

蛍光マイクロフェア免疫クロマトグラフィーによる SARS-CoV-2 抗原を検出するための新しい方法の基礎と臨床評価

Chunyan Zhang*1, Lei Zhou*2*3, Kang Du*4, Ying Zhang*5, Jing Wang*6, Lijuan Chen*7, Yanning Lyu*7, Jun Li*5, Hao Liu*2*3, Junli Huo*8*9, Fei Li*8*9, Jiayi Wang*10*11, Peipei Sang*1, Si Lin*12, Yi Xiao*12, Kan Zhang*10*11 and Kunlun He*13

*1 Birth Defects Prevention and Control Technology Research Center, Chinese PLA General Hospital, Beijing, China

*2 Clinical Laboratory, Wuhan Huoshenshan Hospital, Wuhan, China

*3 Clinical Laboratory, Xijing Hospital of Air Force Medical University of PLA, Xi'an, China

*4 School of Precision Instruments and Optoelectronics Engineering, Tianjin University, Tianjin, China

*5 Clinical Laboratory, First Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing, China

*6 Clinical Laboratory, Chongqing Public Health Medical Center, Southwest University Public Health Hospital, Chongqing, China

*7 Institute of Infectious and Endemic Diseases Prevention and Control, Beijing Center for Diseases Prevention and Control, Beijing, China

*8 Infections Department, Wuhan Huoshenshan Hospital, Wuhan, China

*9 Neurosurgery Department, Xijing Hospital of Air Force Medical University of PLA, Xi'an, China

*10 Medical Department, Wuhan Huoshenshan Hospital, Wuhan, China

*11 Cardiovascular Medicine Department, Xijing Hospital of Air Force Medical University of PLA, Xi'an, China

*12 Beijing Savant Biotechnology Co., Ltd., Beijing, China

*13 Translational Medicine Research Center, Key Laboratory of Ministry of Industry and Information Technology of Biomedical Engineering and Translational Medicine, Chinese PLA General Hospital, Beijing, China

目的：

コロナ動脈性肺炎（COVID-19）の補助診断のための SARS-CoV-2 抗原の迅速な検出試薬を開発し、試薬の方法論的評価と臨床的評価を行うこと。

方法：

SARS-CoV-2 Nタンパク質テストストリップは、二重抗体サンドイッチの原理に基づいて、蛍光マイクロフェア標識技術と免疫クロマトグラフィー技術を組み合わせて作成されました。次に、ストリップの分析能力と臨床応用を評価しました。

結果：

組換え Nタンパク質のストリップの検出限界は 100 ng / ml であり、活性化された SARS-CoV-2 ウイルスの検出限界は 1×10^3 TCID₅₀ / ml でした。ストリップはまた、高い分析特異性と干渉防止能力を備えています。所定のカットオフ値によると、健康な対照および他の呼吸器疾患の患者におけるテストストリップの特異性は 100.00 および 97.29% であり、進行段階および治癒段階の COVID-19 症例の感度は 67.15 および 7.02% でした。RNA テストに対する抗原ストリップの正の一致率と負の一致率は 83.16 と 94.45% でした。

結論：

SARS-CoV-2 蛍光免疫クロマトグラフィーテストストリップは、迅速、高感度、正確な検出を実現でき、その場でウイルスを迅速に検出するための臨床要件を満たすことができます。

