

Rapportage

Status validatie van ELISA en auto-analyzer antilichaam testen voor diagnostiek van SARS-CoV-2; overwegingen voor gebruik

Status per 30 april 2020

Met dank aan de laboratoria die data gedeeld hebben:

Atalmedial, Amsterdam

Centraal bacteriologisch en serologisch laboratorium, Hilversum

Centrum voor Infectieziekteonderzoek Diagnostiek en laboratorium surveillance, RIVM, Bilthoven

Laboratorium voor Medische Microbiologie en Immunologie, Admiraal de Ruyter Ziekenhuis, Goes

Laboratorium voor Medische Microbiologie en Immunologie, Elisabeth-TweeSteden Ziekenhuis, Tilburg

Laboratorium voor Medische Microbiologie en Infectieziekten, Isala Klinieken, Zwolle

Laboratorium voor Medische Microbiologie, Stichting PAMM, Veldhoven

Medische Microbiologie en Immunologie, Sint Antonius Ziekenhuis, Nieuwegein

Medische Microbiologie en Infectiepreventie, Franciscus Gasthuis & Vlietland, Rotterdam

Medische Microbiologie, Maastricht Universitair Medisch Centrum, Maastricht

Sanquin Bloedvoorziening, Amsterdam

Stichting Star-SHL, Etten-Leur en Rotterdam

Viroscience, Erasmus Medisch Centrum, Rotterdam

Status validatie ELISA en auto-analyzers: versie 30 april 2020

Werkgroep serologie, onderdeel van Landelijke Coördinatiestructuur Testcapaciteit

5.1.2e, RIVM - Centrum IDS, coördinator
5.1.2e, ElisabethTweesteden Ziekenhuis
5.1.2e, RIVM - Centrum IDS
5.1.2e, RIVM - Centrum IDS
5.1.2e, Amphia Ziekenhuis, ElisabethTweesteden Ziekenhuis, Julius Center UMCU
5.1.2e, Stichting PAMM
5.1.2e, Sanquin Bloedvoorziening, Amsterdam UMC
5.1.2e, Maastricht UMC+
5.1.2e, Viroscience Erasmus MC
5.1.2e, Viroscience Erasmus MC

Dit is een levend document. Regelmatig zal de data in dit verslag worden geüpdatet, afhankelijk van validatie gegevens die gedeeld worden door laboratoria.

Versiebeheer:

Versie 30 april 2020: eerste versie

Status validatie ELISA en auto-analyzers: versie 30 april 2020

Inhoudsopgave

1	Achtergrond en overwegingen	4
1.1	Inleiding: de mogelijkheden van antilichaam testen	4
1.2	De beperkingen van antilichaamtesten	5
1.3	Welke foutmarge is acceptabel?.....	7
1.4	Advies om verstandig gebruik te maken van antilichaamtesten	8
2.	Status validatie ELISA en serologie auto-analyzers.....	9
3	Resultaten en conclusies validatie ELISA in Nederlandse laboratoria	10
3.1	Afbakening en criteria	10
3.2	Resultaten en conclusies per ELISA of auto-analyzer	11
3.3	Correlatie positieve uitslag in ELISA met aanwezigheid neutraliserende antilichamen.....	13
3.4	Samenvatting eerste laboratorium resultaten.	14
3.5	Voorlopige conclusie op grond van eerste laboratorium resultaten.....	15
4	Stappenplan voor de nabije toekomst.....	16
BIJLAGEN	Voorlopige resultaten per lab in detail	16

1 Achtergrond en overwegingen

In hoofdstuk 1 worden de achtergronden en overwegingen met betrekking tot het gebruik van antilichaam testen toegelicht voor een breder publiek. Inhoudsdeskundigen wordt geadviseerd om te starten bij hoofdstuk 2, vanaf hier zijn de meer technische aspecten van dit rapport beschreven.

1.1 Inleiding: de mogelijkheden van antilichaam testen

Antilichamen worden door het lichaam gemaakt als reactie op het binnendringen van een lichaamsvreemde stof en vormen een onderdeel van het afweersysteem. Antilichamen en afweercellen bestrijden samen een binnendringend ziekteverwekker en kunnen een rol spelen bij de bescherming tegen een volgende infectie met deze ziekteverwekker. Het kan enige tijd (meerdere weken) duren voordat de antilichaamproductie op gang komt. Antilichamen worden voor iedere ziekteverwekker op maat gemaakt, dat wil zeggen dat ze betrekkelijk specifiek zijn. Antilichamen tegen influenza virus binden niet met een coronavirus en vice versa, maar binnen groepen van verwante virussen kan er wel sprake zijn van enige mate van kruisreactiviteit.

Wanneer antilichamen bescherming bieden tegen nieuwe infecties spreekt men van beschermende antilichamen. De aanwezigheid hiervan wijst op (gedeeltelijke) immuniteit. Bij een groot aantal ziekteverwekkers zijn antilichamen hiertoe in staat. Soms zijn de ontsnappingsmechanismen van ziekteverwekkers echter zo goed, dat zelfs grote hoeveelheden antilichamen geen bescherming bieden. Het varieert per ziekteverwekker of antilichamen wel of geen immuniteit geven.

Mogelijke toepassingen van antilichaamtesten zijn:

- Onderzoeken of iemand (recent of in het verleden) een infectie heeft doorgemaakt
- Onderzoeken of iemand immuun is

In de huidige SARS-CoV-2 pandemie klinkt een sterke roep om antilichaamtesten te gebruiken om te bepalen welk deel van de bevolking de virusinfectie al heeft doorgemaakt om vast te stellen wie mogelijk immuun is. Dat zou tal van mogelijkheden bieden, zoals differentiatie van beleid voor mensen die mogelijke immuniteit hebben versus mensen die nog geen immuniteit hebben. Als bekend is hoe groot het deel van de bevolking is dat immuniteit heeft, kan gemodelleerd worden wat de effecten van (versoepeling van) maatregelen zijn. Hierbij wordt er vaak ten onrechte vanuit gegaan dat de aanwezigheid van antilichamen correleert met een totale immuniteit tegen re-infectie. De World Health Organization (WHO) waarschuwde er op 24 april dan ook voor om op basis van antilichaam detectie veronderstellingen te doen ten aanzien van bescherming tegen tweede infecties en op basis hiervan persoon specifieke maatregelen te ontwikkelen (<https://www.who.int/news-room/commentaries/detail/immunity-passports-in-the-context-of-covid-19>).

In reactie op de groeiende behoefte naar wereldwijde testcapaciteit tijdens de COVID-19 pandemie, worden door verschillende fabrikanten enzym-linked immunosorbent assays (ELISA) en auto-analyzer antilichaamtesten aangeboden. Deze testen kunnen binnen een laboratorium setting gebruikt worden om aanwezigheid van antilichamen tegen SARS-CoV-2 in serum van patiënten te bepalen om te onderzoeken of iemand COVID-19 heeft of heeft doorgemaakt in het (recente) verleden.

Binnen de virologie wordt naast antilichaamtesten ook nog gebruik gemaakt van virus neutralisatie testen (VNT, PRNT). Daarbij wordt gebruik gemaakt van het feit dat specifieke antilichamen in serum de vermeerdering van virussen in celwee kunnen remmen. Dit wordt in het algemeen gezien als

Status validatie ELISA en auto-analyzers: versie 30 april 2020

aanwijzing voor de aanwezigheid van mogelijke beschermende antilichamen. Er zijn echter in Nederland nog maar enkele laboratoria die virussen routinematig kweken. Voor SARS-CoV-2 komt daar nog bij dat het kweken onder zeer stringente veiligheidscondities moet worden gedaan (BSL3 condities). Virus neutralisatie testen t.b.v. humane diagnostiek zijn op dit moment, voor zover bekend, beschikbaar bij RIVM-IDS en Erasmus MC. Voorlopige resultaten laten zien dat ELISA testen een goede correlatie kunnen hebben met virus neutraliserende antilichamen voor SARS-CoV-2 (Okba et al., Emerg Infect Dis. 2020 Apr 8;26 (7)).

In dit verslag worden overwegingen met betrekking tot antilichaamtesten beschreven. Ook is een eerste vergelijkende studie van ELISA en auto-analyzer testen voor detectie van antilichamen van SARS-CoV-2 die in Nederlandse laboratoria geëvalueerd zijn uitgevoerd en worden de voorlopige resultaten en conclusies gedeeld. Al naar gelang er meer validatie gegevens binnenkomen bij de werkgroep serologie zal dit rapport wekelijks ge-updatet worden.

1.2 De beperkingen van antilichaamtesten

De beperkingen van de antilichaamtesten vallen in twee grote categorieën uiteen, namelijk I) de menselijke biologie en II) de eigenschappen van de antilichaamtesten.

Beperkingen die onderdeel zijn van de biologie van antilichamen:

- 1) Het duurt enige tijd voordat antilichamen gevormd zijn. De eerste berichten mbt SARS-CoV-2 laten zien dat het een maand na de 1^e ziektedag duurt totdat >90% van de geïnfekteerden antilichamen gevormd heeft. Dat is tijdens een snel verspreidende epidemie een beperking, want hierdoor zal een groot deel van de mensen een negatieve antilichaamtest hebben in de eerste weken na infectie. Resultaten van antilichaamtesten lopen minimaal twee tot vier weken achter bij het werkelijke aantal besmettingen. Vanwege bovengenoemde redenen is vaak een tweede bloedmonster nodig om vast te kunnen stellen of iemand recent een infectie tegen een virus heeft doorgemaakt. In de opeenvolging wordt gekeken naar de kinetiek van antilichamen, zoals omslag van negatief naar positief, toename van positiviteit of verandering van klasse antilichaam (bijvoorbeeld overgang van IgM naar IgG).
- 2) Er zijn verschillende soorten antilichamen tegen verschillende delen van het virus en de nu beschikbare testen verschillen in wat ze meten. Voor een betrouwbare interpretatie van de uitslag is het belangrijk om precies te weten hoe de testen zijn opgebouwd. Die informatie is niet altijd beschikbaar (bedrijfsvertrouwelijk). Door die verscheidenheid aan antigenen en aan menselijke immuunrespons is het dus ook noodzakelijk de testen afzonderlijk te evalueren voordat ze ingezet worden.
- 3) Een deel van de mensen die met SARS-CoV-2 geïnfecteerd zijn geraakt en asymptomatisch zijn gebleven of slechts milde klachten hebben gehad, lijkt nauwelijks of geen antilichamen te vormen. Dit blijkt uit huidig preliminair onderzoek, maar wordt bijvoorbeeld ook gezien bij asymptomatische infecties met H5N1 (Yongchen et al. Emerg Microbes Infect, 2020: 1-14) . Dat betekent dat bij bevolkingsonderzoek of onderzoek van mensen in kritische beroepen het werkelijke aantal besmettingen onderschat zal worden. Het is niet duidelijk hoe groot die onderschatting is, omdat nog onvoldoende onderzoek is gedaan naar asymptomatische en milde infecties met SARS-CoV-2 om deze vraag te kunnen beantwoorden. Het is ook niet duidelijk of mensen met lage antilichaam niveaus misschien toch deels beschermd zijn.
- 4) Antilichamen zijn 'plakkerige eiwitten' die doorgaans niet zo specifiek zijn als we voor onze vraagstellingen zouden wensen. Voor de vraag of mensen de infectie al hebben doorgemaakt is een gebrek aan voldoende specificiteit problematisch, omdat SARS-CoV-2 verwant is aan andere coronavirussen die veelvuldig voorkomen. Er kan ook sprake zijn van storende factoren die niets met infecties te maken hebben zoals rheumafactoren. De antilichamen die

Status validatie ELISA en auto-analyzers: versie 30 april 2020

- je detecteert met een SARS-CoV-2 test, kunnen in werkelijkheid antilichamen tegen een ander coronavirus zijn. Een gebrek aan specificiteit leidt dus tot fout-positieve testuitslagen.
- 5) Antilichamen verdwijnen vaak na enige tijd. De snelheid waarmee antilichamen verdwijnen is onderhevig aan persoonlijke variatie en is afhankelijk van de ziekteverwekker en de ernst van de doorgemaakte infectie. Het verdwijnen van antilichamen leidt tot negatieve testuitslagen, die kunnen leiden tot de onterechte conclusie dat iemand de infectie niet heeft doorgemaakt. Dit leidt in een bevolkingsonderzoek tot een onderschatting van het aantal mensen dat de infectie heeft doorgemaakt.
 - 6) We weten voor SARS-CoV-2 nog niet of en in welke mate de aanwezigheid van antilichamen samenhangt met immuniteit. Hoewel het aannemelijk is dat er wel sprake is van enige mate van immuniteit, is voorzichtigheid geboden gezien de ruime ervaring met andere respiratoire ziekteverwekkers waaruit blijkt dat die samenhang niet vanzelfsprekend is. In parallel met andere respiratoire ziekteverwekkers inclusief de vier "gewone verkoudheidscoronavirussen" wordt er momenteel vanuit gegaan dat re-infecties mogelijk zullen zijn waarbij men waarschijnlijk (veel) minder ziek wordt maar wel besmettelijk kan zijn (Callow et al. Epidemiol Infect, 1990. 105(2): 435-46). Dit kan niet uitgesloten worden en onderzoek hiernaar in de komende jaren zal hierover duidelijkheid gaan geven. Op 24 april heeft de World Health Organization gesteld dat er niet voldoende bewijs is dat aanwezigheid van antilichamen tegen SARS-CoV-2 beschermt tegen een tweede infectie (<https://www.who.int/news-room/commentaries/detail/immunity-passports-in-the-context-of-covid-19>). Daarom is het dan ook niet veilig om mensen met antilichamen zonder beschermende maatregelen voor COVID-19 patiënten te laten zorgen.

Beperkingen van antilichaamtesten:

Antilichaamtesten worden ontwikkeld voor specifieke toepassingen. Een antilichaamtest die bedoeld is om acute infecties bij zieke patiënten aan te tonen moet aan andere eisen voldoen dan een test voor een bevolkingsonderzoek of een test om een doorgemaakte infectie bij gezondheidswerkers mee vast te stellen. Als een test buiten de beoogde toepassing wordt ingezet worden onbetrouwbare resultaten gegenereerd.

Hier volgen specifieke problemen van antilichaamtesten:

- 1) De testen zijn niet gevalideerd voor het doel waarvoor ze worden gebruikt of verkocht. Veel van de nu aangeboden testen zijn gevalideerd door onderzoek met COVID-19 patiënten met ernstige klachten, in vergelijking met gezonde personen. Dit zijn de twee uitersten van het spectrum en er is onvoldoende informatie om uitspraken te kunnen doen over de mate van kruisreacties (fout positieve test uitslagen) of de gevoeligheid van testen bij mensen die milde infectie hebben gehad of asymptomatisch zijn gebleven (fout negatieve test uitslag).
- 2) Gebrek aan sensitiviteit: de sensitiviteit is het vermogen van een test om de beoogde antilichamen te detecteren. De antilichamen worden gedetecteerd (gebonden) door deze te vangen met componenten van de ziekteverwekker. Om goed te werken moeten de juiste componenten van de ziekteverwekker worden gebruikt en moet de 3D-vorm van deze componenten goed bewaard zijn gebleven. Dat laatste blijkt lang niet altijd goed te lukken. Daarnaast moet ieder lichaam 'het wiel zelf uitvinden' met het maken van de juiste antilichamen. Daardoor bestaan er individuele verschillen tussen de antilichamen die aangemaakt worden. Componenten waar één persoon antilichamen tegen maakt, worden niet gemaakt door een ander persoon. Deze factoren zorgen ervoor dat veel antilichaamtesten geen sensitiviteit van of in de buurt van 100% hebben. Een gebrek aan sensitiviteit zorgt voor fout-negatieve uitslagen.

