

Copyright© BioTrack 2020



Datum 4 november 2020

Onderwerp Validatie resultaten BioTrack-MED t.b.v. SARS-CoV-2

Van (10)(2e) BioTrack

Aan (10)(2e)
(10)(2e)

Status *confidentieel*

Achtergrond

In dit rapport wordt de validatie van het BioTrack-MED systeem (de zogenoemde FFX-studie) gepresenteerd. De studie is op 6 mei 2020 van start gegaan te Leeuwarden. De FFX-studie bestaat uit twee groepen (referentie) monsters: een positieve en een negatieve controlegroep. De negatieve controlegroep bestaat uit concentraten van witte bloedcellen en de positieve controlegroep bestaat uit volbloed. Deze monsters werden geleverd door het Rijks Instituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM) te Bilthoven. Deze samples zijn vervolgens door BioTrack, Leeuwarden geanalyseerd met behulp van het BioTrack-MED systeem met daarin geïmplementeerd de SARS-CoV-2 applicatie. De FFX-studie zoals hier omschreven is weer onderdeel van een grotere studie waarin andere partijen participeren. Data en informatie van deze grotere studie wordt separaat gerapporteerd en behandeld.

Materialen en Methoden

Monsters

Testgroep 1, de negatieve controle monsters, bestaat uit witte bloedcel concentraten afkomstig van 10 proefpersonen die blootgesteld waren aan vogelgriepvirus. Deze personen hebben toestemming gegeven voor anoniem gebruik van hun monsters voor onderzoek. Van 6 personen werd na 14 dagen ook een tweede volbloedmonster afgenomen. Afnames vonden plaats tussen 1 maart 2018 en 30 april 2018. Op basis van deze datums wordt gesteld dat deze samples per definitie negatief voor SARS-CoV-2 moeten zijn. Op de serummonsters behorende bij de volbloedmonsters voor cellen zijn in het kader van het huidige onderzoek virus neutralisaties met SARS-CoV-2, proteïne-microarray antistof-bepalingen voor SARS-CoV-1, SARS-CoV-2, MERS-CoV en de humane seizoens-coronavirussen en ELISA (Wantai IgG en IgM) voor SARS-CoV-2 uitgevoerd. Er werden geen antistoffen tegen SARS-CoV-2 bij deze personen gevonden.

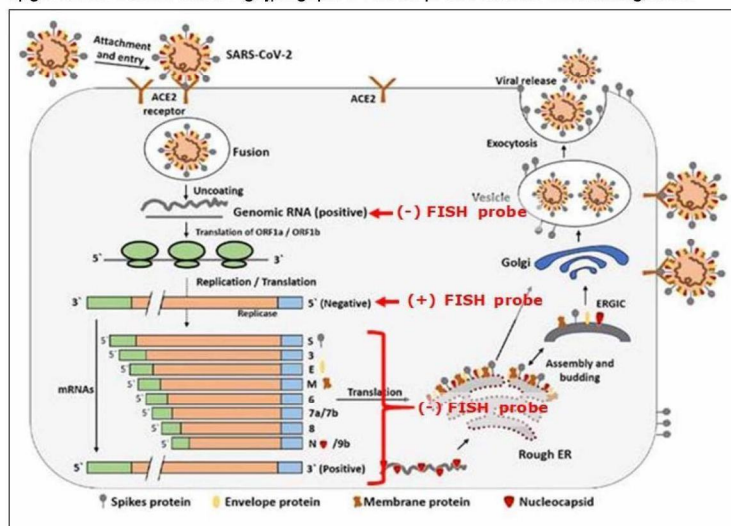
Testgroep 2, de positieve controle monsters, bestaat uit veneus EDTA-bloed afkomstig van 77 van de 79 personen die geïncubeerd zijn in de FFX-100 huishoud transmissie studie. Twee samples konden niet worden geïncubeerd omdat er te weinig materiaal aanwezig was. Op T1 is een gezin geïncubeerd op basis van een positieve PCR voor SARS-CoV-2 bij één van de ouders. Van alle 77 personen werd (waar mogelijk) op 3 tijdstippen (t=0 dagen, t=15-21 dagen en t=4-6 weken, respectievelijk T1, T2 en T3) meerdere monstertypen afgenomen (i.e. keeluitstrijk, neusuitstrijk op T1 en T2, speeksel, feces en veneus bloed op alle tijdstippen). Daarnaast zijn voor een aantal personen ook tussen T1 en T2 nog keel- en neusmonsters afgenomen. De bemonstering vond plaats tussen 28 maart 2020 en 25 mei 2020. Behalve op de bloedmonsters, werd op alle monsters RT-PCR voor SARS-CoV-2 uitgevoerd. Bloedmonsters werden getest voor antistoffen met proteïne-microarray antistof-bepalingen voor SARS-CoV-1, SARS-CoV-2, MERS-CoV en de humane seizoens-coronavirussen en een ELISA (Wantai totaal IgG en IgM) voor SARS-CoV-2 werd uitgevoerd. Tevens werd van alle proefpersonen de symptomatologie geregistreerd.

