύ μετα-COVID και άλλων ιογενών λοιμώξεων. Παρόλο που μελέτες έχουν δείξει ότι ο τίτλος των κυκλοφορούντων εξουδετερωτικών αντισωμάτων μειώθηκε μετά τη μόλυνση, παραμένει ασαφές εάν η δύναμη της χυμικής απόκρισης, όπως μετρείται με τον τίτλο αντισωμάτων, συσχετίζεται με ευνοϊκά αποτελέσματα COVID-19 (Wolfel et al, 2020). Φαίνεται πιθανό ότι η χυμική ανοσία όπως διαμεσολαβείται από την κυκλοφορούσα IgG δεν πρέπει να είναι η μόνη παράμετρος που

μετράται κατά τον προσδιορισμό της ανοσίας μετά τη μόλυνση. Παρ'όλα αυτά, πρέπει να ληφθούν υπόψη οι μειωμένοι τίτλοι αντισωμάτων.

Περαιτέρω μελέτες για την ανοσία κατά του SARS-CoV-2 χρειάζονται επειγόντως για να βοηθήσουν στην καθοδήγηση των πολιτών, της δημόσιας υγείας και των στρατηγικών εμβολίων στο μέλλον για την ελαχιστοποίηση της εξάπλωσης της ιογενούς λοίμωξης, αφού όπως μπορεί κανείς να δει κανένας από τους κατασκευαστές των τεστ δεν έχει σαφή αποτελέσματα για την περίοδο ανοσίας.

.Σε δοκιμές εμβολίων, διαπιστώθηκε μια θετική σημαντική συσχέτιση μεταξύ της αντι-SARS-CoV-2 spike πρωτεΐνης IgG που μετρήθηκε με τυποποιημένη ELISA και δοκιμασία μικρό-εξουδετέρωσης ζωντανού ιού SARS-CoV-2 (Folegatti et al, 2020). Εάν τα εξουδετερωτικά αντισώματα αποδειχθεί ότι είναι προστατευτικά στον άνθρωπο και μπορούν να τον θωρακίσουν έναντι του ιού, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ορολογικές δοκιμασίες ρουτίνας (συμπεριλαμβανομένου του CMIA του Abbott) για την τυποποιημένη αξιολόγηση λειτουργικών αντισωμάτων από υποψήφιους αποδέκτες του εμβολίου.

Άλλα δεδομένα μας υποδηλώνουν επίσης ότι ένας αριθμός ασθενών που επιβεβαιώθηκε ότι ήταν θετικοί στον COVID-19 φαίνονταν να είναι αρνητικοί όταν χρησιμοποιούσαν το τεστ Abbott CMIA, υποδηλώνοντας ότι το σταθερό όριο για θετική διάγνωση έχει οριστεί πολύ υψηλό. Ο λόγος που το κατώφλι (threshold) είναι πολύ υψηλό θα μπορούσε να είναι ότι η επικύρωση της δοκιμασίας μπορεί να έχει διεξαχθεί σε ασθενείς με εξαιρετική συμπτωματολογία COVID-19, καθιστώντας το υπάρχον όριο ακατάλληλο για τον ευρύτερο πληθυσμό, το οποίο είναι ένα πρόβλημα που παρατηρήθηκε προηγουμένως στις ανοσοδοκιμές για τον SARS-CoV-2 (Manalac, 2020).

Το πρόβλημα ψευδώς θετικών ή ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων είναι ένα πρόβλημα που κανένας κατασκευαστής από τους παραπάνω δεν έχει επιλύσει, δυστυχώς, 100%. Επιπρόσθετα, όλοι οι κατασκευαστές αναφέρουν ότι τα τεστ αυτά είναι αποτελεσματικά όταν διενεργούνται από ειδικευμένο προσωπικό, κάτι που εγείρει ερωτήματα για τα self-tests. Είναι απολύτως απαραίτητο να δημιουργηθούν εμπορικά βιώσιμα και ακριβή διαγνωστικά τεστ που μπορούν να διενεργηθούν στο σπίτι με αξιοπιστία.

