



Testes imunológicos para o diagnóstico laboratorial de COVID-19

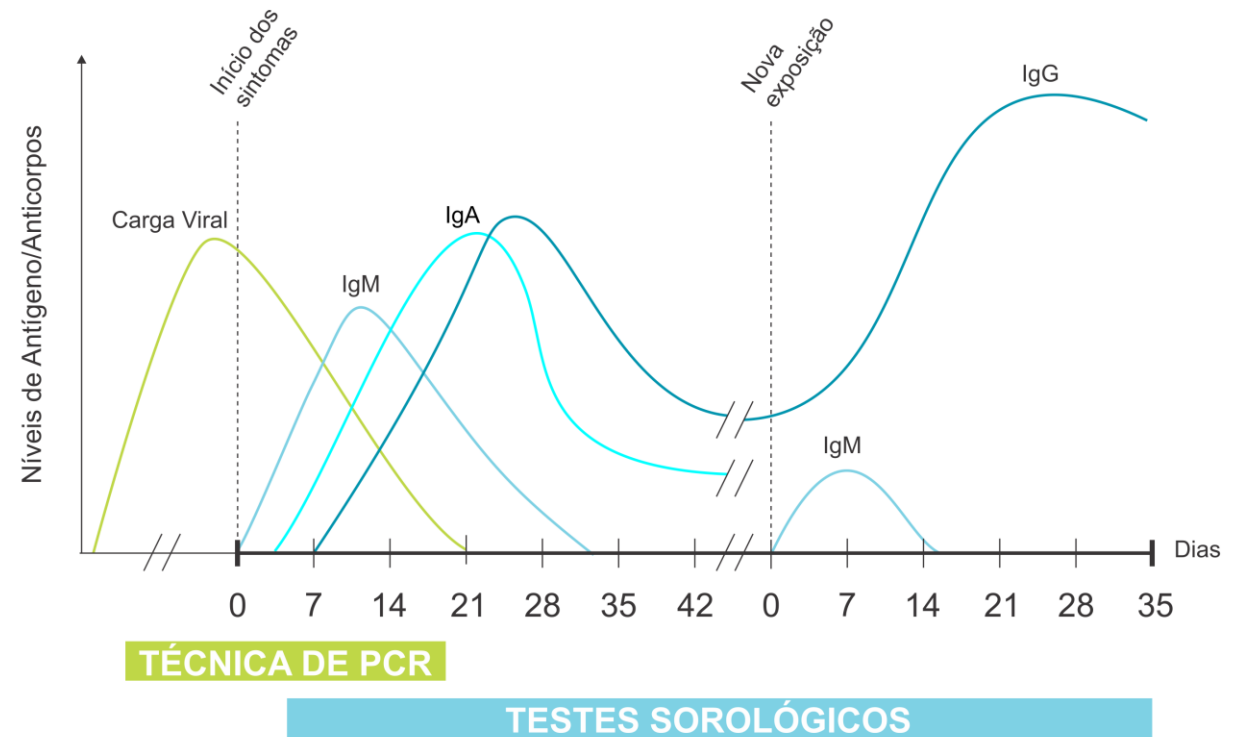
Monitora PAE: Tâmisá Seeko Bandeira Honda

Supervisor: Magnus Ake Gidlund

BMI0468

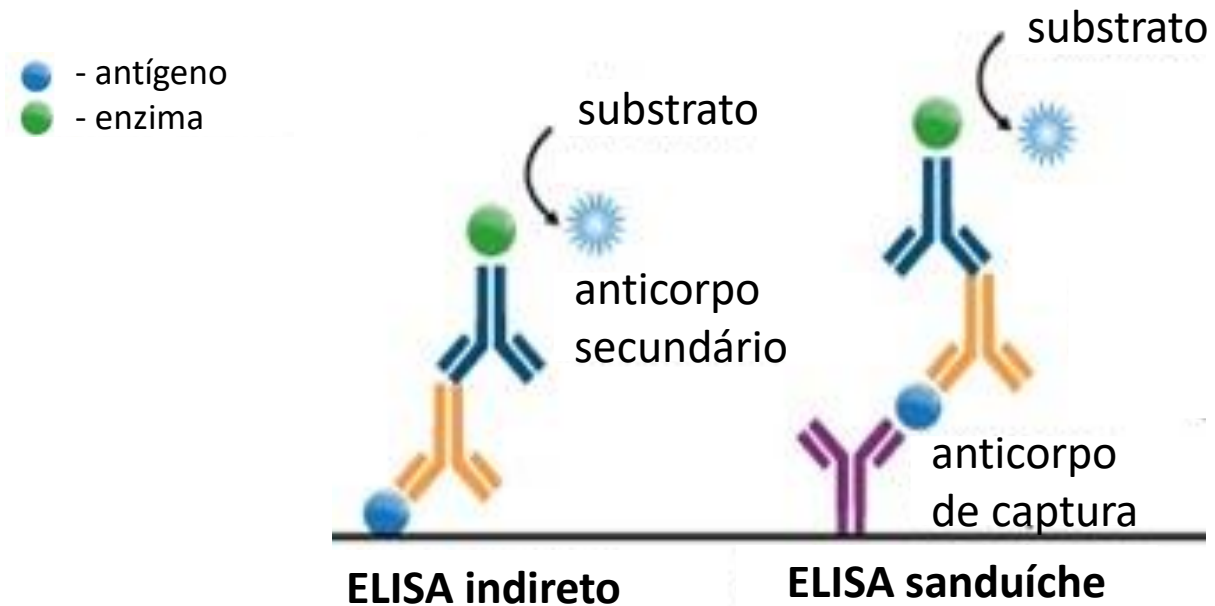
Testes utilizados na prática laboratorial