Voor de studie met BioTrack werd extra EDTA-bloed afgenomen en van het RIVM naar BioTrack verzonden. Van de 82 bloedmonsters welke naar BioTrack werden verzonden om daar de SARS-CoV-2 FISH analyses op uit te voeren, waren 76 afkomstig van het T3 bemonstering tijdstip. De overige 6 monsters waren afkomstig van 3 personen op tijdstip T1 en T2. Daarnaast zijn van 8 personen (3 van het T1 en 5 van het T3 bemonstering tijdstip) bijbehorende 4°C bewaarde keel- en neusmonsters naar BioTrack verzonden. De volledige

dataset van groep 1 werd op 22 juni 2020 en van groep 2 op 24 oktober 2020 verzonden door het RIVM naar BioTrack.

Analytische methoden

De beschrijving van de analytische methoden zoals toegepast door het RIVM wordt in dit rapport verder niet beschreven. Volstaan wordt met de opmerking dat de SARS-CoV-2 RT-PCR een in-house methode is en dat de ELISA met een commerciële methode (Wantai IgG en IgM SARS-CoV-2) is uitgevoerd. De BioTrack-MED FISH werd uitgevoerd met een SARS-CoV-2 specifieke probe gebaseerd op een specifiek gebied van het N-gen en subgenome messengers in combinatie met de BioTrack-MED analyzer. Deze probe heeft een *in-silico* specificiteit van >99,9%. De probe sequentie zoals in deze studie gebruikt, is (+) en detecteert de (-) sense tussenvorm van genomisch RNA. In Figuur 1 is een schematische weergave opgenomen waarin het aangrijpingspunt van de probe visueel wordt aangeduid.



Figuur 1: Lokalisatie van de SARS-CoV-2 probe zoals gebruikt door de BioTrack-MED analyzer binnen de huidige validatie studie. Afbeelding geproduceerd door en hier weergegeven na toestemming van dr. (10)(26) (RIVM, Bilthoven).

Statistiek

Vooraf dient men zich te realiseren dat groep 1 gedefinieerd is als de negatieve controlegroep. Dit houdt per definitie in dat alle meetuitslagen met de referentie methode (i.e. RT-PCR dan wel serologie) negatief moeten zijn zodat de performance van de methode onder test (FISH volgens BioTrack-MED) berekend kan worden.

Uiteraard geldt deze voorwaarde ook voor groep 2, maar dan gedefinieerd als de positieve controlegroep. Groep 2 mag dan, volgens de referentie standaard (RT-PCR of serologie) alleen positieven bevatten. Op dit moment is dat niet zo, het was voor het RIVM niet mogelijk om midden 2020 een set van enige omvang met geconfirmeerde positieve bloedmonsters te leveren. De bloedmonsters die volgens de referentie standaard (PCR of serologie) negatief zijn in groep 2, zijn dan ook geëxcludeerd omdat zij niet als positieven volgens de referentie kunnen dienen. Bij de berekeningen van de sensitiviteit is hiermee rekening gehouden.