はじめに

2019年12月、中国の武漢でウイルス性肺炎の症例が多数発見され、最初の症例は武漢のシーフード市場での曝露に関連していた (Jiang et al.、2020; Wu et al.、2020)。2020年2月11日、ウイルスの分類に関する国際委員会 (ICTV) は、新型コロナウイルスの正式名称を発表しました。重症急性呼吸器症候群コロナウイルス2 (SARS-CoV-2)。同時に、世界保健機関 (WHO) は、新型コロナウイルスに感染した肺炎が正式に「COVID-19」と名付けられたと発表しました (Munster et al.、2020; Zhu N. et al.、2020)。COVID-19は、2020年4月4日までに世界206の国と地域に広がり、全体の88.4%を占めています。世界中で100万件以上のcovid-19が確認され、50,000件以上が死亡しています。コロナウイルスは、呼吸器疾患を引き起こす一般的なプラス鎖RNAウイルスであり、自然界に広く存在しています。人間、脊椎動物、無脊椎動物が寄生宿主になる可能性があります (Guo et al.、2020)。これまでに、7種類の感染性コロナウイルスが発見されました。すなわち、HCoV-229-E、HCoV-OC43、SARS-CoV、HCoV-NL63、HCoV-HKU1、MERS-CoV、そして最近発見されたSARS-CoV-2です。その中で、229E、NL63、OC43、HKU1は一般的な寒冷症状を引き起こす可能性があり、残りの3つは高病原性SARS-CoV (非定型肺炎)、MERS-CoV (中東呼吸器症候群コロナウイルス)、および新たに発見されたSARS-CoV-2です。2.2. 1月22日に国立ゲノミクス科学データセンターによって公式にリリースされたSARS-CoV-2データベースの分析によると、SARS-CoV-2の全ゲノム配列は29903ntであり、これには主に非構造をコードする遺伝子ORF1aおよび1bが含まれます。タンパク質および構造タンパク質をコードするS、E、M、N。MおよびEタンパク質は、ウイルスの集合を調整し、成熟したウイルスエンベロープを形成する上で重要な役割を果たします。一方、Nタンパク質は、ウイルスRNAに結合し、ウイルスRNAの転写と複製、およびキャプシド形成されたゲノムのピリオンへのパッケージングに関与します。

(Ashour et al.、2020; Nishiga et al.、2020; Zhu C. et al.、2020)。調査によると、2019年のSARS-CoV-2と2003年のSARSの発生はどちらもおそらくコウモリに起因しており、ゲノム配列の類似性は最大80%です。さらに、SARS-CoV-2の感染経路と病因はSARS (Sun et al.、2020; Zhou et al.、2020)、すなわちSARS-CoV-2のSタンパク質とアンジオテンシン変換酵素遺伝子2に類似しています。(アンジオテンシン変換酵素2、ACE2) 相互作用が宿主細胞に侵入し、ウイルスの複製を完了します (Prompetchara et al.、2020)。病原体は通常、分子診断と免疫診断によって検査されます。Nタンパク質は、ウイルスの集合過程で露出する可能性があり、臨床的検出の対象の1つになります。公表された記事では、MERS-CoVのNタンパク質を抗原検出法で検出することが可能であると報告されています (Chen et al.、2015)。SARS-CoV-2の発生の初期段階では、蛍光PCR法が優先的に採用されました。この方法の結果は正確でしたが、複雑な操作や環境要因への感受性などの問題もありました。したがって、迅速な免疫診断試薬は、エビデミック予防の中期および後期のスクリーニングに使用できません。イムノアッセイ試薬の開発過程において、公開されているゲノム配列からウイルスNタンパク質の特異的かつ保存された配列を選択し、多数の抗体をスクリーニングした後、二重抗体サンドイッチ抗原法によりウイルス抗原を検出しました。

材料と方法患者とサンプル

2020年1月から2020年4月までの合計990サンプルの鼻/口咽頭スワブが収集され、この研究でテストされました。これには、247人のCOVID-19患者、443人のその他の呼吸器疾患患者、300人の健康な人が含まれます。鼻/中咽頭スワブサンプルは、標準的な操作に従って患者/健康な人々から収集され、ウイルスRNA/蛋白質の分解を防ぐために、ハンクスウイルス保存溶液 (pH7.4-7.6) (Beijing Youkang Technology Co., Ltd) の単一チューブ内に保管および輸送されました。

