

Istituto Nazionale per le Malattie Infettive
Struttura Complessa Laboratorio di Virologia e Laboratori di Biosicurezza
 Direttore: D.ssa M.R. Capobianchi
 e-mail: maria.capobianchi@inmi.it; Tel. 0655170434 Fax 065594555

Rapporto sulla valutazione delle performance analitiche e cliniche di un test rapido per la ricerca di antigene di SARS-CoV-2.

Facendo seguito al mandato di validare il test per la ricerca dell'antigene di SARS-CoV-2, le prime risultanze relative al test **Standard Q COVID-19** SD Biosensor, Inc. possono così essere riassunte. Laboratori della rete CoroNET-Lazio coinvolti nell'esecuzione dei test:

- Laboratorio di Microbiologia e Virologia dell'Osp. S. Pertini
- Laboratorio di Virologia del Policlinico Umberto I
- Laboratorio di Virologia dell'INMI

Oltre ai laboratori del Lazio, anche alcuni laboratori dell'Emilia Romagna hanno fornito i risultati delle valutazioni fatte sullo stesso test.

- Laboratorio di Microbiologia AUSL Romagna/DIMES (Università di Bologna)
- CRREM di Bologna,
- Laboratorio di Microbiologia di Piacenza
- Laboratorio dell'AOSP di Ferrara (Ospedale di Cona).
- Laboratorio di Pievesestina

Valutazione della sensibilità analitica.

La valutazione **STANDARD Q COVID-19 Ag** è stata effettuata analizzando repliche multiple (da 4 a 8 repliche) di tamponi negativi spiked con concentrazioni note di una preparazione di virus cresciuto in coltura (isolato INMI 1).

I risultati ottenuti sono stati inseriti in una curva di regressione di Probit, e la sensibilità risultante (LOD: Limit of detection, cioè concentrazione alla quale si registra la positività nel 95% dei casi) è stata: 3 Log₁₀ TCID₅₀/mL (CI: 2,8-3,5), ovvero 1000 TCID₅₀/ml; corrispondente a 6,6 Log₁₀ RNA cp/ml (CI: 6,4-7,1), ovvero 4 milioni di copie/ml.

I risultati di tale valutazione sono riassunti nella tabella 1

Tabella 1. Sensibilità analitica (LOD) determinata mediante Probit		
Viral preparation TCID₅₀/mL	RNA cp/mL*	STANDARD Q COVID-19 Ag
		Overall % determinations (replicates)
10000 TCID ₅₀ /mL	4x10 ⁷	100% (4/4)
1000 TCID ₅₀ /mL	4x10 ⁶	100% (8/8)
500 TCID ₅₀ /mL	2x10 ⁶	50% (4/8)
250 TCID ₅₀ /mL	1x10 ⁶	25% (2/8)
125 TCID ₅₀ /mL	5x10 ⁵	0% (0/8)
62.5 TCID ₅₀ /mL	2.5x10 ⁵	0% (0/4)
Probit analysis		
LOD: TCID₅₀/ml		1000
LOD: RNA cp/ml		4x10 ⁶

* SARS-CoV-2 RNA was amplified by qRT-PCR in Rotor-GeneQ Real-Time cycler (Qiagen, Hilden, Germany) using RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 (Altona Diagnostic GmbH, Hamburg, Germany). RNA copies/mL are based on a standard curve prepared through serial dilutions of the EURM-019 single stranded RNA (ssRNA) fragments of SARS-CoV-2 including different target genes (<https://crm.jrc.ec.europa.eu/p/EURM-019>).