Status validatie ELISA en auto-analyzers: versie 30 april 2020

- 3) Gebrek aan specificiteit: de specificiteit is het vermogen van een test om mensen zonder de beoogde antilichamen (dus die de infectie niet hebben doorgemaakt) als negatief af te geven. Antilichamen zijn plakkerige substanties. Ze blijven soms aan testcomponenten plakken die er niet toe doen. En als ziekteverwekkers aan elkaar verwant zijn, kunnen antilichamen van de ene ziekteverwekker binden aan componenten van de andere ziekteverwekker. Een goede antilichaamtest maakt gebruik van componenten van de ziekteverwekker die zo uniek mogelijk zijn. Als de specificiteit lager is dan 100% betekent dit dat er fout-positieve uitslagen ontstaan.
- 4) De antilichaam testen die de hoeveelheid beschermende antilichamen meten zijn bewerkelijk en lastig op grote schaal uit te voeren. De beschikbare commerciële testen zijn meestal niet gevalideerd voor geschiktheid voor het meten van beschermende antilichamen.
- 5) Omdat het om detectie van antilichamen tegen een nieuw virus gaat, betreft het in deze situatie een nieuwe methode en is er in deze fase maar zeer beperkte ervaring opgedaan. Gebruik van deze testen in grote groepen zal mogelijke problemen aan het licht brengen zoals bijv. fout positieve of fout negatieve reacties bij gebruik van bepaalde medicijnen, andere gevoeligheid bij verschillende leeftijdsgroepen of tijdens zwangerschap, stabiliteit van de testen na bewaren etc.
- 6) Er is vaak beperkte informatie beschikbaar over de patiënten waarvan het serum is gebruikt om de prestatiekenmerken van de test mee vast te stellen. Relevante informatie die mist is onder andere: 1) het moment van afname ten opzichte van de eerste ziektedag, 2) hoe ernstig ziek de patiënten waren, 3) welke patiëntkenmerken hoorden bij de negatieve monsters en of 4) gekeken is naar kruisreactiviteit met antilichamen tegen andere humane coronavirussen. Punten 1 en 2 zijn bepalend voor de sensitiviteit van de test, punten 3 en 4 voor de specificiteit. Omdat informatie over deze punten vaak ontbreekt, moeten de ELISA en auto-analyzer testen nauwkeurig beoordeeld worden, zodat kan worden bepaald in welke populatie en op welk moment na de infectie ze bruikbaar zijn.

1.3 Welke foutmarge is acceptabel?

De eerdergenoemde beperkingen geven een indruk van de complexiteit van antilichaamtesten. Tot op de dag van vandaag bestaat er geen enkele antilichaamtest die onfeilbaar is – ook niet als het gaat om ver uitontwikkelde testen zoals testen voor HIV. De testen die ontwikkeld zijn tegen SARS-CoV-2 zitten nog in het beginstadium van ontwikkeling en de betrouwbaarheid is van een groot aantal van deze testen nog maar beperkt of vrijwel niet onderzocht. Voordat een test gebruikt kan worden, moeten de prestatiekenmerken eerst goed worden onderzocht. Hoe vaak mag een test een onjuiste uitslag geven om bruikbaar te zijn? Dat hangt af van de consequenties die men aan de uitslag verbindt. Als iemand slechts uit interesse wil weten of hij of zij SARS-CoV-2 heeft doorgemaakt, heeft een onjuiste uitslag waarschijnlijk weinig gevolgen. Als iemand met een fout-positieve uitslag meent immuun te zijn en daardoor risicovol gedrag gaat vertonen kan dat ernstige gevolgen hebben. In de extreme situatie dat maatregelen in het land pas zouden worden afgeschaald op basis van de veronderstelling dat een groot deel van de bevolking immuun is (waarbij modellering duidt op een noodzakelijke 50-60% immuniteit onder de algemene bevolking), terwijl een groot deel van de testuitslagen waarmee dit vastgesteld is fout-positief is, ontstaat er opnieuw een grote uitbraak. Als een groot deel van de uitslagen fout-negatief is, zouden maatregelen onnodig lang kunnen worden aangehouden. Dit staat nog los van het feit dat momenteel nog niet voldoende bekend is in hoeverre de aanwezigheid van IgG samenhangt met daadwerkelijke bescherming.

De antilichaamtesten die nu massaal worden aangeboden voor detectie van antilichamen tegen SARS-CoV-2 zijn meestal ontwikkeld om infecties aan te tonen bij mensen die (recent) flinke klachten

Status validatie ELISA en auto-analyzers: versie 30 april 2020

hebben (gehad) van de infectie. Deze testen zijn voornamelijk geëvalueerd met monsters van patiënten uit het ziekenhuis. Dat is een selectieve patiëntenpopulatie met ernstige klachten, waarbij we inmiddels weten dat grote hoeveelheden antilichamen worden geproduceerd. Er is in deze evaluaties niet of nauwelijks gekeken naar monsters van mensen met milde klachten of asymptomatische infecties. Ook is niet goed gekeken naar de kruisreactiviteit met andere coronavirussen of allerlei andere condities bij mensen die tot kruisreactiviteit leiden.

Een rekenvoorbeeld:

Stel dat 3% van de Nederlandse bevolking een SARS-CoV-2 infectie heeft doorgemaakt. We gaan dit proberen vast te stellen met een serologische test die een sensitiviteit heeft van 99% en een specificiteit van 97%. Dat zijn uitstekende testkarakteristieken voor een serologische test. Veel goed ontwikkelde antilichaamtesten die dagelijks in ziekenhuizen, waarbij een hoge a priori kans op de aandoening groot is, gebruikt worden halen deze specificaties niet. De bevolking testen met een dergelijke test zou er echter toe leiden dat ongeveer de helft van alle positieve testresultaten onjuist is! De positief voorspellende waarde is 50%. De test doet het dan net zo goed als het opgooien van een munt. Is dat acceptabel?

Hoe kan dit? Van de 100 mensen hebben slechts 3 de infectie doorgemaakt. De test heeft een specificiteit van 97%, dus 3 mensen krijgen een fout positieve uitslag. Wel worden bijna alle 3 geïnfecteerde mensen gevonden met een sensitiviteit van 99%. Maar van de positieve uitslagen is dus 3/6 terecht. De test heeft een lage positief voorspellende waarde. De negatief voorspellende waarde is wel veel beter (99,9%).

Als 20% van de bevolking SARS-CoV-2 heeft doorgemaakt, is de positief voorspellende waarde met dezelfde test ~93%. Dat is al een stuk beter. In een ziekenhuispopulatie, waar de a priori kans op een bepaalde aandoening hoog is, omdat de test met de reden van een gerichte verdenking wordt aangevraagd, is het probleem van gebrek aan specificiteit minder groot dan bij een ongerichte screening waarbij de prevalentie veel lager is. Dit geeft aan dat een test niet los kan worden gezien van de populatie en situatie waarin deze wordt toegepast. Daarom zijn de resultaten van antilichaamtesten niet gemakkelijk te interpreteren.

1.4 Advies om verstandig gebruik te maken van antilichaamtesten

De antilichaamtesten tegen SARS-CoV-2 zijn zeer recent ontwikkeld. Ze zijn ontwikkeld om infecties vast te stellen bij patiënten die in de ziekenhuizen terecht komen: mensen die flinke klachten behorende bij COVID-19 hebben en met een hoge a priori kans op een infectie met SARS-CoV-2. De specificaties lijken indrukwekkend, maar onafhankelijk onderzoek dat tot nu toe verricht is laat zien dat die specificaties niet waargemaakt kunnen worden als een bredere populatie patiënten wordt getest. Een toepassing van de testen buiten de beoogde doelgroep van de test leidt tot veel onjuiste uitslagen. Ondanks de grote haast die er is, is het niet wenselijk om testen in te zetten voordat deze de noodzakelijke grondige evaluatie hebben gehad.

In de hoofdstukken 2 en 3 hieronder worden voorlopige resultaten van onderzoeken in Nederland naar de mogelijke toepassingen van ELISA en serologische testen met auto-analyzers gedeeld.

Status validatie ELISA en auto-analyzers: versie 30 april 2020

2. Status validatie ELISA en serologie auto-analyzers

Status per 30 april 2020

Inventarisaties naar de status van validatie van serologische testen zijn uitgevoerd via de Nederlandse Vereniging voor Medische Microbiologie (NVMM). Op deze inventarisaties hebben 51 laboratoria gereageerd, en hieruit bleek dat ELISA of auto-analyzer testen (IgM en IgG) van 11 verschillende fabrikanten op 30 april 2020 in verschillende stadia van validatie verkeren in Nederland. De selectie van deze testen door de laboratoria heeft plaatsgevonden op basis van beschikbaarheid. In totaal zijn er 92 verschillende ELISA testen beschikbaar op de wereldmarkt op 30 april 2020 (<https://www.finddx.org/>). In tabel 1 staan 18 ELISA en auto-analyzer testen die zich in Nederland in een stadium van validatie bevinden waaronder negen testen waarvoor de validaties nog niet gestart zijn. Deze lijst is samengesteld op basis van de informatie van de 51 laboratoria die hebben gereageerd op de uitvraag en is mogelijk niet volledig.

Tabel 1. ELISA en serologische auto-analyzers in verschillende stadia van validatie in Nederland per 30 april 2020

Test	Fabrikant	Soort	Certificaat	Status validatie (n labs)		
				Afgerond	Bezig	Planning
Wantai SARS-CoV-2 Ab ELISA	Beijing Wantai Biological	ELISA	CE-IVD	8	3	8
Wantai SARS-CoV-2 IgM ELISA	Beijing Wantai Biological	ELISA	CE-IVD	5	1	3
EUROIMMUN SARS-CoV-2 IgG	EUROIMMUN AG	ELISA	CE-IVD	4	3	9
EUROIMMUN SARS-CoV-2 IgA	EUROIMMUN AG	ELISA	CE-IVD	4	2	5
LIAISON SARS-CoV-2 IgG*	Diasorin	AA	CE-IVD	1	0	12
EDI Novel Coronavirus COVID-19 ELISA IgG	Epitope Diagnostics Inc	ELISA	CE-IVD	1	1	4
EDI Novel Coronavirus COVID-19 ELISA IgM	Epitope Diagnostics Inc	ELISA	CE-IVD	0	1	4
SARS-CoV-2 IgG ELISA kit	Creative Diagnostics	ELISA	RUO	0	0	1
SARS-CoV-2 IgM ELISA kit	Creative Diagnostics	ELISA	RUO	0	0	1
COVID-19 IgG ELISA Assay	Eagle Biosciences, Inc.	ELISA	RUO	0	0	1
COVID-19 IgM ELISA Assay	Eagle Biosciences, Inc.	ELISA	RUO	0	0	1
Platelia SARS-CoV-2 Total Ab	Bio-Rad Laboratories	ELISA	CE-IVD	0	0	1
MAGLUMI 2019-nCoV IgG (CLIA)	Snibe Co. Ltd.	ELISA	CE-IVD	0	0	1
MAGLUMI 2019-nCoV IgM (CLIA)	Snibe Co. Ltd.	ELISA	CE-IVD	0	0	1
ARCHITECT SARS-CoV-2 IgG assay	Abott core laboratory	AA	CE-IVD	1	0	4
COVID-19 VIRCLIA [®] IgG monotest	Vircell S.L.	AA	CE-IVD	0	0	2
COVID-19 VIRCLIA [®] IgM+IgA monotest	Vircell S.L.	AA	CE-IVD	0	0	2
recomWell SARS-CoV-2 IgG	Mikrogen Diagnostik	ELISA	CE-IVD	0	0	1

AA=auto-analyzer. *Beschikbaar vanaf eind april

De uitvoering van de plannen die er nog zijn voor verder onderzoek en validatie naar deze ELISA en auto-analyzer testen is afhankelijk van de beschikbaarheid en levering van de kits. Verschillende laboratoria geven aan dat er problemen zijn met levering bij enkele van de hierboven beschreven kits. Dit heeft er toe geleid dat sommige validaties minder uitgebreid zijn uitgevoerd dan wenselijk. Dit benadrukt het belang van het gecoördineerd verzamelen van data met betrekking tot de testen van verschillende laboratoria zoals in deze rapportage waarmee dat gedeeltelijk ondervangen kan worden.

3 Resultaten en conclusies validatie ELISA in Nederlandse laboratoria

3.1 Afbakening en criteria

Status per 230 april 2020

De resultaten die beschikbaar zijn van validaties van ELISA en auto-analyzers voor SARS-CoV-2 per 30 april 2020 zijn de eerste resultaten van beperkte validaties, omdat veel kits niet in grote aantallen beschikbaar zijn. De data in dit verslag kan daarom gezien worden als een eerste screening door Nederlandse laboratoria. Er zijn ook eerste publicaties van de evaluatie van ELISA voor SARS-CoV-2 beschikbaar (Okba et al., Emerg Infect Dis. 2020 Apr 8;26 (7); Lassaunière et al. MedRxiv. 10 April 2020. <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.04.09.20056325v1>).

In de bijlagen zijn de beschikbare voorlopige rapporten van de laboratoria die ELISA of auto-analyzer testen hebben gevalideerd/geëvalueerd bijgevoegd, hierin staan details over sensitiviteit en specificiteit in verschillende geteste patiënten populaties, tijdstip van afname na eerste ziekte dag en eventueel uitgevoerde neutralisatietesten. De resultaten in deze rapporten zijn voorlopig, op veel laboratoria worden nog vervolgonderzoeken uitgevoerd met bijvoorbeeld andere patiënten groepen.

Omdat SARS-CoV-2 nog maar recent in Nederland is geïntroduceerd is voornamelijk de sensitiviteit en specificiteit van de IgG antilichamen (versus IgA en IgM) van belang als marker voor het hebben doorgemaakt van de infectie. Het gebruik van serologie voor de acute patiënten zorg wordt slechts als incidenteel noodzakelijk gezien. Criteria waaraan antilichaam testen moeten voldoen verschillen afhankelijk van de toepassing van de test. In deze eerste screening van ELISA en auto-analyzer testen zijn de volgende criteria gehanteerd (expert opinion):

- Voor individuele patiënten diagnostiek: IgG en IgM antilichamen: beide *apart* een specificiteit >98% en sensitiviteit >95% vanaf 10 dagen¹ na ontstaan klachten
- Wanneer door (inter)nationaal onderzoek beter inzichtelijk is geworden hoe aanwezigheid van antistoffen een indicatie kan zijn voor aanwezigheid van beschermende immuniteit tegen herinfectie (en mogelijk een verminderde besmettelijkheid) kan het testen of mensen in specifieke (sub)populaties, bijvoorbeeld zorgmedewerkers en mantelzorgers, een SARS-CoV-2 infectie hebben doorgemaakt zinvol zijn. Bijvoorbeeld met als mogelijk doel aanpassen zekere controle maatregelen: Alleen IgG: specificiteit >98%, sensitiviteit >85% vanaf 10 dagen¹ na ontstaan klachten.
- Epidemiologische sero prevalentie studies: Alleen IgG: specificiteit >98%, sensitiviteit >95%

Dit zijn geen absolute criteria, maar een advies vanuit de Taskforce serologie gebaseerd op expert opinion. De toepasbaarheid van deze criteria zal per situatie afgewogen moeten worden door de lokale experts.

