

Dipartimento: Medicina di Laboratorio
Unità Operativa Complessa: Laboratorio di Microbiologia Clinica, Virologia e Diagnostica
delle Bioemergenze
Direttore: Prof. Maria Rita Gismondo
tel. 02 3904.2239/02 5031.9831
fax. 02 50319832
mariarita.gismondo@unimi.it
segreteria.microbiologia@hsacco.it

Valutazione delle prestazioni diagnostiche del saggio immunocromatografico rapido ADEXUS-Dx[®] COVID-19 per la ricerca degli anticorpi contro SARS-CoV-2

RIASSUNTO

La pandemia di Coronavirus Disease (COVID-19) ha richiesto un notevole impegno diagnostico al fine di poter adottare efficaci misure di contenimento; in particolare, molti test diagnostici rapidi (RDT) per la ricerca di anticorpi anti-SARS-CoV-2 sono stati sviluppati e introdotti sul mercato, richiedendo però un'attenta valutazione clinica delle prestazioni prima di poterli utilizzare. Il presente studio riporta i risultati della valutazione del kit ADEXUS-Dx[®] COVID-19 prodotto da NOWDiagnostics, Inc. (Springdale, AR, USA), per la ricerca di anticorpi IgA, IgG e IgM, ottenuti saggiando 180 campioni di siero di pazienti con un precedente test molecolare per la ricerca del genoma di SARS-CoV-2 e 120 campioni di siero raccolti prima del 01/01/2019: in particolare, per 120/180 campioni il test molecolare aveva dato un risultato positivo, mentre per i restanti 60 negativo; tali campioni sono stati stratificati in base al tempo trascorso tra la raccolta del campione respiratorio e quella di siero. Sono state calcolate specificità e sensibilità: per la prima è stato ottenuto un valore di 100.00%, come atteso; per la seconda è stato ottenuto un valore complessivo del 94.30%. Da sottolineare la positività del test anche in 23/60 (38.30%) campioni con test molecolare negativo. Il saggio ha dimostrato delle ottime prestazioni diagnostiche, anche in campioni di pazienti con test molecolare negativo: questo può essere attribuibile alla rilevazione di IgA in infezioni recenti o di IgG in infezioni pregresse.

INTRODUZIONE

La ricerca dell'acido nucleico di SARS-CoV-2 mediante RT-PCR (Real-Time Polymerase Chain reaction) rappresenta lo standard di riferimento per la diagnosi di Coronavirus Disease (COVID-19). Tuttavia, i test molecolari mostrano alcune limitazioni, quali un flusso di lavoro complesso, la necessità di personale specializzato, un costo medio-alto, una positività limitata alla fase acuta di malattia. I test sierologici sono utili in tal senso, in quanto permettono di individuare soggetti positivi potenzialmente ancora infettivi, che richiedono un'attenta gestione; in particolare, i kit rapidi immunocromatografici (Rapid Diagnostic Test – RDT) sono alternative facili da utilizzare, rapide, impiegabili in screening di ampie popolazioni e dai costi contenuti. Molti RDT si sono resi disponibili sul mercato per la rilevazione di anticorpi IgG e IgM contro SARS-CoV-2 in campioni di plasma, siero o sangue intero: questo approccio permetterebbe di identificare sia soggetti in corso di infezione acuta con IgM positive, che in stato più avanzato con positività per le IgG. Tuttavia, molti dubbi permangono sulle prestazioni diagnostiche di questi saggi, principalmente imputabili a una sensibilità analitica ridotta rispetto a metodi ritenuti gold-standard (es.: chemiluminescenza). È quindi necessario valutare attentamente come impiegare gli RDT, per garantire la limitazione della diffusione e la tutela del paziente.