試薬および機器

マウス抗SARS-CoV-2Nタンパク質モノクローナル抗体-1およびマウス抗SARSCoV-2Nタンパク質モノクローナル抗体-2は、Beijing Biosynthesis Biotechnology Co., Ltd. から購入しました。SARS-CoV-2の組換えNタンパク質は天津大学から寄贈されました。ウサギIgGはBeijingMingchaoxi Technology Co., Ltd. Companyから購入しました。ヒツジ抗ウサギ二次抗体は、Kema Biotechnology (Beijing) Co., Ltd. から購入しました。ラテックス蛍光ミクロスフェアはOceanNanotech (USA) から購入しました。ニトロセルロースメンブレンはMerckChemical Technology (Shanghai) Co., Ltd. から購入しました。ガラスセルロース膜はShanghaiJoey Biotechnology Co., Ltd. から購入しました。PVPボトムプレートはShanghaiKinbio Biotechnology Co., Ltd. から購入しました。N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS)、カルボジイミド (EDC)、および生物学的防腐剤は、Sigma-Aldrich (Shanghai) Trading Co., Ltdから購入しました。Savant-100 蛍光免疫クロマトグラフィーアナライザーは、Beijing Savant Biotechnology Co., Ltdから購入しました。Symphony-100 蛍光免疫分析装置はTianjinBoomsience Technology Co., Ltd. から購入しました。BeijingSavantBiotechnologyCo., Ltd. は、SARS-CoV-2 抗原テストストリップと包装材料の少量生産を担当しています。

方法

設計と手順を図1と図2に模式的に示します。

図1

SARS-CoV-2 Nタンパク質特異的抗体の選択と交差反応 (A)。 SARS-CoV-2 Nタンパク質が抗原イムノアッセイに選択されました (B)。 SARS-CoV-2Nタンパク質と他の6種類のコロナウイルスの配列比較。 リストの上から下へ：1、HCoV-229E (AOG74787.1_N)；2、SARS-CoV-2 (YP009724397.2_N)；3、HCoV-HKU1 (AGW27885.1_N)；4、MERS CoV (AHC74105.1_N)；5、HCoV-NL63 (AFV53152.1_N)；6、HCoV-OC43 (QDH43730.1_N)；7、SARS-CoV ShanghaiQXC1 (AAR86795.1_N)；8、コンセンサス配列、黒い領域 (C)。 SARS-CoV-2 Nタンパク質の発現 (D)。 モノクローナル抗体とSARS-CoV-2Nタンパク質間の親和性の決定。 図6A8、6A6、7e4、1c7、14b9、7a7、および1B12は、北京生合成バイオテクノロジー株式会社 (E) の抗体ライブラリーから選択された7つのモノクローナル抗体を表す。 交差反応性の結果。 免疫標的として抗SARS-CoV-2Nタンパク質モノクローナル抗体-1および抗体-2を選択した。

図2

試薬の準備と検出プロセス (A)。 抗体検出試薬ストリップの調製 (B)。 中咽頭スワブのサンプリング (C)。 二重抗体サンドイッチ抗原の方法 (D)。 UV-LED (E) を使用して結果を読み取ります。 検出器によって分析されます。

(1) 組換え SARS-CoV-2Nタンパク質

SARS-CoV-2 (武漢、アクセッション：QHD43423.2) の配列に従って、Nタンパク質の遺伝子が合成され、pET28aベクターに挿入されました。組換えSARS-CoV-2Nタンパク質は、大腸菌での発現を誘導することによって得られ、Niアフィニティーカラムによって精製されました。

(2) テストストリップの準備

まず、1 mlのラテックス蛍光ミクロスフェア、1mgのEDCおよび1mgのNHSを混合し、室温で3時間攪拌しました。次に、0.1mgのマウス抗SARS-CoV-2Nタンパク質モノクローナル抗体-2を添加し、室温で1時間攪拌した。その後、10 mgのBSAブロッキング溶液を添加し、1時間攪拌しました。遠心分離を2~8°Cで30分間、11,000 r / minで行い、上清を除去しました。最後に、固体沈殿物を1 mlのリン酸緩衝液 (1 mol / L、pH = 7.4) に再溶解し、1μLのProclin 300を添加し、混合物を4°Cで使用のために保存しました。同様に、ウサギIgGをラテックス蛍光ミクロスフェアで標識し、4°Cで保存して使用しました。

