



Pielikums Nr. 2

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”

Tehnoloģijas apraksts

SARS-COV-2 tipa koronavīrusa ekspress diagnostikas antivielu
un antigēna pielietojums

Autors: Aleksandrs Mežeckis



Rīga

2021



Tehnoloģijas apraksts

Tehnoloģijas apraksts attiecas uz molekulāro bioloģiju, biotehnoloģiju, medicīnu, un to iespējams izmantot SARS-CoV-2 tipa koronavīrusa ekspresdiagnostikai.

Koronavīrusi (CoV) ir lielas vīrusu dzimtes pārstāvji, kas izraisa slimības, sākot ar ikdienas saaukstēšanos un beidzot ar daudz nopietnākām slimībām, piemēram, Tuvo Austrumu respiratoro sindromu (MERS-CoV) un smago akūto respiratoro sindromu (SARS-CoV). Jaunais koronavīruss (nCoV, COVID-19, SARS-CoV-2) ir jauns celms, kas līdz šim nav konstatēts cilvēkam¹. Šī celma īpatnība ir ātrā izplatība no cilvēka cilvēkam un sarežģītā slimības gaita.

Pirmie COVID-19 inficēšanās gadījumi konstatēti 2019. gada decembrī Ķīnā. Līdz 2020. gada 9. aprīlim visā pasaulē bija reģistrēti 1 589 256 COVID-19 saslimšanas un 94 949 nāves gadījumi. Lielākā daļa saslimšanas un nāves gadījumu bija ASV (459 981 un, attiecīgi, 16 372), Itālijā (143 626 un, attiecīgi, 18 279), Spānijā (152 446 un, attiecīgi, 15 238). 2020. gada jūlija vidū pasaulē konstatēti 18,8 miljoni saslimšanas un aptuveni 520 tūkstoši nāves gadījumu, 1. vietā saslimšanas un letāla iznākuma ziņā ir ASV (2,7 miljoni un, attiecīgi, 130 850), kam seko Brazīlija (1,45 miljoni un, attiecīgi, 60 813). Koronavīruss un tā izraisītie nāves gadījumi konstatēti jau 213 pasaules valstīs². Nav šaubu, ka, neraugoties uz īstenotajiem pasākumiem, infekcijas izplatīšanās ātrums ir ļoti liels.

Slimniekiem novēro tādu stāvokli kā akūtu respiratoro vīrusu infekciju (ARVI), akūtus nieru bojājumus, sirds mazspēju, aknu darbības traucējumus, aritmiju, un nereti letāls iznākums. Lielākajai daļai pacientu vajadzīga elpošanas funkcijas ārēja uzturēšana³.

Jaunais koronavīruss SARS-CoV-2 pieder pie Beta-CoV B līnijas Coronaviridae dzimtas. Tas ir vienas ķēdes RNS saturošs vīruss. Ierosinātāja ieejas vārti ir augšējo elpceļu epitēlijs un kuņģa un zarnu trakta epiteliocīti. Infekcijas sākumposms ir SARS-CoV-2 iekļūšana mērķa šūnās, kam ir II tipa angiotenzīnu konvertējošā enzīma (ACE-2) receptori. Taču vīrusa galvenais mērķis ir II tipa (AT-2) plaušu alveolārās šūnas, kas nosaka pneimonijas attīstīšanos⁴.

Zināms, ka par COVID-19 laboratorās diagnostikas standarta metodi ir kļuvusi PCR apgrieztās transkripcijas metode. Galvenais laboratorijas izmeklējumiem izmantotā bioloģiskā materiāla veids ir materiāls, ko iegūst, noņemot oro/nazofaringeālo iztriepi.

Tomēr neraugoties uz PCR apgrieztas transkripcijas metodes plašo lietojumu, šai metodei ir ierobežojumi klīniskajai diagnostikai un ārstēšanai⁵. Šai metodei piemītošie trūkumi ir salīdzinoši zema jutība, ilgums un darbietilpība. Saņemti ziņojumi par iespējami augstu kļūdaini negatīvu rezultātu līmeni, lietojot šo testa metodi⁶. Minētie

¹ <https://www.who.int/ru/health-topics/coronavirus/coronavirus>

² <https://www.worldometers.info/coronavirus/>

³ Arabi, Y.M., Murthy, S. & Webb, S. COVID-19: a novel coronavirus and a novel challenge for critical care. Intensive Care Med (2020)

⁴ Pasaules Veselības organizācija. Smagu akūtu respiratoro infekciju klīniskā pārvaldība gadījumos, ja pastāv aizdomas par jauno koronavīrusu (2019-nCoV). Pagaidu rekomendācijas. Publikācijas datums: 2020. gada 25. janvāris. URL: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0020/426206/RUS-Clinical-Management-ofNovel_CoV_Final_without-watermark.pdf?ua=1

⁵ Yu F., Yan L., Wang N. Quantitative Detection and Viral Load Analysis of SARS-CoV-2 in Infected Patients // Clin. Infect. Dis. 2020.