Καθώς αυξάνεται ο κατάλογος των μακροπρόθεσμων επιπτώσεων του COVID-19, καθίσταται ζωτικής σημασίας ο ακριβής προσδιορισμός εάν ένας ασθενής έχει μολυνθεί, επειδή ακόμη και ασυμπτωματικές ή ήπιες περιπτώσεις σχετίζονται με επιβλαβείς μακροπρόθεσμες επιδράσεις σε όργανα όπως οι πνεύμονες και ο εγκέφαλος (Manalac ,

2020). Η αβεβαιότητα σχετικά με την αξιοπιστία των δοκιμών αντισωμάτων στην περίπτωση του COVID-19 υπογραμμίζει την ανάγκη περαιτέρω έρευνας στο πεδίο των διαγνωστικών τεστ.

## Βιβλιογραφία

. Liu Y, Liu Y, Diao B, et al. Diagnostic indexes of a rapid IgG/IgM combined antibody test for SARS-CoV-2. medRxiv 2020; 2020.03.26.20044883.

. Prompetchara E, Kelton C, Pelage T. Immune responses in COVID-19 and potential vaccines: lessons learned from SARS and MERS epidemic. Asian Pacific J Allergy Immunol 2020; 38: 1–9.

. US Department of Health and Human Services. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 5th ed. Washington, DC: US Government Printing Office; December 2009.

. Zhao J, Yuan Q, Wang H, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. Clin Inf Dis Accepted manuscript. Published online 28 March 2020. doi:10.1093/cid/ ciaa344

Abbott Laboratories (2021) SARS-CoV-2 IgG Instructions *Early overview*  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32864735/>

Alberts, B., et al. (1983). Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing, Inc., New York, NY.

Amanat, F. (2020) A serological assay to detect SARS-COV-2. *Natural Medicine* vol. 26

American College of Radiology. ACR recommendations for the use of chest radiography and computed tomography (CT) for suspected COVID-19 infection. <https://www.acr.org/Advocacy-and-Economics/ACRPosition-Statements/Recommendations-for-Chest-Radiography-and-CT-for-Suspected-COVID19-Infection>.

Arvin AM, Fink K, Schmid MA, et al. A perspective on potential antibody-dependent enhancement of SARS-CoV2. *Nature* 2020; 584: 353–363.

Beavis, K. G., Matushek, S. M., Abelina, A., Bethel, C., Hunt, C., Gillen, S., Moran, A., & Tesic, V. (2020). Evaluation of the EUROIMMUN Anti-SARS-CoV-2 ELISA Assay for detection of IgA and IgG antibodies. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 129, 104468. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104468>

Bizzarro N, Tozzoli R, Schoenfeld Y. Are we at a stage to predict autoimmune rheumatic diseases? *Arthritis Rheumatic*. 2007;56:1736–1744. doi: 10.1002/art.22708

Bizzarro N. The predictive significance of autoantibodies in organ-specific autoimmune diseases. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2008;34:326–331. doi: 10.1007/s12016-007-8059-5.

Boscato LM, Stuart MC. Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays. *Clin Chem* 1988;34(1):27-33.

Bryan A, Pepper G, Wener MH, Fink SL, Morishima C, Chaudhary A, Jerome KR, Mathias PC, Greninger AL. (2020) Performance characteristics of the Abbott Architect SARS-CoV-2 IgG assay and seroprevalence in Boise, Idaho. *Journal of clinical microbiology*.

*Burbelo P. (2020) Antibody Profiling by Luciferase Immunoprecipitation System. PubMed*

Burbelo, P.D.; Riedo, F.X.; Morishima, C.; Rawlings, S.; Smith, D.; Das, S.; Stritch, J.R.; Cher tow, D.S.; Davey, R.T., Jr.; Cohen, J.I. (2020) Detection of nucleocapsid antibody to SARS-CoV-2 is more sensitive than antibody to spike protein in COVID-19 patients. medRxiv

Cai XF, Chen J, Li HuJ, et al. (2020) A peptide-based magnetic chemiluminescence enzyme immunoassay for serological diagnosis of coronavirus disease 2019. *J Infect Dis*; 222: 189–193.

