# *In vitro analýza antigenních lateral flow testů na virus SARS-CoV-2 (aktualizace 19. května 2021)*

Účelem Analýzy antigenních testů na SARS-CoV-2 je vědecký příspěvek k diskusi o metodách pro určení parametrů testů z hlediska racionálního určení pořadí, v jakém by mohly jít testy do klinických srovnávacích validačních studií, nikoli jakékoliv praktické doporučení či závěry směřované vůči jejich uživatelům.

Výsledky naměřených hodnot je nutné interpretovat výhradně ve vztahu k použité metodice a cílům pozorování antigenních testů.

Porovnání testů bylo provedeno v necertifikované laboratoři a pro nekomerční výzkumné účely.

Uvedený přístup umožňuje jednoduché přímé srovnání limitu detekce testů se standardem virového antigenu, nenahrazuje však klinickou studii a nemusí vypovídat o citlivosti testu v klinické praxi.

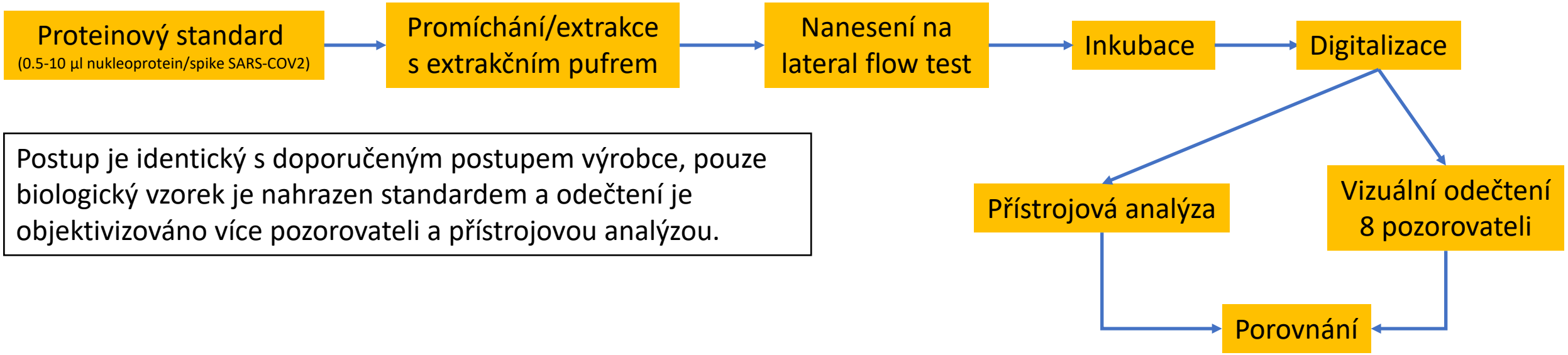
ÚOCHB AV ČR
IOCB PRAGUE

# *Metoda*

Cíl: Stanovení detekčních limitů – odpovídá přibližně **senzitivitě testu**
(Citlivější, senzitivnější test je schopen detekovat menší množství proteinového standardu a tím i menší virovou nálož.)

Standardní pracovní postup použití testu:

Použitý pracovní analytický postup:




Postup je identický s doporučeným postupem výrobce, pouze biologický vzorek je nahrazen standardem a odečtení je objektivizováno více pozorovateli a přístrojovou analýzou.

# *Poznámky*

- Dominantním detekovaným antigenem je dle dokumentace a výsledků **nukleoprotein SARS-CoV-2** (vyjma testu Humasis a Realy).

- Nukleoprotein SARS-CoV-2 není dlouhodobě stabilní v roztoku – vzorek je nutné zpracovat co nejrychleji. Za 1 hodinu dojde ke zhoršení detekčního limitu cca 4krát.

