

Verslag voor NVMM: ELISA SARS-CoV-2 serologie

ELISA voor SARS-CoV-2 serologie: verslag voor NVMM rondvraag 01/05/2020

Laboratorium: **LabMicTA Hengelo**

Contactpersoon: 5.1.2e, 5.1.2e

Medewerkers: 5.1.2e 5.1.2e 5.1.2e

Deel 1 Protocol

Doel en achtergrond

In de regio Wuhan in China startte in december 2019 een uitbraak van een nieuw coronavirus, ook wel SARS severe acute respiratory syndrome -CoV coronavirus -2 genoemd. Het virus kan de ziekte COVID-19 veroorzaken. Op 11 maart 2020 bestempelde de Wereldgezondheidsorganisatie (WHO) de wereldwijde SARS-CoV-2 uitbraak officieel als pandemie.

De eerstelijnsdiagnostiek voor infectie met SARS-CoV-2 bestaat uit afname van materiaal uit de luchtwegen, meestal doormiddel van een nasofarynx- en keelswab of materiaal uit de lagere luchtwegen (bijv. sputum of BAL-vocht), waarna detectie van SARS-CoV-2 virus RNA met PCR.

Tegelijkertijd met de moleculaire detectie zijn in de uitbraakgebieden (voornamelijk China) verschillende soorten serologische tests gevalideerd. Serologische bepalingen zouden mogelijk kunnen worden ingezet voor bijkomende diagnostiek in de (semi-) acute fase of diagnose van doorgemaakte infectie in een later stadium van de uitbraak.

Wij rapporteren in dit verslag voor de rondvraag van de NVMM gegevens over:

- Wantai Total Ab kit (Beijing Wantai Biological) (IgM kit nog niet geleverd)
- EDI IgG en IgM
- EUROIMMUN IgG (IgA kit nog niet geleverd)
- Mikrogen IgG

In deze fase van de validatie hebben we ons toegespitst op de patiëntenpopulatie op dag >10 na de symptomen om een beeld te krijgen van de waarde van serologie in het diagnosticeren van een doorgemaakte infectie.

Materialen en methoden

De te testen kit bestaan uit:

Wantai Total Ab ELISA (Beijing Wantai Biological)

EDI IgG en IgM (Epitope Diagnostics)

EUROIMMUN IgG (EUROIMMUN) (IgA Kit nog niet geleverd)

Mikrogen IgG (MIKROGEN)

Materiaal	Serum
Apparatuur (nummer)	VirClia's Washer Tecan hydroflex (indien handmatig) Spectrofotometer Dynex MRX (indien handmatig) Incubator Stuart (indien handmatig)
Monsters	Spijtsera ingezonden uit ZGT (opslag van monsters ingezonden voor klinisch chemische bepalingen)

Verslag voor NVMM: ELISA SARS-CoV-2 serologie

Prestatiekenmerken en acceptatiecriteria

Juistheid

Op moment van schrijven zijn geen gecertificeerde referentiematerialen, rondzendingsmaterialen of “gouden standaard” methode beschikbaar. De juistheid wordt bepaald door het berekenen van de diagnostische sensitiviteit en specificiteit van serologische testen voor de diagnose van COVID-19, met de SARS-CoV-2 PCR als gouden standaard. De sensitiviteit wordt bepaald met serummonsters van PCR-positieve patiënten; de specificiteit wordt bepaald met een selectie van monsters uit 2018 en 2019 (o.a. serummonsters ingestuurd van patiënten met respiratoire klachten, selectie van IgM positieve monsters voor *Mycoplasma pneumoniae*, EBV, CMV) (n=35).

Voor de indicatie “Aantonen van doorgemaakte infectie” wordt de sensitiviteit bepaald met een panel van 30* PCR-bevestigde patiënten ten minste 10 dagen na begin van symptomen.

(*Zie Afwijkingen tov protocol)

Precisie:

- Herhaalbaarheid (intra-assay): 10 monsters worden in duplo bepaald binnen een run.
- Reproduceerbaarheid (inter-assay): 10 monsters worden in duplo bepaald in twee verschillende runs (op verschillende dagen).

Juistheid	Zie sensitiviteit en specificiteit
Precisie	ELISA: Intra-assay CV $\leq 10\%$; Inter-assay $\leq 15\%$ of specificities fabrikant in bijsluiter
Specificiteit	Geen vooropgestelde acceptatiecriteria in deze fase van de validatie.
Sensitiviteit	Geen vooropgestelde acceptatiecriteria in deze fase van de validatie.

Deel 2 Resultaten

Afwijkingen tov het protocol

T.a.v. inter- en intrarun precisie berekeningen: bij bepaalde duplo paren waren een of beide van de monsters boven de meetlimiet gemeten. Dit maakte het niet mogelijk om de inter- en intrarun precisie te berekenen. Voor de berekening zijn alle monsters gebruikt die een meetwaarde hadden onder de meetlimiet. Bij het verkrijgen van bijkomende kits worden bijkomende testen gepland. Bij bepalingen die volgens de instructies van de fabrikant standaard in duplo zijn ingezet zijn alle monsters meegenomen voor het berekenen van de intra-test precisie.