- RT-PCR
- ELISA
 - Anticorpos totais
 - Anticorpos neutralizantes
- Imunocromatografia
- Citometria de fluxo
 - Imunidade celular



ELISA

- Ensaio imunoenzimático
 - ELISA direto
 - **ELISA indireto**
 - Quantificação de anticorpos



ELISA anticorpos totais

- Quantifica a presença de anticorpos não neutralizantes (IgM ou IgG)

RESEARCH ARTICLE

Journal of
MEDICAL VIROLOGY WILEY

Structural variations in human ACE2 may influence its binding with SARS-CoV-2 spike protein

Mushtaq Hussain¹ | Nusrat Jabeen² | Fozia Raza¹ | Sanya Shabbir^{1,2} |
Ayesha A. Baig¹ | Anusha Amanullah¹ | Basma Aziz¹

COVID-19: angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) expression and tissue susceptibility to SARS-CoV-2 infection

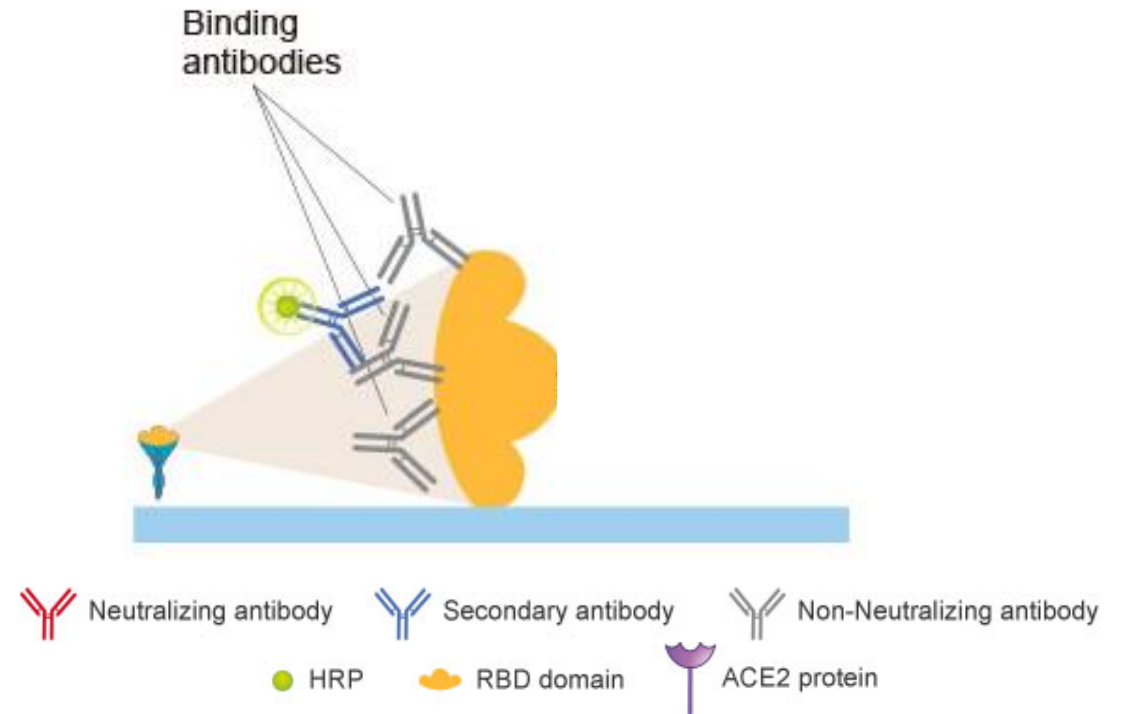
Stephany Beyerstedt¹ • Expedito Barbosa Casaro¹ • Érika Bevilaqua Rangel^{1,2}

