

Verificatie – validatie verslag

SD Biosensor Standard F COVID-19 Ag FIA- validatie

Datum	29 oktober 2020
Auteurs	5.1.2e, 5.1.2e, 5.1.2e

Deel 1 Protocol

Doel en achtergrond

Antigeensneltesten voor de detectie van SARS-CoV-2 infectie zijn minder sensitief en specifiek dan PCR testen. Toch zouden Ag testen een rol kunnen spelen tijdens de 2e golf in de huidige SARS-CoV-2 pandemie, waar de test capaciteit onder druk staat, en snelheid waarmee testuitslagen gegenereerd worden belangrijk is.

Recent (7 oktober 2020) zijn twee van vijf antigeensneltesten, waarvan de betrouwbaarheid onderzocht wordt in Nederland, goedgekeurd. Deze goedgekeurde sneltesten zijn onderzocht door het UMC Utrecht en op Aruba (Panbio covid-19-antigeentest (Abbott), en het Amphia Ziekenhuis in Breda (BD Veritor Plus covid-19-antigeentest (Becton Dickinson). De sensitiviteit varieerde van 71,6 procent tot 94,1 procent. De specificiteit van deze testen was 100% [<https://www.ntvg.nl/artikelen/nieuws/covid-19-hoe-betrouwbaar-zijn-sneltesten/volledig>].

Het betreft validatie van de STANDARDTM F COVID-19 Ag FIA test.

Testprincipe

Patiënt materiaal wordt opgebracht aan één zijde van een membraan en migreert over het membraan naar een testlijn die gecoat is met monoclonale anti- SARS-CoV-2 antistoffen. Tijdens de migratie binden fluorescentie-gelabelde monoclonale anti-SARS-CoV-2 antistoffen aan de aanwezige SARS-CoV-2 nucleoproteïnen en vormen zo een complex. Aangekomen bij de testlijn worden deze complexen gebonden door de monoclonale anti- SARS-CoV-2 antistoffen op de testlijn en geven deze een gezamenlijk fluorescentie signaal af. De STANDARD F analyzer meet de fluorescentie-intensiteit en geeft via een voorgeprogrammeerd algoritme een uitslag af op de display. Aan het eind van het membraan zit een interne procedure controle zone. De analyzer meet het fluorescentie signaal in die zone en bepaalt of de test 'valid' of 'invalid' is.

Fase 1: Technische validatie: valideren van de antigeentest ten aanzien van de routine SARS-CoV-2 PCR met behulp van met name GGD samples (patienten met milde symptomen)

Fase 2: Klinische validatie: valideren van de inzetbaarheid van de antigeentest specifiek voor VVT instellingen in de regio ten behoeve van continuïteit gezondheidszorg.

Definities en afkortingen

DTT	PCR opwerkmethode: samples worden met DTT behandeld en opgekookt, zonder RNA extractie en zuivering, alvorens de PCR wordt uitgevoerd
EMAG/KF	PCR opwerkmethode: Op samples wordt een RNA extractie en zuivering m.b.v EMAG® (bioMérieux) of Kingfisher (Thermo Fisher Scientific) nucleïnezuur extractie apparatuur, alvorens de PCR wordt uitgevoerd

Verificatie – validatie verslag

AMIES	Respiratoire sample (keel en nasofarynxwat) in Amies transport medium
GLY	Respiratoire sample (keel en nasofarynxwat) in GLY transport medium

Materialen en methoden

Materiaal	Pipet 1000 ul, filter tips 1000 ul
Apparatuur (nummer)	SD Biosensor F2400 reader
Monsters	Respiratoire samples (keel- en nasofarynxwat) uit routine COVID-19 diagnostiek in AMIES transmedium of GLY transportmedium
Reagentia (lotnummers en houdbaarheidscriteria)	9 STANDARDTM F COVID-19 Ag FIA testkits a 25 stuks

Uitvoering

Vorbereiding:

- Installatie en calibratie F2400 reader

Uitvoering:

Fase 1:

Gedurende de periode maandag 21 september-vrijdag 25 september 2020 worden SARS-CoV-2 PCR positieve en negatieve samples uit de routine diagnostiek, binnen 24 uur na binnenkomst, getest met de antigeen test op de afdeling serologie van LABMICTA door ervaren microbiologisch analist (en). Onderscheid wordt gemaakt in 1) het type transportmedium waarin het respiratoire monster is aangeleverd, 2) PCR opwerkmethode waarmee de PCR uitslag genereerd is, 3) Ct waarde van PCR uitslag (met name de samples met hoogste Ct waarden, i.e. lage virale load, worden geselecteerd voor een kritische validatie). Een vergelijkbaar aantal PCR negatieve samples per PCR opwerkmethode/transport medium wordt getest. Discrepante bevindingen worden verder onderzocht.