(3) コーティングパッドの準備

マウス抗SARS-CoV-2Nタンパク質モノクローナル抗体-1とヒツジ抗ウサギ二次抗体をそれぞれリン酸緩衝液で希釈しました。上記の溶液を、金フィルム噴霧器を使用して、1 mg / mlの濃度でNC膜上にコーティングした。マウス抗SARS-CoV-2Nタンパク質モノクローナル抗体-1を含むラインをテストライン (Tライン) として設定し、ヒツジ抗ウサギ二次抗体を含むラインを品質管理ライン (Cライン) として設定しました。調製したままのパッドを37°C、湿度<30%で4時間乾燥させた。

(4) マーカーパッドの準備

ラテックス蛍光ミクロスフェア標識マウス抗SARS-CoV-2Nタンパク質モノクローナル抗体-2とラテックス蛍光ミクロスフェア標識ウサギIgGを1:1の容量比で混合し、ガラスセルロース膜に10μLの速度でスプレーしました。/CM。次に、マーカーパッドを45°Cで4時間乾燥させた。

(5) テストストリップアセンブリ

まず、PVCベースにコーティングパッドを貼り付けました。次に、NCフィルムのCライン近くの吸収パッドとTライン近くの端のマーカーパッドを接続し、スリッターで4±0.1mmのテストストリップにカットしました。

検出

テストストリップを使用した抗原検出方法は次のとおりです。

- (1) : 室温でテストカードを取り出し、パッケージを切り取り、後で使用するためにテーブルに置きます。
- (2) 。キット内の標準カードを取り出し、蛍光イムノクロマトグラフの IC カード検出位置にある標準カードの曲線情報を読み取り、分析装置に保存します。
- (3) ; テストする前に、アイテムとバッチ番号と一致する曲線情報を選択します。
- (4) ; 各テストストリップに 60 μ L のサンプル溶液を加え、室温で 15 分間放置してから、検出のために蛍光イムノクロマトグラフィアーアナライザーに挿入します。機器はサンプル濃度値を自動的に計算します (図 2E)。

SARS-CoV-2 核酸 RNA の検出は、蛍光定量 PCR によって実行されました。核酸抽出は文献 (Mollica、2010) に従って操作され、蛍光定量 PCR プロセスは指示に従って操作されました。

データ分析と統計

統計分析はソフトウェア SPSS20.0 を使用して実行され、ノンパラメトリック検定と両側カイ 2 乗検定を使用して 2 つのグループ間の差異が比較されました。結果を予測するための最良のカットオフ値を決定するために、受信者動作特性 (ROC) 分析が構築されました。確率はロジスティック回帰モデルを使用して計算され、推定された確率は ROC 分析で使用され、さまざまなモデルの曲線下面積 (AUC) が計算されました。P 値 < 0.05 は、統計的に有意であると見なされます。

結果

組換え N タンパク質の検出限界 (LoD)

SARS-CoV-2 組換え N タンパク質 (濃度 : 0.5 mg / ml) を使用して、50、100、200、500、および 1 μ g / ml の濃度でサンプルを調製しました。3 つのバッチのテストストリップで各濃度のサンプルを 20 回検出し、検出限界として 19/20 回の繰り返しで陽性の結果が得られた最低濃度を定義しました。表 1 に示すように、100 ng / ml をストリップの検出限界として定義しました。

活性化された SARS-CoV-2 ウイルスの LoD

活性化された SARS-CoV-2 ウイルス (IVCAS 6.7512、武漢ウイルス研究所、CSA。) の LoD は、サンプル保存溶液と実際の臨床マトリックス (健康な人の口腔咽頭スワブサンプルと混合されたサンプル保存溶液) の両方でテストされました。実験は P3 バイオセーフティ保護研究所で実施されました。最初に、活性化された SARS-CoV-2 培地 (宿主細胞 : Vero E6 細胞株、ATCC CRL-1586?) を 1 : 1、1 : 2、1 : 20、1 : 400、および 1 : 2,000 の勾配で希釈しました。各サンプルは少なくとも 2 回テストされ、1 : 2,000 での希釈は 13 回テストされました。次に、1 : 2,000 (100% 陽性、13/13) の濃度を LoD 範囲として使用して、LoD のテストを拡張しました。2 \times 10³、1 \times 10³、および 7.5 \times 10² TCID₅₀ / ml の濃度の希釈液を、それぞれ 20 回テストしました。これらの結果は、1 \times 10³ TCID₅₀ / ml 濃度で 100% (20/20) の陽性結果を示しました。したがって、1 \times 10³ TCID₅₀ / ml を LoD として設定しました (表 1)。