REVIEW ARTICLE

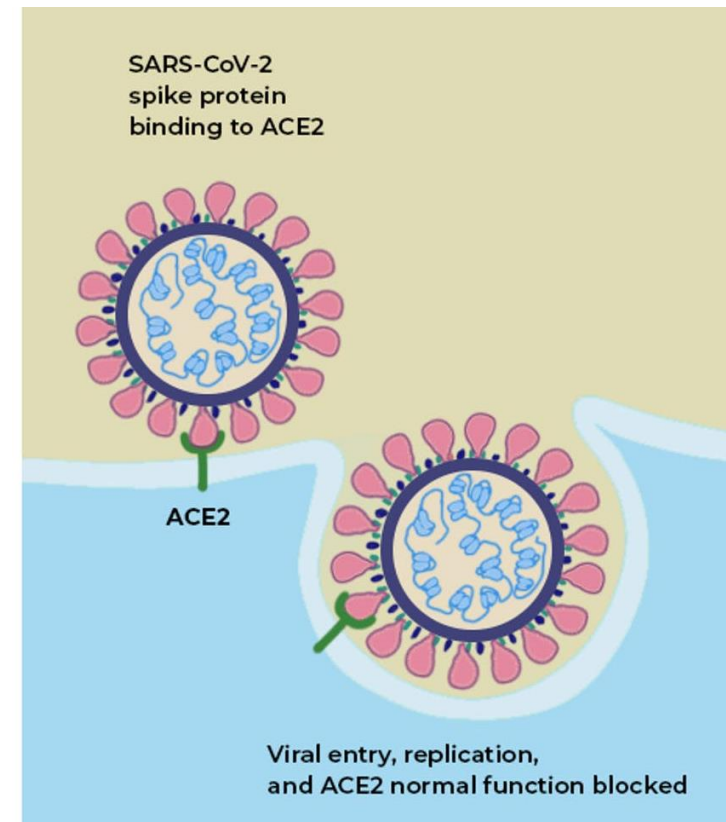
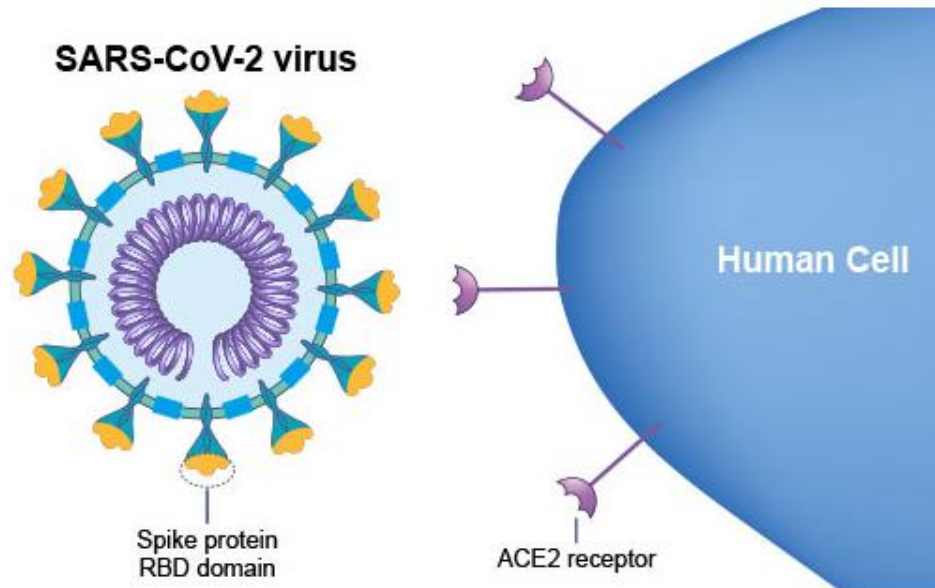
Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antivirus drug development for COVID-19