¹ Uit internationale overleggen, o.a. in de WHO labtechnische werkgroep, komt steeds meer naar voren dat pas 4 weken na start symptomen met de hoogste zekerheid op basis van serologie gesteld kan worden of iemand een infectie heeft doorgemaakt. Dit is een levend document en aanpassingen worden voorzien naarmate data omtrent de kinetiek van immunologische responses in verschillende populaties robuuster wordt.

Status validatie ELISA en auto-analyzers: versie 30 april 2020

3.2 Resultaten en conclusies per ELISA of auto-analyzer

Status per 30 april 2020

De resultaten en conclusies per ELISA voor detectie van antilichamen zijn hieronder beschreven voor vier achtereenvolgende punten:

- a. sensitiviteit bij RT-PCR geconfirmeerde patiënten met ernstige klachten in het ziekenhuis en bij gebruik sera afgenomen > 10 dagen na de eerste ziektedag.
- b. sensitiviteit bij RT-PCR geconfirmeerde patiënten met ernstige klachten in het ziekenhuis en bij gebruik sera afgenomen binnen 10 dagen na start klachten.
- c. sensitiviteit in RT-PCR-geconfirmeerde populaties met geen of milde klachten
- d. sensitiviteit bij patiënten met een positieve neutralisatie titer (PRNT/VNT50; VNT90)
- e. specificiteit.

Indien meerdere laboratoria dezelfde test hebben geëvalueerd wordt bij a, b en c een samenvatting van meerdere resultaten gegeven. Voor de specificiteit zoals vermeld onder d, zijn alle groepen getest door de verschillende laboratoria bij elkaar genomen om de totale specificiteit te berekenen.

Wantai SARS-CoV-2 Ab ELISA (8 labs; totaal panel sensitiviteit n=561, specificiteit n=716)

- a. De sensitiviteit (100%, n=266) voor diagnose bij patiënten met een ernstige infectie, waarbij materiaal is afgenomen >10 of >14 dagen na 1^e ziektedag voldoet aan de vooraf gestelde criteria.
- b. Wisselende sensitiviteit bij patiënten met een ernstige infectie, waarbij materiaal is afgenomen binnen 10 of 14 dagen of met een onbekend aantal dagen na 1^e ziektedag. Deze groepen zijn te verschillend om samen te nemen ten behoeve van dit overzicht. Voorlopige resultaten laten de volgende sensitiviteit zien wat betreft verschillende duur van monsternamen na 1^e ziektedag:
 - <7 dagen: 31% (n=26)
 - <10 dagen of onbekend: 59-77% (n=66)
 - >7 dagen: 75% (n= 36, meeste sera zijn afgenomen van 7 tot 14 dagen na 1^e ziektedag)
 - 4-20 dagen: 92% (n=12)
 - 1-33 dagen: 89% oplopend tot 95% bij afname vervolgsersa (n=37)
- c. De sensitiviteit (95-100%, n =42) in populaties met milde of asymptomatische klachten, bij sera waarvan de meesten zijn afgenomen >10 dagen na 1^e ziektedag voldoet aan de vooraf gestelde criteria. Omdat dit percentage gebaseerd is op een beperkte set monsters, is bevestiging met grotere monsteraantallen nodig.
- d. Goede correlatie met neutraliserende antilichamen met een sensitiviteit van 100% (n=46) bij titer in VNT50%, 99% (n=84) bij titer in VNT90%, en 99% (n=76) bij titer in PRNT50.
- e. De specificiteit voldoet aan de vooraf gestelde criteria met 99,6% (n=716)

Wantai SARS-CoV-2 IgM ELISA (5 labs; totaal panel sensitiviteit n=224, specificiteit n=275)

- a. De sensitiviteit (100%, n=45) voor diagnose bij patiënten met een ernstige infectie, waarbij materiaal is afgenomen >10 of >14 dagen na 1^e ziektedag voldoet aan de vooraf gestelde criteria. Hiervan is bevestiging met grotere monsteraantallen nodig.
- b. Wisselende sensitiviteit bij patiënten met een ernstige infectie, waarbij materiaal is afgenomen binnen 10 of 14 dagen of met een onbekend aantal dagen na 1^e ziektedag. Deze groepen zijn te verschillend om samen te nemen. Voorlopige resultaten laten de volgende sensitiviteit zien wat betreft verschillende duur van monsternamen na 1^e ziektedag:
 - <10 of onbekend: 54% (n=28)
 - 4-20 dagen: 100% (n=12)

Status validatie ELISA en auto-analyzers: versie 30 april 2020

- 1-33 dagen: 95% (n=37)
- c. De sensitiviteit (100%, n=26) in populaties met milde of asymptomatische klachten, bij sera waarvan de meesten zijn afgenomen >10 dagen na 1^e ziektedag voldoet aan de gestelde criteria.. Omdat dit percentage gebaseerd is op een beperkte set monsters, is bevestiging met grotere monsteraantallen nodig. Beperkte correlatie met neutraliserende antilichamen met een sensitiviteit van 89% (n=76) bij titer in PRNT50.
- d. De specificiteit is hoog maar gebaseerd op de vooraf gestelde criteria onvoldoende met 96,4% (n=275).

EUROIMMUN SARS-CoV-2 IgG (4 labs, totaal panel sensitiviteit n= 332; specificiteit n=340)

- a. Wisselende sensitiviteit (81-100%, n=96) voor diagnose bij patiënten met een ernstige infectie, waarbij materiaal is afgenomen >10 of >14 dagen na 1^e ziektedag. Hiervan is bevestiging met grotere monsteraantallen nodig.
- b. De sensitiviteit (36-68%, n= 85) bij patiënten met een ernstige infectie, waarbij materiaal is afgenomen binnen 14 dagen voldoet niet aan de vooraf gestelde criteria. Hiervan is bevestiging met grotere monsteraantallen nodig.
- c. De sensitiviteit (42-77%, n=62) in populaties met milde of asymptomatische klachten, bij sera afgenomen >10 of >14 dagen na 1^e ziektedag voldoet niet aan de vooraf gestelde criteria.
- d. De correlatie met neutraliserende antilichamen is wisselend met een sensitiviteit van 97% (n=35) bij een titer in VNT50%, 100% (n=14) bij een titer in VNT90% en 82% (n=76) bij een titer in PRNT50.
- e. De specificiteit voldoet aan de vooraf gestelde criteria met 99,7% (n=340).

EUROIMMUN SARS-CoV-2 IgA (4 labs, totaal panel sensitiviteit n=288; specificiteit n=312)

- a. Wisselende sensitiviteit (86-100%, n=59) voor diagnose bij patiënten met een ernstige infectie, waarbij materiaal is afgenomen >10 of >14 dagen na 1^e ziektedag. Hiervan is bevestiging met grotere monsteraantallen nodig.
- b. De sensitiviteit (72-89%, n=85) bij patiënten met een ernstige infectie, waarbij materiaal is afgenomen binnen 14 dagen voldoet niet aan de vooraf gestelde criteria. Hiervan is bevestiging met grotere monsteraantallen nodig.
- c. De sensitiviteit (54-76%, n=61) in populaties met milde of asymptomatische klachten, bij sera afgenomen >10 -14 dagen na 1^e ziektedag voldoet niet aan de vooraf gestelde criteria. is de Hiervan is bevestiging met grotere monsteraantallen nodig.
- d. De correlatie met neutraliserende antilichamen heeft een sensitiviteit van 97% (n=76) bij titer in PRNT50.
- e. De specificiteit voldoet niet aan de vooraf gestelde criteriamet 89,1% (n=312).

LIAISON SARS-CoV-2 IgG (1 lab, total panel sensitiviteit n=53; specificiteit n=69)

- a. De eigenschappen in ernstige SARS-CoV-2 infecties, waarbij monsters > 10 dagen na 1^e ziektedag zijn afgenomen zijn niet geëvalueerd ten opzichte van RT-PCR, daarom kunnen hier geen uitspraken over gedaan worden.
- b. De eigenschappen in ernstige SARS-CoV-2 infecties, waarbij monsters < 10 dagen na 1^e ziektedag zijn afgenomen zijn niet geëvalueerd ten opzichte van RT-PCR, daarom kunnen hier geen uitspraken over gedaan worden.
- c. De eigenschappen in milde SARS-CoV-2 infecties zijn nog niet geëvalueerd ten opzichte van RT-PCR, daarom kunnen hier geen uitspraken over gedaan worden.
- d. De correlatie met neutraliserende antilichamen is beperkt met een sensitiviteit van 74% (n=53) bij titer in PRNT50.

Status validatie ELISA en auto-analyzers: versie 30 april 2020

- e. De specificiteit voldoet aan de vooraf gestelde criteria met 98,6% (n=69). Omdat dit percentage gebaseerd is op een beperkte set monsters is bevestiging met grotere monsteraantallen nodig.

EDI Novel Coronavirus COVID-19 ELISA IgG (1 lab, totaal panel sensitiviteit n=34; specificiteit n=36)

- a. De eigenschappen in ernstige SARS-CoV-2 infecties, waarbij monsters > 10 dagen na 1^e ziektedag zijn afgenomen zijn niet geëvalueerd, daarom kunnen hier geen uitspraken over gedaan worden.
- b. De eigenschappen in ernstige SARS-CoV-2 infecties, waarbij monsters <10 dagen na 1^e ziektedag zijn afgenomen zijn niet geëvalueerd, daarom kunnen hier geen uitspraken over gedaan worden.
- c. De sensitiviteit in populaties met milde of asymptomatische klachten voldoet niet aan de vooraf gestelde criteria. Voorlopige resultaten laten de volgende sensitiviteit zien in zorgmedewerkers met milde klachten betreft verschillende duur van afname na 1^e ziektedag:
 - <14 dagen: 38% (n=8)
 - 14-21 dagen: 60% (n=15)
 - >21 dagen: 91%
 Omdat deze percentages gebaseerd zijn op een beperkte set monsters, is bevestiging van grotere monsteraantallen nodig.
- d. Neutralisatie testen zijn nog niet uitgevoerd in correlatie met deze ELISA, daarom kunnen hier geen uitspraken over gedaan worden.
- e. De specificiteit is hoog maar voldoet niet aan de vooraf gestelde criteria met 97,2% (n=36). Omdat dit percentage gebaseerd is op een beperkte set monsters is bevestiging met grotere monsteraantallen nodig.

ARCHITECT SARS-CoV-2 IgG assay, Abbott core laboratory (1 lab, totaal panel sensitiviteit n= 57; specificiteit n=100)

- a. De sensitiviteit (90%, n=20) voor diagnose bij patiënten met een ernstige infectie, waarbij materiaal is afgenomen >14 dagen na 1^e ziektedag voldoet niet aan de vooraf gestelde criteria. Hiervan is bevestiging met grotere monsteraantallen nodig.
- b. De sensitiviteit (44%, n=18) bij patiënten met een ernstige infectie, waarbij materiaal is afgenomen binnen 10 dagen voldoet niet aan de vooraf gestelde criteria. Hiervan is bevestiging met grotere monsteraantallen nodig.
- c. De sensitiviteit (89%, n=19) in populaties met milde of asymptomatische klachten, bij sera afgenomen >10 of >14 dagen na 1^e ziektedag voldoet niet aan de vooraf gestelde criteria.
- d. Neutralisatie testen zijn nog niet uitgevoerd in correlatie met deze auto-analyzer test, daarom kunnen hier geen uitspraken over gedaan worden.
- e. De specificiteit voldoet aan de vooraf gestelde criteria met 100% (n=100).

3.3 Correlatie positieve uitslag in ELISA met aanwezigheid neutraliserende antilichamen.

Afhankelijk van het doel van het uitvoeren van serologie kan het essentieel zijn om de betrouwbaarheid van routine serologietesten voor het vaststellen van de aanwezigheid van neutraliserende antilichamen vast te stellen. Test capaciteit voor het bepalen van de aanwezigheid van neutraliserende antistoffen is in ieder geval aanwezig bij Erasmus MC en RIVM. Aanwezigheid van neutraliserende antistoffen is een mogelijke aanwijzing voor beschermende immuniteit. De

Status validatie ELISA en auto-analyzers: versie 30 april 2020

sensitiviteit van de testen uit dit rapport berekent met een neutralisatie test als referentie test zijn hierboven reeds vermeld onder punt "d".

In een cohort van n=26 patiënten met milde klachten die positief waren voor aanwezigheid van Ab met de Wantai Ab ELISA, werd in 15/26 patiënten aanwezigheid van neutraliserende antistoffen op basis van een VNT₅₀ gevonden en in slechts 2/26 patiënten bij een cutoff van 90% remming.

In een cohort van n=32 patiënten met ernstige klachten die positief waren voor aanwezigheid van Ab met de Wantai Ab ELISA, werd in 32/32 patiënten aanwezigheid van neutraliserende antistoffen aangetoond met zowel een cutoff van 50% en 90% remming in de VNT. Deze data lijken een eerste aanwijzing voor een minder goede correlatie tussen positiviteit in de Wantai total Ab ELISA met aanwezigheid van neutraliserende antistoffen in cohorten met milde klachten (patiënten zonder ziekenhuisopname).

3.4 Samenvatting eerste laboratorium resultaten.

De ELISA of auto-analyzers variëren in hoe ze presteren. *In bepaalde groepen zijn de monsteraantallen te klein voor definitieve conclusies met betrekking tot gebruik, en deze moeten nog bevestigd worden met grotere monsteraantallen.*

De Wantai SARS-CoV-2 Ab kit voldoet aan de vooraf gestelde criteria voor gebruik **in aanvulling op** voorkeursdiagnostiek bij **ernstig zieke patiënten, vanaf 10 dagen na 1^e ziektedag**. De standaard voor diagnostiek in deze setting is echter RT-PCR. Serologie met behulp van ELISA zou voor diagnostiek bij deze groep patiënten, waarbij op basis van kliniek (bv op basis van CT-scan) een sterk vermoeden bestaat op een SARS-CoV-2 infectie maar waarbij de PCR herhaaldelijk negatief is, van diagnostische waarde kunnen zijn. De EUROIMMUN SARS-CoV-2 IgG ELISA behoeft verder onderzoek omdat deze kit, in patiënten met ernstige infecties die in het ziekenhuis zijn opgenomen waarbij monsterafname >10 dagen na 1^e ziektedag plaatsvindt, wisselende sensitiviteit heeft waarbij deze <95% is in sommige labs. De EDI Novel Coronavirus COVID-19 ELISA IgG is nog niet geëvalueerd in patiënten met ernstige infecties, dit behoeft verder onderzoek. De LIAISON SARS-Cov-2 IgG test voldoet met een sensitiviteit van 94% (n=18) bij ernstig zieke patiënten vanaf 14 dagen na 1^e ziektedag net niet aan het vooraf gesteld criterium van >95% en de ARCHITECT SARS-CoV-2 IgG ook niet met 90% (n=20). Omdat deze percentage gebaseerd zijn op klein monster aantallen, moet dit preciezer bepaald worden met grotere monsteraantallen. Op dit moment zijn voor de validatie van de LIAISON en de ARCHITECT voor beiden resultaten bekend van één laboratorium, van beiden worden in de komende weken meer resultaten verwacht. Deze evaluaties hebben hoge prioriteit, omdat de mogelijke inzetbaarheid van de LIAISON en de ARCHITECT IgG testen de serologische test capaciteit in Nederland sterk zou den vergroten.