Er zijn diverse soorten vergelijkingen binnen de huidige dataset mogelijk, ware het niet dat de monsters (groep 2) die door BioTrack werden ontvangen en geanalyseerd zijn voor het merendeel op T3 betrekking hebben. Met betrekking tot T1 en T2 zijn 3 monsters beschikbaar, dit is te weinig voor statistische relevantie. Dit betekent dat vergelijkingen met T1 en T2 vroeg in de infectie minder goed mogelijk zijn. Ditzelfde geldt voor de keel- en neusmonsters (n=3 voor T1 en n=5 voor T3), dit is te weinig voor statistische relevantie. In de hier gepresenteerde statistische analyse zijn de volgende vergelijkingen gemaakt:

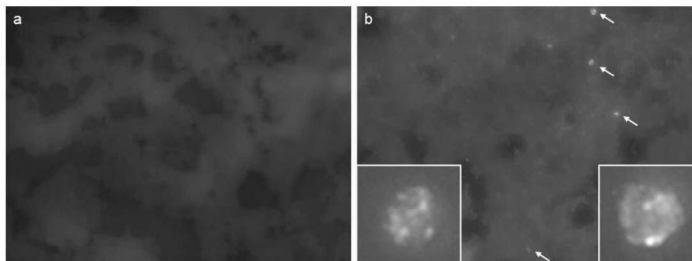
- Serologie met Wantai op T3 versus BioTrack-MED FISH op T3: deze vergelijking is valide en vormt een zinvolle vergelijking voor de bruikbaarheid van de BioTrack-MED FISH voor "late diagnostiek". De sensitiviteit en de specificiteit van de BioTrack-MED FISH wordt berekend binnen dezelfde groep monsters. Dat is groep T3, dit zijn z.g. "late" monsters. De serologie (uitgevoerd met ELISA (Wantai)) op T3 dient in deze vergelijking als referentie.
- RT-PCR op enig moment voor of op T3 positief versus BioTrack-MED FISH op T3: deze vergelijking is zinvol voor de bruikbaarheid van de BioTrack-MED FISH voor "vroeg diagnostiek". Hierbij wordt het voorgaande traject genomen als referentie; RT-PCR wordt als proxy voor een geïnfecteerd persoon genomen als op enig tijdstip voor en inclusief T3 deze positief is in de monsters. Omdat het een huishoud transmissie studie is, kan transmissie ook na T1 zijn opgetreden. De rationale hiervoor is dat SARS-CoV-2 RNA verondersteld wordt langer aanwezig te zijn in witte bloedcellen die materiaal in de luchtwegen hebben opgeruimd, waardoor er enige indicatie verkregen wordt tussen beide methoden. De sensitiviteit en specificiteit van de BioTrack-MED FISH wordt berekend en de RT-PCR op T1 t/m T3 dient in deze vergelijking als referentie.

Resultaten

De meetresultaten welke met de SARS-CoV-2-applicatie van de BioTrack-MED analyzer werden behaald, zijn opgenomen in de oorspronkelijke datasheets van groep 1 (22 juni 2020) en van groep 2 (24 oktober 2020) die door het RIVM naar BioTrack werden verstuurd. De samengestelde data zijn opgenomen als bijlage bij dit rapport. Met deze bijlage is de dataset van deze validatiestudie compleet. Zoals hierboven beschreven, zijn er in dit rapport vooralsnog twee vergelijkingen gemaakt. Voor elk van deze vergelijkingen zijn specificiteit en sensitiviteit berekend. De resultaten hiervan zijn weergegeven in Tabel 1. Een voorbeeld van negatieve en positieve resultaten zijn weergegeven in Figuur 2.

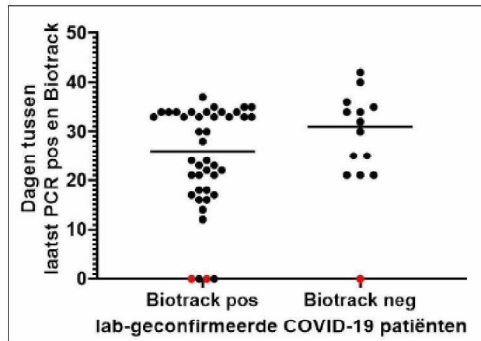
Parameter**	BTMED T3 vs Wantai T3*	BTMED T3 vs RT-PCR*
Sensitiviteit	0.89	0.85
Specificiteit	1.00	1.00
* Gebruikt als referentie		

Tabel 1: Vergelijking BioTrack-MED (BTMED) resultaten op T3 met ELISA (Wantai) T3 en RT-PCR (T1 t/m T3).



