

Copyright© BioTrack 2020



Validatie van de BioTrack-MED SARS-CoV-2 applicatie in speeksel

© BIOTRACK | Versie : 16 december 2020.

Deze publicatie mag zonder voorafgaande schriftelijke toestemming niet verspreid worden dan wel delen daaruit overgenomen/geciteerd worden.

5.1.2e | BioTrack, Leeuwarden, Afdeling Research & Development

5.1.2e | BioTrack, Leeuwarden, Afdeling Research & Development

5.1.2e | BioTrack, Leeuwarden, Afdeling Research & Development

Index

Sectie	Pagina
Samenvatting	3
Inleiding	4
Materialen en Methoden	4
Afbakening en criteria	5
Toepasbaarheid	5
Resultaten	9
Conclusie	9
Bijlage I	10
Bijlage II	11
Bijlage III	13

Samenvatting

In dit rapport worden de resultaten weergegeven van de validatie van de SARS-CoV-2 detectie in speeksel middels de BioTrack-MED analyzer, met daarin geïmplementeerd de SARS-CoV-2 applicatie, fluorescentie in situ hybridisatie. Als referentiemethode werd gebruik gemaakt van de RT-PCR en als referentiemateriaal van de keel-neus swab. De dataverzameling en rapportage is verzorgd door BioTrack, Leeuwarden. De toegepaste technologie (CE-IVD gemarkeerd onder nummer: NL-CA002-2020-51055) werd eerder gevalideerd voor bloed in samenwerking met het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM).

In deze validatiestudie voor speeksel werden 130 RT-PCR positieve speekselmonsters en 361 RT-PCR negatieve speekselmonsters getest middels fluorescentie in situ hybridisatie. Het resultaat van de studie was een sensitiviteit van 96.9% en een specificiteit van 98.6%. Geconcludeerd kan worden dat de detectie van SARS-CoV-2 in speeksel middels de SARS-CoV-2 applicatie van de BioTrack-MED analyzer zich goed verhoudt tot de referentiemethode, de RT-PCR, en voldoet aan de WHO standaard.

1. Inleiding

Dit document betreft de rapportage "Validatie van de BioTrack-MED SARS-CoV-2 applicatie in speeksel". De dataverzameling en rapportage is verzorgd door BioTrack, Leeuwarden. De toegepaste technologie is CE-IVD gemarkeerd onder nummer 5.1.21 en werd eerder, in een separate studie, gevalideerd voor bloed in samenwerking met het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), afdeling respiratoire virusziekten. Dit rapport heeft als doel de toepasbaarheid van fluorescentie in situ hybridisatie (FISH) als analytisch principe in de detectie van SARS-CoV-2 viruspartikels in speeksel vast te stellen, gebruikmakende van de BioTrack-MED analyzer, waarbij RT-PCR als referentie zal worden gebruikt.

Iedere diagnostische methode dient geëvalueerd (gevalideerd) te zijn voor specifieke omstandigheden en een gedefinieerde algemene of bijzondere doelgroep. Elk laboratorium dient zich hiervan te vergewissen en zelf een evaluatie/validatie uit te voeren wanneer de precieze diagnostische setting (dat wil zeggen de gehele keten) niet reeds elders voor een specifiek product met voldoende resultaat is geëvalueerd. Zo ook hier; het huidige document voorziet in zo'n eigen validatie aangezien de precieze diagnostische setting voor gebruik van FISH in speeksel voor SARS-CoV-2-detectie niet eerder met voldoende diepgang werd geëvalueerd.

Deze validatie is uitgevoerd conform de nationale (RIVM¹) en internationale (WHO², FDA³) richtlijnen.