Bij serologische diagnostiek uitgevoerd binnen 10 of 14 dagen na 1^e ziektedag voldoen geen van de geëvalueerde antilichaam testen aan de criteria, of wisselende resultaten worden verkregen. De antilichaam testen met wisselende sensitiviteit, de Wantai SARS-CoV-2 Ab en IgM, moeten hierop verder onderzocht worden met duidelijker gedefinieerde afname momenten.

De Wantai SARS-CoV-2 Ab kit voldoet ook aan de vooraf gestelde criteria voor diagnostiek in een populatie van patiënten met milde klachten of met asymptomatische infecties omdat de sensitiviteit 95-100% is in deze populaties >10 dagen na start van symptomen. Deze sensitiviteit is ook hoog genoeg voor het testen van subpopulaties en voor sero-prevalentie onderzoeken. Omdat er een

Status validatie ELISA en auto-analyzers: versie 30 april 2020

beperkt aantal monsters van patiënten uit deze groep getest is, moet dit nog bevestigd worden met grotere monster aantallen. De sensitiviteit van de EUROIMMUN IgG is in groepen met milde klachten <85%, en voldoet daardoor niet aan de vooraf gestelde criteria voor diagnostiek bij milde klachten, populatie onderzoek en sero-prevalentie studies. De EDI Novel Coronavirus COVID-19 ELISA IgG heeft, met beperkte monsteraantallen, een specificiteit van 38-91% in patiënten met milde klachten, en voldoet ook niet aan de gestelde criteria voor sensitiviteit bij patiënten met milde klachten. Mogelijk is de EDI Novel Coronavirus COVID-19 ELISA IgG wél geschikt voor (sub)populatie onderzoek omdat bij monsterafname > 21 dagen na 1^e ziektedag de sensitiviteit 91% is, dit moet bevestigd worden met grotere monsteraantallen. De ARCHITECT SARS-CoV-2 IgG test voldoet niet aan de vooraf gestelde criteria voor sensitiviteit in populaties met milde klachten (89%, n=19), maar vanwege lage monsteraantallen moet dit verder onderzocht worden. De LIAISON SARS-CoV-2 is nog niet geëvalueerd in een populatie met milde of asymptomatische klachten, ook deze evaluatie heeft hoge prioriteit.

Met betrekking tot specificiteit voldoen de EUROIMMUN IgG (99,7%, n=340), de Wantai Ab (99,6%, n=450), de LIAISON IgG (98,6%, n= 69) en de ARCHITECT SARS-CoV-2 IgG (100%, n=100) aan de vooraf gestelde criteria, terwijl de EUROIMMUN SARS-CoV-2 IgA en de Wantai SARS-CoV-2 IgM voldoen niet aan de vooraf opgestelde eisen voor specificiteit met respectievelijk 89,1% (n=312) en 96,4% (n=275). De EDI Novel Coronavirus COVID-19 ELISA IgG voldoet net niet aan de vooraf gestelde eisen met een specificiteit van 97,2%. Omdat dit percentage berust op onderzoek met beperkt monsteraantal (n=36), moet onderzoek uitgevoerd worden met grotere monsteraantallen om de specificiteit preciezer te bepalen.

3.5 Voorlopige conclusie op grond van eerste laboratorium resultaten

Op grond van de eerste resultaten kunnen de volgende vier voorlopige conclusies getrokken worden:

Niet van alle hier geteste antilichaam testen is de specificiteit >98%. Serologische testen met een lagere specificiteit kunnen wel ingezet worden, maar dan moet er vervolgonderzoek plaatsvinden. Dit moet voor specifieke situaties afgewogen worden door lokale experts.

1. Voor diagnostiek bij patiënten met ernstige klachten wanneer monsternamen plaatsvindt na minimaal 10 dagen na de 1^e ziektedag voldoet de Wantai SARS-CoV-2 Ab aan de vooraf gestelde criteria. De EUROIMMUN SARS-CoV-2 IgG voldoet in sommige laboratoria aan de vooraf gestelde criteria, en de LIAISON SARS-CoV-2 IgG en de ARCHITECT SARS-CoV-2 IgG zijn nog niet (voldoende) onderzocht in deze populatie. Deze laatste testen zouden verder onderzocht moeten worden. Hierbij is serologie vooral secundair van toepassing, voor patiënten met een negatieve SARS-CoV-2 PCR en blijvende sterke verdenking.
2. Bij het testen van doorgemaakte infecties van populaties met milde klachten of asymptomatische infecties voldoet de Wantai SARS-CoV-2 Ab ELISA bij monsterafname >10 dagen na 1^e ziektedag. Andere geëvalueerde antilichaam testen zijn nog niet (voldoende) onderzocht op prestaties in deze populatie en zouden nog verder onderzocht moeten worden.

Status validatie ELISA en auto-analyzers: versie 30 april 2020

4 Stappenplan voor de nabije toekomst

De onafhankelijke vaststelling van de gewenste prestatiekenmerken van ELISA en serologie met auto-analyzers wordt gedaan onder coördinatie van de taskforce serologie, en het onderzoek is gaande. Dit is een eerste gebundeld verslag, deze zal aangepast worden wanneer nieuwe validatie data verkregen wordt uit de laboratoria. Het wordt dan ook zeer op prijs gesteld als laboratoria hun data met betrekking tot de prestatiekenmerken van testen blijven delen met de collega laboratoria via de taskforce serologie.

Hoe nu verder?

Op dit moment staat er een landelijke bestelling uit voor 12,000 Wantai SARS-CoV-2 Ab ELISA kits, goed voor 1 miljoen testen. Levering hiervan vindt binnenkort plaats. Als eerste stap zullen testen uitgeleverd worden aan MMLs ten behoeve van de patiëntenzorg. Er is een uitvraag gedaan bij de MMLs om aan te geven of er interesse bestaat in afname van testen voor de patiëntenzorg.

BIJLAGEN Voorlopige resultaten per lab in detail



National Institute for Public Health
and the Environment
Ministry of Health, Welfare and Sport

Sensitivity and specificity of Wantai Ab and EUROIMMUN IgG/IgA SARS-CoV-2 ELISA tests in clinical patients

At the end of 2019, SARS-CoV-2 emerged in the human population. The subsequent growing pandemic spread of the virus is accompanied by high morbidity and mortality, and has an enormous negative impact on societal and economic circumstances world-wide. In response to this outbreak ELISA tests are currently overflowing the diagnostic market. As at 30 April 2020, the FIND organization has listed 108 manual or automated assays in different stages of validation and regulation on its website. The added value of these ELISA tests for individual patient diagnostics and their usefulness for epidemiological studies and to direct mitigation strategies, urgently needs to be established. Here, we took a first look at the clinical sensitivity and specificity of three ELISA kits.

Methods.

Three ELISA kits for detection of SARS-CoV-2 antibodies were included in the study. Selection was partially based on pre-study dossier analysis of data provided by the manufacturers that included test-specifics (antigen used), validation data on sensitivity and specificity in relation to type of cohort used and reliability of the manufacturer. The following three kits were analyzed in this report:

Test	Manufacturer	Certification	Antigen
Wantai SARS-CoV-2 Ab ELISA	Beijing Wantai Biological	CE-IVD	RBD
EUROIMMUN SARS-CoV-2 IgG	EUROIMMUN AG	CE-IVD	S1
EUROIMMUN SARS-CoV-2 IgA	EUROIMMUN AG	CE-IVD	S1

All ELISA tests were used according to manufacturer's instructions. Virus neutralization tests were performed as described previously with some modifications (Algaissi et al., 2020). Briefly, serial dilutions of heat-inactivated samples (30 min 56°C) were incubated with 100 TCID₅₀ of SARS-CoV-2 virus for 1h at 35°C. African green monkey (Vero-E6) cells were added in a concentration of 2×10^4 cells per well and incubated for three days at 35°C in an incubator with 5% CO₂. The virus neutralization titer was defined as the reciprocal of the sample dilution that showed a 90% (VNT90) or 50% (VNT50) protection of virus growth. Samples with titers equal to ten and higher were defined as positive.

RIVM

A. van Leeuwenhoeklaan 9
3721 MA Bilthoven
Postbus 1
3720 BA Bilthoven
www.rivm.nl

T 5.1.2e
info@rivm.nl

Authors

5.1.2e
5.1.2e
5.1.2e
5.1.2e
5.1.2e
5.1.2e

T 5.1.2e

The following sera were used for the validation of the three ELISA kits with SARS-COV-2 RT-PCR (Corman et al., 2020) as reference test:

specificity panel	Number	Number	Number
	Wantai Ab	EUROIMMUN IgG	EUROIMMUN IgA
healthy blood donors (the Netherlands)	42	42	30
acute EBV (the Netherlands)	10	10	10
acute CMV (the Netherlands)	10	10	10
Other hCoV (OC43; NL63; HKU1; 229E, all convalescent, the Netherlands)	20	20	3 ^a
Total	82	82	53
Sensitivity panel^b			
acute hospitalized patients (PCR-confirmed)	39	39	33
convalescent hospitalized patients (PCR-confirmed)	43	43	6
convalescent mild illness hospital workers (PCR-confirmed)	32	16	14
Total	114	98	53

^aonly hCoV-OC43. ^bSera from confirmed SARS-CoV-2 patients were provided by [redacted], ETZ [redacted] (ADRZ) and Afke Brandenburg (Izore). CMV and EBV acute sera were provided by [redacted] (LUMC), common hCoV convalescent sera were provided by [redacted] (RIVM), [redacted] (ADRZ). Serum from healthy blood donors were obtained through Sanquin.

For the validation of the sensitivity of the Wantai Ab ELISA against virus neutralization (VNT) as reference test, all serum samples of COVID-19 patients with a known neutralizing antibody titer (≥ 10) available at RIVM were analyzed versus the Wantai Ab ELISA. This included 46 sera with a titer in the VNT50 and 80 sera with a titer in the VNT90 (initially not all sera that were scored at 90% neutralization were scored at 50% as well, hence this discrepancy in numbers).

Results.

Specificity and sensitivity with RT-PCR as reference test.

The three ELISA tests were analyzed for sensitivity and specificity based on clinical samples from PCR-confirmed COVID-19 patients and from EBV/CMV/other hCOV infected patients/healthy individuals collected before 2019. In tables 1-3 the calculated specifics are depicted per test and are based on PCR-positivity as reference test.

Tables 1-3. Clinical sensitivity and specificity (%) for three commercial ELISA tests.

1. Wantai SARS-CoV-2 Ab ELISA, Beijing Wantai Biological

Positive/ total no. samples	Cohort	Post onset symptoms (days)	Sensitivity	Specificity
30/39	Acute hospitalized patients	<10	77%	na
43/43	Convalescent hospitalized patients	10-15	100%	na
32/32	Convalescent mild illness hospital worker	>15	100%	na
89/98	Total cohort		91%	
75/75	Total post onset symptoms > 10 days	>10	100%	
0/82	Healthy blood donors (42), EBV (10), CMV (10), other HCoV (20)			100%

2. EUROIMMUN SARS-CoV-2 IgG, EUROIMMUN AG

Positive/ total no. samples	Cohort	Post onset symptoms (days)	Sensitivity	Specificity
15/39	Acute hospitalized patients	<10	38%	na
43/43	Convalescent hospitalized patients	10-15	100%	na
10/16	Convalescent mild illness hospital worker	>15	63%	na
68/98	Total cohort		69%	
53/59	Total post onset symptoms > 10 days	>10	90%	
0/82	Healthy blood donors (42), EBV (10), CMV (10), other HCoV (20)			100%

3. EUROIMMUN SARS-CoV-2 IgA, EUROIMMUN AG

Positive/ total no. samples	Cohort	Post onset symptoms (days)	Sensitivity	Specificity
24/33	Acute hospitalized patients	<10	72%	na
6/6	Convalescent hospitalized patients	10-15	100%	na
8/14	Convalescent mild illness hospital worker	>15	57%	na
38/53	Total cohort		72%	
14/20	Total post onset symptoms > 10 days	>10	70%	
9/53	Healthy blood donors (30), EBV (10), CMV (10), HCoV-OC43 (3)			83%

Sensitivity Wantai Ab with virus neutralization as reference test.

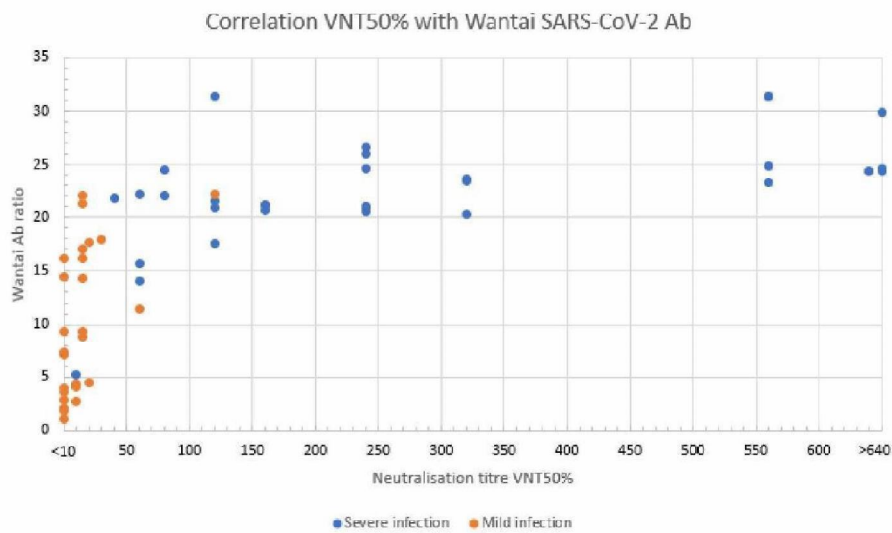
Secondly, the Wantai total Ab ELISA was analyzed for sensitivity with a SARS-CoV-2 virus neutralization test (VNT) as reference test. Of 46 sera with an established titer for neutralizing antibodies in a VNT scored at 50% neutralization (VNT50%), **100%** were observed positive in the ELISA. Of 80 sera with an established titer for neutralizing antibodies in a VNT scored at 90% neutralization (VNT90%), **99%** were positive in the Wantai ELISA.

Correlation positive result in Wantai Ab with presence of neutralizing antibodies.