Fase 2: Volgt

Prestatiekenmerken en acceptatiecriteria

Fase 1:

1. De sensitiviteit van de antigeentest t.a.v. de PCR test uitgevoerd op een en het zelfde transportmedium moet $\geq 80\%$ zijn.
2. De specificiteit van de antigeentest t.a.v. de PCR test uitgevoerd op een en het zelfde transportmedium moet $\geq 97\%$ zijn.

Verificatie – validatie verslag

3. Inter-test variatie < 20%, en intra-test variatie < 20%

Fase 2:

1. volgt

Deel 2 Resultaten

Afwijkingen tov het protocol

Niet alle samples in deze validatie werden geselecteerd in de opgegeven periode 21-25 september. 20 samples die PCR negatief testten met DTT methode zijn geselecteerd op 7 oktober. Wegens een tekort aan testmateriaal konden geen PCR negatieve samples met GLY transport medium in de validatie meegenomen worden. I.v.m.

ondervertegenwoordiging van EMAG/KF geconfirmeerde samples werd de validatie verder uitgebreid met samples geselecteerd op 26 en 27 oktober, toen testen weer voorradig waren. Deze samples werden niet meer geselecteerd op alleen de hoogste Ct waarden.

In de nieuwe voorraad antigeen testen heeft de fabrikant de 'nozzle cap' waarmee de sample op de testkaart gedruppeld wordt van een filter voorzien.

Resultaten

Uit de samples voor routine COVID-19 PCR diagnostiek werden in totaal 120 PCR positieve samples geselecteerd, waarvan het transportmedium in 13 gevallen GLY medium betrof en in 107 gevallen Amies medium. Van de samples in Amies medium was in 47 gevallen voor de PCR uitvoering de DTT opkook methode gebruikt, en in 60 gevallen de EMAG/KF extractie. Een vergelijkbare hoeveelheid PCR negatieve samples per DTT/extractie methode werd geselecteerd.

Samples werden vanaf 22 september per dag geselecteerd op basis van de hoogste Ct waarden: i.e. laagste virale load (semi-quantitatieve maat voor de virale load) voor een kritische validatie. Ct waarden varieerden van 18,09 tot 34,13 voor PCR uitslagen met DTT methode, en van 14,91 tot 32,85 voor PCR uitslagen met EMAG/KF methode, en kunnen ingedeeld worden in Ct-groepen zoals weergegeven in tabel 1.

Om de waarde van de validatie beter in te kunnen schatten voor klinische toepassing kan gekeken worden naar de normaal verdeling van Ct waarden in de populatie. Hiervoor zijn de Ct waarden van alle van de GGD afkomstige positieve samples (totaal 8383) in de periode 1 tot 26 oktober in Ct-groepen verdeeld en de onderlinge verhouding in aantallen per groep uitgezet. Hetzelfde is gedaan voor de Ct waarden van de gebruikte samples in deze validatie (totaal 107) (zie Figuur 1.)

De sensitiviteit t.a.v. PCR-positieve DTT samples is **93,6%**. Drie samples (6,4%) testten aanvankelijk negatief met de antigeen test (Ct waarden: 28,86; 30,26; 34,13; zie ook tabel 2). Na herhaling van de antigeen test op deze drie samples werd een sensitiviteit van 97,9% verkregen (2/3 samples testten laag positief).

De specificiteit t.a.v. PCR-positieve DTT samples is **84,1%**. Alle fout-positieve samples zijn geconfirmemd met EMAG/KF PCR (in alle gevallen was de PCR uitslag met EMAG/KF methode negatief, net zoals met de DTT methode). Na herhaling van de antigeen test op deze aanvankelijk fout-positieve samples werd een specificiteit van **95,5%** verkregen. Zie ook tabel 3.

De sensitiviteit t.a.v. PCR-positieve EMAG/KF samples is **71,7%**. 17 samples (28,3%) testten aanvankelijk negatief met de antigeen test (voor verdeling Ct waarden van alle fout negatieve samples zie tabel 2). Na herhaling van de antigeen test op deze 17 samples werd een sensitiviteit van 73,3% verkregen.

De specificiteit t.a.v. PCR-positieve EMAG/KF samples is **98,3%**; 1 van 60 samples testte fout positief, ook na herhaling van de test (Ook met de DTT methode bleek dit sample PCR negatief) . Zie ook tabel 3.

Verificatie – validatie verslag

De overall sensitiviteit t.a.v. PCR-positieve samples is **81,3%**, en de specificiteit **97,1%**, na herhaling van de fout-positieve samples. Zie ook tabel 4.