Yuan Huang¹, Chan Yang¹, Xin-feng Xu¹, Wei Xu¹ and Shu-wen Liu^{1,2}

Currently Available Antibody Tests



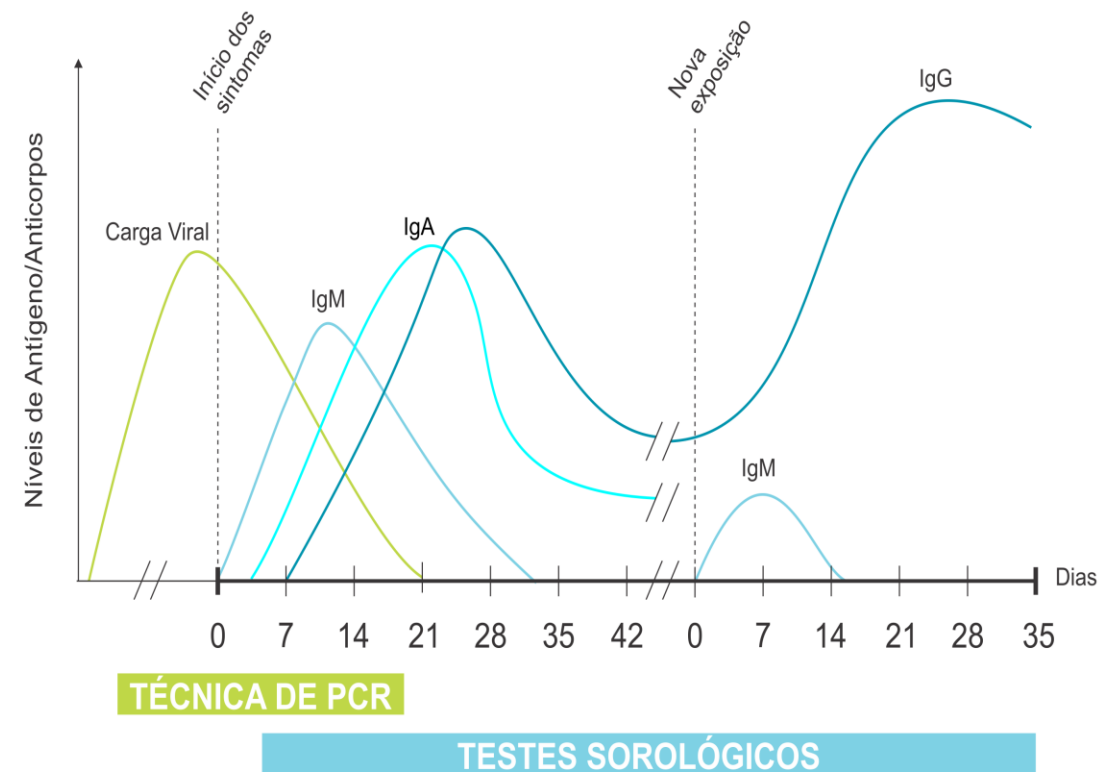
Pesquisa por anticorpos neutralizantes



Pesquisa por anticorpos neutralizantes

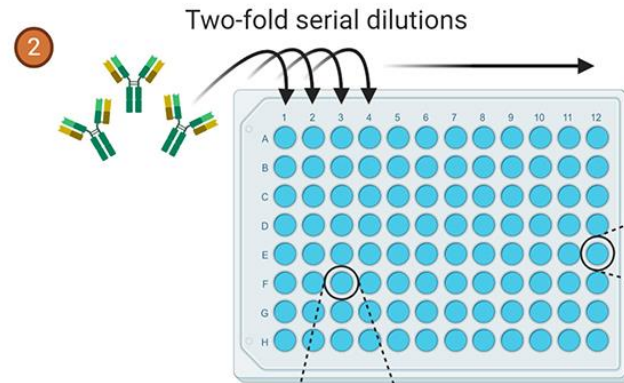
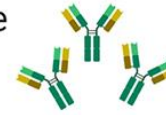
- Anticorpos contra proteína S (RDB)
 - Impede a ligação *Spike*-ACE2
- Especificidade > 99,5%
 - Sangue (Soro)

“A Pesquisa de Anticorpos contra a Proteína S (S1 RBD) deve ser realizada a partir de 3 semanas (idealmente 30 dias) após a infecção ou administração da vacina (2ª dose)”

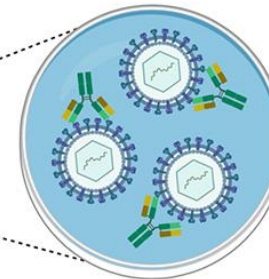


Serum Virus Neutralization Assay

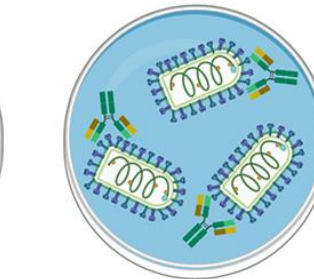
- 1 Collect serum from immunized animal and heat inactivate
(contains antibodies that neutralize virus infection)



- 3 Add virus

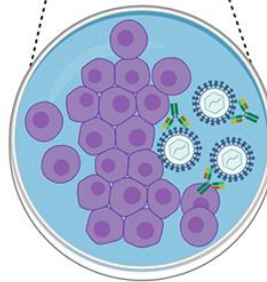


live SARS-CoV-2

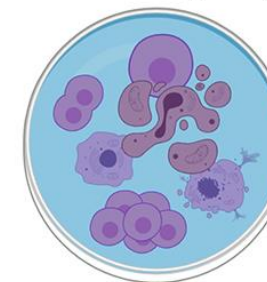


or
pseudovirus
expressing spike

- 4 Add cells



- 5 Measure cytopathic effect (CPE)



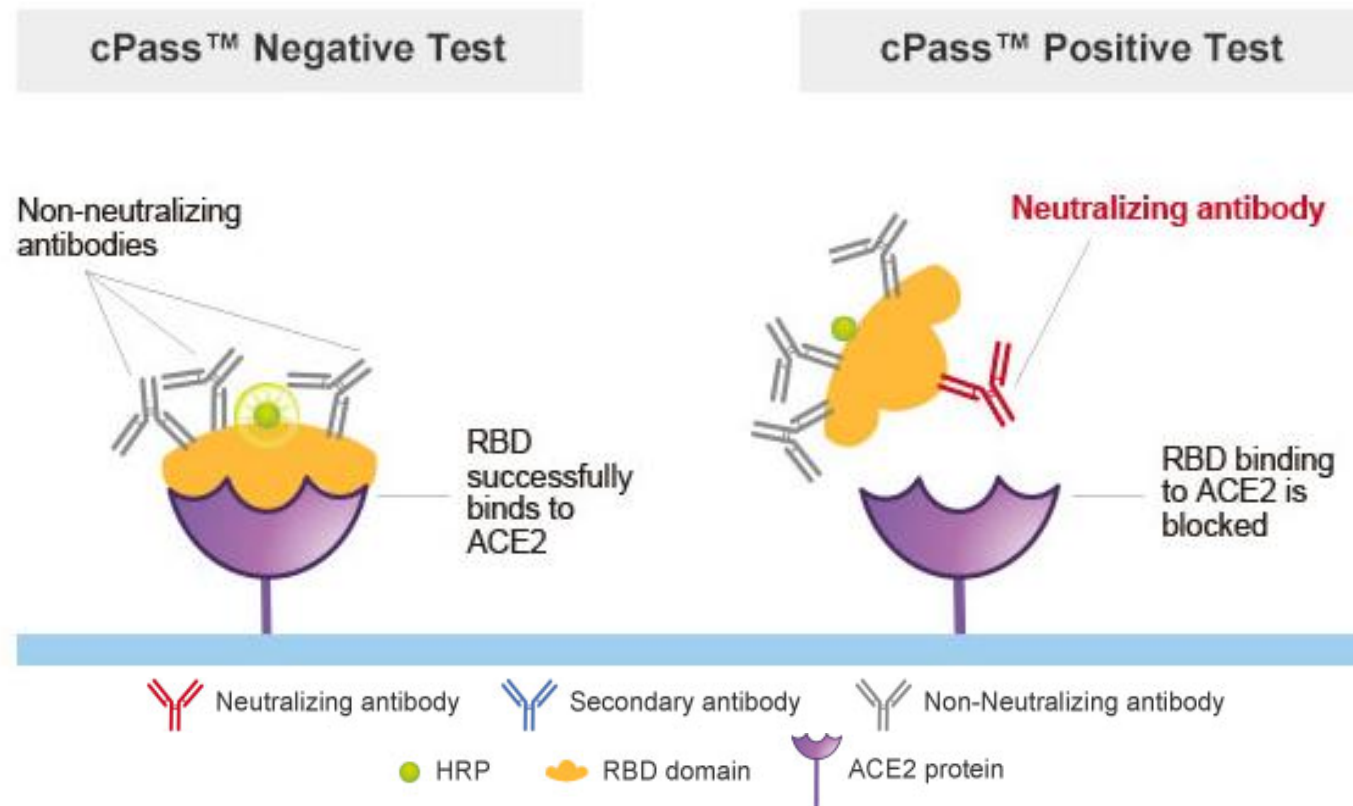
- clumping
- inclusion bodies
- pyknosis
- syncytia
- swelling