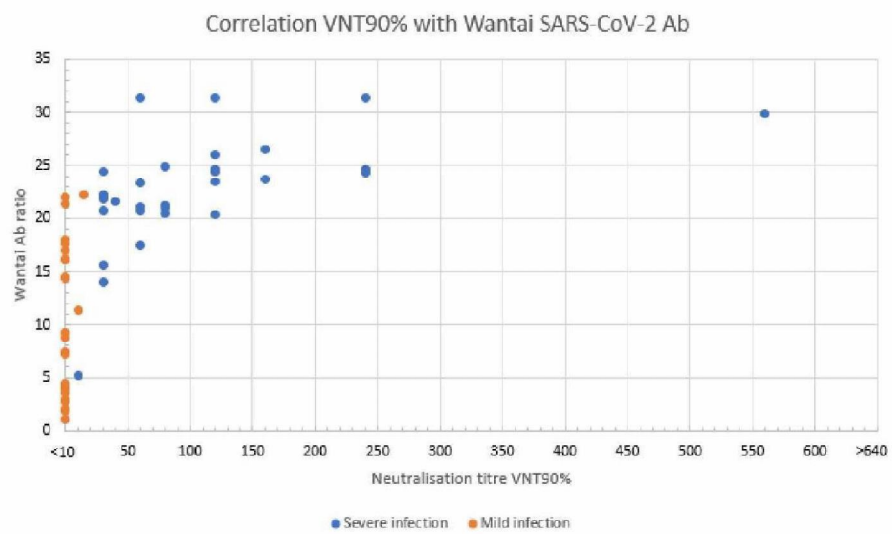
Lastly, the correlation between OD/C.O ratio in the Wantai total Ab ELISA and virus neutralization titers was analyzed in a cohort with PCR-confirmed, Wantai ELISA positive COVID-19 patients with mild disease (n=26) and severe disease (n=32). In the mild disease cohort, neutralizing antibodies were observed in 15/26 ELISA positive patients using a VNT50 (Figure 1A) and in only 2/26 using a VNT90 (Figure 1B). In the severe disease cohort, neutralizing antibodies were observed in 32/32 ELISA positive patients in both the VNT50 and VNT90.

Figure 1. Correlation Wantai Ab ELISA and virus neutralization test in mild and severe COVID-19 patients

A. vs VNT50%



B. vs VNT90%



Discussion and conclusion.

Pre-setting the minimal performance required from ELISA tests depends on the application. The three ELISA tests were judged based on the following minimal thresholds (expert opinion):

- individual patient diagnostics: specificity >98%; sensitivity >95%.
- sero-epidemiological studies (e.g. collecting seroprevalence data as proxy for herd immunity, input in models): specificity >98%; sensitivity >90%.

Based on the first validation data presented here with PCR as reference test, it can be concluded that based on the overall data for samples *taken > 10 days post onset symptoms* for PCR-confirmed severe COVID-19 cases, all of the three ELISA tests fulfilled the sensitivity criteria set above. However, when analyzing sera from mild patients taken > 15 days post onset of symptoms, only the Wantai SARS-CoV-2 Ab ELISA fulfilled the preset criteria.

Zooming in on the performance of the Wantai total Ab test, we observed a 100% sensitivity with virus neutralization as reference test. When looking at the correlation between a positive outcome in the Wantai total Ab test and the presence of virus neutralizing antibodies, we observed a good correlation in convalescent severe patients but not so much in convalescent mild patients.

Looking at specificity, the EUROIMMUN IgA test did not reach the preset threshold for specificity. This was due to cross reactivity of sera from patients suffering from acute EBV and CMV infections, three out of ten samples were positive in EUROIMMUN IgA for both. Wantai Ab and EUROIMMUN IgG kits both had a specificity of 100%, fulfilling the specificity criteria.

Further validation is necessary with larger well defined sample sets for a more precise determination of test specificities in relation with virus neutralization while test performances need to be interpreted in the light of the rapidly increasing information on antibody kinetics in different (sub) clinical patient cohorts.

These data presented here underline the importance of extensive validation in the right (sub)populations and settings to avoid guidance of clinical care and control efforts at individual and population level based on false diagnostic outcomes.

30 April 2020,

5.1.2e
5.1.2e
5.1.2e
5.1.2e
5.1.2e
5.1.2e
5.1.2e



Summary of validation data : Wantai, Euroimmun and DiaSorin Liaison XL

Date: 21-04-20

5.1.2e

Nisreen Okba
Bart Haagmans

5.1.2e

Table 1. Sample panel used to validate the performance of the ELISA/Liaison and the antibody RDT assays for SARS-CoV-2

Sensitivity				
Country	Sample source	Infection	No. samples Liaison/ELISA (RDT*)	Post symptom onset range
Netherlands	RT-PCR confirmed SARS-CoV-2	Mild/Moderate	0/15 (15)	1-24
		Severe	55/78 (78)	1-43
Specificity				
Netherlands	Non-CoV respiratory infections*	Adeno virus	0/5 (1)	2-4weeks
		HMPV	3/9 (3)	2-4weeks
		Flu A	8/10 (4)	2-4weeks
		Flu B	5/6 (4)	2-4weeks
		RSV A	5/5 (4)	2-4weeks
		RSV B	4/4 (4)	2-4weeks
		CMV	1/4 (2)	2-4weeks
		EBV	1/7 (3)	2-4weeks
		<i>M.pneumoniae</i>	1/1 (1)	2-4weeks
		Rhinovirus	9/9 (2)	2-4weeks
		Bocavirus	0/2 (0)	2-4weeks
		Parainfluenza 1/3	0/4 (0)	2-4weeks
		Enterovirus	0/2 (0)	2-4weeks
		Netherlands	hCoV infections	HCoV 229E
HCoV-NL63	8/18 (7)			2-4weeks
HCoV-OC43	21/39 (9)			2-4weeks
Netherlands		MERS-CoV	1/3 (3)	2-4weeks

* numbers were limited due to RDT kit availability



Table 2. A summary of the performance characteristics of the Wantai Ig and IgM ELISA, Euroimmun IgG and IgA ELISA and DiaSorin Liaison platform.

		Wantai Ig	Wantai IgM	Euroimmun IgG*	Euroimmun IgA*	Liaison
Specificity	n/N	149/150	148/150	160/161	151/161	68/69
	Value	0.9933	0.9867	0.9938	0.9379	0.9855
	(95% CI)	(0.9632 - 0.9997)	(0.9527 - 0.9976)	(0.9657 - 0.9997)	(0.8895 - 0.9659)	(0.9224 - 0.9993)
Overall Sensitivity	n/N	75/76	68/76	62/76	74/76	39/53
	Value	0.9868	0.8947	0.8158	0.9737	0.7358
	(95% CI)	(0.9292 - 0.9993)	(0.8058 - 0.9457)	(0.7142 - 0.8870)	(0.9090 - 0.9953)	(0.6042 - 0.8356)
Positive Predictive Value	Value	0.9868	0.9714	0.9841	0.881	0.975
	(95% CI)	(0.9292 - 0.9993)	(0.9017 - 0.9949)	(0.9154 - 0.9992)	(0.7946 - 0.9340)	(0.8712 - 0.9987)
Negative Predictive Value	Value	0.9933	0.9487	0.9195	0.9869	0.8293
	(95% CI)	(0.9632 - 0.9997)	(0.9021 - 0.9738)	(0.8695 - 0.9515)	(0.9536 - 0.9977)	(0.7336 - 0.8955)
Likelihood Ratio		148	67.11	131.3	15.68	50.77
>14 dps Sensitivity	n/N	26/26	19/26	25/26	26/26	17/18
	Value	1	0.7308	0.9615	1	0.9444
	(95% CI)	(0.8713 - 1.000)	(0.5392 - 0.8630)	(0.8111 - 0.9980)	(0.8713 - 1.000)	(0.7424 - 0.9972)
Positive Predictive Value	Value	0.963	0.9048	0.9615	0.7222	0.9444
	(95% CI)	(0.8172 - 0.9981)	(0.7109 - 0.9831)	(0.8111 - 0.9980)	(0.5601 - 0.8415)	(0.7424 - 0.9972)
Negative Predictive Value	Value	1	0.9548	0.9938	1	0.9855
	(95% CI)	(0.9749 - 1.000)	(0.9097 - 0.9780)	(0.9657 - 0.9997)	(0.9752 - 1.000)	(0.9224 - 0.9993)
Likelihood Ratio		150	54.81	154.8	16.1	65.17

The outcome of the commercial assays was compared to in-house PRNT50.

For sensitivity calculations therefor only the PRNT50 positive samples were used for the calculations.

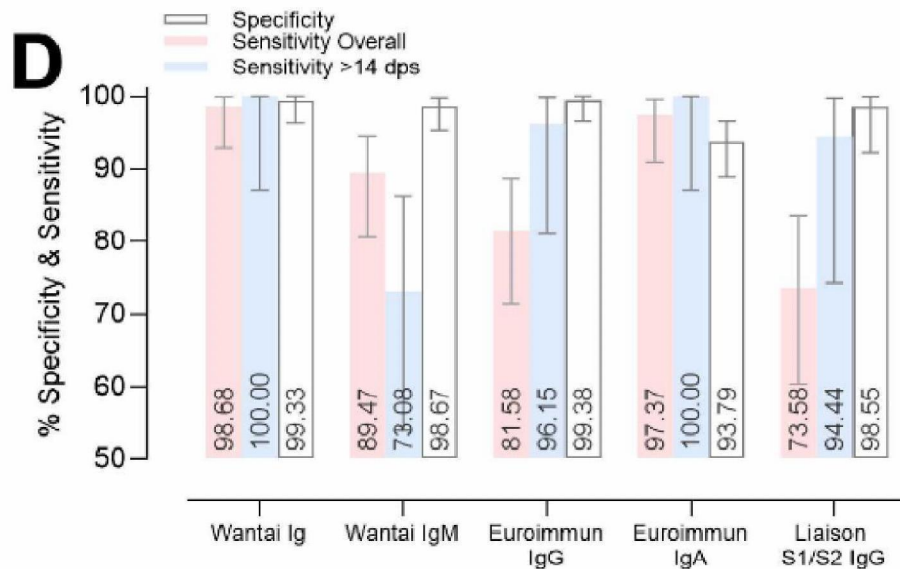


Figure 1. Performance of various commercial serological assays for detection of SARS-CoV-2-specific antibodies. Specificities and sensitivities of Wantai Ig and IgM ELISAs, Euroimmun IgG and IgA ELISAs and DiaSorin Liaison XL S1/S2 IgG chemiluminescence immunoassay. Results of the assays are correlated to SARS-CoV-2 neutralization (PRNT50).

Data submitted for publication

Voorlopig validatierapport Wantai SARS-CoV-2 IgM en IgT

Naam auteur :
Datum : 10-4-2020

Doel

Coronavirusziekte 2019 (COVID-19) is een luchtwegaandoening veroorzaakt door infectie met het SARS-CoV-2 virus. Dit virus is een nieuwe stam van het Corona virus dat voor het eerst werd geïdentificeerd tijdens een uitbraak in Wuhan, China, die in december 2019 begon. Veel voorkomende tekenen van infectie zijn onder meer koorts, hoesten, kortademigheid en ademhalingsmoeilijkheden. In ernstige gevallen kan infectie longontsteking, ernstig acuut ademhalingsyndroom (SARS), nierfalen en overlijden veroorzaken.

Het CBSL wil naast het testen op RNA met een PCR, ook gaan testen op antistoffen uit bloed. Hiervoor zijn kits van Wantai besteld. De kits zijn bedoeld voor het screenen van patiënten waar van wordt vermoed dat ze besmet zijn met het SARS-CoV-2-virus, en als hulpmiddel bij de diagnose van COVID-19.

Principe (inleiding)

De Wantai SARS-CoV-2 Ab ELISA is een enzym gebonden immunosorbent assay (ELISA) voor kwalitatieve detectie van totale antilichamen (IgT) tegen SARS-CoV-2-virus in humaan serum of plasmamonsters. Deze ELISA heeft een tweestaps incubatie, waarbij een patiënten monster met specifieke SARS-CoV-2-antilichamen wordt toegevoegd aan microwell-strips die vooraf zijn bekleed met recombinant SARS-CoV-2-antigeen. Na een eerste wasstap wordt horseradish peroxidase conjugaat (HRP-conjugaat) toegevoegd, hier zit een tweede recombinant SARS-CoV-2-antigeen aan gekoppeld. De microwells worden vervolgens gewassen om ongebonden conjugaat te verwijderen en substraat (chromogeen) wordt toegevoegd. In de microwells die het antigeen-antilichaam-antigeen immuuncomplex bevatten, wordt het substraat omgezet tot een blauw gekleurd product. Het blauwe product kleurt geel nadat de reactie is gestopt met zwavelzuur. De kleurintensiteit kan worden gemeten en deze is evenredig met de hoeveelheid antilichaam die in de welletjes is gebonden. In de IgT ELISA worden dus alle antilichamen gebonden, IgA, IgM én IgG.

De Wantai SARS-CoV-2 IgM ELISA is een ELISA kit voor kwalitatieve detectie van IgM tegen SARS-CoV-2-virus in humaan serum of plasmamonsters. Deze ELISA heeft ook een tweestaps incubatie waarbij de strips vooraf zijn gecoat met antilichamen die zijn gericht tegen humaan IgM (anti- μ -keten). Het patiënten monster wordt toegevoegd en tijdens de eerste incubatie worden alle IgM-klasse antilichamen in de welletjes gebonden. Na de eerste wasstap wordt het specifieke SARS-CoV-2 IgM gebonden door de toevoeging van HRP-conjugaat waaraan recombinant SARS-CoV-2 antigeen zit. Hierbij ontstaat een (anti- μ) - (SARS-CoV-2-IgM) - (SARS-CoV-2 Ag-HRP) immuuncomplex wat blauw kleurt na toevoeging van substraat en geel na toevoegen van zwavelzuur. Ook hierbij is de hoeveelheid kleurintensiteit evenredig met de hoeveelheid antilichaam die in de welletjes is gebonden.

Welletjes die monsters bevatten die negatief zijn voor SARS-CoV-2-antilichamen, blijven kleurloos.