2. Materialen en Methoden

Monsters

In totaal zijn 130 positieve en 361 negatieve monsters geïncludeerd in de studie, welke werden verkregen uit restmaterialen van positieve en negatieve monsters. De studiepopulatie bestaat uit mensen welke zich vrijwillig hebben aangemeld voor een speekselonderzoek, uitgevoerd door BioTrack te Leeuwarden, in de periode van 1-10-2020 tot 1-12-2020. De studiepopulatie bestond uit circa 89% mannen en 11% vrouwen in de leeftijd van 18-70 jaar. Alle personen zijn getest op SARS-CoV-2 door een lokale GGD (\pm 1 dag voor of na speekselafname) met behulp van RT-PCR van een keel-neus swab. De gebruikte RT-PCR protocollen verschillen per laboratorium. Sommige laboratoria gebruiken gevalideerde in-house protocollen, terwijl andere laboratoria commerciële testen gebruiken (rivm.nl/sites/default/files/2020-11/Toelichting%20Ct-waarde_0.pdf). Alle negatief-geteste personen hadden milde klachten op het moment van monsterafname. Bij de positief-geteste personen waren 80% mild-symptomatisch en 20% ernstig-symptomatisch op het moment van monsterafname. De inclusiecriteria voor de studiepopulatie waren: \geq 18 jaar oud; mild- tot ernstig-symptomatisch op het moment van monsterafname; positief of negatief RT-PCR resultaat, uitgevoerd door een lokale GGD.

Alle personen in deze studie hebben getekend voor het mogelijke gebruik van hun speekselmonster voor onderzoek door BioTrack. Omdat het hier restmateriaal betreft, is voor dit onderzoek geen METC nodig.

¹ Status validatie SARS-CoV-2 antigeen sneltesten, Status per 14 december 2020

² <https://extranet.who.int/paweb/vitro-diagnostics/coronavirus-disease-covid-19-pandemic-%E2%80%94-emergency-use-listing-procedure-eul-open>

³ Policy for Coronavirus Disease-2019 Tests During the Public Health Emergency (Revised) – Immediately in Effect Guidance for Clinical Laboratories, Commercial Manufacturers, and Food and Drug Administration Staff. Document issued on the web on May 11, 2020.

Analytische methode

Fluorescentie in situ hybridisatie (FISH) is een DNA/RNA detectiemethode. Het principe van deze methode is als volgt: een enkelstrengs nucleotide, gelabeld met een (fluorescerend) reporter molecuul wordt aan het te analyseren monster (hier: speeksel) toegevoegd. Dit molecuul, het enkelstrengs nucleotide met daaraan gekoppeld het (fluorescerende) reporter molecuul, wordt aangeduid met de term 'probe'. Het is deze term die in de rest van dit rapport gebruikt zal worden. De DNA-volgorde van de probe bepaald met welk enkelstrengs doel-nucleotide zij kan hybridiseren. Deze DNA-volgorde is dan ook bepalend voor de **specificiteit** van de probe en, dus, de analyse. Nadat de probe specifiek is gehybridiseerd met het enkelstrengs doel-nucleotide wordt de niet-gehybridiseerde probe weggewassen en blijft een specifiek "aangekleurd" monster over welke met diverse fluorescentie-gebaseerde beeldvormende methoden kan worden bestudeerd. Het FISH-principe is reeds meer dan 30 jaar bekend en hierover is een uitgebreide wetenschappelijke bibliografie beschikbaar in de reguliere literatuur databases. Hieronder volgt de specificatie voor de SARS-CoV-2 FISH zoals die in deze studie zal worden gevalideerd.

- De in deze studie toegepaste probe is gericht tegen het expressie-product van het Nucleocapside gen van SARS-CoV-2. De *in-silico* specificiteit van deze probe bedraagt 100% per 20 november 2020.
- Deze probe werd gevalideerd voor gebruik in bloed in een eerdere validatie welke i.s.m. het RIVM werd uitgevoerd.
- Voor het aflezen van de FISH-resultaten werd gebruik gemaakt van de BioTrack-MED analyzer (patentnummer EP 08874964.3), welke ook werd toegepast in de hierboven genoemde validatie.