⁶ Li Y., Yao L., Li J. Stability Issues of RT-PCR Testing of SARS-CoV-2 for Hospitalized Patients Clinically

trūkumi neļauj izmantot uz PCR balstītu metodi koronavīrusa infekcijas ekspresdiagnostikai.

Saņemti ziņojumi par ātrā kombinētā IgM-IgG antivielu testa izstrādi un klīnisko lietojumu SARS-CoV-2 infekcijas diagnostikai⁷. Testēšanas vispārējais jutīgums bija 88,66 %, specifiskums – 90,63 %. IgM-IgG kombinēto analīzi var lietot simptomātisku un bezsimptomu SARS-CoV-2 nēsātāju ātram skrīningam slimnīcās, klīnikās un izmēģinājumu laboratorijās, taču to nevar izmantot mājas apstākļos. Tā ir imūnfermentu analīze uz testa sloksnēm, ne kvantitatīva, paredzēta tādu šķidrumu analīzei kā nesadalītas asinis, serums un plazma. Vēl viena šāda veida testēšanas īpatnība ir tā, ka vīrusa esību nosaka nevis tieši, bet netieši – ar antivielām pret to. Ņemot vērā to, ka IgM antivielas pacienta asinīs atklājas tikai pēc 3 – 6 dienām, bet IgG – pēc 8 dienām⁸, šis tests neapšaubāmi nav izmantojams pirmajās 1 – 3 dienās pēc inficēšanās pat tad, ja ir simptomi, to var izmantot daļēji no trešās (labāk sestās) līdz astotai dienai – tad tas uzrādīs IgM antivielas, – un tikai sākot ar devīto dienu, tas ir pilnvērtīgi izmantojams. Jāņem vērā arī tas, ka šādā termiņā izveidojušos antivielu afinitāte ir zema. Turklāt testam vajadzīgas asinis, mājas apstākļos šādu testu, šķiet, izmantot nav iespējams pat sākot ar 9. dienu, vēl jo vairāk tāpēc, ka šajā laikā cilvēks jau var atrasties slimnīcā.

Tehnoloģijas būtība

Šī tehnoloģijas mērķis ir testa izveidošana SARS-CoV-2 tipa koronavīrusa ekspresdiagnostikai, kas dos iespēju jau pirmajās inficēšanās dienās ātri, vienkārši un droši noteikt inficētos pacientus un bezsimptomu nēsātājus, lai novērstu vīrusa nodošanu un nodrošinātu pacientu savlaicīgu ārstēšanu.

Piedāvātā testa sloksne un to saturošais ekspresdiagnostikums paredzēts SARS-CoV-2 tipa koronavīrusa ekspresdiagnostikai. Par prototipu daļēji var uzskatīt iepriekš aprakstīto koronavīrusa antivielu testu.

Tehniskais rezultāts galvenokārt ir vīrusa esības vai neesības noteikšana, sākot no pirmajām dienām, kad radušās aizdomas par infekciju, pateicoties tam, ka tests vērsts tieši uz SARS-CoV-2 tipa koronavīrusa, nevis vēlāk parādījušās imunoloģiskās atbildes uz to, noteikšanu, un tas ir jutīgs par pret nelielu vīrusa koncentrāciju. Diagnostikuma noteikšanas sliekšnis ir 5×10^5 vīrusa daļiņas uz iztriepi, tas ir jutīgs arī pie 103 kopiju vīrusa slodzes, tajā pašā laikā, kad saskaņā ar ziņojumiem literatūrā vīrusa slodze piektajā dienā ir $6,5 \times 10^5$ vīrusa daļiņas uz oro/nazofaringeālo iztriepi, bet vēlāk samazinās līdz $3,5 \times 10^5$, krēpās 7×10^6 kopiju ml.