Definities en afkortingen

COVID-19	Coronavirus disease 2019
SARS	Severe acute respiratory syndrome
CBSL	Centraal Bacteriologisch en Serologisch Laboratorium
IgG	Immunoglobulinen G
IgA	Immunoglobulinen A
IgM	Immunoglobulinen M

K: Kwaliteit\Validatieprotocollen en rapporten\Serologie\Corona\Voorlopig Validatierapport Wantai SARS-CoV-2 IgM en IgT.doc_RIVM_TFserologie

IgT	Immunoglobulinen totaal
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
HRP	Horseradish peroxidase
HbsAg	Hepatitis B
HIV	Human immunodeficiency virus
HCV	Hepatitis C
BSE	Boviene spongiforme encefalopathie
H2SO4	Zwavelzuur
UA	Uitvoerende analist
VA	Viserend analist
AM	Arts-microbioloog
NC	Negatieve controle
PC	Positieve controle
CE-IVD	Conformite Europeenne- in vitro diagnostics
A/CO	Absorptie/Cutt-off ratio
nm	nanometer

Doelgroep

Medewerkers serologie

Veiligheid

Er wordt gewerkt volgens [PR Veiligheid en Hygiëne](#)

In de bijsluiters van de kits staat de volgende reagentia als gevaarlijk omschreven:

- De controles zijn negatief bevonden voor HBsAg en antilichamen tegen HIV 1/2, HCV, Syfilis. Ga uiterst voorzichtig om met reagentia en monsters alsof ze infectieziekten kunnen overdragen. Van runder afgeleide sera zijn gebruikt voor het stabiliseren van de positieve en negatieve controles, en zijn in principe BSE vrij.
- Sommige reagentia kunnen toxisch of kankerverwekkend zijn, irritatie of brandwonden veroorzaken. Contact met de huid en het slijmvlies moet worden vermeden met de volgende reagentia: stopoplossing, de chromogenen en de wasbuffer. De stopoplossing 0,5 M H2SO4 is een zuur. Gebruik het met gepaste zorg. Veeg gemorste vloeistoffen onmiddellijk op en was ze met water als ze in contact komen met de huid of ogen. ProClinTM 300 0,1% gebruikt als conserveermiddel, kan irritatie veroorzaken

Verantwoordelijkheden

De validatie wordt uitgevoerd door verschillende serologie analisten.

De VS serologie is verantwoordelijk voor het validatieplan en rapport.

De AM is eindverantwoordelijk voor deze validatie.

Na implementatie van deze test zijn de verantwoordelijkheden als volgt:

De UA is verantwoordelijk voor het volgens protocol uitvoeren van het onderzoek.

De VA is verantwoordelijk voor de administratieve resultaatverwerking.

De AM is verantwoordelijk voor het autoriseren van de onderzoeksresultaten.

Reagentia, media en hulpstoffen

- Kit Wantai SARS-CoV-2 Ab ELISA
- Kit Wantai SARS-CoV-2 IgM ELISA

Apparatuur en hulpmiddelen

- BEP 2000 Diasorin
- BEP conductive tips 1100 ul
- BEP conductive tips 300 ul
- BEP waste bags

K: Kwaliteit\Validatieprotocollen en rapporten\Serologie\Corona\Voorlopig Validatierapport
Wantai SARS-CoV-2 IgM en IgT.doc_RIVM_TFserologie

- BEP bottles 2,5ml
- Pipetten P30, P100, P1000 met bijbehorende puntjes
- Opstuurbuisjes
- Vortex
- Centrifuge

Biologisch materiaal

Serum of plasma (citraat, heparine of EDTA)

Uitvoering

Validatie proces: Plan van aanpak

SARS-CoV-2 antilichaam bepaling is een nieuwe test. Met behulp van een PCR zijn patiënten positief getest op dit virus. Van deze patiënten wordt bloed afgenomen en getest op antilichamen met behulp van de Wantai kits.

De SARS-CoV-2 Ab en IgM ELISA zijn CE-IVD gevalideerd. In de bijsluiters staan alleen de sensitiviteit en specificiteit beschreven. Omdat het een nieuwe test betreft, moeten voor een volledige validatie de volgende parameters bepaald worden:

Tabel 1. Parameters voor validatie

		Validatie parameters
		CE-IVD/FDA test óf een onderzoeksprocedure van een ander lab ZONDER AANPASSINGEN
1	Literatuuronderzoek	X*
2	Accuraatheid	X
3	Analytische sensitiviteit	X
	Limit of detection/analytische sensitiviteit	X
	Efficiëntie	X
	Lineariteit (indien kwantitatief)	
4	Analytische specificiteit	X*
5	Variatie	X
	Intra-assay variatie	X
	Inter-assay variatie	X
	Juistheid en precisie	X
6.	ROBUUSTHEID (optioneel)	X
	Kritische punten	X
7.	Laboratorium validatie (optioneel)	X*
7.1	Sensitiviteit	X*
7.2	Specificiteit	X*
7.3	Prevalentie (prior kans)	X*
7.4	Positief voorspellende waarde	X*
7.5	Negatief voorspellende waarde	X*
8	Prospectieve risicoanalyse	X*
9	Communicatie naar de aanvragers	X*

* Omdat er een beperkt aantal testen zijn, wordt er een voorlopige validatie uitgevoerd met de parameters die een * hebben. Bij voldoende positieve bloedmonsters en testen kan er een volledige validatie uitgevoerd gaan worden.

Prestatiekenmerken en acceptatiecriteria

Literatuur onderzoek: Er is literatuur van een onderzoek met de Wantai kits door de fabrikant en distributeur van de Wantai testen aangeboden. Aanvullend worden de bijsluiters van de te valideren test geraadpleegd voor een aantal parameters.

K: Kwaliteit\Validatieprotocollen en rapporten\Serologie\Corona\Voorlopig Validatierapport Wantai SARS-CoV-2 IgM en IgT.doc_RIVM_TFserologie

Accuraatheid: Voor het testen van accuraatheid van de SARS-CoV-2 IgT en IgM ELISA dienen minimaal 3 patiënten monsters meegenomen te worden die:

1. Sterk positief zijn
2. Laag positief zijn
3. Negatief zijn.

De analytische sensitiviteit voldoet aan onze criteria als:

Om de analytische sensitiviteit en efficiëntie te bepalen van de SARS-CoV-2 IgT en IgM ELISA wordt er een verdunningsreeks ingezet van een sterk positief monster. De efficiëntie van de curve (R^2) mag niet lager zijn dan 0.95.

De analytische specificiteit zal ook getest worden:

Het is bekend dat deze testen kunnen kruis reageren met andere Coronavirussen. Op dit moment is dat minder relevant omdat er zoveel SARS-CoV-2 infecties zijn dan andere Coronavirus infecties en een positief resultaat is meest waarschijnlijk van SARS-CoV-2. Op het CBSL wordt op Coronavirussen getest in de Respifinder PCR, dit zijn NL63, OC43 en 229E. Van patiënten die positief zijn voor 1 van deze virussen wordt bloed getest in de SARS-CoV-2 ELISA's. Verder wordt op de afdeling serologie wat betreft respiratoire pathogenen Mycoplasma pneumoniae IgM uit serum bepaald. Van minimaal 1 positief monster wordt gekeken of deze ook positief wordt in de SARS-CoV-2 ELISA's.

Variatie: De variatie wordt bepaald met hoge, midden en lage positieve patiënten monsters, meerdere in één run (intra) en in verschillende runs (inter).

De variatie coëfficiënt mag voor de intra-assay en de inter-assay variatie niet hoger zijn dan 10% voor patiënten monsters.

Robuustheid:

Vries-dooi cycli van monsters

In de bijsluiters staat dat serummonsters, ofwel zo vers mogelijk bepaald moeten worden (maximaal acht dagen bij 2 tot 8 °C) of ingevroren bewaard. Verder staat er dat herhaaldelijk ontdooien-cycli moeten worden vermeden.

Om te kijken wat voor effect het heeft, wordt een positief monster voor elke test een drietal keer ingevroren en ontdooid.

Laboratoriumvalidatie

Testen van minimaal 15 monsters waar van:

POSITIEF 10
NEGATIEF 5

De PCR positieve patiënten zijn prospectieve monsters en voor de negatieve monsters worden sera van patiënten gebruikt die zijn ingevroren minimaal een half jaar voordat de uitbraak in China begon.

Acceptatie criterium laboratorium validatie:

- Resultaten van een PCR op antigeen en een ELISA op antilichamen zijn moeilijk met elkaar te vergelijken omdat beide testen in een andere fase van het ziektebeloop gedaan worden. Uit het onderzoek van de fabrikant blijkt dat de PCR in de eerste week na begin van de ziekte het meest betrouwbaar is. Verder blijkt uit het onderzoek dat de gemiddelde seroconversietijd van de IgT 11 dagen is en van de IgM 12 dagen. Na 15 dagen na begin van de ziekte is de seroconversie van IgT 100% en IgM 94,3%. Als acceptatie criterium wordt het volgende gesteld: De positieve en de negatieve resultaten dienen voor 95% overeen te komen met de resultaten van de PCR bij een ziekteduur van meer dan 15 dagen.
- Volgens de bijsluiters van de SARS-CoV-2 IgM ELISA is de specificiteit 100% en de sensitiviteit 86.8%. Volgens de bijsluiters van de SARS-CoV-2 IgT ELISA is de specificiteit 100% en de sensitiviteit 94.5.8%. Specificiteit en sensitiviteit mogen niet lager zijn dan 85 %.

Aanvullende validatie

Geldigheid van de test. De SARS-CoV-2 IgT en IgM ELISA is geldig indien de positieve controle positief is en de negatieve controle negatief.

Controles en patiënten monsters worden getest volgens het protocol wat beschreven staat in de bijsluiters. Deze protocollen zijn op de pipetteerautomaat BEP 2000 gezet. In het bedieningsvoorschrift staat de werking van de BEP beschreven: [BD BEP 2000](#).

Validatieplan is besproken met de AM met aandachtsgebied serologie op 07-04-2020 en goedgekeurd.

Verificatie proces:

Uitvoering

Analytische validatie:

Literatuuronderzoek

1 Artikel is aangeleverd door Sanbio (distributeur Wantai-kits) met een klinisch onderzoek naar antistoffen bij SARS-CoV-2 positieve patiënten waarbij de SARS-CoV-2 Ab en IgM ELISA kits gebruikt zijn. Verder zijn de bijsluiters van de kits ook geraadpleegd:

- Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus
- Bijsluiter SARS-CoV-2_Ab_ELISA_V1
- Bijsluiter SARS-CoV-2_IgM_ELISA_V1

Analytische specificiteit

Voor het bepalen van de analytische specificiteit is 1 patiënten monster getest per target. De patiënten die positief waren voor OC43 en NL63 zijn negatief getest in onze SARS-CoV-2 PCR. Van de patiënt die positief was voor M. pneumoniae IgM is geen SARS-CoV-2 PCR gedaan omdat dit een bloed monster betrof van voor de uitbraak in China.

Tabel 2. Specificiteit overzicht

Patiënten monsters positief voor	Resultaat in de SARS-CoV-2 Ab en IgM ELISA
OC43	Negatief
NL 63	Negatief
M. pneumoniae IgM	Negatief

Criterium met betrekking tot specificiteit is gehaald.

Laboratorium validatie

Voor de laboratorium validatie worden de resultaten van de SARS-CoV-2 IgT en IgM ELISA vergeleken met de SARS-CoV-2 PCR.

Van de patiënten die in de routine werden getest met de SARS-CoV-2 PCR, worden bloedmonsters getest met behulp van de SARS-CoV-2 IgT en IgM ELISA op de BEP 2000. Een vergelijking van de verkregen resultaten zal worden gemaakt en van hieruit kunnen we bekijken of de SARS-CoV-2 IgT en IgM ELISA een goede aanvulling is op de huidige SARS-CoV-2 diagnostiek.

Voor de laboratorium validatie zijn in totaal 21 monsters getest. Hiervan waren er 12 patiënten positief in de in-house SARS-CoV-2 PCR, en 2 patiënten positief getest in een ander ziekenhuis. 2 Patiënten waren negatief getest in de in-house SARS-CoV-2 PCR en van 5 patiënten is geen SARS-CoV-2 PCR gedaan omdat dit bloed monsters betrof van patiënten van voor de uitbraak in China.

Van de 7 negatieve monsters bleven alle monsters negatief in de SARS-CoV-2 IgT en IgM ELISA.

Van de 14 positieve monsters in de SARS-CoV-2 PCR werden 14 monsters positief in de SARS-CoV-2 IgM ELISA en 13 monsters positief in de in de SARS-CoV-2 IgT ELISA.

In tabel 3 een overzicht van alle geteste monsters. Het discrepante monster staat in het rood aangegeven.

Tabel 3. Overzicht patiënten monsters

monster	Tijd monsternamen na 1e zkt dag (dagen)	PCR	SARS-CoV-2 IgM ELISA			SARS-CoV-2 IgT ELISA		
		Ct	OD	A/CO	interpretatie	OD	A/CO	interpretatie
1	>4	Ander z.h.	3,000	28,6	positief	1,873	9,9	positief
2	8	28,89	3,000	28,6	positief	3,000	15,8	positief
3	20	20,82	2,040	19,4	positief	2,070	10,9	positief
4	8	24,51	0,912	8,7	positief	3,000	15,8	positief
5	14	24,47	3,000	28,6	positief	2,876	15,1	positief
6	>9	Ander z.h.	3,000	28,6	positief	3,000	15,8	positief
7	20	22,89	0,936	8,9	positief	3,000	15,8	positief
8	16	24,02	3,000	28,6	positief	3,000	15,8	positief
9	8	20,82	1,663	15,8	positief	1,676	8,8	positief
10	onbekend	21,61	1,746	16,6	positief	3,000	15,8	positief
11	13	18,89	2,260	21,5	positief	3,000	15,8	positief
12	8	25,66	0,125	1,2	positief	0,072	0,4	negatief
13	16	28,31	0,379	3,6	positief	2,163	11,4	positief
14	8	27,02	0,605	5,8	positief	3,000	15,8	positief
15	18	neg	0,005	0,0	negatief	0,001	0,0	negatief
16	7	neg	0,002	0,0	negatief	0,003	0,0	negatief
17	n.v.t.	n.v.t.	0,004	0,0	negatief	0,054	0,3	negatief
18	n.v.t.	n.v.t.	0,005	0,0	negatief	0,003	0,0	negatief
19	n.v.t.	n.v.t.	0,004	0,0	negatief	0,001	0,0	negatief
20	n.v.t.	n.v.t.	0,004	0,0	negatief	0,000	0,0	negatief
21	n.v.t.	n.v.t.	0,004	0,0	negatief	0,002	0,0	negatief

Ng= niet gedaan

N.v.t = niet van toepassing

Negatieve resultaten A/CO <0.9 Positieve resultaten A/CO ≥ 1.1 Dubieus A/C.O. = 0.9-1.1

Er lijkt geen verband te zijn tussen de Ct waarde en de hoogte van de OD waarde, daarom is een methode vergelijking niet gedaan.

Om parameters voor laboratorium validatie te berekenen zijn de uitslagen van positieve en negatieve monsters voor elke ELISA in tabel 4 t/m 7 ingevoerd.