Het percentage fout-negatieve uitslagen stijgt bij toenemende Ct waarde, dus bij een lagere virale load in het respiratoire materiaal (tabel 2).

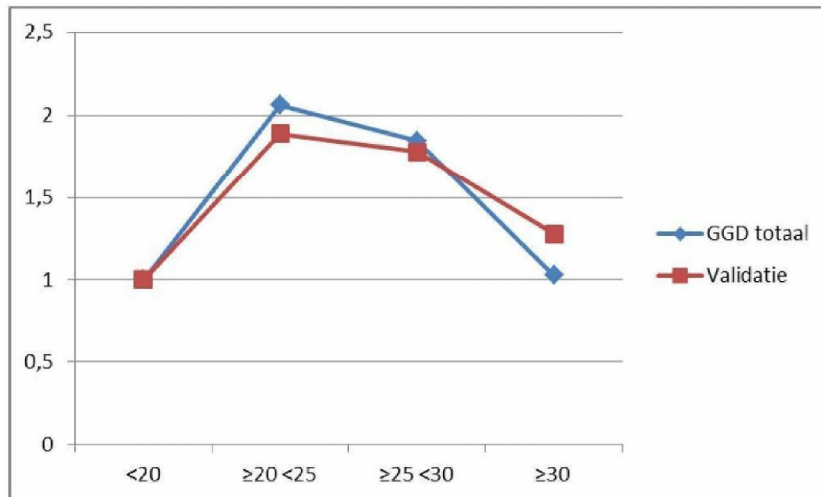
De inter-test variatie bedroeg 0,3-7,4%; de intra-test variatie bedroeg 1,1-8,1% (Tabel 5)

I.v.m. afwezigheid van antigeen testresultaten met PCR negatieve samples met GLY medium worden alle resultaten met betrekking tot dit medium vooralsnog buiten beschouwing gelaten.

DTT		
Ct waarde		Aantal samples
	< 20	2
	≥ 20, < 25	5
	≥ 25, < 30	22
	≥ 30	18
Aanvrager		Aantal samples
	GGD	45
	Travel health clinic	1
	Specialist ouderengnk	1
EMAG/KF		
Ct waarde		Aantal samples
	< 20	16
	≥ 20, < 25	29
	≥ 25, < 30	10
	≥ 30	5
Aanvrager		Aantal samples
	GGD	55
	Bureau Arbo & Milieu	2
	Anders	3

Tabel 1.

Verificatie – validatie verslag



Figuur 1. Verhouding tussen groepen Ct waarden van PCR positief geteste samples. X-as: groepen Ct waarden. Zie ook de tekst.

Ct waarde		Aantal samples fout-negatief/aantal samples getest
	< 20	0/18 (0%)
	≥ 20, < 25	6/34 (17%)
	≥ 25, < 30	7/32 (22%)
	≥ 30	7/23 (30%)
Aanvrager		Aantal samples
	GGD	18
	Bureau Arbo & Milieu	
	anders	2

Tabel 2. Aantal samples met fout-negatieve antigeentest per Ct-groep

Verificatie – validatie verslag

DTT (Amies)	Aantal:	1e resultaat		Sensitiviteit (%):	resultaat na herhalen		Sensitiviteit (%)na herhalen:
PCR +	47	Ag test +	44	93,6	Ag test +	46	97,9
		Ag test -	3		Ag test -	1	
				Specificiteit (%):			Specificiteit (%)na herhalen:
PCR -	44	Ag test -	37	84,1	Ag test -	42	95,5
		Ag test +	7		Ag test +	2	

EMAG/KG (Amies)	Aantal:	1e resultaat		Sensitiviteit (%):	resultaat na herhalen		Sensitiviteit (%)na herhalen:
PCR +	60	Ag test +	43	71,7	Ag test +	44	73,3
		Ag test -	17		Ag test -	16	
				Specificiteit (%):			Specificiteit (%)na herhalen:
PCR -	60	Ag test -	59	98,3	Ag test -	59	98,3
		Ag test +	1		Ag test +	1	

EMAG/KF (GLY)	Aantal:	1e resultaat		Sensitiviteit (%):	resultaat na herhalen		Sensitiviteit (%)na herhalen:
PCR +	13	Ag test +	9	69,2	Ag test +	11	84,6
		Ag test -	4		Ag test -	2	

Tabel 3. Sensitiviteit en specificiteit per soort medium en PCR procedure (DTT of EMAG/KF)

Amies	Aantal:	1e resultaat		Sensitiviteit (%):	resultaat na herhaling		Sensitiviteit (%)na Herhalen:
PCR +	107	Ag test +	87	81,3	Ag test +	90	84,1
		Ag test -	20		Ag test -	17	
				Specificiteit (%):			Specificiteit (%)na Herhalen:
PCR -	104	Ag test -	96	92,3	Ag test -	101	97,1
		Ag test +	8		Ag test +	3	

Tabel 4. Overall sensitiviteit en specificiteit voor samples in Amies medium

Inter test variatie				
	dag 1	dag 2	Gemiddelde	CV %
20327191	31,72	28,56	30,1	7,4
20327194	35,86	35,73	35,8	0,3
Intra test variatie				
	meting 1	meting 2	Gemiddelde	CV %
20327191	28,56	25,45	27,0	8,1
20327194	35,73	35,18	35,5	1,1

Tabel 5. Inter- en intra-test variatie.