Piedāvājuma tehniskais rezultāts ir iespēja iegūt precīzu rezultātu 10 – 15 minūšu laikā. Minēto tehnisko rezultātu nodrošina tas, ka saskaņā ar izgudrojumu SARS-CoV-2 tipa koronavīrusa noteikšanai paredzētās testa sistēmas pamatā ir imunoprecipitācijas metode, kad vīrusa daļiņas atklāj ar iekrāsotu specifisku antivielu palīdzību. Turklāt

Diagnosed with COVID-19 // J. Med. Virol. 2020

⁷ Li Z., Yi Y., Luo X. Development and Clinical Application of A Rapid IgM-IgG Combined Antibody Test for SARS-CoV-2 Infection Diagnosis // J. Med. Virol. 2020.

⁸ Lee HK, Lee BH, Seok SH, et al. Production of specific antibodies against SARS-coronavirus nucleocapsid protein without cross reactivity with human coronaviruses 229E and OC43. J Vet Sci. 2010;11(2):165-167, Wan ZY ZX, Yan XG IFA in testing specific antibody of SARS coronavirus. South China J Prev Med 2003;29(3):36-37



rezultātu panāk arī tādā veidā, ka paraugs nav ilgstoši jā sagatavo analīzei, respektīvi, kopš nodoma veikt testu, ja tāds ir pieejams, līdz rezultāta iegūšanai paiet tikai 10 – 15 minūtes atšķirībā no 15 minūtēm antivielu testam, pirms kura vajadzīgas vismaz 15 minūtes asins paņemšanai un parauga sagatavošanai analīzei. Tehniskais rezultāts ir arī iespēja noteikt SARS-CoV-2 tipa koronavīrusu pat mājās apstākļos, lai kontrolētu savu veselības stāvokli. Minēto tehnisko rezultātu nodrošina tas, ka galvenais bioloģiskais materiāls izpētei ir oro/nazofaringeālā iztriepe, taču var izpētīt arī citus bioloģiskos šķidrumus.

Tehniskais rezultāts ir arī koronavīrusa esības vai neesības noteikšanas precizitāte izmeklējamajā paraugā. To panāk tāpēc, ka tests ir vērsts uz vīrusa noteikšanu ar tiešo paņēmieni, respektīvi, izmanto tehnoloģiju, kas dod iespēju novērtēt tieši vīrusa, nevis tā ierosinātās imūnās atbildes, esību.

Tehniskais rezultāts ir arī specifiskums, ko nodrošina testā izmantoto antivielu specifiskums tikai un vienīgi attiecībā uz SARS-CoV-2 tipa koronavīrusu.

Tehniskais rezultāts ir arī darbības uzticamība, kļūdaini pozitīvu un kļūdaini negatīvu rezultātu skaita samazināšanās, paaugstinot testa specifiskumu un precizitāti, pateicoties testa sistēmas elementu tehniskajām īpašībām. Tehniskais rezultāts ir arī testa sistēmas ražošanas vienkāršošana un izmaksu samazināšana tāpēc, ka nav nepieciešama plaša mēroga ražošanas un procesu sagatavošana rekombinantā proteīna attīrīšanai un locīšanai in vitro, jo , testa izgatavošanai vajadzīgs liels daudzums antivielu. Antivielu ražošana, izmantojot dzīvniekus, ir ekonomiski izdevīgāka par rekombinantā proteīna, turklāt pareizi locīta, ar pieejamiem centriem antivielu saistīšanai, ražošanu; tās var izgatavot lielā daudzumā ar mazākiem izdevumiem.

Tehniskais rezultāts ir arī koronavīrusa diagnostikas metožu spektra paplašināšana. Ja nav vēlēšanās vai iespējas izmantot analogus iepriekš aprakstīto trūkumu vai vienkāršu loģistikas problēmu, vai politikas īpatnību dēļ, šī testa sistēma dos iespēju noteikt koronavīrusa klātbūtni.

Pandēmijas apstākļos ir ārkārtīgi svarīgi ātri un plašā mērogā ieviest testēšanu, kas dos iespēju savlaicīgi atklāt saslimušos un infekcijas nēsātājus un aizsargāt pret slimības izplatību, tās smagu gaitu un letāliem iznākumiem. Ieteiktais ekspresdiagnostikums atbilst šīm prasībām vairāk nekā jebkura pašlaik zināmā testa sistēma. Ieteikti arī jauni, oriģināli objekti, kurus izmanto testa sloksnes un diagnostikuma iegūšanai.