Tabel 4. Berekening laboratorium validatie

Index test= SARS-CoV-2 IgM ELISA	Referentietest SARS-CoV-2 PCR		
	Uitslag +	Uitslag -	Totaal
Uitslag indextest +	14	0	14
Uitslag indextest -	0	7	7
Totaal	14	7	21

Tabel 5. Berekening parameters laboratorium validatie SARS-CoV-2 IgM ELISA

Parameter	
Sensitiviteit	100%
Specificiteit	100%
Prevalentie (prior kans)	67%
Positief voorspellende waarde	100%
Negatief voorspellende waarde	100%

Tabel 6. Berekening laboratorium validatie

Index test= SARS-CoV-2 IgT ELISA	Referentietest SARS-CoV-2 PCR		
	Uitslag +	Uitslag -	Totaal
Uitslag indextest +	13	0	13
Uitslag indextest -	1	7	8
Totaal	14	7	21

Tabel 7. Berekening parameters laboratorium validatie SARS-CoV-2 IgT ELISA

Parameter	
Sensitiviteit	93%
Specificiteit	100%
Prevalentie (prior kans)	67%
Positief voorspellende waarde	100%
Negatief voorspellende waarde	88%

De acceptatie criteria voor de laboratorium validatie waren:

- *De positieve en de negatieve resultaten dienen voor 95% overeen te komen met de resultaten van de PCR bij een ziekteduur van meer dan 15 dagen.*
De overeenkomst tussen de SARS-CoV-2 PCR en de SARS-CoV-2 IgM ELISA is 100%. De overeenkomst tussen de SARS-CoV-2 PCR en de SARS-CoV-2 IgT ELISA is 95,2%. Het monster wat negatief is in de IgT ELISA, is zwak positief in de IgM ELISA. Het tijdstip van monstername na 1^e ziektedag is 8 dagen wat binnen het criterium van 15 dagen valt. Het criterium wat we gesteld hebben voor de positieve en negatieve resultaten is behaald.
- *Specificiteit en sensitiviteit mogen niet lager zijn dan 85 %.*
Sensitiviteit van de SARS-CoV-2 IgM ELISA is 100% en van de SARS-CoV-2 IgT ELISA 93%. Specificiteit van beide ELISA's is 100%. Dit acceptatiecriterium is ook behaald.

Interpretatie, berekening, uitslag

- Criteria voor positieve of negatieve uitslagen

De resultaten worden berekend door elke monsterabsorptiewaarde (A) te relateren aan de Cutoff (C.O.) van de plaat.

De Cutoff wordt als volgt berekend voor:

SARS-CoV-2 IgM

Cutoff = $N_c \times 2,1$

(N_c = de gemiddelde absorptiewaarde voor drie negatieve controles).

SARS CoV-2 Ab totaal

Cutoff = $N_c + 0,16$

(N_c = de gemiddelde absorptiewaarde voor drie negatieve controles).

Resultaten worden als volgt geïnterpreteerd:

Negatieve resultaten (A/CO < 0.9): monsters met een absorptiewaarde lager dan de afkapwaarde zijn negatief voor deze assay, wat aangeeft dat er geen SARS-CoV-2 antilichamen zijn gedetecteerd met WANTAI SARS-CoV-2 ELISA.

Positieve resultaten (A/CO ≥ 1.1): monsters met een absorptiewaarde die gelijk is aan of groter is dan de afkapwaarde worden als positief beschouwd.

Dubieus (A/C.O. = 0.9-1.1): monsters met een absorptiewaarde tot Cutoff ratio tussen 0,9 en 1,1 worden beschouwd als dubieus en het opnieuw insturen van een test van deze samples is aan te bevelen om de eerste resultaten te bevestigen.

- Remming

In de bijsluiter staat dat de uitvoering van de assay wordt gehinderd door zeer lipemische, icterische of hemolytische monsters. Deze mogen niet worden gebruikt omdat ze bij de assay valse resultaten kunnen opleveren. Patiënten monsters worden geaccepteerd volgens [PR-Materiaalontvangst en aanvraagverwerking](#). De grenzen die worden aangehouden als acceptabel voor patiënten monsters bij het CBSL liggen onder bovenstaande grenzen.

Conclusie vries-dooi cycli van monsters volgt.

- Turn around en hands-on time

Het protocol op de BEP is ongeveer 1,5 uur. De hands-on time is ongeveer een uur omdat de kits in ieder geval een half uur op kamertemperatuur moeten komen. Turn around time is 2,5 uur.

-Algemene conclusie

De voorlopige conclusie is dat data uit deze validatiestudie aantonen dat de SARS-CoV-2 ELISA's passen en dat deze ELISA's gebruikt kunnen worden voor het aantonen van antistoffen tegen SARS-CoV-2.

De voorlopige validatie van deze ELISA's, zoals hier beschreven, voldoet aan de vooraf gestelde acceptatie criteria. Na het ontvangen van voldoende positieve bloedmonsters en testkits kan er een volledige validatie uitgevoerd gaan worden.

-Aanbevelingen

Aanbevolen wordt om op korte termijn de serologische bepalingen (door middel van ELISA) op antistoffen tegen SARS-CoV-2, te implementeren in de routine diagnostiek. Daarbij dienen onderstaande punten wel in acht te worden genomen:

- Deze ELISA kan ingezet worden uit serum of uit plasma.
- De ELISA's worden op de BEP 2000 ingezet.
- De ELISA's kunnen niet in combinatie met de Siemens testen gedraaid worden op de BEP 2000.

Kwaliteitsbeheersing

Als een methode in gebruik genomen gaat worden dienen de volgende acties uitgevoerd te worden

1. *Testcodes definiëren (bij methode)*
Testcodes zijn M_SARSCOV_M_SER_RUW, M_SARSCOV_M_SER_INT, M_SARSCOV_T_SER_RUW en M_SARSCOV_T_SER_INT
2. *Werklijst definiëren (bij methode)*
3. *Kwaliteitscontrole definiëren (bij methode)*
De testresultaten zijn geldig als aan de criteria voor kwaliteitscontrole is voldaan.

Kwaliteitscontrole SARS-CoV-2 IgM:

- De absorptiewaarde van de positieve controles moeten $\geq 0,800$ zijn
- De absorptiewaarde van de negatieve controles moeten $\leq 0,100$ zijn

Kwaliteitscontrole SARS CoV-2 IgT:

- De absorptiewaarde van de positieve controles moeten $\geq 0,190$ zijn
- De absorptiewaarde van de negatieve controles moeten $\leq 0,100$ zijn

Als een van de negatieve controles niet voldoet aan de kwaliteitscontrolecriteria, moet deze worden weggelaten en moet de gemiddelde waarde worden berekend met behulp van de overige twee waarden. Als meer dan één negatieve controle niet voldoet aan de specificaties, is de test ongeldig en moet deze worden herhaald.

4. *Evt. online koppelingsresultaten verifiëren (bij methode)*

5. *Voorraadbeheer regelen*

De plastics die gebruikt worden voor deze test zijn reeds in gebruik en hiervoor is de voorraadbeheer geregeld. De SARS CoV-2 IgM ELISA kit en SARS CoV-2 Ab ELISA kit zijn opgenomen in ons bestelsysteem.

Firma	Reagentia/Plastic	Bestellen	Minimale Voorraad
Diasorin	BEP conductive tips 1100 ul	0	2
	BEP conductive tips 300 ul	0	2
	BEP waste bags	0	1
	BEP bottles 2,5 ml	0	1
Sanbio	Wantai SARS CoV-2 IgM ELISA kit	5	2
	Wantai SARS CoV-2 Ab ELISA kit	5	2

6. *SOP z.s.m. geldig verklaren*
7. *Medewerkers inwerken*
8. *PRI uitvoeren*
9. *PRI bespreken met medewerkers*

Samenhangende procedures en formulieren

- [PR Veiligheid en hygiëne \(versie 10\)](#)
- [PR Materiaalontvangst en aanvraagverwerking \(versie 23\)](#)
- [WV-S-BD BEP 2000 \(versie 12\)](#)

Bijlagen

- [Bijsluiter SARS-CoV-2 Ab ELISA V1](#)
- [Bijsluiter SARS-CoV-2 IgM ELISA V1](#)

Literatuur

- [Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus](#)

Akkoord verslag

Opsteller

Arts Microbioloog

Datum :
 Naam :
 Handtekening :

Einde document

Evaluatie van prestatiekenmerken van de Euroimmun ELISA

Verricht in Admiraal de Ruyter ziekenhuis, Goes

Door: Bieke van Looy, dr 5 1 2e, arts microbioloog, prof dr. Ger Rijkers en drs 5 1 2e, arts-microbioloog

Inleiding en voorafgestelde eisen:

Een test die antistoffen tegen SARS-CoV-2 bepaalt is nuttig zijn om vast te stellen of iemand recent een infectie met dit virus heeft doorgemaakt. Omdat dit virus nog maar recent in Nederland is geïntroduceerd is voornamelijk de sensitiviteit en specificiteit van de IgG antistoffen van belang, als marker voor het hebben doorgemaakt van de infectie. Beide zouden >98% moeten zijn in een laag prevalentie populatie (<10%). De sensitiviteit en specificiteit van de IgA antistoffen zijn minder belangrijk in de huidige situatie, daar worden nu geen eisen voor vastgesteld.

Methode:

Voor de evaluatie werd gebruik gemaakt van sera van 40 patiënten die dusdanig ziek waren vanwege een infectie met SARS-CoV-2 dat ze moesten worden opgenomen. Van iedere patiënt werd de eerste ziektedag nagevraagd en geregistreerd. Van dezelfde patiënt werden gedurende de opname periode meerdere bloedmonsters afgenomen, waarbij het aantal dagen tussen de eerste ziektedag en de afname datum werd berekend. Daarnaast werden sera van 41 bewezen COVID-19 positieve gezondheidsmedewerkers meegenomen. Deze hadden allen milde klachten. Ook hiervan werden de eerste ziektedag en afnamedatum van serum geregistreerd. De sera werden gebruikt om te bepalen op welk moment in het ziekteproces de antistof test positief werd voor IgA en IgG antistoffen tegen SARS-CoV-2. Dit is de sensitiviteitsmeting. Er worden ook 73 sera meegenomen die in 2019 waren afgenomen van patiënten die zeker geen SARS-CoV-2 infectie hadden gehad. Deze sera waren afkomstig van patiënten van verschillende leeftijden, zowel mannen als vrouwen, waaronder ook zwangeren, en patiënten die een infectie hadden met een ander coronavirus dan SARS-CoV-2. Ook werden patiënten met rheumafactoren in bloed meegenomen. Deze sera vormden het specificiteitspanel.

Resultaten:

Zie tabel 1 voor de resultaten. De specificiteit van de IgG antistoffen was 100% voor de Euroimmun ELISA. De specificiteit van de IgA antistoffen was in dit cohort 89%. De sensitiviteit van de IgA en IgG antistof testen hing samen met de tijd na ontstaan van klachten en de ernst van infectie.

Conclusie en discussie:

De Euroimmun IgG ELISA is zeer specifiek, de specificiteit van de IgA antistof test is matig. Daardoor is dit onderdeel van de test in een laag prevalentie omgeving, zonder ondersteuning van de IgG antistoffen niet bruikbaar. Er is een opvallend verschil in sensitiviteit te zien als mensen met milde klachten (zorgpersoneel) vergeleken worden met mensen met ernstige klachten. Het cohort is onvoldoende lang vervolgd om een conclusie te kunnen trekken over het mogelijke uitblijven van een immuunrespons. Het kan ook zijn dat in de groep met milde klachten de immuunrespons trager op gang komt. Er kan niet worden uitgesloten dat het gebrek aan sensitiviteit van de Euroimmun ELISA de conclusie over de immuunrespons negatief beïnvloedt. Voor definitieve conclusies moeten de resultaten vergeleken worden met een andere assay.

Sensitiviteitspanel			gehospitaliseerde patiënten	zorgpersoneel (milde infecties)
afname t.o.v 1e ziektedag			Euroimmun ELISA	Euroimmun ELISA
1-7 dagen	IgA	pos	15	0
		n	18	0
		%pos	83%	NA
	IgG	pos	7	0
		n	18	0
		%pos	39%	NA
8-14 dagen	IgA	pos	25	1
		n	28	2
		%pos	89%	50%
	IgG	pos	19	0
		n	28	2
		%pos	68%	0%
15-21 dagen	IgA	pos	15	9
		n	16	13
		%pos	94%	69%
	IgG	pos	13	5
		n	16	12
		%pos	81%	42%
22-28 dagen	IgA	pos	6	16
		n	7	21
		%pos	86%	76%
	IgG	pos	6	15
		n	7	21
		%pos	86%	71%
>29 dagen	IgA	pos	2	7
		n	2	13
		%pos	100%	54%
	IgG	pos	2	10
		n	2	13
		%pos	100%	77%
Specificiteitspanel				
	IgA	fout-pos	8	
		n	73	
		% spec	89%	
	IgG	fout-pos	0	
		n	73	
		% spec	100%	

Figuur 1. Performance Euroimmun Elisa bij gehospitaliseerde patiënten en zorgpersoneel, afgezet ten opzichte van de eerste ziektedag.

Department of Medical Microbiology and Infection Control, Franciscus Gasthuis & Vlietland

Comparison of diagnostic accuracies of rapid serological tests and ELISA to molecular diagnostics in patients with suspected COVID-19 presenting to the hospital

Objectives: To assess the diagnostic performance of rapid lateral flow immunochromatographic assays (LFA) compared to enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and nucleic acid amplification tests (NAT) in suspected coronavirus disease 2019 (COVID-19) patients.

Methods: Patients presenting to a Dutch teaching hospital were eligible between March 17 and April 10, 2020, when they had respiratory symptoms that were suspected for COVID-19. The performances of six different LFA tests were evaluated in plasma samples obtained on corresponding respiratory sample dates of NAT testing. Subsequently, the best performing LFA was evaluated in 228 patients and in 50 sera of a historical patient control group.

Results: In the pilot analysis sensitivity characteristics of LFA were heterogenous ranging from 2/20 (10%) to 11/20 (55%). In the total cohort, Orient Gene Biotech COVID-19 IgG/IgM Rapid Test LFA had a sensitivity of 43/99 (41%) and specificity of 126/129 (98%). Sensitivity increased to 31/52 (60%) in patients with at least seven days of symptoms, and to 21/33 (64%) in patients with C-reactive protein (CRP) ≥ 100 . Sensitivity and specificity of Wantai ELISA was 36/67 (54%) and 43/43 (100%) in all patients, respectively, but sensitivity increased to 27/36 (75%) in patients with at least seven days of symptoms.

Table 1. Sensitivity of lateral flow immunochromatographic immunoassays in pilot cohort

LFA test	Sensitivity	Specificity
Boson Biotech Rapid 2019-nCoV IgG/IgM Combo Test Card	10 / 20 (50%)	5/ 5 (100%)
Cellex qSARS-CoV-2 IgG/IgM Cassette Rapid Test	4 /20 (20%)	5/ 5 (100%)
Dynamiker Biotechnology 2019-nCOV IgG/IgM Rapid Test	2 / 20 (10%)	5/ 5 (100%)
Orient Gene Biotech COVID-19 IgG/IgM Rapid Test Cassette	11 / 20 (55%)	5/ 5 (100%)
Prometheus Bio 2019-nCOV IgG/IgM Rapid Test	4 / 20 (20%)	5/ 5 (100%)
Wantai SARS-CoV-2 Ab	10 / 20 (50%)	5/ 5 (100%)

Department of Medical Microbiology and Infection Control, Franciscus Gasthuis & Vlietland

Table 2. Performance characteristics of Orient Gene Biotech LFA and Wantai ELISA in COVID-19 suspected patients compared to NAT as reference standard

	All patients	Time from symptom onset to sample collection < 7 days ^a	Time from symptom onset to sample collection ≥ 7 days ^a	p-value	Non-ICU	ICU	p-value	CRP <100	CRP ≥100	p-value
Orient Gene Biotech LFA										
Sensitivity	43/99 (43)	11/39 (28)	31/52 (60)	<0.01	35/83 (42)	8/16 (50)	0.56	22/66 (33)	21/33 (64)	<0.01
Specificity	126/129 (98)	39/40 (98)	48/50 (96)	0.96	122/124 (98)	4/5 (80)	<0.01	109/111 (98)	17/18 (94)	0.33
Wantai ELISA										
Sensitivity	36/67 (54)	8/26 (31)	27/36 (75)	<0.01	27/52 (52)	9/14 (64)	0.37	21/47 (45)	15/20 (75)	0.02
Specificity	43/43 (100)	9/9 (100)	23/23 (100)	1.00	40/40 (100)	3/3 (100)	1.00	39/39 (100)	4/4 (100)	1.00

^a In some patients time from symptom onset was undetermined or unavailable.