3. Afbakening en criteria

- a. Het systeem, te weten de fysieke BioTrack-MED analyzer, maar tevens het protocol en de SARS-CoV-2 probe, zijn CE-IVD gemarkeerd onder 5.1.21
- b. Het systeem, te weten de fysieke BioTrack-MED analyzer, maar tevens het protocol en de SARS-CoV-2 probe, zijn eerder gevalideerd voor gebruik in bloed in een validatiestudie welke samen met RIVM werd uitgevoerd. In Bijlage I is een samenvatting van de resultaten van deze eerdere validatiestudie opgenomen.
- c. Het personeel betrokken bij de uitvoering van de huidige studie is minimaal in bezit van een relevante (i.e. medisch-analytische) opleiding op hbo-niveau.
- d. Evaluatie in een juiste studiepopulatie om sensitiviteit en specificiteit vast te stellen.
- e. Analyse van ten minste 100 RT-PCR positieven en ten minste 300 RT-PCR negatieven.
- f. Een minimale sensitiviteit van $\geq 90\%$ en een specificiteit van $\geq 97\%$ ten opzichte van de RT-PCR (WHO standaard).

4. Toepasbaarheid

Aangaande de toepasbaarheid van de resultaten van deze validatiestudie zullen onderstaande aspecten toegelicht worden. Het betreft hier:

- a. De doelpopulatie
- b. Soort monster
- c. Aflezen van de uitslag

Copyright© BioTrack 2020

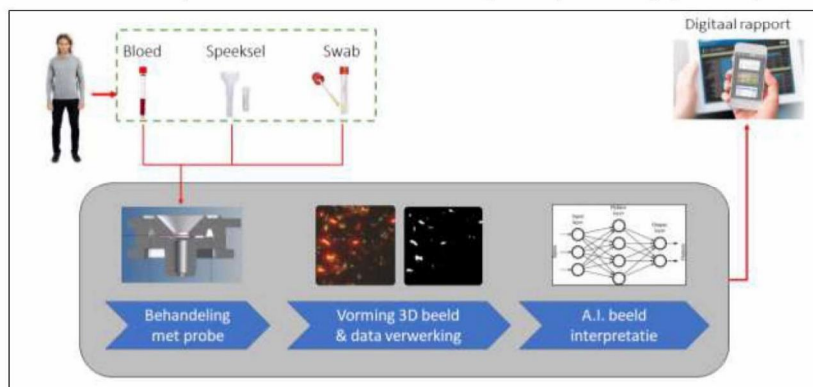


- d. Aantal uitgevoerde testen per dag
- e. Beïnvloeding van de testuitslag
- f. Toegevoegde waarde van de test

Ad (a): De doelpopulatie betreft personen ≥ 18 jaar die mild- tot ernstig-symptomatisch zijn op het moment van monstername.

Ad (b): Het soort monster dat gebruikt wordt binnen deze validatiestudie is speeksel. Dit speeksel is gefixeerd in 70% ethanol (1:1), waarop de SARS-CoV-2 FISH analyse wordt uitgevoerd. De referentiemethode (RT-PCR) wordt toegepast op een keel-neus swab, uitgevoerd door de GGD'en.

Ad (c): Het aflezen van de resultaten van de SARS-CoV-2 FISH-procedure vindt plaats met behulp van de BioTrack-MED analyzer. Een kort overzicht van de werking de analyzer is weergegeven in Figuur 1.