表 1
検出限界。

干渉防止

この実験では、ムチン、血液、鼻腔液、抗ウイルス薬、抗生物質などのサンプルに含まれる一般的な干渉物質のテスト結果への干渉を調査しました。同じ抗原濃度のサンプルを異なる干渉物質と混合し、同じバッチのストリップをテストに使用しました。表 2 に示すように、テスト結果は SARS-CoV-2 の検出結果から逸脱していませんでした。これは、サンプル中の一般的な干渉物質が実験結果に干渉しないことを示しています。

表 2
干渉物質の濃度表。

交差反応性

モノクローナル抗体 (Beijing Biosynthesis Biotechnology Co. Ltd. の抗体ライブラリーから) と SARS-CoV-2 N タンパク質の間の親和性実験は、選択された抗体の最適な作業濃度を示しました (図 1D)。ウエスタンブロッティング (WB) (Algenas et al.、2014) 交差反応実験は、SARS-CoV-2 組換え N タンパク質の 2 つのモノクローナル抗体と、SARS-CoV および MERS-CoV の組換え N タンパク質の

間で実施されました。抗体の特異性（図1E）。交差反応性検出の結果は、抗体がSARS-CoVの組換えNタンパク質に対して交差反応性を示し、他の7種類のコロナウイルスに対して交差反応性を示さず（表3）、他の研究と一致していました（Saahir Khan et al.、2020）。陽性反応を示したSARS-CoVタンパク質については、サンプルを1、500、200、100、および50 ng / mlの濃度に希釈しました。結果は、SARS-CoVタンパク質を50ng / mlの濃度に希釈した場合、交差反応性がないことを示しました（表3）。

表3
さまざまな病原体サンプルの結果。

精度検証

EP15-A3の要件に従って、ネガティブ（N1 \ N2）、ウィークポジティブ（S1 \ S2）、およびストロングポジティブ（P1 \ P2）のサンプルを1日5回、5日間テストし、すべてのサンプルの合計精度をテストしました。正または負の一致率について計算されました。表4の結果は、S2サンプルの正の一致率が96%であることを除いて、他のサンプルの一致率はすべて100%であることを示しています。テスト中のすべての抗原キットは、UV-LED励起下で均一な蛍光分布を示しました。

表4
精度。

カットオフ値の決定

アッセイの感度と特異性を調査するために、私たちの主要な実験では、219人の健康な対照と87人の診断されたCOVID-19症例から306サンプル（年齢範囲2~86、平均40.12±14.33）が検出され、カットオフ値を決定するために使用されました。図3Aに示すように、 <0.05 のp値は、すべてのテストで統計的に有意であると見なされました。AUCは0.932（95%CI : 0.894~0.970）でした。最大Youdenインデックス（Youdenインデックス=感度+特異度-1）は0.846で、カットオフは0.0495、感度は90.0%、特異度は94.7%でした。そのため、カットオフ値としてT / C0.05を設定しました。

図3

抗原ストリップの臨床応用と評価（A）。抗原ストリップのカットオフ決定のROC曲線（B）。COVID-19症例（進行期、●；治癒期、○）、他の呼吸器疾患の患者（■）、および健康な対照（□）における抗原ストリップの結果。*** p < 0.001; ns、ナンセンス（C）。COVID-19の開発のさまざまな時点での抗原検出率。抗原検査（●）、RNA検査（○）（D）。抗原ストリップの診断値、RNA検出および複合評価。