Obiettivi

L'obiettivo di questo studio è quello di valutare le prestazioni del kit RDT per la ricerca di anticorpi totali (IgA, IgG, e IgM) contro SARS-CoV-2 prodotto dalla società NOWDiagnostics, Inc. (Springdale, AR, USA); in particolare:

- 1) valutare la specificità, con un valore atteso $\geq 99.99\%$
- 2) valutare la sensibilità, con un valore atteso $> 90.00\%$
- 3) valutare la positività di campioni sierologici in pazienti con test molecolare negativo

La selezione dei campioni ed i test sono stati effettuati dal Laboratorio di Microbiologia Clinica, Virologia e Diagnostica delle Bioemergenze afferente al Dipartimento di Scienze Biomediche e Cliniche L. Sacco dell'Università degli Studi di Milano e facente parte dell'ASST Fatebenefratelli Sacco, ospedale Luigi Sacco.

MATERIALI E METODI

Popolazione in studio

Per la valutazione della specificità sono stati selezionati 120 campioni di siero raccolti prima della circolazione di SARS-CoV-2 (2017-2018), garantendo la mancanza di esposizione al virus dei soggetti (gruppo NoCoV).

Per la valutazione della sensibilità sono stati selezionati 120 campioni di plasma, sangue intero o siero di pazienti con un precedente risultato positivo al test molecolare (gruppo PoMo) per SARS-CoV-2 stratificati, su indicazione del proponente dello studio, secondo il tempo passato dalla raccolta del materiale respiratorio per l'analisi (tabella 1). Inoltre, sono stati saggiati 60 campioni di siero, plasma o sangue intero di pazienti con un risultato negativo al test molecolare (gruppo NeMo), al fine di valutare le prestazioni del kit anche in soggetti di cui è incerta l'esposizione al virus (tabella 1). Tutti i test molecolari sono stati effettuati con saggi approvati dalla Food and Drug Administration (FDA), per la diagnosi di infezione da SARS-CoV-2

Giorni post-test molecolare	Positivi	Negativi
0-6	30	30
7-13	30	10
14-20	30	10
>21	30	10

Tabella 1. Stratificazione dei campioni positivi e negativi al test molecolare

La tabella riassume le categorie temporali utilizzate per la stratificazione temporale. La minor numerosità nella colonna Negativi è dovuta alla mancanza di campioni inseribili in queste categorie.

Ricerca di anticorpi anti-SARS-CoV-2

La ricerca degli anticorpi totali anti-SARs-CoV-2 è stata effettuata utilizzando il kit rapido ADEXUS-Dx[®] COVID-19: il dispositivo è basato sulla tecnologia immunocromatografica a flusso laterale e permette di utilizzare campioni di plasma, sangue intero o siero, sia da prelievo di sangue periferico che per capillarità con diretto contatto del dispositivo su puntura digitale. Per minimizzare il rischio d'interferenza dovuta agli eritrociti, una membrana posizionata tra la zona di caricamento e quella di test permette di trattenere la componente corpuscolare; inoltre, al fine di semplificare l'esecuzione da personale non addestrato, la reazione non necessita dell'aggiunta di tamponi di reazione. Il risultato positivo è dato dalla comparsa di una banda nella zona test. Per il presente studio di valutazione sono stati utilizzati campioni di sangue intero e siero da prelievo di sangue periferico.

RISULTATI

Tutti i campioni sono stati correttamente selezionati e catalogati. In totale si sono ottenuti 163 risultati negativi e 123 positivi; i rimanenti 14, tutti appartenenti al gruppo di pazienti con test molecolare positivo e risultati negativi con il saggio in studio, sono stati esclusi sulla base del concordante risultato negativo ottenuto con metodo ad alta sensibilità in chemiluminescenza (CLIA). Tutti i campioni del gruppo NoCoV sono risultati negativi.

I risultati del gruppo PoMo sono riportati nella tabella 2: in particolare, tra i negativi 4/6 avevano un risultato positivo al metodo CLIA, mentre nessun dato aggiuntivo era disponibile per i rimanenti 2/6.