- Pro zajištění robustnosti analýzy a vyloučení ovlivnění výsledku variabilitou a event. i selháním jednotlivých testů, jsou testy v oblasti limitu detekce zkoušeny opakovaně – nejméně v triplikátu (shodné výsledky) event. kvadruplikátu (pro nesouhlasné výsledky)

- „Přístrojový limit detekce“ je takové minimální množství antigenu nukleoproteinu, kdy dochází k pozitivitě testu min. v 75 % procentech případů (např. 3 nebo 4 testy ze 4)

- „Vizuální limit detekce“ je takové minimální množství antigenu nukleoproteinu nad přístrojovým limitem detekce, které je současně označeno za pozitivní daným procentuálním množstvím pozorovatelů

# *Porovnání testů dle citlivosti k nukleoproteinu SARS-CoV-2: Výtěrové testy*

| Test | Přístrojový limit detekce | Vizuální limit detekce [pg] při shodě pozorovatelů | | | Poznámky |
|---|---|---|---|---|---|
| | [pg] | 100 % | 80 % | 60 % | **Menší hodnota = lepší výsledek.** |
| Flowflex | <25 | 50 | 31,25 | 31,25 | |
| Beier | 31,25 | 250 | 125 | 125 | # Test selhal v cca 50 % případů. |
| NADAL | 125 | 250 | 250 | 250 | |
| Wantai | 125 | 250 | 250 | 250 | $ Vysoká variabilita výsledků testu. |
| Ecotest | 125 | 500 | 125 | 125 | |
| Novacheck# | 125 | 500 | 250 | 250 | * Citlivost testu může být podhodnocena vzhledem k současné detekci RBD domény. |
| Lituo | 125 | 500 | 250 | 250 | |
| Bioneovan | 250 | 500 | 250 | 250 | |
| Wondfo výtěr | 250 | 500 | 500 | 250 | |
| Diaquick$ | 500 | 500 | 500 | 500 | |
| Humasis* | 500 | 500 | 500 | 500 | |
| Biosynex | 500 | 1 000 | 500 | 500 | |
| Singclean výtěr | 1 000 | 1 000 | 1 000 | 1 000 | |
| Lepu | 250 | 2 000 | 500 | 250 | |
| SD Biosensor | 500 | 2 000 | 1 000 | 500 | |
| Abbott | 500 | 2 000 | 1 000 | 1 000 | |
| VivaDiag$ | 2 000 | 5 000 | 2 000 | 2 000 | |
| TestSeaLabs | 1 000 | 20 000 | 10 000 | 10 000 | |
| Safecare | 5 000 | 50 000 | 20 000 | 20 000 | |
| iChroma | 250 | neaplikovatelné | | | |

# *Porovnání testů dle citlivosti k nukleoproteinu SARS-CoV-2: Testy ze slin*

| Test | Přístrojový limit detekce | Vizuální limit detekce [pg] při shodě pozorovatelů | | | Poznámky |
|---|---|---|---|---|---|
| | [pg] | 100 % | 80 % | 60 % | **Menší hodnota = lepší výsledek.** |
| RapidFor | <25 | 500 | 500 | 125 | |
| PCL | <50 | 500 | 250 | 250 | * Citlivost testu může být podhodnocena vzhledem k současné detekci RBD domény. |
| Saligen | <50 | 500 | 500 | 500 | |
| Singclean sliny | 250 | 500 | 500 | 250 | |
| Realy* | 500 | 1 000 | 250 | 250 | |
| V-chek$ | 1 000 | 2 000 | 1 000 | 1 000 | $ Vysoká variabilita výsledků testu. |
| Zandcell | 500 | 5 000 | 1 000 | 1 000 | |
| Orawell | 1 000 | 5 000 | 2 000 | 2 000 | |
| Wondfo sliny | 500 | 5 000 | 5 000 | 2 000 | |
| Norman sliny | 1 000 | 5 000 | 5 000 | 2 000 | |
| EONbt | 2 000 | 10 000 | 10 000 | 5 000 | |