臨床応用と評価

このパートスタディは、ランダム化比較試験と単一盲検実験でした。247人の確認されたCOVID-19患者（男性、n = 102、女性、n = 145;年齢範囲2~86、中央値48）、他の呼吸器疾患の443人の患者（男性、n = 222、女性、n = 221）からの臨床サンプル;年齢範囲0~93、中央値35）および300人の健康な人々（男性、n = 159、女性= 141;年齢範囲20~58、中央値32）が登録され、それぞれ抗原ストリップおよび蛍光PCR法によって検出されました。最後に、非盲検化後の臨床診断に基づいて、検出の感度と特異性を評価しました。247人のCOVID-19患者のうち、137人の患者（男性、n = 47、女性、n = 90、年齢範囲2~86、中央値49）が疾患進行段階（発熱後0~44日、平均）でした。25日目）、および治癒段階（19~55日目、平均37日目）の110人の患者（男性、n = 55、女性、n = 55;年齢範囲4~86、中央値48）。国民健康委員会によるCOVID-19の排出基準によると、ここでの治癒段階は、体温が3日以上正常であり、気道の症状が明らかに改善されていることを意味し、CT画像は炎症が明らかに吸収され、気道病原体の核酸検査は2回連続して陰性です。図3B~Dおよび表5に示すように、結果は、健康な対照および他の呼吸器疾患の患者におけるテストストリップの特異性が100.00および97.29%であり、進行段階および治癒段階の症例の感度が67.15および7.02であることを示しました。%。クリニックで最も一般的に使用されている技術であるRNAテストの結果と比較すると、抗原ストリップの正の一致率（PPA）と負の一致率（NPA）は、83.16%（79/95）と94.45%（562/595）でした。（表5）。

表5
テストストリップの特異性と感度。

他の呼吸器疾患の443人の患者のうち、インフルエンザA H1N1、インフルエンザA H3、インフルエンザB ビクトリア、インフルエンザB 山形に感染したインフルエンザの症例は68人でした。ストリップは、1.5%（1/68）の偽陽性率で、優れた識別能力を備えています。COVID-19の症例では、発症の異なる時点での抗原検出率を観察しました。図3Cに示すように、発熱後35日以内の抗原の検出率は48%を超えて

いました。全体的な病気の発症の傾向は、RNA 検出の傾向と類似していた。2つの方法の両方の検出率は35日後に大幅に減少し、これは疾患の経過と一致していました。補助診断のためにRNA検出を補足するために抗原検査が使用された場合、複合評価の診断値はAUC 0.865 (95%CI : 0.822?0.909) に増加しました(図3D)が、単一抗原検査とRNA検査の診断値は0.802 (95%CI : 0.752?0.852) および0.825 (95%CI : 0.776?0.874) でした。

考察現在、SARS-CoV-2の検出には、主に核酸検出と免疫検出が含まれます。核酸検査、または分子検査は、ウイルスの遺伝物質を検出することによって感染症を診断するためのゴールドスタンダードです。しかし、この方法は主に蛍光定量PCRによって行われ、抽出プロセスが複雑で、実験環境や条件の要件が高く、検出時間が長く、検出漏れ率が非常に高いという問題があります。さらに、SARS-CoV-2は新しいタイプのRNAウイルスであり、RNAは抽出プロセス中に容易に分解されることが研究によって示されています(Landolt et al.、2016; Nwokeoji et al.、2016; Le Bleu et al.、2017)、これは偽陰性の結果につながります。したがって、RNAは迅速検査や多数の疑わしい症例のスクリーニングの要件に適合させることはできません。SARSウイルスのイムノアッセイから得られた経験によると、イムノアッセイは、SARS-CoV-2の核酸検出の補足として使用できます。特に、同様の臨床症状があり、核酸検査が陰性である疑いのある症例では、非常に補完的です。診断効果(Li et al.、2003; Shi et al.、2003)。