Figuur 2: Voorbeeld van een negatief testresultaat (a) en een positief testresultaat (b), waarin de pijlen witte bloedcellen aangeven die positief voor SARS-CoV-2 getest zijn. De inzet laat 2 positieve witte bloedcellen in een grotere magnificatie zien.

Vervolgens is gekeken naar de delay tussen de laatste datum dat de RT-PCR positief was ten opzichte van het resultaat met de BioTrack-MED FISH op T3. De resultaten zijn weergegeven in Figuur 3.



Figuur 3: De delay in dagen tussen de laatste positieve RT-PCR test (op T1, T2 of T3) en het resultaat met de BioTrack-MED FISH op T3. Zwart is T3, rood is T1 en de mediaan is weergegeven. Het verschil in de verdeling is niet significant verschillend.

Met betrekking tot de 3 monsters die beschikbaar zijn op tijdstippen T1 en T2, zijn de resultaten weergegeven in Tabel 2. Het is indicatief dat de BioTrack-MED in 67% tot hetzelfde resultaat als de RT-PCR komt, maar de aantallen zijn zo laag dat aan deze uitspraak geen significante waarde gehecht kan worden.

Tabel 2: Resultaten van de RT-PCR en BioTrack-MED op de 3 bloedmonsters van T1 en T2.

Patiënt	T1		T2	
	RT-PCR	BTMED	RT-PCR	BTMED
1	POS	POS	NEG	NEG
2	POS	NEG	NEG	POS
3	POS	POS	NEG	NEG

Voor de keel- en neus monsters (n=3 voor T1 en n=5 voor T3), zijn de resultaten weergegeven in Tabel 3. De kanttekening die bij deze tabel gemaakt moet worden, is dat in de monsters van T1 zeer weinig cellen te zien waren, waardoor de BioTrack-MED geen goede uitslag kon geven en de monsters op T1 niet analyseerbaar waren.

Tabel 3: Resultaten van de RT-PCR en BioTrack-MED op de keel- en neus monsters van T1 en T3.

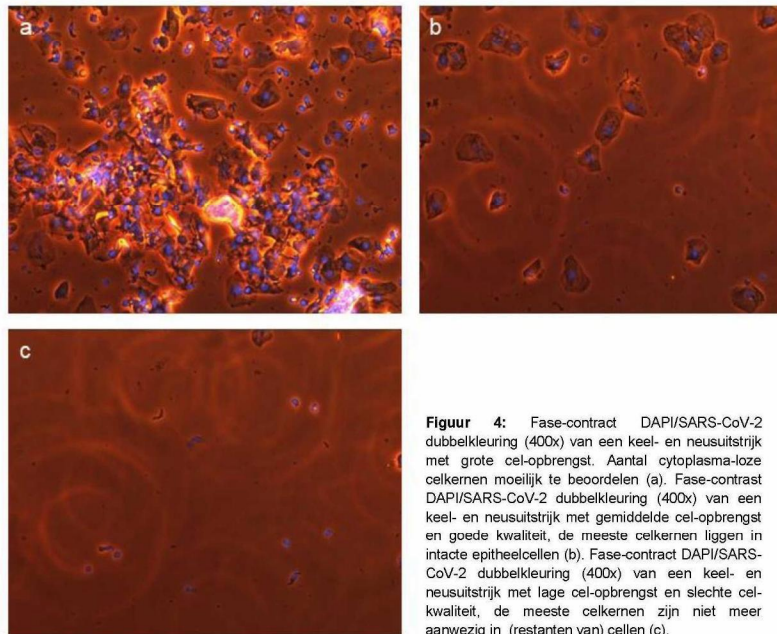
	Patiënt	RT-PCR		BTMED	
		neus	keel	neus	keel
T1	1	POS	POS	N.A.*	N.A.*
	2	POS	POS	N.A.*	N.A.*
	3	POS	POS	N.A.*	N.A.*
T3	1	POS	NEG	NEG	NEG
	2	NEG	NEG	NEG	NEG
	3	NEG	NEG	NEG	NEG
	4	NEG	NEG	NEG	NEG
	5	NEG	NEG	NEG	NEG
*	Niet analyseerbaar want te cel opbrengst te laag. Vastgesteld met fase-contrast microscoop (400x).				

