



Pielikums Nr. 1

Ziņojumam

“Par ieteikumiem rīcībpolitikas veidotājiem un Izvērtējums par ātrās diagnostikas iekārtām

Projekta Nr. VPP-COVID-2020/1-0025 “Jaunās tehnoloģijas Covid-19 pacientu tēmētai monitorēšanai, testēšanai un terapijai (3-T Project)”

WP2 apakšprojekta: “Tēmēta testēšana” ietvaros”

Ātrās diagnostikas testa izstrādes apraksts

Autors:

Atvasināta publiska persona “Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrs” asociētā profesore Renate Ranka



Rīga

2021

Ātrās diagnostikas testa izstrādes apraksts

Tika iegūtas izstrādātas poliklonālās peļu antivielas kā papildu iespēju ātrā antigēnu testa izstrādei. Peles tika imunizētas ar SARS-CoV-2 RBD rekombinanto S proteīnu. Procesā piemērota standarta imunizācijas shēma. Savākti seruma paraugi un veikta iegūto poliklonālo peles anti-RBD antivielu attīrīšana.

Testēja gan anti-4-epitopu poliklonālās trušu, gan anti-RBD poliklonālās peļu antivielas, izmantojot ELISA un Western Blot metodes, lai novērtētu to potenciālo veikspēju ātrās diagnostikas testa izstrādē. Tika izmantoti komerciāli pieejamie SARS-CoV-2 antigēni, inaktivētie SARS-CoV-2 vīrusa paraugi, kā arī siekalu paraugi un nazofaringeālās/orofaringeālās uztriepes no COVID-19 pozitīviem pacientiem.

Klīnisko paraugu izmantošanā tika ievērota Helsinku deklarācija. Pētījuma protokolu apstiprināja Rīgas Stradiņa universitātes Pētījumu ētikas komiteja (Nr. 6-1/08/7). Salīdzināšanai un papildināšanai tika izmantotas dažādas komerciāli pieejamās poliklonālās un monoklonālās SARS-CoV-2 antivielas.

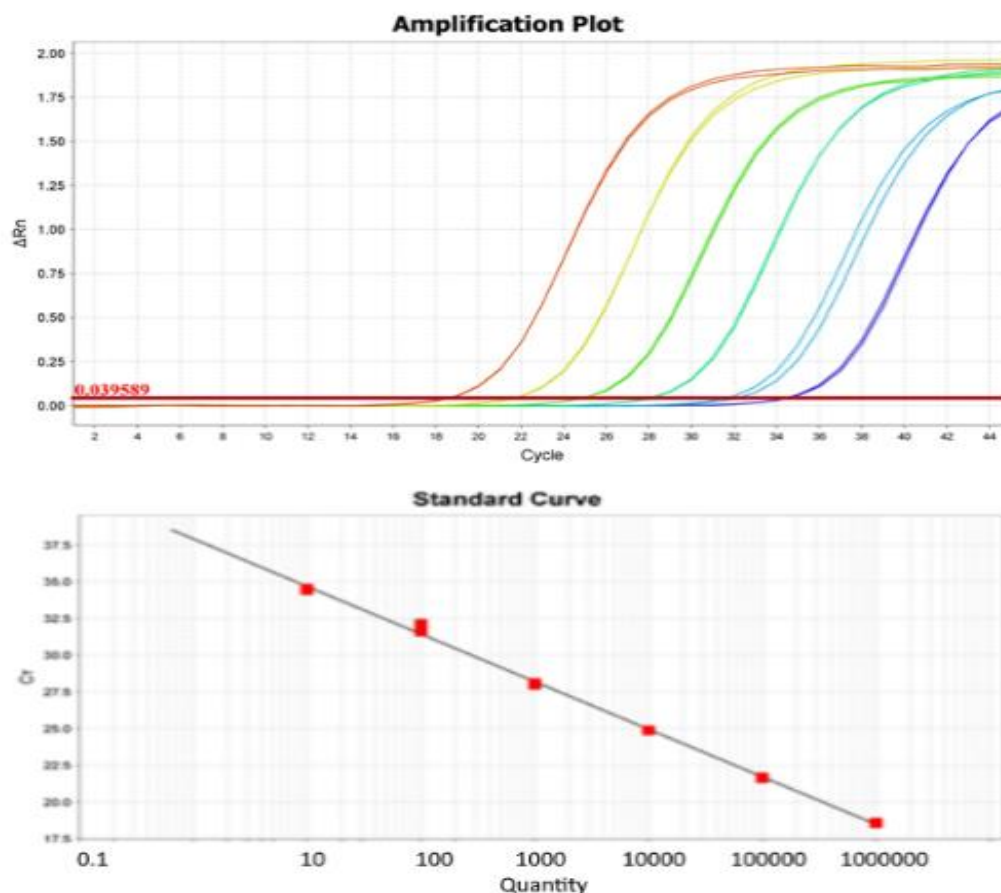
Rezultāti parādīja, ka poliklonālās peļu antivielas bija pārākas par trušu antivielām, tāpēc tika nolemts tās izmantot turpmākajā darbā.