# *Závěry*

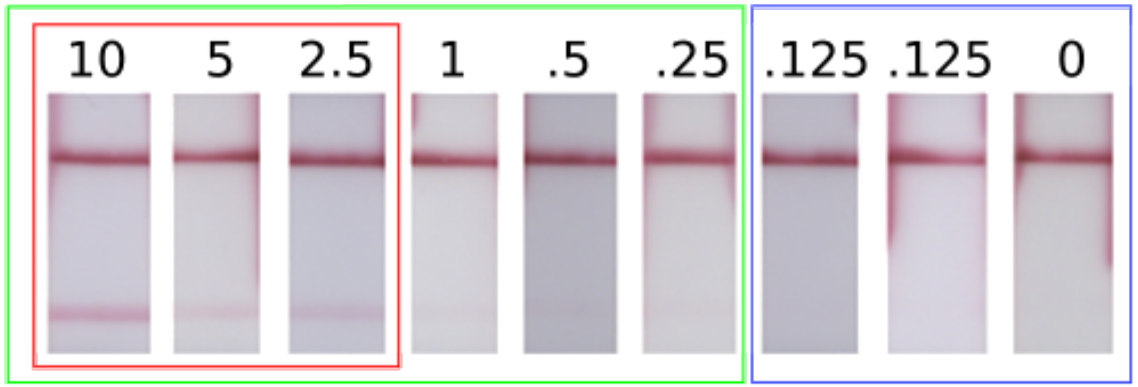
- Citlivost testů má řádové rozdíly (0,05–50 ng).
- Rozdíl v citlivosti mezi přístrojovou a vizuální detekcí může dosahovat jednoho řádu.
- Výrazné rozdíly v citlivosti mezi různými pozorovateli.
- Test s použitím proteinového standardu (nukleoprotein SARS-CoV-2) může poukázat na senzitivitu testu, specifitu takto hodnotit nelze.

→ **Je vhodné volit testy s nižším limitem detekce.**

→ **Uživatele je nutné proškolit, jak správně vyhodnotit výsledek.**

- I méně výrazné proužky znamenají pozitivitu!
- Jednoduché zaškolení (např. formou obrázkového testu) může vést ke čtyřnásobnému zvýšení citlivosti testu.

| Pozorovatel | Falešně neg. [%] | Falešně poz. [%] |
|---|---|---|
| 1 | 16 | 1 |
| 2 | 11 | 1 |
| 3 | 41 | 0 |
| 4 | 23 | 0 |
| 5 | 7 | 4 |
| 6 | 33 | 0 |
| 7 | 36 | 0 |
| 8 | 20 | 0 |




Vizuálně pozitivní Přístrojově pozitivní Negativní

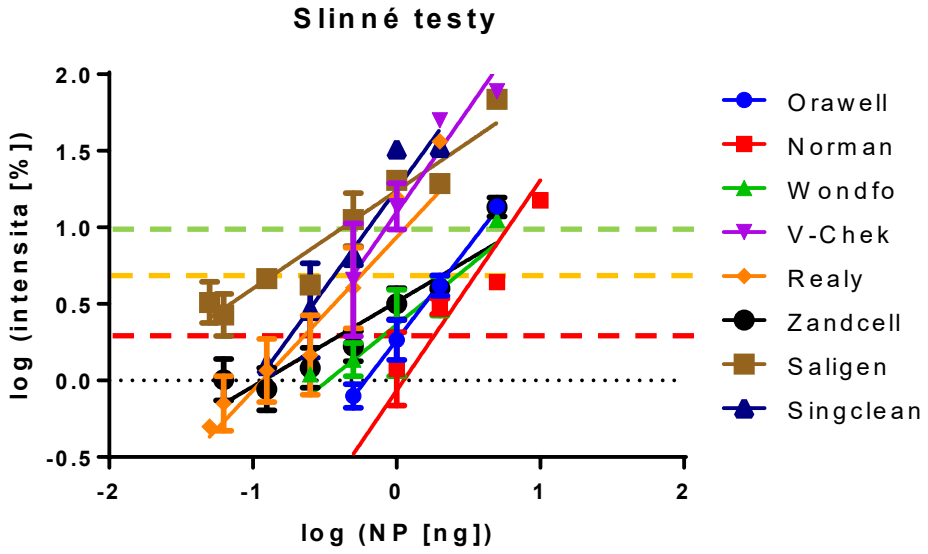
Kalibrační řada přístrojově pozitivních testů – oproti vizuální detekci, kde je citlivost při 100% shodě 2,5 ng.

