Ministry of Higher Education
And Scientific Research
University of Mosul
College of Dentistry

Detection of SARS Cov-2 IgG, and IgA Antibodies in Patient's Serum, Saliva and Nasal fluid using ELISA

A Thesis Submitted to the Council College of Dentistry /University of Mosul

By

Ghaith Rabie Mohammed Al-Taie

As a Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master in Oral Microbiology

Supervised by

Asst. Prof. Dr. Ghada Younis Abdul-Rahman

2023 A.D. **1444 A.H.**

Abstract

Method:

For the purpose of detecting SARS-CoV-2 IgA-RBD and IgG-NCP, a set of a randomized three patients' groups (a total 55 subjects, randomized into 20 Non previously infected control, 20 fully vaccinated people from Al Salam teaching hospital vaccination ward upon receiving the vaccine doses, and 15 patients newly recovered from SARS-CoV-2 infection from Al Shifaa quarantine hospital after remission from COVID-19 infection and preparing to discharge). The collection was made as three fluid samples; serum, saliva, and nasal fluid, for a total of three samples per pateint, to make a total of 165 samples to be tested. By using a commercial immunoassay kit (Anti-SARS-CoV-2 ELISA RBD IgA, and Anti-SARS- CoV-2 NCP ELISA IgG) the study was designed to assess the levels of the immunoglobulin in each sample from different health status and anatomical locations to give the statistical difference and the correct conclusion regarding this study. Statistical analysis was performed using SPSS version 24, and Microsoft Excel version (16.0.15028). Test equations were performed via Mann-Whitney U Test and the Kruskal-Wallis H test. To evaluate the non-gaussian distribution among the study groups for each of the outcomes, $p < 0.05$ was undertaken as statistically significant.

Results:

The results showed that two doses of mRNA BNT162b2 vaccine Comirnaty Pfizer/BioNTech, New York, NY, USA), elicited a powerful anti-SARS-CoV-2 nasal and salivary IgA and IgG monoclonal antibody protection (as compared to control 0.625 Cut of Index (COI). The vaccinated subjects resulted in a higher median salivary concentration of IgG against Nucleocapsid protein (NCP) values as

1.69 COI, with a p-value of 0.0001. Similar results for the median salivary concentration of the vaccinated subjects in IgA against receptor binding domain (RBD) with a value of 2.41 COI, if compared to control median values of 0.67 COI, with a p-value of 0.0001); (as compared to control 0.34 COI, the vaccinated subjects resulted in a higher median nasal concentration of IgG NCP values as 1.52 COI, with a p-value of 0.0001. Similar results for the median nasal concentration of IgA RBD with a value of 1.84 COI, if compared to control median values of 0.71 COI). Two injections 25 days a part shown to trigger a stronger titer of protective immunity as compared to a single early shot, still it`s less robust compared to the titers measured for the recovered subjects from COVID-19 infection. The vaccinated subjects are significantly better tested via IgA in Saliva as compared to IgG, because of the higher median values for the IgA vs IgG, 2.41 COI and 1.69 COI respectively with a p-value of 0.008. In a similar state, the IgA is the best test for the convalescent subjects in term of nasal fluid samples investigations, as the median value is comparatively higher than the median value of IgG, 1.94 COI and 1.47 COI respectively, with a p-value of 0.045.

Conclusion:

Take into consideration that there was a lack of trustable ELISA based assays with specially designed kit for this purpose, focusing on nasal and salivary secretions, the current study proofed that our pre investigational and investigational data are consistent. The results of this study indicate, that a protective antigen specific nasal and salivary monoclonal antibody, can be triggered following proper vaccination regimen with mRNA COVID-19 vaccine, so this paves the way for using mucosal protective antibodies detection kits, as a suitable alternative option as a less invasive method compared to serum investigations, for detecting the protection against SARS-CoV-2 infection, induced by vaccine.

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة الموصل

كلية طب الأسنان

التحري عن الكلوبيولينات المناعية ضد فيروس سارس-كوف-٢ كالغلوبولين المناعي من النوع جي والغلوبولين المناعي من نوع اي في عينات اللعاب والمصل والسائل الانفي في المرضى باستخدام أختبار المقايسة المناعية الإنزيمية إليزا

رسالة مقدمة

الى جامعة الموصل - كلية طب الأسنان

من قبل

غيث ربيع محمد صالح الطائي

كجزء من متطلبات لنيل شهادة الماجستير في الأحياء المجهرية الفموية

بأشراف

الأستاذ المساعد الدكتورة غادة يونس عبدالرحمن

1444 A.H. **202٣ A.D.**

الخلاصة

الطريقة:

أجرينا بحثنا للكشف عن الأجسام المضادة وحيدة النسيلة المصلية لفيروس سارز-كوف-٢ من نوع الغلوبولين المناعي ج -ضد قفيصة البروتين النووي و ايضا الغلوبولين المناعي أ – ضد نطاق الارتباط بالمستلم ، في عينة من ثلاث مجموعات عشوائية من المرضى (إجمالي ٥٥ شخصا، تم تقسيمهم عشوائيًا إلى ٢٠ شخصًا غير مصابين سابقًا ، ٢٠ شخصًا تم تطعيمهم بالكامل من ردهة التطعيم بمستشفى السلام التعليمي في الموصل عند تلقي جرعات اللقاح ، و ١٥ مريضاً شُفيوا حديثاً من عدوى سارز-كوف-٢ من مستشفى الشفاء للحجر الصحي بعد واثناء تعافيهم من عدوى كوفيد-١٩ والاستعداد للخروج) في ثلاث عينات سوائل مصل ولعاب وسوائل أنف ، بواقع ثلاث عينات لكل مشارك ، لجعل إجمالي ١٦٥ عينة ليتم اختبارها ، باستخدام عدة فحص مناعية تجارية من نوع (فحص إليزا المخصص للكشف عن الغلوبولين المناعي أ – ضد نطاق الارتباط بالمستلم و فحص إليزا المخصص للكشف عن الغلوبولين المناعي ج - ضد قفيصة البروتين النووي).