Copyright © BioTrack 2020

BIOTRACK 
 real time diagnostics

Het lage aantal cellen in de T1 monsters kan mogelijk verklaard worden door de wijze van afname zoals toegepast voor de keel- en neusuitstrijk. Op basis van deze bevinding werd een nader onderzoek ingesteld naar de kwaliteit en de opbrengst van cellen in keel- en neusuitstrijken. In Figuur 4 worden voorbeelden gegeven van keel- en neusuitstrijken waaruit duidelijk blijkt welke microscopische verschillen normaliter worden geobserveerd bij deze afname methode.

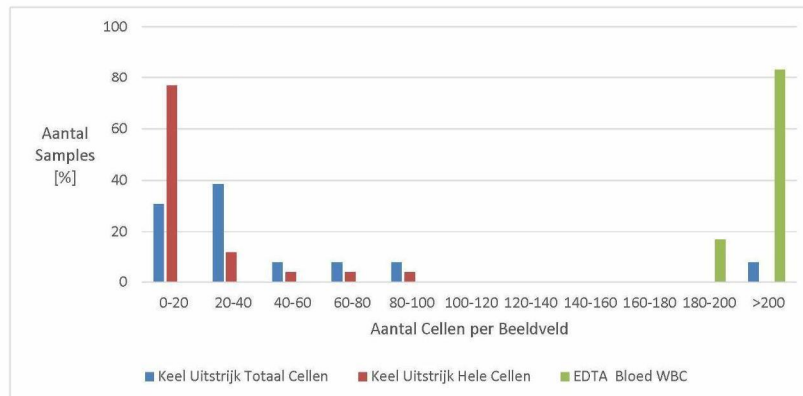
Van een set van 26 verschillende keel- en neusuitstrijken werd vervolgens simultaan een



Figuur 4: Fase-contrast DAPI/SARS-CoV-2 dubbelkleuring (400x) van een keel- en neusuitstrijk met grote cel-opbrengst. Aantal cytoplasma-loze celkernen moeilijk te beoordelen (a). Fase-contrast DAPI/SARS-CoV-2 dubbelkleuring (400x) van een keel- en neusuitstrijk met gemiddelde cel-opbrengst en goede kwaliteit, de meeste celkernen liggen in intacte epitheelcellen (b). Fase-contrast DAPI/SARS-CoV-2 dubbelkleuring (400x) van een keel- en neusuitstrijk met lage cel-opbrengst en slechte celkwaliteit, de meeste celkernen zijn niet meer aanwezig in (restanten van) cellen (c).

DNA-kleuring (DAPI) en een fase-contrast beeld gemaakt. In deze beelden werd het totale aantal celkernen (i.e. DAPI-positieve objecten) en het totale aantal celkernen wat zich in een intact cellichaam bevindt geteld. Deze aantallen zijn indicatief voor respectievelijk opbrengst en kwaliteit. De aanname is dat losse celkernen het gevolg zijn van mechanische schade tijdens de procedure van de keel- en neusuitstrijk. In Figuur 5 worden de resultaten van dit onderzoek weergegeven.

Copyright© BioTrack 2020

BIOTRACK 
 real time diagnostics


Figuur 5: Frequentie histogram, waarin de opbrengst van het totaal aantal (epitheel)cellen en het aantal intacte (epitheel)cellen van materiaal verkregen via de keel- en neusuitstrijk is vergeleken met de opbrengst van cellen uit EDTA bloed.

Uit de grafiek wordt duidelijk dat de cel-opbrengst van de keel- en neusuitstrijk laag is en dat de cel kwaliteit een grote variatie vertoont, waarschijnlijk als gevolg van de keel- en neusuitstrijk procedure. Het toepassen van keel- en neusuitstrijken vermindert de gevoeligheid van de analyse (ongeacht de methode) en bemoeilijkt dan ook onderlinge vergelijkbaarheid van de analyseresultaten.