Tehniskais rezultāts, ko dod minēto objektu izmantošana, ir atbilstošās testa sloksnes un diagnostikuma iegūšana. Tā ir dzīvnieku izcelsmes anti viela, ko satur testa sloksne un diagnostikums koronavīrusa noteikšanai. Tā ir testa sloksnes aktīvā viela SARS-COV-2 tipa koronavīrusa esības noteikšanai. Šāda anti viela saistās ar SARS-COV-2 tipa koronavīrusa olbaltumvielas fragmentu M, no 60 līdz 180 aminoskābju atlikumu, un/vai S, ar 306 līdz 380 aminoskābju atlikumu, un/vai N, ar 216 līdz 360 aminoskābju atlikumu, un/vai E, ar 6 līdz 70 aminoskābju atlikumu. Šo antivielu iegūst, ievadot dzīvniekam hibrīdu olbaltumvielu vai ģenētisku konstrukciju (skat. turpmāk) – imunizāciju. Tā var būt truša anti viela, taču ar to neaprobežojas. Ieteikta arī kompozīcija, kuras sastāvā ir šāda anti viela un mērķa piedeva izmantošanai SARS-COV-2 tipa koronavīrusa diagnostikā. Šādu kompozīciju izmanto testa sloksnes un diagnostikuma izgatavošanai – uzklāj attiecīgajās zonās testa sloksnes funkcionālo zonu veidošanai. Ieteikta arī hibrīda olbaltumviela un ģenētiska konstrukcija, kuras sastāvā ir polinukleotīds, kas kodē minēto hibrīdo olbaltumvielu, un citi elementi, kas

nodrošina minētās hibrīdās olbaltumvielas sintēzi organismā-producentā izmantošanai koronavīrusa infekcijas diagnosticēšanai. Hibrīdā olbaltumviela, ko izmanto SARS-COV-2 tipa koronavīrusa izraisītās infekcijas diagnostikai, ir iekļauti šāda koronavīrusa ar lokaniem tiltiņiem savienoti M, S, N, E olbaltumvielu fragmenti, un to raksturo aminoskābju sekvence SEQ ID NO.:1 vai SEQ ID NO.:2. Izgudrojumā minētā anti viela saistās ar šādu hibrīdo olbaltumvielu. Saistīšanās notiek ar SARS-COV-2 tipa koronavīrusa olbaltumvielas fragmentu M, no 60 līdz 180 aminoskābju atlikumu, un/vai S, ar 306 līdz 380 aminoskābju atlikumu, un/vai N, ar 216 līdz 360 aminoskābju atlikumu, un/vai E, ar 6 līdz 70 aminoskābju atlikumu. Ģenētiskā konstrukcija var saturēt arī fragmentu, kas kodē sekrētu heteroloģisko sekvenci, piemēram, no tās TPA, EPO, STH vai IFG.

Tehnoloģijas dizains

Šis izgudrojums ir SARS-COV-2 tipa koronavīrusa ekspresdiagnostikums, kas dod iespēju ar imunoprecipitācijas metodes palīdzību noteikt SARS-COV-2 tipa koronavīrusa esamību bioloģiskā materiāla paraugā. Izpētei izmantotais bioloģiskais materiāls var būt jebkurš bioloģisks šķidrums, piemēram, materiāls, ko iegūst, ņemot iztriepi no deguna, oro/nazofaringeālā iztriepe, firbrobronhoskopijā iegūtie bronhu skalošanas (bronhoalveolārā lavāža) ūdeņi, (endo)traheālais, nazofaringālais aspirāts, krēpas, plaušu biopsijas vai autopsijas materiāls, nesadalītas asinis, serums, urīns. Diagnostikuma izmantošanas ērtībai galvenais materiāls ir tas, ko iegūst, ņemot oro/nazofaringeālo iztriepi. Nesadalītas asinis pirms testēšanas nepieciešams koagulēt, asins serumu var uzklāt tieši uz testa sloksnes.

Ekspresdiagnostikuma sastāvā ir korpusā ievietota testa sloksne, parauga ņemšanas ierīce un vienā no variantiem arī trauks ar šķidrumu parauga izšķīdināšanai. Tas var būt 2 – 3 minēto komponentu komplekts vai apvienota ierīce. Otrajā gadījumā testa sloksnes korpus var būt savienots ar parauga ņemšanas ierīci, tā, savukārt, var būt savienota ar noņemamu trauku ar šķidrumu parauga izšķīdināšanai. Komplekta gadījumā traukam ar šķidrumu parauga izšķīdināšanai var būt konusveida vāciņš, ko pēc parauga izšķīdināšanas var nogriezt un ērtībai izmantot iegūtā šķidruma uzklāšanai uz testa sloksnes.