Si osserva una buona concordanza fra i valori ottenuti nella nostra analisi (1000 TCID50/ml corrispondenti a 4 milioni di copie di RNA/ml) e quelli dichiarati dalla Ditta, (sensibilità: 2000 TCID50/ml)

Sensibilità e specificità clinica

La valutazione della performance clinica è stata effettuata su tamponi nasofaringei prelevati a pazienti afferenti al Pronto Soccorso o a reparti di Malattie Infettive, oppure provenienti dal territorio nell'ambito di attività di prevenzione. I tamponi sono stati raccolti secondo le procedure standard utilizzate per il test molecolare, stemperati in UTM secondo e già testati con metodo molecolare per la presenza di RNA di SARS-CoV-2. Vista l'attuale scarsa numerosità dei campioni positivi, sono stati inclusi in maniera progressiva tutti i campioni risultati positivi dall'inizio dello studio; i campioni negativi sono stati selezionati in maniera random fra quelli risultati negativi per presenza di RNA virale, per raggiungere una numerosità complessiva più che doppia rispetto ai positivi. I dati riportati in questo rapporto raccolgono quelli derivanti dalla sperimentazione effettuata nel Lazio e i dati forniti dai laboratori dell'Emilia Romagna.

Il test rapido è stato eseguito in laboratorio (quindi non nell'immediata prossimità della raccolta, sul campo), su campioni conservati per un massimo di 24h a +4°C come consigliato dalle specifiche del test. In nessun caso è stato utilizzato campione congelato, oppure mantenuto a temperatura ambiente, o a +4 per più di 48 ore. Il campione di tamponi positivi utilizzato nell'analisi è rappresentativo della situazione epidemiologica attuale, con carica virale, desunta dal Ct del test molecolare, relativamente bassa se paragonata ai valori osservati sui soggetti, per lo più pazienti sintomatici, analizzati nel periodo di massima attività epidemica. Sono stati inclusi nell'analisi 933 campioni totali, di cui **328 positivi in real time PCR** (RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR, Allplex™ SARS-CoV-2 Assay, Simplexa™ COVID-19 Direct kit, Cobas® SARS-CoV-2) e con valore di ciclo soglia (Ct) in real time PCR noto (**Ct medio: 31.7±7.4; Ct mediano 34.2, range 15->39.7**).

I risultati complessivi sono riassunti nella Tabella 2.

Tabella 2 Sensibilità e specificità clinica di STANDARD Q COVID-19 Ag			
Performance Clinica	RT-PCR Positivi	RT-PCR Negativi	Totale
RDT Positivi	72	11	83
RDT Negativi	256	594	850
Totale	328	605	933

	Proporzione[#]	Percentuale (95% CI)
Sensibilità	72/328	21.95% (17.59% - 26.83%)
Specificità	594/605	98.18% (96.77% to 99.09%)

[#] n pos/N Tot

Da sottolineare che i dati di sensibilità clinica dichiarati dalla Ditta nella documentazione illustrativa del test (>80%), così come la specificità (100%), sono migliori rispetto a quelli ottenuti nella presente valutazione. Una spiegazione di tale evidente discrepanza può essere una maggiore carica virale (minore Ct) nei campioni della casistica analizzata dalla Ditta, oppure diverse condizioni di svolgimento della valutazione. Riguardo al secondo aspetto, va considerato che la valutazione effettuata in laboratorio non corrisponde perfettamente alle condizioni di effettivo svolgimento del test sul campo, laddove il volume di raccolta del campione (in provetta dedicata, pre-filled) è minore rispetto al tampone classico in UTM destinato al test molecolare, e il test è eseguito immediatamente sul posto, senza conservazione in frigorifero. Pertanto è verosimile che le condizioni di effettuazione del test in laboratorio ne penalizzino l'effettiva resa finale in termini di sensibilità clinica.

Il Ct medio dei campioni risultati positivi al test rapido è 20.1 ± 4.9 (mediana 19, range 11-35); se si scompongono i campioni in classi in base all'intervallo di Ct ottenuto con il test molecolare, le % di positivi si distribuiscono secondo un gradiente coerente con la maggior carica virale corrispondente ai Ct più bassi (Tabella 3).

Tabella 3: % di positività in base ai range di Ct		
Range di Ct	N° di campioni pos Ag/totali PCR	% di positività con STANDARD Q COVID-19 Ag
<18	25/25	100
18-25	39/50	78
25-35	7/138	5.1
>35	1/115	0.9

In base ai valori di sensibilità e specificità risultanti dall'analisi complessiva (Tabella 2), e considerando che il potere predittivo e l'accuratezza di ogni test varia in base alla prevalenza, è stata fatta una simulazione di questi parametri assumendo diversi valori di prevalenza dell'infezione.