هذه الدراسة صممت لتقييم مستويات الغلوبولين المناعي في كل عينة من مختلف الحالات الصحية والمناطق التشريحية لإعطاء الفرق الإحصائي والاستنتاج الصحيح فيما يتعلق بهذه الدراسة.

تم إجراء التحليل الإحصائي باستخدام الإصدار ٢٤ من برنامج (الحزمة الاحصائية للعلوم المناعية) ، بالإضافة إلى إصدار (١٦,٠,١٥٠٢٨) اكسل مايكروسوفت، وتم إجراء معادلات الاختبار عبر اختبار مان ويتني يو، وكذلك اختبار كروسكال واليس اج ، لتقييم التوزيع غير الغاوسي بين مجموعات الدراسة ، لكل نتيجة من النتائج ، تم إعتبار قيمة $P < 0.05$ ذات دلالة إحصائية.

نتائج:

أظهر عملنا أن جرعتين من لقاح الحمض النووي الريبوزي المسمى تجاريا ب "كوميرناتي بي ان تي ١٦٢بي٢ المصنع من قبل شركة فايزر/بايوتنك" ، نيويورك ، نيويورك ، الولايات المتحدة الأمريكية) ، أثار تكوين مقاومة قوية ضد سارز-كوف-٢ في الأنف واللعاب من نوع الغلوبولين المناعي من نوع اي و الغلوبولين المناعي من نوع جي وحيدة النسيلة (بالمقارنة مع مجموعة المقايسة الذي كانت نتائجه لمتوسط مستوى السيروم الغلوبولين المناعي من نوع جي - ضد قفيصة البروتين النووي كان ٠,٦٢٥ القيمة الحدية, مقارنة بالأشخاص الملقحين ارتفاع متوسط تركيز اللعاب لمتوسط مستوى السيروم الغلوبولين المناعي لنفس النوع لقيم ١,٦٩ القيمة الحدية، مع قيمة $p < 0.0001$, للدلالة على احصائية المقارنة. ينطبق الأمر نفسه على متوسط التركيز اللعابي لسيروم الغلوبولين المناعي من نوع اي ضد نطاق الارتباط بالمستلم, للأشخاص الذين تم تلقيحهم في بقيمة ٢,٤١ القيمة الحدية ، مقارنة بقيم مجموعة المقايسة ٠,٦٧ القيمة الحدية ، مع قيمة $p < 0.0001$) ، (بالمقارنة بقيم مجموعة المقايسة ٠,٣٤ القيمة الحدية ، نتج عن الأشخاص الذين تم تلقيحهم تركيز سائل أنفي السيروم الغلوبولين المناعي من نوع جي - ضد قفيصة البروتين النووي بمتوسط ١,٥٢ القيمة الحدية ، مع قيمة $p < 0.0001$. وينطبق نفس الشيء على متوسط تركيز الأنف من الغلوبولين المناعي من نوع اي ضد نطاق الارتباط بالمستلم بقيمة ١,٨٤ القيمة الحدية ، مقارنة بقيم التحكم الوسيطة ٠,٧١ القيمة الحدية.

حقنتان بينهما ٢٥ يومًا من اللقاح ظهر أنهما يطلقان عيارًا أقوى من المناعة الوقائية مقارنةً بالحقنة المبكرة الفردية ، إلا أنه لا يزال أقل قوة مقارنةً بالعيار المقاس للأشخاص الذين تم شفائهم من عدوى كوفيد-١٩. مع الأخذ في الاعتبار أنه كان هناك نقص في الاختبارات والعدد الفحصية المعتمدة على

Appendix III – Manufacturer specification of the operation kit and COI values.

EUROIMMUN
a PerkinElmer company

Medizinische
Labordiagnostika
AG

Anti-SARS-CoV-2 NCP ELISA (IgG)

- Sensitive detection of IgG against SARS-CoV-2 using the nucleocapsid protein
- Antigen with the strongest immune dominance in the coronavirus family
- Optimised specificity of the ELISA due to the use of a modified nucleocapsid protein (NCP) that only contains diagnostically relevant epitopes
- Validated for serum, plasma and dried capillary blood as the sample material; fully automatable

Technical data

Antigen	Modified nucleocapsid protein (NCP)
Calibration	Semiquantitative; calculation of a ratio from the extinction of the sample and that of the calibrator
Result interpretation	EUROIMMUN recommends interpreting results as follows: Ratio < 0.8: negative Ratio ≥ 0.8 to < 1.1: borderline Ratio ≥ 1.1: positive
Sample dilution	Serum or plasma, 1 : 101 in sample buffer, or 4.76 mm punched out membrane piece with dried capillary blood in 250 µl sample buffer
Reagents	Ready for use, with the exception of the wash buffer (10x); colour-coded solutions, in most cases exchangeable with those in other EUROIMMUN ELISA kits
Test procedure	60 min (37° C) / 30 min (RT) / 15 min (RT) (sample/conjugate/substrate incubations), fully automatable
Measurement	450 nm, reference wavelength between 620 nm and 650 nm
Test kit format	96 break-off wells; kit includes all necessary reagents
Stability	12 months
Order number	**EI 2606-9601-2 G; EI 2606-9620-2 G** (designed especially for processing on the EUROLabWorkstation ELISA)