# *Závěry*

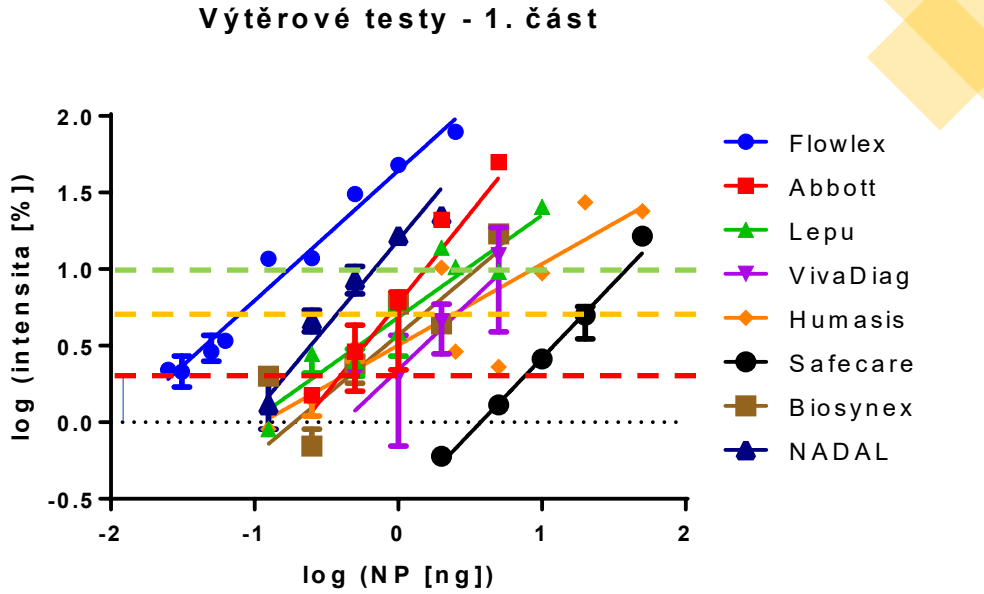
- Řádové rozdíly mezi intenzitou signálu a limitem detekce
  (řada i dobře citlivých testů má za výstup tenké proužky)
  $\Rightarrow$ diskrepance mezi manuálním a přístrojovým odečtením
- U většiny testů výrazná lineární závislost po log-log transformaci

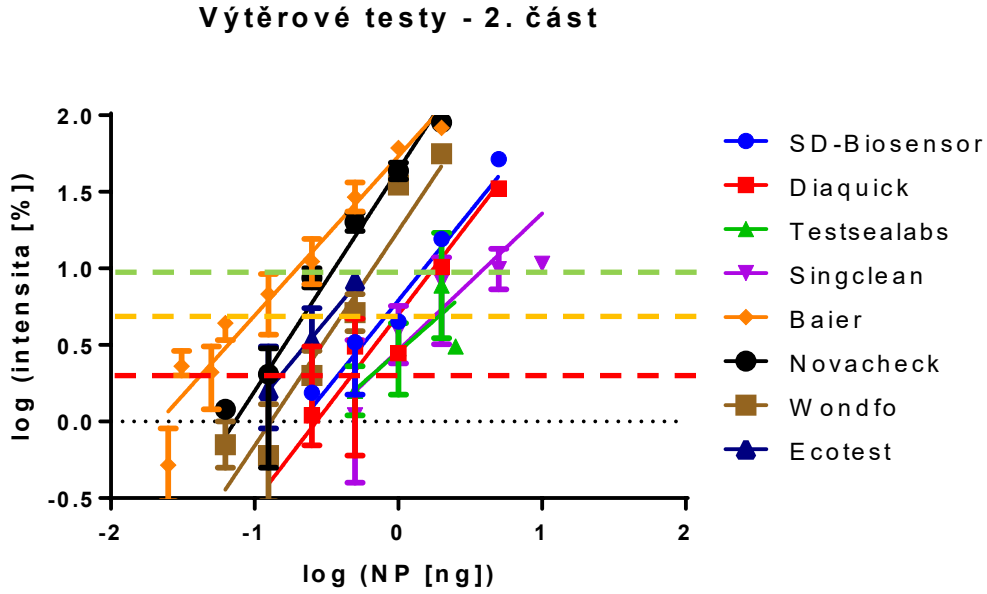
$$\log\left(\frac{intenzita\ testovacího\ proužku}{intenzita\ kontrolního\ proužku} \times 100\ \%\right) \sim \log(množství\ nukleoproteinu)$$