イムノアッセイは、体内のウイルスタンパク質(抗原)、または体内のウイルスタンパク質に特異的な抗体を検出して診断することにより、抗原と抗体の間の特異的反応に基づいています。イムノアッセイには、抗原検出と抗体検出が含まれます。免疫蛍光ミクロスフェアに基づく抗原検出キットは、サンプルをライゼートに添加するだけで、検出のためにサンプル中の抗原を溶解することができ、定量PCRの面倒を回避できます。RNA抽出プロセスは実験操作プロセスを大幅に簡素化し、検出時間を短縮しますが、まだテストが不足しています。一方、RNA検出は生ウイルスの検出を目的とし、抗原検出はウイルスタンパク質の検出を目的としています。原則として、タンパク質断片はウイルス破裂後にも検出できます。したがって、欠乏症を補うものとして、感染後に抗体検査を行うことが特に重要です。

SARS-CoV-2のいくつかの検出方法を比較することにより、核酸の検出時間が早くなり、抗原検出がより便利で高速になり、組み合わせることでSARS-CoV-2検出の要件をより適切に満たすことができます。この研究では、複合評価の診断値はAUC 0.865 (95%CI : 0.822?0.909) に増加しましたが、単一抗原検査とRNA検査の診断値は0.802 (95%CI : 0.752?0.852) と0.825 (95%CI : 0.776?0.874) (図3D)。

この方法の感度を向上させるために、SARS-CoV-2 Nタンパク質の特定の空間構造(抗原決定基)に対して、十分な親和性を備えた高特異性モノクローナル抗体を選択しました。次に、蛍光光度信号検出と組み合わせた蛍光免疫標識法を選択しました。これにより、従来の金コロイド粒子標識法と比較して、分析法の感度を1~2桁向上させることができます。多施設臨床試験のデータによると、進行段階のCOVID-19症例における抗原ストリップの感度は67.15%でしたが、結果はRNAテストに近く、PPAとNPAは83.16と94.45%でした。一方、COVID-19症例の治癒段階での抗原ストリップの検出率7.02%は、偽陽性の可能性を除いて、抗原断片が治癒した患者の体内に一時的に保存される可能性があること、または抗原検査が可能であることも示しています。放電指標としてRNA検出を支援します。製品「新しいコロナウイルス(SARS-CoV-2) Nタンパク質検出キット(蛍光免疫クロマトグラフィー)」は、欧州適合性(2020年3月13日、証明書番号HKT-20200313-001)によって認定され、シンガポールの健康科学当局(2020年7月13日; MDP2020-98)。

本研究では、活性化SARS-CoV-2ウイルスの検証実験をP3検査室で実施し、臨床実験をP2+検査室(P3保護を使用する医療スタッフ)で実施した。テストストリップは、生きているウイルスの検出において優れたパフォーマンスを示しました。不活化ウイルスの検出はどうですか?不活化前後の結果を比較したところ、不活化後のタンパク質破壊が検出結果に影響を与えることがわかりました(データは別の研究で示しています)。450 ngの精製Nタンパク質の平均試験結果(T/C値)は、不活化前は2.89(陽性)、不活化後(56°C処理)は0.041(陰性)でした。次に、Nタンパク質を喉スワブ(健康な人から入手)および鼻スワブ(健康な人から入手)とそれぞれ混合した。サンプルの不活性化後、検出結果は大幅に減少しました。活性化されたウイルスは本研究の限界でしたが、これにより検出の感度と精度が保証されました。したがって、テストはP2+ラボで実施する必要があります。これにより、予備的な結果がはるかに速く提供され、核酸検出と連携して、効率と精度が向上します。一方、抗原検査は、訓練を受けた専門家や大規模な機器を必要としないため、健康な集団のスクリーニングや治癒後の患者の自己モニタリングに簡単に使用できます。シンプルさと実現可能性の観点から比較テストを行いました。

UV光は、高感度の抗原ストリップの検出機器として使用できます。UV光(LoD1x10³TCID₅₀ / ml)の検出結果は、研究で使用されたSavant-100蛍光免疫クロマトグラフィーアナライザーの検出結果と一致していました(検出および臨床試験のデータはCE認証およびシンガポールHAS認証に提出されました)。これらの利点は、最近の展望論文(Mina et al.、2020)でMinaと同僚によって推奨された「迅速で器具のない抗原検査」の必要性を満たすでしょう。解説では、現在のRT-PCR蛍光検査に加えて、学校、空港、さらには自宅で使用するために、迅速で機器を使用しないイムノクロマトグラフィー検査方法を開発することを推奨しています。このような迅速な検査方法は、感染した患者が自分の感染を他の人に感染させ