Ierīce parauga ņemšanai ir, piemēram, vates tampons, vates kociņš, lāpstiņa vai pipete, taču šis klāsts nav ierobežots. Ar tā palīdzību var paņemt siekalas, asinis un citus bioloģiskos šķidrumus. Asins paņemšanas vajadzībām diagnostikumā var būt iekļauts skarifikators un dezinficējošs materiāls, piemēram, spirta salvete.

Tajā var būt trauks, piemēram, mēģene ar šķidrumu parauga izšķīdināšanai. Šim nolūkam pietiek ar 1 – 2 ml šķīduma. Šķidrums parauga izšķīdināšanai var būt buferšķidrums, piemēram, izotoniskais fizioloģiskais šķidrums, piemēram, (0,9%NaCl) vai PBS (0,9% NaCl fosfātu buferī), taču šis klāsts nav ierobežots. Parauga izšķīdināšanai paredzētā šķidruma – noskalošanas šķidruma – uzdevums ir vīrusa daļiņu pārvešana no parauga ņemšanas ierīces, piemēram, tampona, šķidrā fāzē. Atkarībā no sloksnes veida vai nu iegūtā parauga alikvotu uzklāj fiksētajai zonai, vai sloksnes malu iegremdē sagatavotajā paraugā. Ekspresdiagnostikumā ir iekļauta arī instrukcija.



Ja paraugs ir asinis, tad vai nu izklāj asins maisījumu ar buferi, vēlams koagulētu, vai buferi uzklāj uz asins piliena, kas atrodas uz testa.

Pareizi lietot lielumu TCID 50/ml, kas atspoguļo vīrusu slodzi. Zināms, ka vīrusa RNS vidējā slodze, kad paraugs ir ņemts oro/nazofaringeāli, ir $6,76 \times 10^5$ kopijas uz izmeklējamu paraugu līdz 5. dienai, maksimāli $7,11 \times 10^8$ kopijas uz paraugu. Paraugiem, kas ņemti pēc 5. dienas, vidējā vīrusu slodze ir $3,44 \times 10^5$ kopijas. Vīrusu vidējā slodze krēpās ir 7×10^6 kopijas ml. Paredzamā testa noteikšanas robeža ir 5×10^5 kopijas ml. Turklāt tests būs jutīgs, ja tam uzklās paraugu ar vīrusu slodzi 103 kopijas.

Testa sloksne ir pamatmateriāla sloksne, uz kuras izvietotas funkcionālās zonas, ko veido nesēji un aktīvie aģenti. Funkcionālo zonu izvietojuma shēma uz testa sloksnes parādīta 1(A) attēlā: 1. zona ar pārlaidumu uz 2. zonu vai cieši tai piekļauta; 2. zona ar pārlaidumu uz 3. zonu vai cieši tai piekļauta; 3. zona ar malām zem 2. un 4. zonas vai tām cieši piekļauta; 4. zona ar ar pārlaidumu uz 3. zonu vai cieši tai piekļauta. Šķidrums plūsmu nodrošina kapilārie spēki.

Galvenā prasība, kas izvirzīta pamatmateriālam – pamatnei – ir materiāla zema saslāpināmība – hidrofobija. Par hidrofobu materiālu uzskata plastikātu, kura slapināšanas leņķis ir lielāks par 80. Šim nosacījumam atbilst lielākā daļa plastikātu, tādu kā polikarbonāts, PVH, polietilēns.

Pirmā funkcionālā zona ir hidrofilis materiāls, kas nonāk saskarē ar analizējamo paraugu. Šīs zonas uzdevums ir atdalīt lielas piesārņojošās daļas (šūnas un to atlūzas), satvert no parauga vīrusa daļas un ar šķidrums plūsmu aizvadīt to tālāk uz konjugācijas zonu. Šai zonai izmantotajam materiālam galvenais kritērijs ir augsta kapilārā iesūktspēja, ko nosaka pārvietošanās attālums – vairāk nekā 10 mm/min. Tas var būt, piemēram celulozes “spilvens”, ko iegūst, saspiežot filtrpapīra kārtas, vai vienkārši hromotogrāfiskais papīrs.