Categorie PoMo	Positivi	Negativi
0-6	25	2
7-13	25	3
14-20	25	0
>21	25	1

Tabella 2. Dettaglio dei risultati ottenuti con ADEXUS-Dx[®] COVID-19 del gruppo PoMo

I risultati del gruppo PoMo sono riportati secondo le categorie temporali stabilite: la distribuzione di 25 campioni per ogni categoria è casuale, ma aiuta a evidenziare la scarsa differenza in termini di risultati tra le stesse.

I risultati del gruppo NeMo sono riportati nella tabella 3: in totale è stato registrato un tasso di positività totale del 38.30%, con un valore più elevato nelle categorie 0-6 e 14-20 (50.00% per entrambe); la maggioranza di risultati negativi, anche confrontata con il gruppo PoMo, non stupisce, dato che per i pazienti inclusi non è stata accertata l'avvenuta infezione da SARS-CoV-2.

Categorie NeMo	Positivi	Negativi
0-6	15	15
7-13	1	9
14-20	5	5
>21	2	8

Tabella 3. Dettaglio dei risultati ottenuti con ADEXUS-Dx[®] COVID-19 del gruppo NeMo

A differenza del gruppo PoMo, i risultati nelle diverse categorie temporali mostrano una maggiore variabilità, probabilmente dipendente dalle tempistiche di effettuazione dei prelievi.

La sensibilità e la specificità totali sono risultate del 94.30% e 100.00%, rispettivamente, entrambe sopra i limiti di accettabilità stabiliti (>90.00% e ≥ 99.99%, rispettivamente).

DISCUSSIONE

Il kit sierologico RDT ADEXUS-Dx[®] COVID-19 per la ricerca di anticorpi totali contro SARS-CoV-2, prodotto da NOWDiagnostics, Inc., ha mostrato una specificità del 100.0% ed una sensibilità del 94.3%, entrambi valori che soddisfano i criteri di accettabilità per l'utilizzo clinico di questi dispositivi.

I risultati del gruppo NeMo, in cui tutte le indagini molecolari avevano dato esito negativo, necessitano di un'attenta interpretazione. Le categorie temporali d'inclusione si basano sulla distanza tra prelievo del campione respiratorio per il saggio molecolare e prelievo ematico per la ricerca di anticorpi: questo significa che campioni tra 0 e 13 giorni potrebbero essere stati collezionati dopo diverse settimane dall'infezione, dando modo al sistema immunitario di sviluppare una risposta e giustificando la negatività dell'indagine molecolare. D'altra parte, la ricerca di IgA offre la possibilità di allargare la finestra temporale di positività per gli anticorpi, come potrebbero dimostrare i campioni nella fascia 0-6; dovrebbe essere in ogni caso condotta una valutazione prendendo in considerazione la probabile data d'infezione, nonché saggiando i campioni per IgA, IgG e IgM singolarmente con un test ad alta sensibilità, al fine di dimostrare il ruolo delle diverse componenti immunitarie.

Dal punto di vista esecutivo, il kit ADEXUS-Dx[®] COVID-19 si è dimostrato molto semplice da utilizzare, necessitando solo di un pungidito per ottenere il sangue capillare e di appoggiare direttamente il dispositivo sul dito del paziente per l'assorbimento del campione; questo, unito alla possibilità di conservazione a temperatura ambiente, all'assenza di un tampone di reazione e all'estrema portabilità, rendono ADEXUS-Dx[®] COVID-19 estremamente adattabile a condizioni di utilizzo varie e operatori non specializzati.