Created with BioRender

© 2020 BioCentury, Inc. All rights reserved. Unauthorized distribution prohibited.

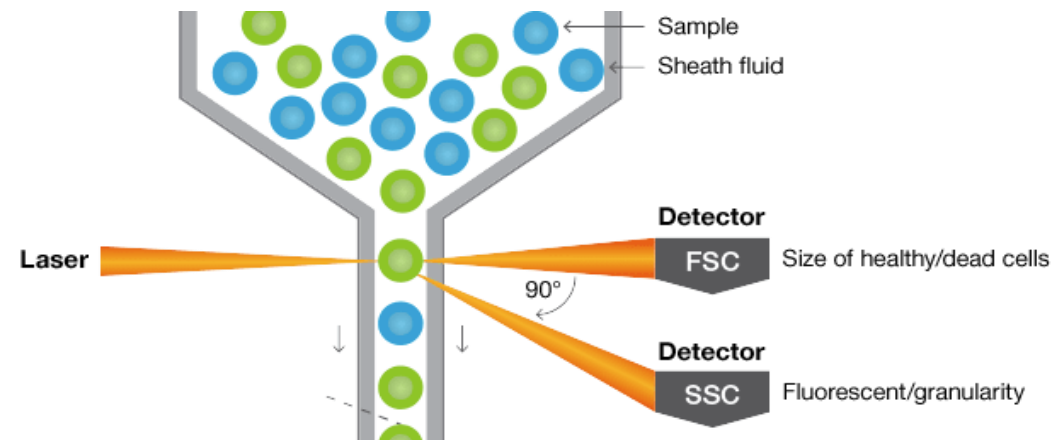
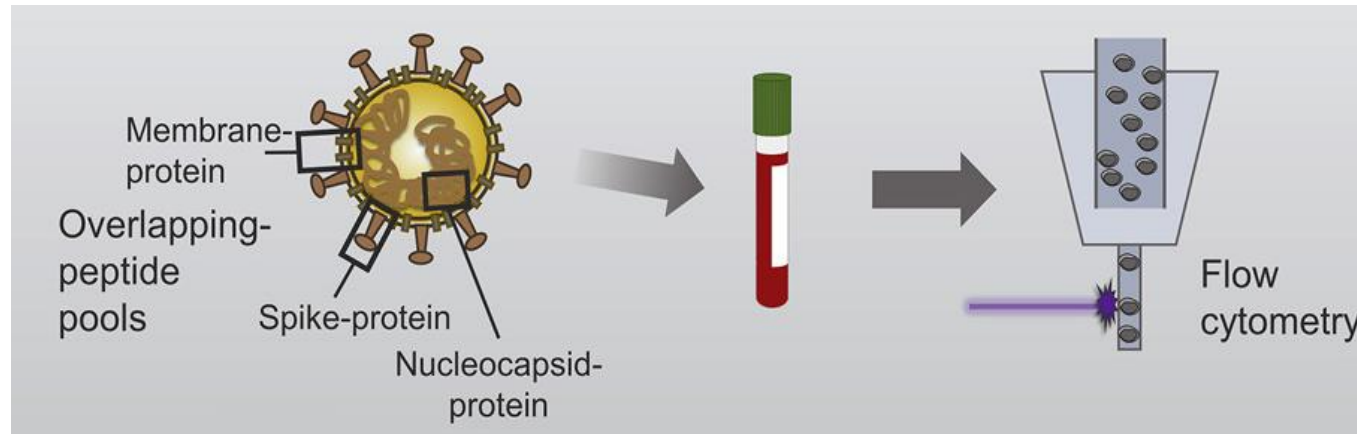
BIOCENTURY