Otro funkcionālo zonu jeb konjugācijas zonu veido hidrofila materiāla nesējs, kas labi pārnes šķidrumus un turklāt vāji adsorbē olbaltumvielas, uz kura uzklātas specifiski iekrāsotas antivielas, piemēram, truša antivielas, kas saistītas ar pigmentu saturošu šūnu daļiņām – specifiskas(-u) antivielas(-u) kompleksi ar pigmentu saturošu šūnu. Tāda nesēja materiāla antivielu saistīšanas rādītājs ir mazāks par 30 mkg/cm², optimāli 20 – 25 mkg/cm², un tas ir, piemēram, celulozes acetāts. Piemēram, materiāliem, kas labi saista olbaltumvielas molekulas, piemēram, nitrocelulozei un neilonam, šis parametrs ir >200 mkg/cm² antivielām un 120 mkg/cm² olbaltumvielām.

Specifiskas antivielas iegūst no dzīvnieku, piemēram, trušu, seruma, taču ar tiem neaprobežojoties, kas imunizēti ar rekombinanto polipeptīdu, ko veido vairāki SARS-CoV-2 vīrusa antigēni, vai ar ģenētisku konstrukciju tās sintēzei organisma-producenta šūnās. Polipeptīdu vai plazmas, vai vīrusa DNS iegūst baktēriju kultūrā, piemēram, E.coli, B.subtilis, bet ar tām neaprobežojoties, lineāro ģenētisko konstrukciju – ar PCR metodi, kā matricu izmantojot plazmas vai vīrusa DNS, attīra un veic dzīvnieku imunizāciju. No seruma, kas iegūts no, piemēram, peles, truša, izdala specifiskas poliklonālās antivielas. Šādā veidā iespējams iegūt lielu daudzumu antivielu. Iegūst antivielas saturošu kompozīciju izmantošanai SARS-COV-2 tipa koronavīrusa esamības diagnostikā.

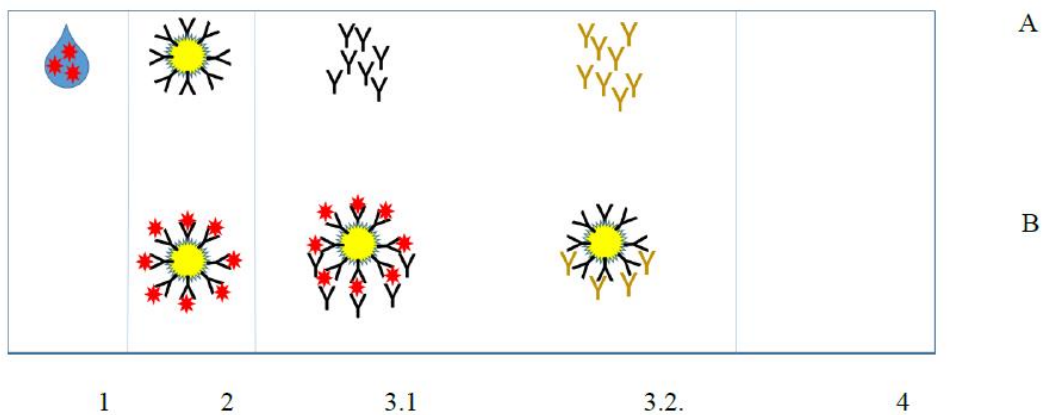
Iegūto antivielu kompozīciju sadala divās akilvotās, no kurām vienu iezīmē ar pigmentu saturošu šūnu, piemēram, zelta koloīdu, vai arī ar iekrāsotām lateksa lodītēm, taču ar tām neaprobežojoties – tās ir īpaši iekrāsotas poliklonālās vai monoklonālās antivielas



otrajai funkcionālajai zonai. Otro alikvotu izmanto trešajai funkcionālajai zonai, precīzāk, 3.1. zonai.

Testa laikā šķidrums, kurā ir vīrusa daļiņas (skat. 1. A attēlu, 1. zonu), saslapina otro zonu un izšķīdina antivielu kompleksu ar pigmentu saturošo šūnu, rezultātā izveidojoties iekrāsotiem antivielas-vīrusa daļiņas kompleksiem, kuri ar šķidruma plūsmu virzās tālāk uz precipitācijas zonu. Pigmentu saturošās šūnas-antivielas komplekss ir pigmentu saturošās šūnas “lode”, kam “aplīpinātas” antivielas. Ja izmeklējamajā paraugā ir vīruss, konjugāta zonā šīs daļiņas ar saistītajām antivielām veido kompleksu ar vīrusu (skat. 1.B attēlu, 2. zonu). Ja kā pigmentu saturošo šūnu izmanto zelta koloīdu, uz katru daļiņu ir apmēram 50 – 100 antivielu molekulu.