I risultati sono mostrati nella Tabella 4.

Tabella 4. Simulazione di PPV, NPV e accuratezza in base alla prevalenza				
	Prevalenza dell'infezione	Valore predittivo positivo	Valore predittivo negativo	Accuratezza
Valore	0.5% Nel Lazio 0,001	5.72%	99.60%	97.80%
95% CI		3.16% to 10.14%	99.58% - 99.62%	96.64% - 98.64%
Valore	1%	10.87%	99.20%	97.42%
95% CI		6.16% to 18.48%	99.16% - 99.25%	96.19% - 98.34%
Valore	2%	19.77%	98.40%	96.66%
95% CI		11.70% to 31.42%	98.31% - 98.49%	95.29% - 97.71%
Valore	10%	57.29%	91.88%	90.56%
95% CI		41.91% to 71.38%	91.44% - 92.31%	88.50% - 92.36%
* questi valori dipendono dalla prevalenza				

Questa simulazione rende evidente che l'interpretazione dei dati del test, ai fini di sanità pubblica, dipende dal contesto della prevalenza e dallo scopo della valutazione.

In parallelo con la valutazione del test immunocromatografico è stata eseguita una valutazione delle performance del test **Standard F COVID-19 Ag FIA SD Biosensor, Inc**, che è simile come principio di test immunocromatografico **Standard Q COVID-19**, ma prevede la lettura di un segnale fluorescente mediante un piccolo strumento portatile.

Le risultanze possono così essere riassunte.

Laboratori della rete CoroNET-Lazio coinvolti:

- Laboratorio di Microbiologia e Virologia Università Cattolica-Policlinico Gemelli
- Laboratorio di Virologia dell'INMI

Valutazione della **sensibilità analitica**.

Tale valutazione è stata effettuata analizzando con il test in parola repliche multiple (4 repliche) di tamponi negativi spiked con concentrazioni note di una preparazione di virus cresciuto in coltura (isolato INMI 1).

I risultati ottenuti sono stati inseriti in una curva di regressione di Probit, e la sensibilità risultante (LOD: Limit of detection, cioè concentrazione alla quale si registra la positività nel 95% dei casi) è stata: 2.7 Log₁₀ TCID₅₀/mL (CI: 2,5-3,9), ovvero 500 TCID₅₀/ml, corrispondente a 6,3 Log₁₀ RNA cp/ml (CI: 6,1-7,6), ovvero 2 milioni di copie di RNA virale/ml.

I risultati di tale valutazione sono riassunti nella Tabella 5

Tabella 5. Sensibilità analitica (LOD) determinata mediante Probit				
Viral preparation TCID₅₀/mL	RNA cp/mL*	STANDARD F COVID-19 Ag FIA		
		Overall determinations (replicates)	Mean COI	SD
1000 TCID ₅₀ /mL	4x10 ⁶	100% (4/4)	1.6	0.3
500 TCID ₅₀ /mL	2x10 ⁶	100% (4/4)	1.2	0.1
250 TCID ₅₀ /mL	1x10 ⁶	50% (2/4)	1.0	0.1
125 TCID ₅₀ /mL	5x10 ⁵	25% (1/4)	0.9	0.1
62.5 TCID ₅₀ /mL	2.5x10 ⁵	0% (0/4)	0.7	0.1
Probit analysis				
LOD: TCID₅₀/ml	500			
LOD: RNA cp/ml	2x10 ⁶			

* SARS-CoV-2 RNA was amplified by qRT-PCR in Rotor-GeneQ Real-Time cycler (Qiagen, Hilden, Germany) using RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 (Altona Diagnostic GmbH, Hamburg, Germany). RNA copies/mL are based on a standard curve prepared through serial dilutions of the EURM-019 single stranded RNA (ssRNA) fragments of SARS-CoV-2 including different target genes (<https://crm.jrc.ec.europa.eu/p/EURM-019>).