Pesquisa por anticorpos neutralizantes

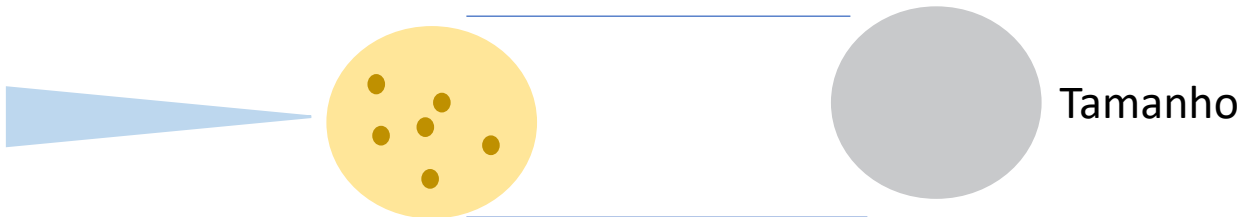


Anticorpos > 20-30% +
Anticorpos < 20-30% -

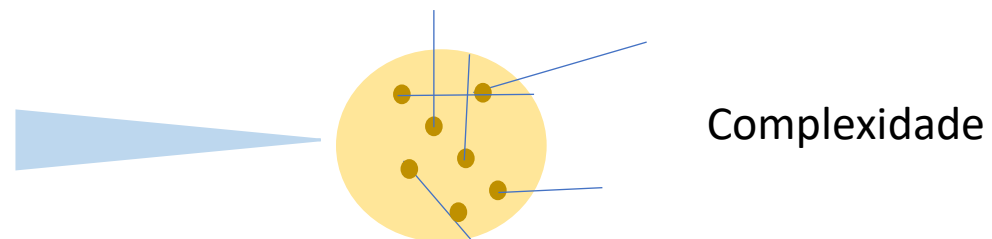
Linfócitos T específicos para SARS-CoV-2



FSC (foward scater)

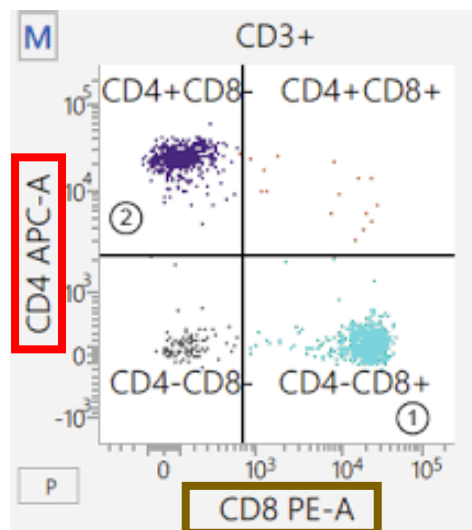


SSC (side scater)