Ekspress Diagnostika SARS-COV-2



Att. 1



Att. 2

Trešā funkcionālo zonu, precipitācijas zonu, veido nitrocelulozes membrānas, kas izkārtotas divās daļās – uz vienas (skat. 1.A attēlu, 3.1. zonu) uzklātas neiezīmētās antivielas no otrās alikvotas –specifiskas jaunā koronavīrusa olbaltumvielām, – uz otrās (skat. 1.A attēlu, 3.2. zonu) – sekundārās antivielas, specifiskas tā zīdītāja antivielām, kurā vai uz kura konstantā domēna pamata iegūtas specifiskās antivielas 2. zonai, piemēram, kazas sekundārās antivielas pie truša, peles (taču ar to neaprobežojoties) imunoglobulīniem. Šajā zonā lieto tieši nitrocelulozi, jo tikai tāds materiāls nodrošina

iespēju saglabāt uz tā nosēdināmo olbaltumvielu funkcionālo aktivitāti, vienlaikus nodrošinot nespecifiskas saistīšanas bloķēšanu un saglabājot transporta funkciju ar šķidrums plūsmu. Turklāt 3. zonas nitrocelulozes membrānai antivielu saistīšana ir augstāka nekā standarta olbaltumvielām, piemēram, BSA (200 mkg/cm² pret 120 mkg/cm²).

Testa turpinājumā 3.1. daļā tiks aizturēts pigmentu saturošās šūnas-antivielas-vīrusa daļiņas iekrāsotais komplekss, 3.2. – ar vīrusu nesaistītais pigmentu saturošās šūnas-antivielas iekrāsotais komplekss (skat. 1.B attēlu, 3. zonu).

Runājot par 3.1. – specifisko antivielu –specifiskās antivielas uz membrānas notur pigmentu saturošās šūnas konjugātus ar tādām pašām specifiskām antivielām, tādēļ, ka ir saistība ar vīrusa epitopiem (skat. 1.B attēlu, 3.1. zonu).

Uz 3.2. zonas sekundārajām antivielām imobilizētais iekrāsotais komplekss nodrošina testa norises pareizības pārbaudi (skat. 1.B attēlu, 3.2. zonu). Runājot par 3.2. – iekšējo kontroli – pigmentu saturošās šūnas daļiņas notur uz vietas, tādēļ, ka ir sekundāro antivielu saistība ar primārajām antivielām. Šādā veidā parāda pigmentu saturošās šūnas konjugāta saglabāšanos ar specifiskām antivielām.

Specifiskā iekrāsojuma veidošanās atkarīga no kompleksa vīrus-antiviela-pigmentu saturošā šūna saistības ar antivielām, kas imobilizētas uz membrānas. Kā specifisko, tā sekundāro uz membrānas imobilizēto antivielu daudzums ir mazāks par antivielas-pigmentu saturošās šūnas konjugātu daudzumu. Pārreķinot attiecībā pret testa sloksni, atšķirība starp imobilizētajām un konjugētajām antivielām ir aptuveni 10 reizes – apmēram 150 ng pret 1 mkg. Ja vīrusa un tādējādi kompleksu ir daudz, tad ne visi kompleksi tiek aizturēti uz membrānas 3.1. zonā, daļa pāries uz 3.2. zonu. Ja vīrusa ir maz vai tā vispār nav, tad nesaistītais konjugāts tāpat pāries uz 3.2. zonu.

Visbeidzot, ceturrtā funkcionālā zona jeb kapilārā sūkņa zona, kas sastāv no tā paša materiāla kā 1. zona, piemēram, no filtrpapīra, un nodrošina šķidrums plūsmu un molekulu, tajā skaitā izveidotā kompleksa vīrusa daļiņa-iekrāsotā specifiskā antivielā, maksimālu pārnesi no pirmās funkcionālās zonās uz trešo – precipitācijas – zonu.

Par testa pozitīvu rezultātu liecina iekrāsojums testa sloksnes trešās – precipitācijas – zonas abās daļās. Iekrāsojums tikai sekundāro antivielu zonā (3.2. zona) norāda uz vīrusa daļiņu neesību detekcijai pietiekamā daudzumā.

Iekrāsojums tikai specifisko antivielu zonā (3.1. zona) vai izplūdušas iekrāsotās zonas liecina par tehniskām problēmām testā, piemēram, par konjugāta antivielas-pigmentu saturošā šūna sabrukumu.