Si osserva una moderata concordanza fra i valori ottenuti nella nostra analisi (500 TCID50 corrispondenti a 2 milioni di copie di RNA) e quelli dichiarati dalla Ditta (sensibilità: 125 TCID50/ml), che comunque ricadono nello stesso ordine di grandezza.

Sensibilità e specificità clinica

Il test rapido STANDARD F COVID-19 Ag FIA è stato eseguito su campioni conservati per un massimo di 24h a +4°C come consigliato dalle specifiche del test. In nessun caso è stato utilizzato campione congelato, oppure mantenuto a temperatura ambiente, o a +4 per più di 48 ore.

Il campione di positivi utilizzato nell'analisi è rappresentativo della situazione epidemiologica attuale, con carica virale, desunta dal Ct del test molecolare, relativamente bassa (se paragonata ai valori osservati sui soggetti, per lo più pazienti sintomatici, analizzati nel periodo di massima attività epidemica).

Sono stati analizzati 359 campioni totali, di cui 104 positivi alla real time PCR (RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR, Allplex™ SARS-CoV-2 Assay, Simplexa™ COVID-19 Direct kit, Cobas® SARS-CoV-2); **Ct medio: 30.8±6.8; Ct mediano 31.3, range 15.3->39.7**. I risultati complessivi sono riassunti nella Tabella 6.

Tabella 6. Sensibilità e specificità clinica di STANDARD F COVID-19 Ag FIA			
Performance Clinica	RT-PCR Positivi	RT-PCR Negativi	Totale
RDT Positivi	49	4	53
RDT Negativi	55	251	306
Totali	104	255	359

	Proporzione[#]	Percentuale (95% CI)
Sensibilità	49 /104	47.12% (37.25% to 57.15%)
Specificità	251/255	98.43% (96.03% to 99.57%)

[#] n pos/N Tot

Il Ct medio dei campioni risultati positivi al test rapido è 27.2±7.0 (mediana 26.4, range 15,3->39,7); se si scompongono i campioni in classi, in base all'intervallo di Ct ottenuto con il test molecolare, le % di positivi si distribuiscono secondo un gradiente coerente con la maggior carica virale corrispondente ai Ct più bassi (Tabella 6).

Tabella 6. % di positività in base ai range di Ct		
Range di Ct	N° di campioni pos Ag/totali PCR	% di positività con STANDARD F COVID-19 Ag FIA
<18	5/5	100
18-25	15/16	95
25-35	23/55	42
>35	6/28	21

In base ai valori di sensibilità e specificità risultanti dall'analisi complessiva (Tabella 5), e considerando che il potere predittivo e l'accuratezza di ogni test varia in base alla prevalenza, è stata fatta una simulazione di questi parametri assumendo diversi valori di prevalenza dell'infezione.

I risultati sono mostrati nella Tabella 7.

Tabella 7. Simulazione di PPV, NPV e accuratezza in base alla prevalenza				
	Prevalenza dell'infezione	Valore predittivo positivo	Valore predittivo negativo	Accuratezza
Valore	0.5%	13.11%	99.73%	98.17%
95% CI		5.29% - 8.96%	99.68% - 99.78%	96.19% - 99.29%
Valore	1%	23.28%	99.46%	97.92%
95% CI		10.10% - 45.03%	99.35% - 99.55%	95.85% - 99.13%
Valore	2%	38.00%	98.92%	97.41%
95% CI		18.50% - 62.34%	98.70% - 99.09%	95.18% - 98.79%
Valore	10%	76.94%	94.37%	93.30%
95% CI		55.28% - 90.01%	93.32% - 95.26%	90.20% - 95.66%
* questi valori dipendono dalla prevalenza				

Il confronto con la stessa simulazione effettuata con il test STANDARD Q COVID-19 Ag evidenzia come il test STANDARD F COVID-19 Ag FIA sia più accurato e abbia un maggior potere predittivo positivo in tutte le situazioni di prevalenza considerate, a fronte di un piccolo guadagno sul potere predittivo negativo.

Il Direttore del Laboratorio
 D.ssa Maria Rosaria Capobianchi

Maria Rosaria Capobianchi