

Metodika a cíle porovnání antigenních testů na SARS-CoV-2

Hlavní cíl: Porovnání citlivosti antigenních testů (limit detekce)

Zdůvodnění: Tzv. antigenní testy SARS-CoV-2 jsou testy založené v naprosté většině na imunologické metodě „lateral flow assay“, která umožňuje rychlou detekci (cca 15 min) proteinového antigenu viru. Standardním postupem uvedení na trh je klinické porovnání s referenční metodou (zde většinou RT-qPCR) a stanovení senzitivity a specifity testu. Tyto parametry jsou vždy závislé na vlastnostech studované populace (př.: pokud bude mít populace vyšší virovou nálož, tj. více viru a jeho antigenu, je inherentně dosaženo vyšší senzitivity testu). Pokud antigenní testy nebyly studovány na stejné populaci, je obtížné porovnat vzájemně jejich citlivost.

Dílčí cíl 1: Vytvoření standardu pro porovnání testů mezi sebou

Zdůvodnění: Pro zjištění citlivosti testů lze vytvořit referenční definovaný standard, ke kterému budou porovnány jednotlivé citlivosti testů. Pro tento standard je vhodné, aby byl definovaný = tj. aby bylo možné snadno připravit nový, který bude identický s předchozím a byl neinfekční, což by umožnilo snadné porovnání bez nutnosti práce v laboratoři s úrovní zabezpečení BS2+/BSL3.

Řešení: Dle dostupných dat od výrobců a našeho šetření testy v naprosté většině případů detekují antigen v podobě nukleoproteinu viru SARS-CoV-2 (což je logické vzhledem k největší produkci tohoto proteinu infikovanými buňkami). Vzhledem k tomu je možné užít jako referenční standard roztok rekombinantního nukleoproteinu (dále N-SARS-CoV-2). Oproti využití celého viru jako standardu je výhodou nižší infekčnost a výrazně jednodušší kvantifikace antigenu. Jako základní referenční protein byly použity alikvoty nukleoproteinu od firmy Sino Biological. Pro vyloučení jiných antigenů byly testovány i jiné antigenní struktury (např. tzv. spike protein).

Dílčí cíl 2: Porovnání testů mezi sebou

Metodika: Aby se zajistilo, že testování bude co nejvíce odpovídat reálnému postupu zpracování vzorků, byl vždy použit pro stanovení případné pozitivitu testu postup stanovený výrobcem. Jedinou výjimkou v postupu bylo nahrazení biologického vzorku (nasofaryngeální výtěr/nosní výtěr/ sliny) nanesením malého objemu referenčního standardu nukleoproteinu (objem 0,5–10 μ l), a to buď na výtěrový tampon (Lepu), nebo přímo do roztoku extrakčního pufru (většina ostatních testů). V případě, že test pracoval se vzorkem slin, byl daný vzorek nahrazen stejným objemem pufru TBS 1x (pH 7.4) s přidavkem definovaného množství nukleoproteinu. Pro stanovení limitu detekce (LOD, limit of detection) byly zkoušeny postupně roztoky vždy s polovičním množstvím nukleoproteinu do dosažení negativitu testu. Nejnižší množství proteinu postačující k pozitivnímu testu je označeno jako limit detekce. Pro redukci subjektivní chyby při odečtení testu, které probíhá vizuální kontrolou, byl daný test vždy v čase odečtení digitalizován pomocí stolního skeneru s fixním nastavením bez aktivní úpravy obrazu. Tento digitalizovaný snímek byl podroben analýze obrazu (software Fiji, modul Gel analysis). Pro snížení efektu variability jednotlivých testů a eliminaci případného ovlivnění analýzy testů selháním

jednotlivých kusů testů, je celá studie prováděna v multiplikátech, kdy minimální počet testů pro vyhodnocení v hraničních koncentracích (tj. v oblasti LOD) je tři či v případě rozporných výsledků čtyři. Nejnižší množství nukleoproteinu vedoucí k pozitivě detekčního proužku alespoň u 75 % testů je dále označeno jako „přístrojová LOD“. Pokud nebyl prokazatelně dosažen limit detekce, je dané množství antigenu označeno symbolem „<“.

Pro analýzu běžným pozorovatelem byly předloženy snímky odeslány k zaslepenému vyhodnocení (pozitivní/negativní skupině 8 nezávislých pozorovatelů). Pro zajištění dostatečné robustnosti vyhodnocení jsou u každého testu uvedeny tři tzv. vizuální limity detekce („vizuální LOD“). Tyto hodnoty odpovídají takové nejmenší koncentraci nukleoproteinu, která splňuje podmínku přístrojového LOD (tj. jedná se prokazatelně o pozitivní test) a současně vykazuje minimálně danou průměrnou procentuální pozitivitu u odečtení pozorovateli (tj. 100 %, 80 % a 60 %).

Shrnutí:

1. Užití standardu nukleoproteinu umožňuje objektivně porovnat citlivost (limit detekce) jednotlivých testů založených na detekci nukleoproteinu SARS-CoV-2 (většina dostupných testů).

Pozn. U testů využívajících více cílů (ze zkoumaných testů pouze Humasis) může dojít k podhodnocení citlivosti.

2. Strojové odečtení umožňuje objektivizovat stanovení limitu detekce. Vizuální odečtení ukázalo reálnou situaci při odečítání a umožnilo analyzovat rozdíl mezi jednotlivými pozorovateli-hodnotiteli. Zjištěné rozdíly ukazují, že testy se liší nejen v limitu detekce, ale i jednoznačnosti pozitivního proužku. Lepší bude test, který ukazuje pozitivitu velmi silně do co nejnižších koncentrací nukleoproteinu.

MUDr. František Sedlák, Skupina Jana Konvalinky, Ústav organické chemie a biochemie AV ČR