Veikta RT-PĶR balstītas SARS-CoV-2 vīrusa noteikšanas metodes aprobācija, mākslīgo plazmīdu konstruēšana un vīrusu slodzes testa izstrāde, izmantojot E gēna plazmīdu un inaktivētus SARS-CoV-2 vīrusa paraugus.

Tests sastāvēja no PĶR praimera-zondes komplekciem, kas detektēja divus vīrusa gēnus: no RNS atkarīgo RNS polimerāzi (RdRP gēns, IP4 fragments) un apvalka (E) gēna fragmentu, kurus ieteica Pasaules Veselības organizācija¹.

Šim testam tika izstrādāts iekšējais plazmīdu standarts/pozitīvā kontrole, molekulāri klonējot SARS-CoV-2 vīrusa E gēnu. Šādu testu pieejamība mūsu laboratorijā daļēji palīdzēja pārvarēt COVID-19 diagnostikas testu piegādes deficītu. Izmantojot plazmīdu standarta kontroli, tika pierādīts, ka testam ir augsta jutība ar kalibrēšanas diapazonu 10 līdz 1,000,000 vīrusa kopijas (2. attēls). Ir noteikta RT-PĶR testa jutīguma robeža.

¹ Corman et al., 2019



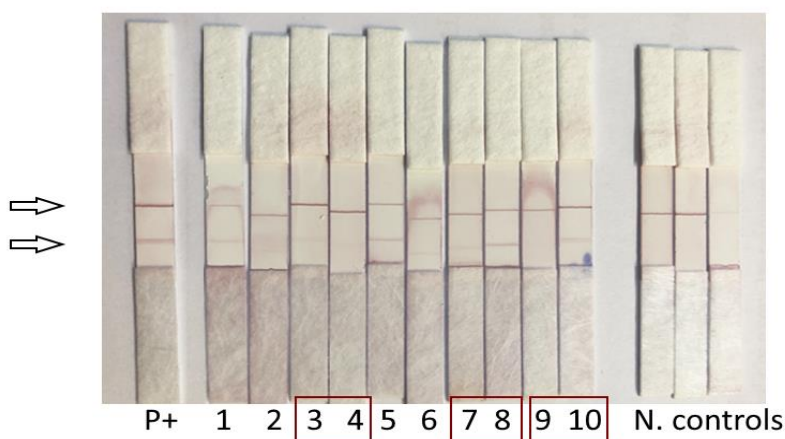
2. attēls. RT-PĶR SARS-CoV-2 testa amplifikācijas diagramma un kalibrēšanas standarta līkne, izmantojot iekšējo plazmīdu standarta kontroli.

Ātrais antigēnu noteikšanas tests tika izstrādāts, izmantojot uz vietas sagatavotās poliklonālās peļu anti-RBD antivielas. Piedāvātais tests ir balstīts uz plaši pieejamiem sānu plūsmas testiem (*Lateral Flow Assays*) ar koloidālā zelta konjugētām poliklonālām antivielām, jo hromoforas un nekonjugētas antivielas izgulsnējās noteikšanas zonā. Testēšanas sākuma fāzēs tika izmantoti rekombinantie antigēni. Pārbaudītas daudzas antivielu kombinācijas un reakcijas parametri.

Nākamajā posmā varēja novērtēt testa parametrus siekalu paraugos pacientiem ar apstiprinātu COVID-19 diagnozi.

Iegūtie rezultāti parādīja, ka novērtētajam sānu plūsmas ātrajam antigēnu testam bija augsta diagnostiskā jutība siekalu paraugos, kas iegūti no pacientiem, kuri tika testēti galvenokārt pirmās COVID-19 saslimšanas nedēļas laikā (3. attēls).

Standartizācija un optimizācija



COVID symptoms:	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+		
COVID test:	+	+	*	+	n	+	+	+	+	n	+	

3. attēls. Jauna antigēnu bāzes ātrās noteikšanas testa novērtēšana SARS-CoV-2 diagnostikai siekalu paraugos. Abu marķieru lokācija ir parādīta ar bultiņām. P+: pozitīvā kontrole (S1+S2 rekombinantais antigēns); N. controls: negatīvās kontroles (veselu personu siekalu paraugi); 1 - 10: COVID pacientu siekalu paraugi; n: nav testēts (siekalu paraugs tika ņemts pirms diagnozes); +*: siekalu paraugs tika ņemts 5 dienas pēc pozitīva COVID testa (visi pārējie paraugi tika ņemti 1-2 dienas pēc pozitīva COVID testa). Ir izcelti paraugi no vienas mājsaimniecības.