Cerino, P.; Gallo, A.; Pierri, B.; Buonerba, C.; Cuomo, M.C.; Vassallo, L.; Lo Conte, G.; Coppola, A.; Pizzolante, A.; Boccia, G.; et al. (2021) Seroprevalence of SARS-CoV-2 Assessed by Four Chemiluminescence Immunoassays and One Immunochromatography Test for SARS-Cov-2. *Front. Public Health*, 9, 649781.\

Cervia C, Nilsson J, Zurbuchen Y, Valaperti A, Schreiner J, Wolfensberger A, Raeber ME, Adamo S, Emmenegger M, Hasler S, Bosshard PP. (2020) Systemic and mucosal antibody secretion specific to SARS-CoV-2 during mild versus severe COVID-19. *bioRxiv*.

Chen, Z., Zhang, L. Quin, B. et al, (2005) Modified Vaccinia Virus. *Journal of Viron*, Vol. 79

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).(2014) Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Fourth Edition. CLSI Document M29-A4. Wayne, PA: CLSI;

Coronavirus Update (2021) COVID-19 Virus Pandemic - World meter. <https://www.worldometers.info/coronavirus/#countries>

DiaSorin (2021) LIAISON® SARS-CoV-2 S1/S2 IgG ([REF] 311460) *Instructions Manual*. Liaison

Ejazi, S., Shosh, S. Ali, N. (2020) Antibody detection assays for Covid-10 diagnosis. *Immunology & Cell Biology*, vol 133

ELISA technical guide and protocols (2010) Available through Thermo Scientific <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/Application-Notes/TR0065-ELISA-guide.pdf>

Engvall, Eva, and Peter Perlmann. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8.9 (1971): 871-874

Evaluation of the Abbott SARS-CoV-2 IgG for the detection of anti-SARS CoV-2 antibodies. (2020) *Public Health England*. <https://www.gov.uk/government/publications/covid-19-laboratory-evaluations-of-serologicalassays>

*file:///C:/Users/Stella/Downloads/fmolb-08-682405.pdf Evaluation of methods*

FIND. FIND evaluation update: SARS-CoV-2 immunoassays - FIND. [https://www.finddx.org/covid-19/sa\\_rscov2-eval-immuno/](https://www.finddx.org/covid-19/sa_rscov2-eval-immuno/)



FIND. SARS-CoV-2 molecular assay evaluation: results. <https://www.finddx.org/covid-19/sarscov2-eval-molecular/molecular-eval-results/>.

FNLCR (2020) Serology Test Evaluation Report for “SARS-COV-2 ELISA (IgG)” from Euroimmun. Frederick National Laboratory for Cancer Research

Folegatti PM, Ewer KJ, Aley PK, Angus B, Becker S, Belijammerstorfer S, Bellamy D, Bibi S, Bittaye M, Clutterbuck EA, Dold C. (2020) Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomized controlled trial. *The Lancet*. Aug 15;396(10249):467–78

Hamilton, RG, (2013) Clinical laboratory assessment of IgE. *Clinical Immunology* vol. 111

Harvell H, Robb ML, Watkins N, Ijaz S, Dicks S, Patel M, et al. Convalescent plasma therapy for the treatment of patients with COVID-19: Assessment of methods available for antibody detection and their correlation with neutralizing antibody levels. *Transfus Med* 2020;1–9. pmid:33333627

Hennes EM, Zeniya M, Czaja AJ, Parés A, Dalekos GN, Krawitt EL, International Autoimmune Hepatitis Group et al. Simplified criteria for the diagnosis of autoimmune hepatitis. *Hepatology*. 2008;48:169–176. doi: 10.1002/hep.22322

Hoffman, M., Weber, H., Schroeder, S. et al (2020) SARS-CoV-2 Cell Entry. *Cell Press*, Volume 181, Issue 2.