Data are presented in absolute numbers (percentages).

ICU = intensive care unit.

Basisanalyse Wantai IgTotaal en IgM testen

leeftijd/geslacht per groep

van 151 personen zijn in totaal 201 bepalingen gedaan.

Deze personen zijn als volgt verdeeld

	Totaal (n, mediaan, min-max age)	M (n, mediaan, min-max age)	V (n, mediaan, min-max age)
Afdeling	22 (74.5, 52-89)	13 (72, 52-87)	9 (75, 58-89)
IC	37 (69, 39-81)	29 (69, 39-81)	8 (71, 51-74)
Totaal (afd+IC)	59 (71,39-89)	42 (70, 39- 87)	17 (74, 51-89)
mild werknemer	19 (38,22-57)	4 (38, 26-47)	15 (38,22-57)
Totaal (afd+IC+werknemer)	78 (65.5,22-89)	46 (68.5, 26- 87)	32 (57.5, 22-89)
geenCOVID	73 (33, 51,26)	51,26	12 (34,0-94)

serumafname patienten

	Dagen tussen begin klachten en bloedafname Mediaan [min-max];(n met info /van n totaal)
Afdeling	16 [9-22]; (19/22)
IC	12 [1-33]; (34/37)
Totaal (afd+IC)	14 [1-33]; (53/59)
mild werknemer	30 [26-38]; (15/19)
Totaal (afd+IC+werknemer)	16.5 [1-38]; (68/78)

Wantai - IgM

	EQUIVOCAL	NEG	POS	<i>n</i> =	
Afdeling	0	0	22		22
geenCOVID	2	66	5		73
IC	1	1	35		37
mild werknemer	0	0	19		19
					151

1e monster pp

specificiteit: 90.41 (CI: 80.67 - 95.73)
 sensitiviteit Afdeling: 100 (CI: 81.5 - 100)
 sensitiviteit IC: 94.59 (CI: 80.47 - 99.06)
 sensitiviteit mild (medewerker): 100 (CI: 79.08 - 100)

PCR	EQUIVOCAL	NEG	POS
NEG	0	0	1
POS	1	1	74

Wantai- IgTotaal**IgTotaal**

	EQUIVOCAL	NEG	POS	<i>n</i> =	
Afdeling	0	0	22		22
geenCOVID	0	73	0		73
IC	1	3	33		37
mild werknemer	1	0	18		19
					151

1e monster pp

specificiteit: 100 (CI: 93.77 - 100)
 sensitiviteit Afdeling: 100 (CI: 81.5 - 100)
 sensitiviteit IC: 89.19 (CI: 73.64 - 96.48)
 sensitiviteit mild (medewerker): 94.74 (CI: 71.89 - 99.72)

PCR	EQUIVOCAL	NEG	POS
NEG	0	0	1
POS	2	3	71

Inhoudsopgave

Inhoudsopgave	1
1. Doel	2
1.1 Verantwoordelijkheden	2
2. Aanpak validatie/verificatie inclusief tijdsplanning	2
3. Definities en afkortingen	3
4. Acceptatiecriteria	3
5. Klinische validatie	4
6. Kwaliteitscontrole	4
7. Bijbehorende documenten	4
8. Goedkeuring validatie/verificatie plan	4
9. Meetresultaten	4
11. Berekening parameters	4
11.1 Gevoeligheid	4
11.2 Lineariteit (bij kwantitatieve test)	5
11.3 Specificiteit	5
11.4 Juistheid	5
11.5 Precisie (haalbaarheid-reproduceerbaarheid)	5
11.6 Meetonzekerheid	5
11.7 Meetinterval	5
12. Conclusies	6
13. Accordering validatie/verificatie rapport	6

1. Doel

Het doel is om de Wantai SARS-CoV-2 IgM en AB (totaal IgG) ELISA en de Euroimmun SARS-Cov-2 diagnostische testen te valideren. Deze testen zijn van belang zodat kan worden aangetoond of iemand COVID-19 heeft doorgemaakt. COVID-19 is een luchtweginfectie die wordt veroorzaakt door het SARS-CoV-2 virus, een virus dat in december 2019 voor het eerst werd aangetoond bij een patient uit Wuhan, China. Het virus veroorzaakt bij sommige mensen ernstige ziektebeelden, waarbij IC-opname noodzakelijk kan zijn en mensen soms overlijden. In andere gevallen veroorzaakt het slechts milde symptomen of verloopt de ziekte volledig asymptomatisch. De ziekte legt momenteel een grote druk op het Nederlandse zorgsysteem en het is daarom belangrijk om te kunnen bepalen wie de ziekte heeft doorgemaakt en wie niet.

1.1 Verantwoordelijkheden

Auteur plan: M Mulder

Auteur verslag: M. Mulder

Uitvoering verificatie/validatie: analisten infectieserologie

2. Aanpak validatie/verificatie inclusief tijdsplanning

NB: alle onderstaande testen worden uitgevoerd voor zowel de Wantai SARS-CoV-2 als de Euroimmun SARS-Cov-2 diagnostische test.

- Gevoeligheid: er worden 15 serum samples getest van patienten die positief zijn getest met behulp van PCR. Er worden van alle patienten samples getest tenminste 14 dagen na start klachten.
- Lineariteit (bij kwantitatieve test): nvt
- Specificiteit: er worden 15 verschillende negatieve samples getest:
 - Tenminste 11 random sera van patienten van voor december 2019
 - Indien mogelijk 2 sera van patienten die recent voor het betreffende serum positief zijn getest voor een ander coronavirus dan SARS-CoV
 - Indien mogelijk 1 zwangeren en 1 acute EBV meenemen (mogelijk aspecifieke reactiviteit)
- Juistheid: nvt

- Precisie (haalbaarheid-reproduceerbaarheid): Van 3 patienten en 3 negatieve controles wordt het sample herhaald in dezelfde run en van 3 patienten wordt op 2 andere dagen in een andere run het laatste sample herhaald om de intra- en inter run variabiliteit te testen.
- Meetonzekerheid: nvt
- Meetinterval: nvt

3. Definities en afkortingen

CDL	Centraal Diagnostisch Laboratorium
COVID-19	Coronavirus disease 2019, een ziekte die wordt veroorzaakt door het virus SARS-CoV-2
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
SARS-CoV 2	Het virus dat de ziekte COVID-19 veroorzaakt.
Maastricht UMC+	Maastricht Universitair Medisch Centrum
MMB	Medische Microbiologie
Odin	Online Documenten en Informatie Navigatiesysteem

4. Acceptatiecriteria

De acceptatiecriteria van de bepaalde parameters zijn:

- Gevoeligheid: 90%. Uit literatuur blijkt dat niet iedereen na 14 dagen al IgM en IgG antistoffen aanmaakt. Een negatief resultaat bij een PCR-positieve patient is dus niet in alle gevallen te wijten aan de test. Volgens een recent onderzoek zou op dag 15 respectievelijk 94.3% en 79.8% IgM en IgG antistoffen maken. De samples worden daarom uitgewisseld met een ander ziekenhuis om te bekijken of hier dezelfde resultaten worden gevonden.
- Lineariteit (bij kwantitatieve test): nvt
- Specificiteit: 95% De test mag nauwelijks vals-positieve resultaten geven, aangezien een vals-positief resultaat de schijn zal wekken dat iemand al afweer heeft ontwikkeld tegen SARS-CoV-2 en dus over immuniteit beschikt.
- Juistheid: nvt
- Precisie (haalbaarheid-reproduceerbaarheid): De waarde van de positieve samples mag bij de verschillende testmomenten niet meer dan 20% verschillen. Bij negatieve samples wordt aangehouden dat ze alle keren negatief zijn, ongeacht de meetwaarde.
- Meetonzekerheid: nvt
- Meetinterval:

5. Klinische validatie*Alleen bij validatie: nvt***6. Kwaliteitscontrole**

De test wordt beschouwd als valide wanneer de resultaten van de verificatie voldoen aan de eisen volgens de acceptatiecriteria.

7. Bijbehorende documenten

Tabel 7.1

Bijbehorende documenten en formulieren	
Titel	Codering
Zhao et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. (Nog niet gepubliceerd)	
WANTAI SARS-CoV-2 Ab en IgM ELISA handleiding	
Euroimmun IgA en IgG handleiding	

8. Goedkeuring validatie/verificatie plan

Naam: 5.1.2e

Functie: arts-microbioloog

Datum: 3-4-2020

9. Meetresultaten

Zie bijlage, daar zijn alle meetresultaten terug te vinden

10. Afwijkingen van het validatie/verificatieplan

Er zijn geen afwijkingen geweest van het validatieplan

11. Berekening parameters**11.1 Gevoeligheid**

Wantai totaal Ig	PCR pos	PCR neg	Totaal
Elisa pos/dub	15	0	15
Elisa neg	0	15	15

Totaal	15	15	30
---------------	----	----	----

Wantai IgM	PCR pos	PCR neg	Totaal
Elisa pos/dub	15	1	16
Elisa neg	0	14	14
Totaal	15	15	30

In totaal zijn 15 samples getest van patiënten welke positief waren Met de PCR, allen hadden een eerste ziektedag van meer dan 14 dagen. Hiervan zijn allen positief getest voor de Totaal Ig en voor de IgM. Dus zowel de totaal Ig als de IgM hebben een sensitiviteit van 100% in de gemeten samples en voldoen dus aan de eerder gestelde eisen.

11.2 Lineariteit (bij kwantitatieve test)

N.v.t.

11.3 Specificiteit

Er zijn 15 negatieve samples getest allen kwam van sera, welke voor 2020 zijn afgenomen. Aangezien het SARS-COV-2 toen nog niet circuleerde, moeten deze samples negatief zijn geweest. Van de Totaal Ig waren alle 15 samples negatief, dus ook een specificiteit van 100%. Bij de IgM liet 1 sample een dubieus resultaat zien. Dit leidt tot een specificiteit van 93%. Dit is lager van de vooraf gestelde grens, echter het resultaat wat dit sample laat zien, is reden voor hertesten en/of confirmatie, namelijk een negatieve totaal Ig en een grenswaarde IgM, afhankelijk van eerste ziektedag.

11.4 Juistheid

N.v.t.

11.5 Precisie (haalbaarheid-reproduceerbaarheid)

Er zijn 3 positieve samples zijn 3 maal ingezet in de dezelfde run voor de intrarun variatie. Dit toonde een variatie van 0%, en 12% voor de totaal Ig. En de IgM liet een variatie zien van 0%, 4% en 5 %, Daarbij voldoen ze aan de eerder gestelde eisen.

1 sample is in 2 verschillende runs ingezet voor de interrun variatie. Deze liet voor de totaal Ig een variatie zien van 2,5% en voor de IgM een variatie van 4,71%. Hierbij voldoet ook dit aan de eerder gestelde eisen.

11.6 Meetonzekerheid

N.v.t.

11.7 Meetinterval

N.v.t.

11.8 Positief voorspellende waarde

De positief voorspellende waarde van de totaal Ig is (15/15) 100% en van de IgM is (15/16) 93,7%.

11.9 Negatief voorspellende waarde

De negatief voorspellende waarde van de totaal Ig is (15/15) 100% en van de IgM is (14/14) 100%.

12. Conclusies

De gevonden gevoeligheid voor zowel de totaal Ig (100%) en IgM (100%) voldoen aan de eerder gestelde eis van minimaal 90% en worden geaccepteerd.

De gevonden specificiteit van de totaal Ig (100%) voldoet aan de eerder gestelde eis van minimaal 95% en is geaccepteerd. De IgM daarentegen liet een specificiteit zien van 93% en ligt onder de eerder gestelde eis. Een solitair IgM positief resultaat dient bevestigd te worden middels een confirmatie test. De inter- en intrarun variaties zijn onder de eerder gestelde grens van 20% en worden geaccepteerd.

13. Accordering validatie/verificatie rapport

Vrijgeven van dit document vindt plaats door middel van digitale autorisatie in Odin door het kernstaflid.

Uitslagen Wantai

				RIVM	Wantai Waarde	Wantai Interpretatie	Wantai Waarde	Wantai Intepretatie
Ernst	geslacht	leeftijd	aantal ziektedagen	leeftijdsgroep	totaal Ig	totaal Ig	IgM	IgM
IC	v	73	22	>70	21,341	positief	416,667	positief
IC	m	64	19	19-70	18,128	positief	284,048	positief
IC	m	75	16	>70	21,341	positief	409,048	positief
IC	m	73	16	>70	21,341	positief	416,667	positief
IC	m	65	20	19-70	5,207	positief	329,762	positief
IC	v	75	19	>70	17,707	positief	416,667	positief
IC	m	68	19	19-70	21,341	positief	268,333	positief
IC	m	74	22	>70	21,341	positief	187,976	positief
IC	m	79	17	>70	11,707	positief	416,667	positief
IC	v	76	16	>70	21,341	positief	162,976	positief
IC	m	67	17	19-70	21,341	positief	416,667	positief
IC	v	76	17	>70	21,341	positief	266,31	positief
IC	m	63	21	19-70	21,341	positief	280,357	positief
mild	v	48	15	19-70	6,634	positief	156,071	positief
mild	v	58	30	19-70	2,091	positief	1,19	positief
andere corona	m	71	n.v.t.	>70	0,018	negatief	0,714	negatief
andere corona	v	64	n.v.t.	19-70	0,043	negatief	1,071	grenswaarde
zwanger	v	16	n.v.t.	12-18	0,037	negatief	0,595	negatief
negatieve controle	v	25	n.v.t.	19-70	0,037	negatief	0,714	negatief
negatieve controle	v	33	n.v.t.	19-70	0,012	negatief	0,714	negatief
negatieve controle	v	71	n.v.t.	>70	0,03	negatief	0,714	negatief
negatieve controle	m	63	n.v.t.	19-70	0,043	negatief	0,833	negatief
negatieve controle	m	56	n.v.t.	19-70	0,018	negatief	0,714	negatief
negatieve controle	m	17	n.v.t.	12-18	0,024	negatief	0,833	negatief
negatieve controle	m	78	n.v.t.	>70	0,024	negatief	0,595	negatief
negatieve controle	m	36	n.v.t.	19-70	0,037	negatief	0,714	negatief
negatieve controle	v	64	n.v.t.	19-70	0,03	negatief	0,595	negatief
negatieve controle	v	49	n.v.t.	19-70	0,049	negatief	0,714	negatief
negatieve controle	v	6	n.v.t.	<12	0,03	negatief	0,595	negatief
acute EBV	v	17	n.v.t.	12-18	0,177	negatief	0,714	negatief