$\Rightarrow$ vynesení do grafu




Limitní [%] k subjektivnímu odečtení
10 % – skoro všichni odečtou dobře
5 % – většina odečte dobře
2 % – jen velmi „zkušení“ odečtou dobře



# *Seznam analyzovaných testů*

| Název | Výrobce | Přesný název testu |
|---|---|---|
| Flowflex | ACON Biotech (Hangzhou) Co., Ltd. | Flowflex SARS-CoV-2 Antigen rapid test |
| Beier | Beier | COVID-19 Antigen Rapid Test Kit |
| NADAL | nal von minden GmbH | NADAL® COVID-19 Ag Rapid Test |
| Ecotest | Assure Tech (Hangzhou) Co., Ltd. | COVID-19 Antigen Rapid Test Device |
| iChroma | Boditech Med Inc. | iChromα COVID-19 Ag |
| Lepu | LEPU MEDICAL | 2019-nCoV Antigen Rapid Test Kit (Colloidal Gold Immunography) |
| Diaquick | DIALAB Ges.m.b.H, Wr.Neudorf/AT | Insert DIAQUICK COVID-19 Ag Cassette |
| Humasis | Humasis Co., Ltd. | COVID-19 Ag Test |
| Biosynex | Biosynex Swiss SA | BIOSYNEX COVID-19 AG BSS |
| Abbott | Abbott Rapid Diagnostics Jena GmbH | Panbio™ COVID-19 RAPID TEST DEVICE (NASOPHARYNGEAL) |
| SD Biosensor | SD Biosensor, Inc. | STANDARD Q COVID-19 Ag |
| Singclean výtěr | Singclean | Singclean GOOD TEST Testovací sada Covid-19 SARS-CoV-2 ze vzorků z nosu, nosohltanu a krku |
| Testsealabs | HANGZHOU TESTSEA BIOTECHNOLOGY CO., LTD. | TESTSEALABS Rapid Test kit |
| Novacheck | Novatech Tibbi Cihaz Urunleri San. ve Tic. | novacheck-Ag SARS CoV-2 Covid-19 Antigen Rapid Test |
| Wonfo výtěr | Wondfo | 2019-nCoV Antigen Test (Lateral Flow Method) |
| Safecare | SAFECARE BIO-TECH | COVID-19 Ag Rapid Test výtěrová sada |
| VivaDiag | | SARS CoV-2 Ag Rychlý test |
| Lituo | Zhuhai Lituo Biotechnology Co., Ltd. | COVID-19 Antigen Detection Kit (Colloidal Gold) |
| Wantai | Beijing WANTAI Biological Pharmacy Enterprise Co., Ltd. | WANTAI SARS-CoV-2 Ag Rapid Test (Colloidal Gold) |
| Bioneovan | Bioneovan Co., Ltd. | COVID-19 Antigen Test Kit (Colloidal Gold) |

# *Seznam analyzovaných testů*

| Název | Výrobce | Přesný název testu |
|---|---|---|
| Saligen | Bakter Medical s.r.o. | Saligen |
| Singclean sliny | Singclean | IVD COVID-19 ANTIGEN TEST KIT (Colloidal Gold) SARS-CoV-2 ze vzorků slin |
| Zandcell | Zandcell | COVID-19 (SARS-CoV-2) Antigen Test Kit (Hypersensitive Colloidal Gold) |
| V-chek | Guangzhou Decheng Biotechnology Co., LTD | V-CHEK™ 2019-nCoV Ag Saliva rapid Test Card (Immunochromatography) |
| Wondfo sliny | Wondfo | 2019-nCoV Antigen Test (Lateral Flow Method) |
| Realy | REALY TECH | REALY Novel Coronavirus (SARS-Cov-2) Antigen Rapid Test Device(saliva) |
| Norman sliny | NORMAN Biological Technology | Norman Novel Coronavirus 2019 nCoV Antigen Testing Kit |
| Orawell | Orawell | COVID-19 Ag Rapid Saliva Test Device |
| RapidFor | | SARS CoV-2 Saliva Antigen Test |
| PCL | PCL Inc. | PCL COVID19 Ag Gold |
| EONbt | Eon Biotechnology Limited, UK | COVID-19 Antigen Saliva Rapid test device for Quantitative detection of COVID-19 in human saliva sample |