Hönemann, M.; Lück, C.; Maier, M.; Pietsch, C.; Dietze, N.; Berthold, T.; Encalada, M.V.N.; Grünewald, T.; Neumeister, V.; Dalpke, A.; et al. Comprehensive evaluation of eight commercial SARS-CoV-2 IgG assays. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2021,

Horlock, C. (n.d.) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). British Society for Immunology. <https://www.immunology.org/public-information/bitesized-immunology/experimental-techniques/enzyme-linked-immunosorbent-assay>

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32247384/> *Developing antibody tests*

<https://www.thermofisher.com/gr/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa.html>

Jiang, H., Zhang, H. Y Li (2020) Global profiling of Sars-CoV-2 using a proteome microarray. *MedRxiv Journal*

Jiang, S., Hillyer, C. Du, L. et al, (2020) Diagnostic indexes of a rapid combined antibody test for Sars-CoV-2. *Medical Directive*

John R. Crowther, Methods in Molecular Biology, The ELISA Guidebook. Second Edition. Humana Press, a part of Springer Science + Business Media, LLC 2009

Krishnamurthy, HK, Jayaraman, V, Krishna, K. et al (2020) Antibody profiling and prevalence in the US pupylation. *Medical Archives 2020*

Kumar, S. Maurya, V. Prasad, AK. Et al (2020) Structural, glycosylation and antigenic variation between 2019 novel coronavirus. *Virus disease vol 31*

Lassaunière R., Frische A., Harboe Z.B., Nielsen A.C.Y., Fomsgaard A., Krogfelt K.A., Jorgensen C.S. (2020). Evaluation of Nine Commercial SARS-CoV-2 Immunoassays. medRxiv 04.09.20056325.

Liberal, R., Grant, C. R., Saka's, L., Bizzarro, N., & Bogdan's, D. P. (2013). Diagnostic and clinical significance of anti-centromere antibodies in primary biliary cirrhosis. *Clinics and research in hepatology and gastroenterology*, 37(6), 572–585. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2013.04.005>

Liu, W. (2020) Evaluation of Nucleocapsid and Spike Protein. *Journal of Clinical Microbiology, Vol 58*

Lv, H., Wu, N., Tsang, O. et al (2020) Cross-reactive Antibody Response between SARS-CoV-2 and SARS-CoV Infections. *Cell Reports-Cell Press*

Manalac J, Yee J, Calayag K, Nguyen L, Patel PM, Zhou D, Shi RZ. (2020) Evaluation of Abbott Anti-SARS-CoV-2 CMIA IgG and EUROIMMUN ELISA IgG/IgA assays in a clinical lab. *Clinical Chemical Acta*. Nov 1;510:687–90.

Mena Chery, V., Yount, B., Sims, A. et al (2016) SARS-like WIV1-Cov poised for human emergence. *Nat. Med. Vol 21*

Merck, K. (2021) An introduction to Antibodies. Sigma Aldrich

Moniuszko-Malinowski, A.; Jelski, W.; Dunaj, J.; Mroczko, B.; Czarina, P.; Krzyzewski, E.; Praniewicz, S. Serology in COVID-19: Comparison of Two Methods . *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2021, 18, 6497. <https://doi.org/10.3390/ijerph18126497>

Novatein Biosciences (n.d.) Chemiluminescence Immunoassay (CLIA)  
[http://novateinbio.com/techinfo/GeneralReference/Chemiluminescence%20Immunoassay%20\(CLIA\)%20Tech%20Info.pdf](http://novateinbio.com/techinfo/GeneralReference/Chemiluminescence%20Immunoassay%20(CLIA)%20Tech%20Info.pdf)

Odueyungbo A, Browne D, Akhtar-Danesh N, Thabane L.(2008) Comparison of generalized estimating equations and quadratic inference functions using data from the National Longitudinal Survey of Children and Youth (NLSCY) database. *BMC Med Res Methodology*. ;8:28