Verificatie – validatie verslag

Conclusie

De SD Biosensor Standard F COVID-19 Ag FIA uitgevoerd met Amies medium (nasofarynx wat plus keelwat) voldoet aan de validatie criteria (sensitiviteit: 81,3%; specificiteit: 97,1% na herhaling van de laag positieven). Er kan een start gemaakt worden met de klinische validatie.

De volgende opmerkingen/overwegingen moeten daarin worden meegenomen:

De verschillen in sensitiviteit en specificiteit van de antigeen test tussen de DTT samples en EMAG/KF samples zijn moeilijk te verklaren en kunnen op toeval berusten dan wel op verschillen in prestaties tussen beide opwerkmethode voor PCR. Evenwel, in beide gevallen zit het antigeen in Amies medium gesuspendeerd en worden de buizen niet anders voorbereid alvorens er materiaal uitgehaald wordt voor de PCR of voor de antigeen test. Ook bleken de samples met een fout-positieve antigeen test (PCR-negatief met DTT) ook PCR-negatief met EMAG/KF, waardoor het verschil in opwerkmethode niet van invloed lijkt te zijn geweest op de specificiteit van de antigeentest. In de praktijk worden deze twee opwerkmethode naast elkaar gebruikt.

De fout positieve samples hebben een waarde in de antigeen test vlak boven de afkap waarde 1,0 (1,09-2,21). Een optie zou kunnen zijn, bij klinisch gebruik, om alle positieve testen tussen 1,0 en 1,5 direct te hertesten. In de huidige technische validatie levert dit een specificiteit van 97,1 %.

Het merendeel van de fout-positieven (7/8) zijn getest in een fase voordat SD-Biosensor de filter plaatste in de nozzle-cap. Na invoering van de filter vonden wij ook een aanzienlijke toename van fout-negatieven samples (3/19 (15%)) >> 17/43 (40%). Het kan zijn het filter te veel antigeen tegenhoud, wat de specificiteit ten goede komt maar ten koste gaat van de sensitiviteit. Dit moet verder uitgezocht worden en bij de evaluaties voor klinische toepassing worden meegenomen.

De kans op een fout negatieve uitslag wordt groter bij een lagere virale load. Een lagere virale load kan gepaard gaan met een lagere kans op transmissie. Hoe deze zich precies aan elkaar verhouden is nog onduidelijk. Een fout negatieve antigeen test kan evenwel soms optreden bij een sample met een relatief lage Ct waarde (bv. Ct 21,44 (EMAG/KF)). Een factor die een rol zou kunnen spelen zou bv. productie van neutraliserende antistoffen kunnen zijn. Mogelijk dat de duur van de infectie/klachten (in relatie met de antistof respons) een bepalende factor kan zijn.

In de validatie zijn geen samples met CT waarden > 34,13 opgenomen. Echter de gevalideerde materialen zijn representatief voor wat er in de GGD populatie gevonden wordt, en er wordt in de validatie enigszins geskewed naar de hogere Ct waarden (lagere virale loads), zoals te zien is in Figuur 1. De verwachting is dan ook dat de sneltest in de praktijk beter zal presteren doordat de groep met hogere virale loads in werkelijkheid groter dan die opgenomen is in deze technische validatie. De materialen zijn binnen een dag na PCR uitslag getest met de antigeen test (vers materiaal). De GGD samples zijn in de regel van patiënten met milde klachten, conform de huidige testcriteria van het RIVM. Samples van asymptomatische patiënten zijn in deze validatie dus niet vertegenwoordigd.

Ct waarden met DTT methode verkregen liggen in de regel iets hoger dan met EMAG/KF.

De positief voorspellende waarde (PPV) en negatief voorspellende waarde (NPV) van de test zijn afhankelijk van de prevalentie. Bij sensitiviteit 81,3%; specificiteit 97,1% (na herhalen van zwak positieve samples):

prevalentie %	PPV	NPV
1	22	100
5	60	99
10	76	98
15	83	97
20	88	95

Verificatie – validatie verslag

VERTROUWELIJK