CD4

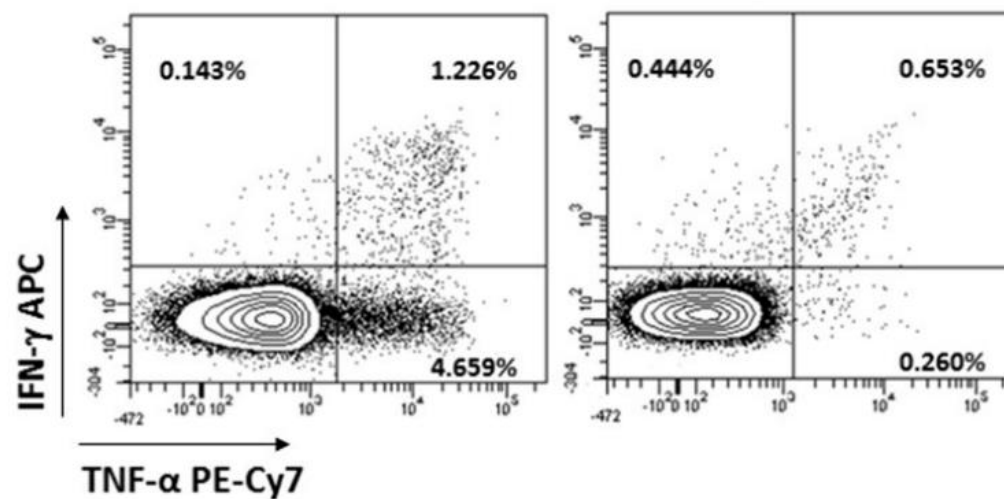
CD8

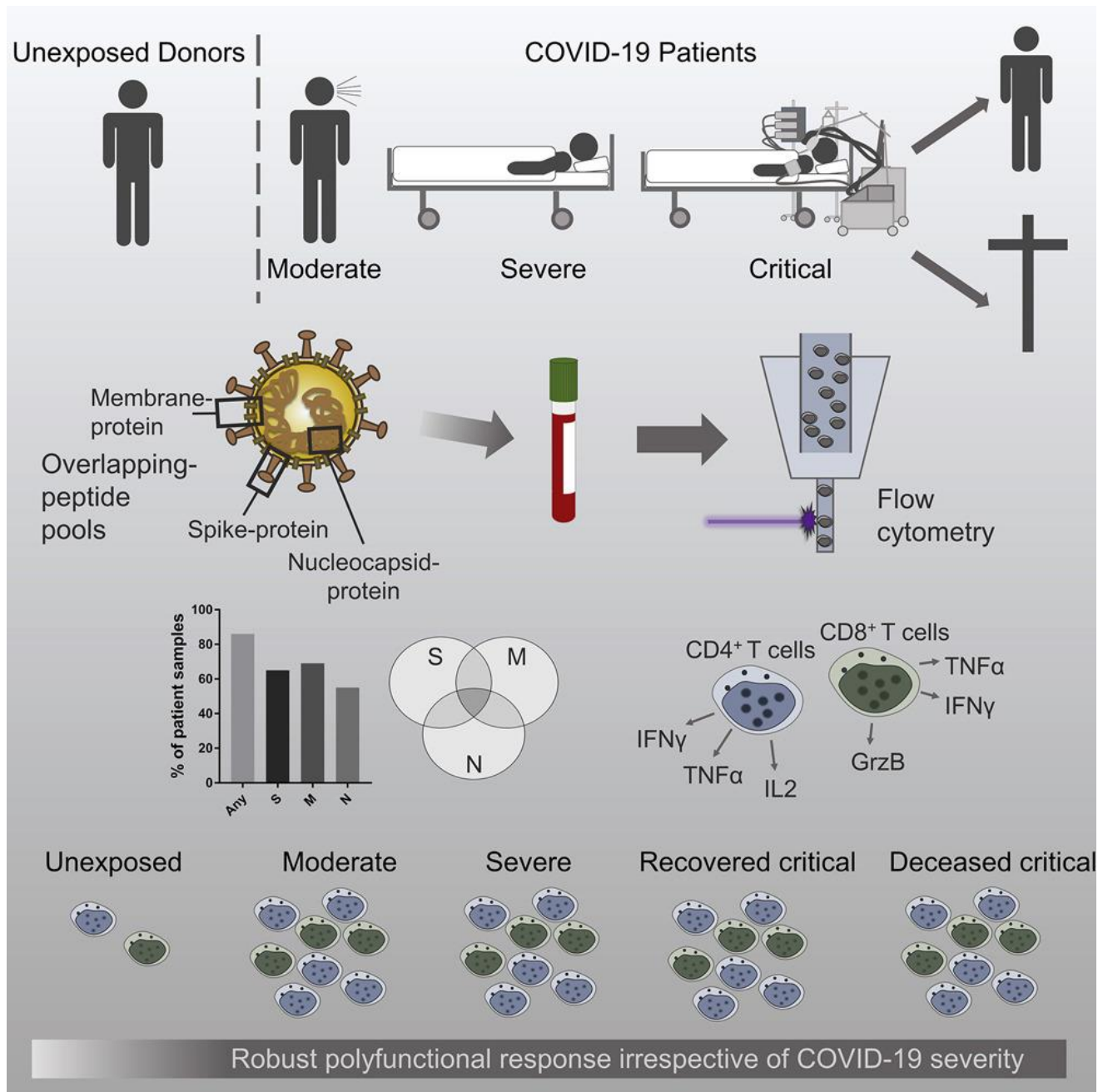


A

CD4⁺ T-cells

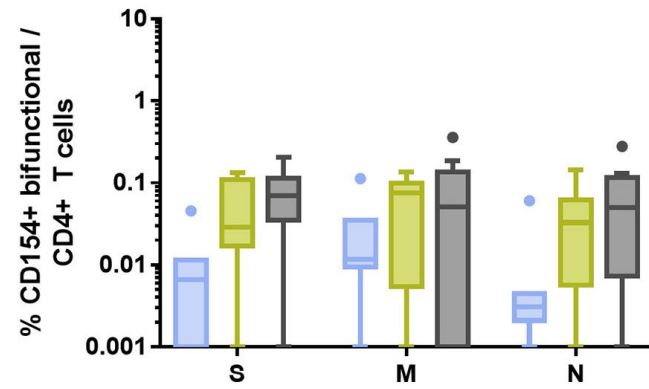
CD8⁺ T-cells



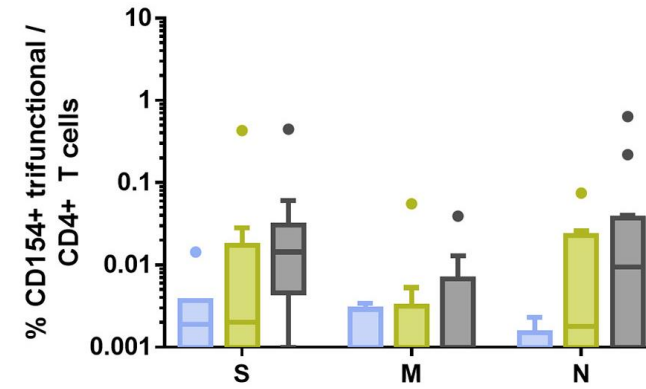




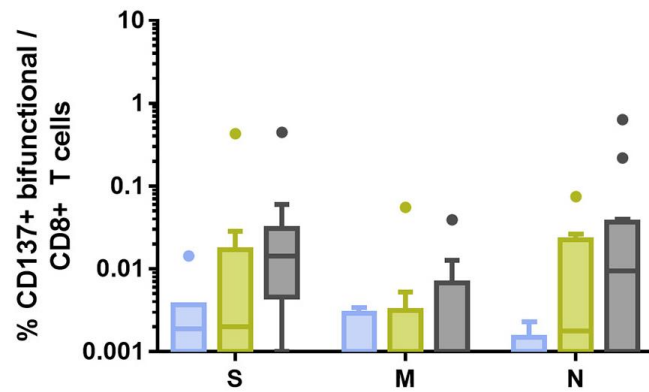
E



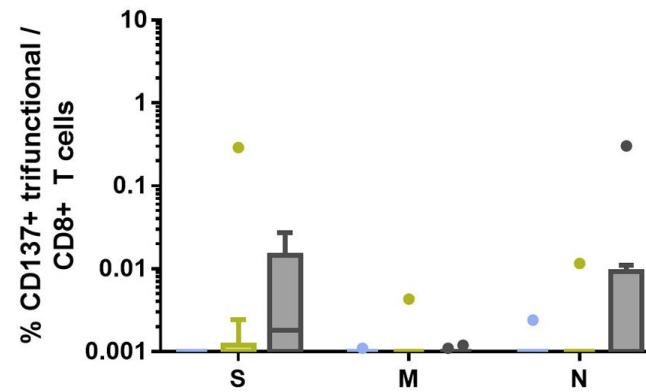
F



N



O



TESTES INDIRETOS – IMUNOLÓGICOS

	TESTES SOROLÓGICOS		
	Pesquisa de anticorpos totais	Pesquisa de anticorpos IgG e IgM	Pesquisa de anticorpos neutralizantes
Método	Eletroquimioluminescência (ECLIA)	Quimioluminescência (CLIA)	Eletroquimioluminescência (ECLIA)/ Imunoenzimático funcional
Alvo	Anticorpos totais contra a proteína N (nucleocapsídeo) do vírus	Anticorpos IgG e IgM contra a proteína N (nucleocapsídeo) do vírus	Anticorpos neutralizantes contra a proteína S (<i>spike</i>) do vírus
Material	Sangue (soro)	Sangue (soro)	Sangue (soro)
Indicações	• Indivíduos com ou sem antecedente de quadro clínico compatível com Covid-19, para avaliar se houve infecção pregressa • Pessoas com histórico de infecção confirmada, para avaliar se houve produção de anticorpos	• Indivíduos com ou sem antecedente de quadro clínico compatível com Covid-19, para avaliar se houve infecção pregressa • Pessoas com histórico de infecção confirmada, para avaliar se houve produção de anticorpos • Em protocolos de prevenção de transmissão, já que alguns países de destino têm exigido, além da RT-PCR, a sorologia para IgG e IgM como requisito para entrada em seu território	• Pessoas com antecedente de Covid-19 confirmada ou não, ou com histórico de exposição pregressa, para avaliar a produção de anticorpos neutralizantes (protetores) • Possível utilidade para avaliar a resposta vacinal
Momento da coleta	14 dias após o início dos sintomas ou 21 dias após a exposição de risco	14 dias após o início dos sintomas ou 21 dias após a exposição de risco	14 dias após o início dos sintomas ou 21 dias após a exposição de risco; para avaliação de resposta vacinal, 30 dias após a última dose da vacina

Momento da coleta	14 dias após o início dos sintomas ou 21 dias após a exposição de risco	14 dias após o início dos sintomas ou 21 dias após a exposição de risco	14 dias após o início dos sintomas ou 21 dias após a exposição de risco; para avaliação de resposta vacinal, 30 dias após a última dose da vacina