Conclusies

Op basis van bovenstaande worden onderstaande vier conclusies getrokken:

- De overeenkomsten binnen de negatieve controlegroep zijn coherent. Op dit moment zijn de resultaten welke zijn behaald met FISH-analyses op deze groep van monsters voldoende overtuigend. Groep 1 leent zich dan ook goed om een specificiteitsberekening op te baseren.
- Betreffende de vergelijking van serologie T3 en BioTrack-MED T3 wordt geconcludeerd dat er van een goede sensitiviteit (89%) en specificiteit (100%) sprake is. Geconcludeerd wordt dat FISH volgens BioTrack-MED prima inzetbaar is voor het diagnosticeren van "late samples". Aangezien deze data gebaseerd zijn op metingen aan de T3 samples lijkt de uitspraak gerechtvaardigd dat BioTrack-MED een vergelijkbare toepasbaarheid heeft als methoden gebaseerd op serologie in de weken volgend op een infectie. De aantallen tests in deze groep zijn eveneens ruim voldoende.
- Betreffende de vergelijking van de RT-PCR (positief op T1, T2 of T3) en BioTrack-MED wordt geconcludeerd dat er van een goede sensitiviteit (85%) en specificiteit (100%) sprake is. FISH-baar materiaal (mRNA) van SARS-CoV-2 blijft lang aanwezig in de witte bloedcellen. Er is aangetoond dat, alhoewel het virus zich na ongeveer 3 weken na het beginnen van de symptomen niet meer repliceert, er tot 12 weken nog RNA aangetoond kan worden (Li N, et al., *J Med Virol*, 2020, doi: 10.1002/jmv.25952; Xiao F, et al., *Emerg Infect Dis*, 2020, doi: 10.3201/eid2608.200681). Duidelijk is dat er behoefte is aan "vroeg" monsters waarop RT-PCR en FISH analyses kunnen worden uitgevoerd. Er zijn 3 monsters voor T1 en T2, maar dit is te weinig voor enige statistische relevantie. Echter binnen de studie met derden, waar RIVM ook in participeert, is dit wel aan de orde en worden vergelijkbare scores behaald. Zie hiervoor de tussenrapportage van de betreffende studie.
- De vergelijking tussen de RT-PCR resultaten en de BioTrack-MED resultaten is zeer interessant voor het vaststellen van de toepasbaarheid van het BioTrack-MED systeem in de detectie en interpretatie van z.g. "vroeg samples". Om dit verder in kaart te brengen, is een vervolg met vooral speekselmonsters wenselijk.
- De cel opbrengst van keel- en neusuitstrijken is zeer variabel. Microscopisch wordt een LOG2 verschil in opbrengst geobserveerd, variërend van geen of enkele cellen (circa 75%) tot meer dan 80 cellen (in 8% van de gevallen). Dit bemoeilijkt de toepassing van microscopische methoden. In een andere studie is reeds (veel) ervaring opgedaan met de speeksel matrix. Speeksel heeft een hoog en constant celgetal waarin naast epitheelcellen ook minimaal 10%-15% witte bloedcellen voorkomen. Dit is een prima basis voor COVID-19 analyse middels FISH-gebaseerde methoden. Keel- en neusuitstrijken lijken, daarentegen, hier minder geschikt voor.

Aanbevelingen

O.b.v. deze resultaten willen we graag een voorlopige conclusie en vervolgstappen bepalen:

- Het afronden van de SARS-CoV-2 FISH op bloed studie en het formuleren van een eindoordeel.
- Het uitbreiden van de studie met “vroeg” monsters waarop RT-PCR en FISH kunnen worden uitgevoerd om de toepasbaarheid van FISH in de vroege diagnostiek vast te stellen. Met het opslaan van het COVID-19 virus in Nederland zou het goed zijn als, op korte termijn, groep 2 wordt uitgebreid met nieuwe monsters waarbij, naast veneus bloed, ook speeksel wordt afgenomen.
- Daarnaast is de BioTrack-MED nu ook inzetbaar om ook speeksel monsters te kunnen verwerken. Eerste resultaten van een eigen studie zijn veelbelovend en in overleg met RIVM willen we graag in een separate rapportage deze resultaten delen en hierin vervolgstappen zetten.
- Het gezamenlijk met RIVM uitbreiden van de dataset met BioTrack-MED analyses op speeksel monsters. Deze data maken een matrix met identieke vergelijking met de reeds aanwezige RT-PCR data mogelijk.