Tests, kura pamatā ir imunoprecipitācija uz testa sloksnes, ir kvalitatīvs, tāpēc tas nav jutīgs pret izpētāmā antigēna pārmērīgu daudzumu. Jebkurš antigēna daudzums, kas pārsniedz detekcijas sliekšni, iekrāsos 3.1. zonu, bet ar vīrusu saistīts vai nesaistīts konjugāts iekrāsos 3.2. zonu.

Izgatavojot testa sloksnes, konjugācijas zonā uzklāj kompozīciju, kuras sastāvā ir antivielu komplekss ar pigmentu saturošās šūnas daļām, un precipitācijas zonas pirmajai daļai (3.1.) – kompozīciju, kas satur specifiskas antivielas, precipitācijas zonas otrajai daļai (3.2.) – kompozīciju, kas satur sekundārās antivielas pie specifiskajām antivielām. Turklāt pēc antivielu un pigmentu saturošo šūnu kompleksa uzklāšanas veic žāvēšanu, vēlams, liofilo. Konjugāta žāvēšanai to vēlams uzklāt stabilizējoša bufera



sastāvā, kas satur kādu no cukuriem – aizsargāt pret agregāciju, pievienojot cukurus, piemēram, manitolu, trehalozi vai saharozi.

Ražojot vienu no variantiem masveidā, izgatavo plati, kas veidota no zonām ar uzklātiem reaģentiem, un pēc tam šo plati sagriež sloksnēs. Ieteikta arī antiViela, ko satur testa sloksne un diagnostikums koronavīrusa noteikšanai SARS-COV-2. Tā var būt trūša antiViela, taču ar to neaprobežojas.

AntiVielu iegūst, imunizējot dzīvniekus ar hibrīdu olbaltumu vai ģenētisku konstrukciju atbilstoši izgudrojumam. Ieteikta arī hibrīda olbaltumviela un ģenētiska konstrukcija, kuras sastāvā ir polinukleotīds, kas kodē minēto hibrīdo olbaltumvielu, un citi elementi, kas nodrošina minētās hibrīdās olbaltumvielas sintēzi organismā-producentā izmantošanai koronavīrusa infekcijas diagnosticēšanai. Hibrīdā olbaltumviela, ko izmanto SARS-COV-2 tipa koronavīrusa izraisītās infekcijas diagnostikai, ir iekļauti šāda koronavīrusa ar lokaniem tiltiņiem savienoti M, S, N, E olbaltumvielu fragmenti, un to raksturo aminoskābju sekvence SEQ ID NO.:1 vai SEQ ID NO.:2. Izgudrojumā minētā antiViela saistās ar šādu hibrīdo olbaltumvielu un arī SARS-COV-2 tipa koronavīrusu. Saistīšanās notiek ar SARS-COV-2 tipa koronavīrusa olbaltumvielas fragmentu M, no 60 līdz 180 aminoskābju atlikumu, un/vai S, ar 306 līdz 380 aminoskābju atlikumu, un/vai N, ar 216 līdz 360 aminoskābju atlikumu, un/vai E, ar 6 līdz 70 aminoskābju atlikumu. Ģenētiskā konstrukcija var saturēt arī fragmentu, kas kodē sekrētu heteroloģisko sekvenci, piemēram, no tās TPA, EPO, STH vai IFG.

Rasējumu īss apraksts

Att. 1. Testa sistēmas shēma: 1 – parauga uzklāšanas zona, 2 – konjugāta zona, 3 – rezultāta zona: 3.1. – specifisko antiVielu zona, 3.2. – iekšējās kontroles zona, 4 – kapilārā sūkņa zona, A – līdz analizējamā parauga uzklāšanai, B – pēc analizējamā parauga, kas satur jauno koronavīrusu, uzklāšanas.

Att. 2 Testa sloksnes prototipa fotogrāfija: 1 – parauga uzklāšanas zona, 2 – konjugāta zona, 3 – rezultāta zona, 4 – kapilārā sūkņa zona. 2. zona pilnīgi aizkrāsota – satur konjugātu antiVielas-zelta koloīds, galīgajā diagnostikumā tā būs paslēpta zem sloksnes – korpusa iepakojuma daļas. Svītra starp 3. un 4. zonu – tā ir ēna uz zonu robežas, komerciālajos komplektos tā ir vieta, kas parasti noslēpta zem nekausējamas lentes.