る前に、COVID-19を早期に診断することができます。研究者は、不活化ウイルスに対するストリップの感度と特異性を高めるために、さらなる研究で方法を改善し続けます。さらに、研究者は、血糖値計として使用されるものと同様に、家庭での使用に適した携帯機器、試薬、および標準を開発することを望んでいます。

データ可用性ステートメント

研究で提示された元の貢献は、記事/補足資料に含まれています。さらにお問い合わせは、対応する著者に向けることができます。

倫理声明

人間の参加者が関与する研究は、中国人民解放軍総病院の倫理委員会、No. 2020-001によってレビューおよび承認されました。武漢火神山病院の倫理委員会、No. 2020-003; 重慶公衆衛生医療センターの倫理委員会、No. 2020-007-01。倫理委員会は、参加のための書面によるインフォームドコンセントの要件を放棄しました。著者の貢献KZとKHが研究を設計しました。SLとKDは方法を確立しました。LZ、YZ、LC、JH、およびFLは、臨床情報とサンプルを収集しました。YL、HL、JL、PS、YX、およびJYWが検出を実行しました。CZとKHはデータ分析を行い、原稿を書きました。すべての著者が記事に寄稿し、提出されたバージョンを承認しました。

資金調達

この作品は、北京科学技術計画プロジェクト(番号Z201100005420022)によってサポートされていました。

利害の対立

SLとYXは、Beijing Savant Biotechnology Co., Ltd.に雇用されていました。残りの著者は、潜在的な利益相反と解釈される可能性のある商業的または金銭的關係がない状態で調査が行われたと宣言しています。

謝辞

武漢火神山病院、南西大学公衆衛生病院、北京疾病予防管理センター、中国人民解放軍総病院の専門家の皆様のご協力に感謝いたします。

参考文献

Algenas C., Agaton C., Fagerberg L., Asplund A., Bjorling L., Bjorling E., et al. (2014)。ウエスタンブロットアプリケーションでの抗体の性能は状況に依存します。バイオテクノロジー。J. 9 (3)、435-445。土井: 10.1002 / biot.201300341

キーワード:

SARS-CoV-2、COVID-19、臨床評価、抗原検出、免疫クロマトグラフィー

引用:

Zhang C, Zhou L, Du K, Zhang Y, Wang J, Chen L, Lyu Y, Li J, Liu H, Huo J, Li F, Wang J, Sang P, Lin S, Xiao Y, Zhang K and He K (2020)

蛍光ミクロスフェア免疫クロマトグラフィーによるSARS-CoV-2抗原を検出するための新しい方法の基礎と臨床評価。

Front. Cell. Infect. Microbiol. 10:553837. doi: 10.3389/fcimb.2020.553837

受領: 2020年4月20日;

承認済み: 2020年11月5日。

公開日: 2020年11月30日。

著者:

Zisis Kozlakidis, International Agency For Research On Cancer (IARC), France

Reviewed by:

Binghuai Lu, China-Japan Friendship Hospital, China

Yueyun Ma, Fourth Military Medical University, China

Charles William Stratton, Vanderbilt University Medical Center, United States

Copyright?

2020Zhang、Zhou、Du、Zhang、Wang、Chen、Lyu、Li、Liu、Huo、Li、Wang、Sang、Lin、Xiao、Zhang andHe。

これは、クリエイティブ・コモンズ表示ライセンス (CC BY) の条件の下で配布されるオープンアクセスの記事です。他のフォーラムでの使用、配布、または複製は、元の著者と著作権所有者がクレジットされ、このジャーナルの元の出版物が認められた学術的慣行に従って引用されている場合に限り許可されます。これらの条件に従わない使用、配布、または複製は許可されていません。

これらの著者は、この作業に等しく貢献しています。