Sensibilidade	96% Em pacientes com doença sintomática confirmada por PCR e, pelo menos, 14 dias de intervalo entre a coleta da PCR e da sorologia	IgG = 96% IgM = 85% Em pacientes com doença sintomática confirmada por PCR e, pelo menos, 14 dias de intervalo entre a coleta da PCR e da sorologia	97% Em pacientes com doença sintomática confirmada por PCR e, pelo menos, 14 dias de intervalo entre a coleta da PCR e da sorologia
Especificidade	99%	IgG = 100% IgM = 98%	97%
Vantagens	• Para melhorar a acurácia do teste, o Fleury utiliza dois métodos diferentes para cada amostra analisada: ECLIA, que detecta a presença dos anticorpos específicos, e CLIA, que discrimina as classes IgG e IgM. Essa estratégia reduz muito a possibilidade de resultados falso-positivos ou falso-negativos e fornece mais informações para a interpretação do resultado. Verdadeiros positivos habitualmente são reagentes em ambas as metodologias. • O efeito do decaimento do nível de anticorpos ao longo do tempo na sensibilidade é minimizado pela estratégia de combinar duas técnicas.	• Para melhorar a acurácia do teste, o Fleury utiliza dois métodos diferentes para cada amostra analisada: ECLIA, que detecta a presença dos anticorpos específicos, e CLIA, que discrimina as classes IgG e IgM. Essa estratégia reduz muito a possibilidade de resultados falso-positivos ou falso-negativos e fornece mais informações para a interpretação do resultado. Verdadeiros positivos habitualmente são reagentes em ambas as metodologias. • O efeito do decaimento do nível de anticorpos ao longo do tempo na sensibilidade é minimizado pela estratégia de combinar duas técnicas.	• Para melhorar a acurácia do teste, o Fleury utiliza um fluxo com dois métodos diferentes: ECLIA, que detecta os anticorpos antiproteína <i>spike</i>, e imunoenzimático funcional, para as amostras positivas na primeira etapa, o qual confirma e quantifica a função neutralizante. • A estratégia aumenta a especificidade do teste, pois elimina, na triagem, as amostras que não contêm anticorpos anti-<i>spike</i>, mas apresentam resultados limítrofes no teste imunoenzimático, que poderiam ser incorretamente interpretadas como positivas. • Nas amostras de validação previamente caracterizadas para a presença de anticorpos anti-<i>spike</i>, a concordância de resultados entre os métodos ECLIA e imunoenzimático se aproximou de 100%.