Data 30/09/2020

Prof. Maria R. Gismondo
Responsabile dello studio
Università degli Studi di Milano

Data 29 settembre 2020

Dr. Silvio Furino
Director Operations Europe
Now Diagnostics Europe Srl

Dipartimento: Medicina di Laboratorio
Unità Operativa Complessa: Laboratorio di Microbiologia Clinica, Virologia e Diagnostica delle Bioemergenze

Direttore: Prof. Maria Rita Gismondo

tel. 02 3904.2239/02 5031.9831

fax. 02 50319832

mariarita.gismondo@unimi.it /

segreteria.microbiologia@hsacco.it

Evaluation of the diagnostic performance of the Rapid Diagnostic Test ADEXUSDx[®] COVID-19 Test for the detection of anti SARS-CoV-2 antibodies

SUMMARY

The Coronavirus Disease (COVID-19) pandemic demanded a strong diagnostic effort for implementing the most efficient containing measures; in particular, a lot of rapid diagnostic tests (RDTs) for the detection of anti SARS-CoV-2 antibodies were developed and launched, even a careful evaluation of their performance is required for a proper use. The present study evaluated the ADEXUSDx[®] COVID-19 Test (NOWDiagnostics, Inc. - Springdale, AR, USA), a RDT targeting total antibody (IgA, IgG and IgM): the test was challenged with 180 serum samples from patients with a molecular test targeting SARS-CoV-2 viral RNA (120 positive and 60 negative) plus 120 serum samples collected not later than 31/12/2018; specimens were categorized according to time lapse between molecular test and RDT. Specificity and sensitivity were calculated: the former resulted 100%, while the latter 94.30%. Interestingly, also 23/60 sera from patients who had tested negative by molecular test resulted positive by RDT. The ADEXUSDx[®] COVID-19 Test demonstrated very good performance, also in patients classified as negative, probably due to the presence of IgA in very early infections and IgM and/or IgG in more advanced ones.

INTRODUCTION

Positive test result via Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) for the detection of SARS-CoV-2 viral RNA represents the standard Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) diagnosis. Nevertheless, molecular assays are burdened by several limitations, like a long work-flow, the need of expertise for execution and interpretation, a mid-high cost and a limited period of positivity (early infections). Serological tests can be useful in identifying positive patients for their correct management and containment measures; in particular, Rapid Diagnostic Tests (RDT) fit very well with the requirements of a rapid response, being they are fast, user friendly, cheap and suitable for large screening use. Many RDTs are now present on the market for SARS-CoV-2 IgM and IgG detection in plasma, serum or whole blood specimens, allowing the recognition of acute (IgM) or advanced (IgG) disease. Still, many concerns remain on RDTs performance, mainly linked to their limited analytic sensitivity compared to gold-standard methods (i.e.: chemiluminescence assays). For this reason, a careful evaluation is necessary before RDTs use, to guarantee infection spread limitation and community protection.

Aims

The present work aimed at evaluating the performance of the ADEXUSDx[®] COVID-19 Test (NOWDiagnostics, Inc. - Springdale, AR, USA), detecting total anti SARS-CoV-2 antibodies; specifically:

- 1) quantify test specificity (expected $\geq 99.99\%$ for clinical use)
- 2) quantify test sensitivity (expected $\geq 90.00\%$ for clinical use)
- 3) evaluate the positivity rate in subjects that never tested positive for SARS-CoV-2 with a molecular assay

Sample selections and processing were performed at the Laboratory of Clinical Microbiology, Virology and Bioemergence of the ASST Fatebenefratelli Sacco, University Hospital Luigi Sacco, Milan (Milan University Department of Biomedical and Clinical Sciences L. Sacco).

MATERIALS AND METHODS

Study population

For specificity evaluation, a total of 120 samples, collected in the period 2017-2018, were selected to ensure exclusion of subjects exposed to SARS-CoV-2 (NoCoV group).

For sensitivity evaluation, a total of 120 plasma or serum from patients with a SARS-CoV-2 positive molecular test result were included (PoMo group): samples were stratified according to time lapse between molecular test and blood collection (Table 1). In addition, 60 plasma or serum samples from patients with a SARS-CoV-2 negative molecular test result were included (NeMo group), to evaluate test performance in individuals with undefined exposure (Table 1). All molecular tests were performed using Food and Drug Administration (FDA) emergency use authorized kits for SARS-CoV-2 diagnosis.