Okba NMA, Müller MA, Li W, Wang C, Geurtsvankessel CH, Corman VM, et al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2-Specific Antibody Responses in Coronavirus Disease Patients. *Emerg Infect Dis* 2020;26:1478–88. pmid:32267220

Okba, N.M.A.; Müller, M.A.; Li, W.; Wang, C.; GeurtsvanKessel, C.H.; Corman, V.M.; Lammers, M.M.; Sikkema, R.S.; De Bruin, E.; Chandler, F.D.; et al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2-Specific Antibody Responses in Coronavirus Disease Patients. *Emerg. Infect. Dis.* 2020, 26, 1478–1488

Ollert M. et al (2005) Allergen-specific IgE comparison. *Clinical Immunology* vol.51

Petersen P. et al (2004) Performance evaluation of a specific IgE assay. *Clinical Biochemistry Vol 37*

Peterson, P. (2020) Lips method for the detection of Sars-CoV-2 antibodies. *European Journal of Immunology*. DOI: 10.1002/eji.202048715

Petherick, A. (2020) Developing antibody tests for SarS-Cov-2. *Lancet* doi: 10.1016/S0140-6736(20)30788-1. PMID: 32247384; PMCID: PMC7270070.

Puelles VG, Lighterman M, Linden Meyer MT, € et al. Multiorgan and renal tropism of SARS-CoV-2. *N Engl J Med* 2020; 383: 590–592. 5

Shao Z, Feng Y, Zhong L, et al. Clinical efficacy of intravenous immunoglobulin therapy in critical patients with COVID-19: A multicenter retrospective cohort study. medRxiv 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.04.11.20061739>

Shen C, Wang Z, Zhao F, et al. Treatment of 5 critically ill patients with COVID-19 with convalescent plasma. *JAMA* Published online March 27, 2020. doi:10.1001/jama.2020.4783

- Scholz, J. (2021) Impact of Sars Cov-2 variants on antibody tests. Euroimmun Laboratories
- Traubel, (2021) SaRS Antibody Testing. Richmond Research Institute
- Udugama B, Kadhiresan P, Kozlowski HN, et al. Diagnosing COVID-19: the disease and tools for detection. *ACS Nano* 2020; 14: 3822–3835
- Vashi's SK (2020) In Vitro diagnostic assays for COVID-19. *Basel Diagnostics vol 202*
- Watanabe, A. McCarthy, K. Kuraoka, M. Schmidt, A. et al (2019) Antibodies to a Conserved Influenza Head Interface. *Elsevier, Science Direct*
- Wild D (2013) Immunoassay for beginners. In: The immunoassay handbook. Theory and applications of ligand binding, ELISA and related techniques. Wild DG (ed). Springer, Amsterdam, pp 7–10
- World Health Organization. Laboratory testing strategy recommendations for COVID-19: interim guidance, 21 March 2020. World Health Organization; 2020.
- Wrap, D., Wang, N. Corbett, K. et al (2020) Cryo-Em structure of the 2019-nCoV spike. *Science Journal Vol 367*
- Wu, F., Zhao, S., Yu, B. *et al.* A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* **579**, 265–269 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2008-3>
- Wu, N. et al. (2020) Cross-reactive antibody response between SARS-CoV-2 and SARS-CoV infections. *Cell Rep* Doi: 31: 107725.
- [www.euroimmun.com](http://www.euroimmun.com). Anti-SARS-CoV-2 ELISA (IgA), 2020, p. 1–2.
- Zhang J, Zhang X, Liu J, et al. Serological detection of 2019-nCoV respond to the epidemic: a useful complement to nucleic acid testing. *Int Immunopharmacology* 2020; 88: 106861.
- Zhang W, Du RH, Li B, et al. Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes. *Emerg Microbes Infect* 2020; 9: 386–389. 11.
- Zhou, P., Yang, XL., Wang, XG. *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* **579**, 270–273 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>