T.a.v aantal monsters van PCR-positieve patiënten: In een later stadium zijn bijkomende sera toegevoegd van PCR-positieve patiënten, wat het totaal op 48 brengt. Niet elke kit is getest met deze 48 patiënten omwille van te weinig testmaterialen en/of technische problemen bij bepaalde kits.

T.a.v instructies fabrikant Wantai Total Ab: We hebben ervoor gekozen om tijdens deze validaties niet alle positieve monsters in duplo te herhalen (cf. instructies fabrikant).

Verslag voor NVMM: ELISA SARS-CoV-2 serologie

Resultaten

Juistheid

Sensitiviteit

% positieve monsters						
	Wantai	EUROIMMUN	EDI			Mikrogen
	Total Ab	IgG	IgM	IgG	Combinatie IgM/IgG	IgG
<i>PCR+ patienten ≥10d na begin symptomen</i>	100% (n=48)	77% (n=48)	80% (n=30)	80% (n=30)	87% (n=30)	92% (n=48)

In het panel van 30 monsters was de mediane tijd na begin symptomen 14 dagen (range: 10-32 dagen). In het panel van 48 monsters (30 eerder beschreven monsters +18 bijkomende monsters) was de mediane tijd na begin symptomen 15 dagen (range 10-32). Het panel van 30 monsters bevat 30 monsters van unieke patiënten. Het panel van 48 monsters bevat monsters van 44 unieke patiënten.

De monsters zijn afkomstig van serum dat afgenomen is voor klinisch chemische bepalingen bij patiënten. In het panel zijn zowel patiënten aanwezig die na een evaluatie op de SEH zijn ontslagen voor thuisisolatie, opgenomen zijn op een verpleegafdeling en op de intensieve zorgen.

Specificiteit

% negatieve monsters						
	Wantai	EUROIMMUN	EDI			Mikrogen
	Total Ab	IgG	IgM	IgG	Combinatie IgM/IgG	IgG
Sera uit 2018 en 2019	100% (n=35)	100% (n=35)	100% (n=35)	94% (n=35)	97% (n=94)	100% (n=35)

Een panel van 35 sera uit 2018 en 2019 zijn geselecteerd (25 monsters ingestuurd voor serologie respiratoire pathogenen (waaronder o.a. ook CMV IgM positieven), 5 geselecteerd voor EBV/Mycoplasma IgM en 5 willekeurige monsters voor SOA serologie).

De enige reactieve monsters waren 2 monsters met een dubieus resultaat op de EDI IgG ELISA. Indien dubieuze monsters als negatief worden beschouwd hebben alle geteste kits een specificiteit van 100% voor het geteste panel.

Verslag voor NVMM: ELISA SARS-CoV-2 serologie

Samenvatting sensitiviteit en specificiteit

	Wantai	EUROIMMUN	EDI			Mikrogen
	Total Ab	IgG	IgM	IgG	Combinatie IgM/IgG	IgG
Sensitiviteit	100% (n=48)	77% (n=48)	80% (n=30)	80% (n=30)	87% (n=30)	92% (n=48)
Specificiteit	100% (n=35)	100% (n=35)	100% (n=35)	94% (n=35)	97% (n=94)	100% (n=35)

Precisie

	CV (%)				
	Wantai	EUROIMMUN	EDI		Mikrogen
	Total Ab	IgG	IgM	IgG	IgG
Intra-run	2,3% (n=6)	10,3% (n=10)	12,1% (n=30)	1,9% (n=30)	8,6% (n=9)
Inter-run	9,1% (n=9)	11,8% (n=10)	19,6% (n=10)	-	13,1% (n=9)

CV berekend met root mean square van CV duplobepalingen voor intra- en inter-run precisie.

Omwille van technische problemen met de EDI kit kon geen bijkomende run worden gedraaid voor de bepaling van de inter-run precisie.

Conclusie

Juistheid

- Sensitiviteit: De geteste kits hebben een sensitiviteit van 80-92% voor IgG bij patiënten ≥ 10 d (mediaan: 14-15) na begin van de symptomen. Voor IgM is dit 80% (1 geteste kit) en voor de combinatie IgM/IgG of total Ab is dit 87-100%. Op basis van de literatuur zijn dit te verwachten resultaten in deze populatie. De Wantai Total Ab ELISA kit toonde de hoogste sensitiviteit (100%). Wij hebben enkel sera van patiënten met ten minste een ziekenhuisbezoek – gegevens over patiënten met milde klachten ontbreken.
- Specificiteit: Bijna alle geteste kits hadden een specificiteit van 100% bij een panel van 35 pre-pandemie sera (geselecteerd op o.a. respiratoire symptomen en IgM positiviteit voor EBV, CMV en mycoplasma). De EDI IgG ELISA rapporteerde 2/35 monsters als dubieus en had hierdoor de laagste specificiteit.

Precisie

- Alle geteste kits buiten de EDI IgM kit voldeden aan de vooropgestelde criteria. Bijkomende evaluaties zijn nog gepland wegens de inclusie van minder monsters dan gepland.

Besluit: De Wantai Total Ab is momenteel de best presterende kit uit dit panel, met een sensitiviteit en specificiteit van 100% in het geteste monsterpanel. Op het moment van schrijven missen we nog enkele kits om de vergelijking compleet te maken.