Days after molecular test	Positive	Negative
0-6	30	30
7-13	30	10
14-20	30	10
>21	30	10

Table 1. Samples stratification according to time lapse between molecular test and blood collection

Table 1 summarizes the temporal categories used for sample stratification.

Anti-SARS-CoV-2 antibodies detection

Total anti-SARS-CoV-2 antibodies detection was performed using the RDT ADEXUSDx[®] COVID-19 Test, based on immunochromatographic technology; the device is suitable for use with plasma, serum or whole blood samples, from digital puncture also. A membrane retains blood cells, avoiding their interference with the assay. No buffer reaction is required, making the device highly user friendly and portable. In the present study, plasma, serum and whole blood specimens were used.

RESULTS

All samples were correctly selected and identified. A total of 163 negative and 123 positive results were obtained, while 14 samples were excluded: they resulted negative with both RDT and a high sensitive chemiluminescence assay (CIA), despite being included according to the positive result with molecular test. All the NoCoV group samples were negative, as expected.

Table 2 reports the results for PoMo group: in particular, among negative, discrepancy was confirmed by aforementioned CLIA test, while no information was available for the other 2/6.

PoMo categories	Positive	Negative
0-6	25	2
7-13	25	3
14-20	25	0
>21	25	1

Table 2. Results summary for PoMo group

PoMo results are reported according to temporal categories: each class contained 25 specimens in the positive column, which allowed for an even distribution of results per category.

Table 3 reports the results for NeMo group: the global positivity rate was 38.30%, higher in the 0-6 and 14-20 categories (50.00% each). The majority in negative results is not surprising, even when compared with PoMo results, as for these patients SARS-CoV-2 infection was never found during other clinical assessments.

NeMo categories	Positive	Negative
0-6	15	15
7-13	1	9
14-20	5	5
>21	2	8

Table 3. Results summary for NeMo group

Results of NeMo group showed a more variability in terms of distribution across the different categories, that could be ascribable to time span between infection acquisition and sample collection.

Total sensitivity and specificity were calculated in 94.30% and 100.00%, respectively, both values above the cut-off required for the device use in clinical practice (>90.00% e \geq 99.99%, respectively).

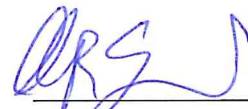
DISCUSSION

The RDT ADEXUSDx[®] COVID-19 Test for the detection of total anti-SARS-CoV-2 antibodies, by NOWDiagnostics, Inc., showed a 100.00% specificity and a 94.3% sensitivity, both values above the cut-off required for the device use in clinical practice (>90.00% e \geq 99.99%, respectively).

NeMo group results, which molecular tests were all negative for viral RNA, require a careful interpretation. Temporal categories were defined on the basis of time lapse between collection of respiratory sample for molecular analysis and antibody testing: such selection criterion implies that samples in categories 0-6 and 7-13 could have been collected after several weeks from infection, allowing immune system to respond to infection. Nevertheless, the positivity could be due to IgA detection: such occurrence, even needing confirmation with IgA specific assay, represents an important tool for patients management, since it can allow to identify more positive patients in early stage of infection.

From a practical point of view, the ADEXUSDx[®] COVID-19 Test proved to be easy-to-use, since it can be directly put into contact with capillary blood on the finger puncture for sample absorption. Moreover, stability of cartridge integrated reagents at room temperature, no requirement of a reaction buffer, a time-to-result of 15 minutes and extreme portability make the ADEXUSDx[®] COVID-19 Test very flexible for use in not specialized settings (i.e. airports, train stations, schools...), especially considering the large number of subjects that could be tested in these situations..

Date 30/09/2020



Prof. Maria R. Gismondo
Principal Investigator
Università degli Studi di Milano

Date 29 settembre 2020



Dr. Silvio Furino
Director Operations Europe
Now Diagnostics Europe Srl