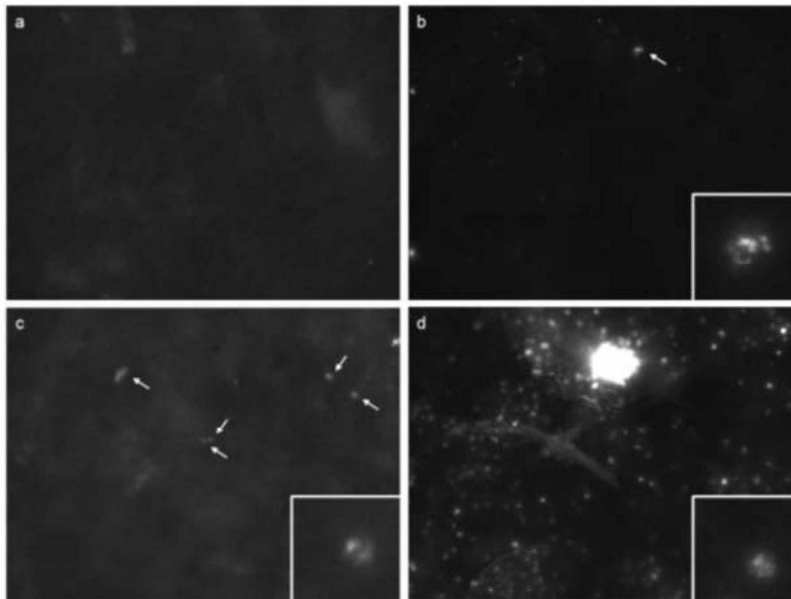


Figuur 1: Korte, grafische weergave van de workflow van de BioTrack-MED analyzer. Het is mogelijk om divers patiëntmateriaal te behandelen met één of meerdere specifieke probes (in een eenvoudig en snel protocol) en een veelvoud van deze materialen vervolgens autonoom door de analyzer te laten beoordelen. De resultaten worden altijd lokaal, op de computer van de analyzer, opgeslagen. Daarnaast kunnen de resultaten digitaal gecommuniceerd worden.

De BioTrack-MED analyzer is in essentie een autonome, multi-sample filtercytometer. De analyzer is in staat om per monster ($n=18$ per run) een microscopisch 3D fluorescentie beeld (200x vergroting, Figuur 2) te produceren en om in dit 3D beeld objecten te isoleren. Per object wordt er vervolgens middels diverse computer vision algoritmen een aantal morfometrische parameters ($n=20$) uitgerekend. De aldus ontstane metadata-set wordt vervolgens aangeboden aan een getraind neuraal netwerk wat in staat is om de aangeboden morfometrische data in diagnostische informatie om te zetten. Deze diagnostische informatie kan informatie zoals virale load en virale activiteit omvatten. Deze diagnostische informatie wordt lokaal op de analyzer opgeslagen. Vervolgens kan de analytische data en diagnostische informatie gedeeld worden in een beveiligde cloud omgeving en/of verzonden worden via geëncrypteerde mail. De specificaties van de BioTrack-MED analyzer staan weergegeven in Bijlage II.

Ad (d): Aflezen van de tests verloopt, zoals hierboven beschreven, volledig automatisch. Het aflezen van een set van 18 samples duurt ongeveer 30-60 minuten. Dat betekent dat een analist tot $((480/30) \times 18 =)$ 288 samples per werkdag kan laten analyseren.


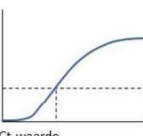



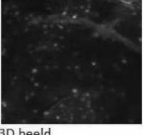



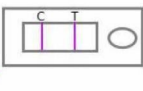


Ad (e): De BioTrack-MED analyzer is ontworpen om buiten een laboratoriumomgeving te functioneren. Het is dan ook een relatief zwaar en robuust toestel. Dat heeft wel tot gevolg dat het systeem *an sich* in een laboratoriumomgeving niet/nauwelijks te lijden heeft van omgevingsinvloeden. Daarnaast voorziet het afname protocol van deze FISH-methode erin dat het speeksel direct in 70% (v/v) ethanol wordt opgevangen. Cellen en biomoleculen in het monster worden daarmee momentaan gefixeerd. Invloeden als temperatuur, biologische degradatie en bewaartijd zijn daarmee geminimaliseerd. Eventuele invloeden op het resultaat worden hoofdzakelijk bepaald door technische fouten van de analist. Ook hier zijn de kansen daarop tot een minimum beperkt doordat het BioTrack-MED protocol zo eenvoudig mogelijk is gemaakt en een aantal interne controle momenten bevat. Daarnaast worden standaard synthetisch geproduceerde positieve en negatieve preparaten geïncubeerd in de analyse-runs. Ook is de analyzer in staat om, autonoom, interne leidingen te desinfecteren en te reinigen. Daarnaast kent de analyzer de mogelijkheid om (interne) vervuiling te detecteren.



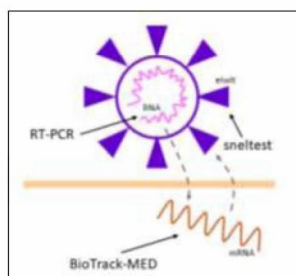
Figuur 2: Microscopische beelden van de SARS-CoV-2 applicatie van de BioTrack-MED analyzer in speekselmonsters. Voorbeeld van een (a) negatief, (b) licht positief, (c) medium positief en (d) zwaar positief testresultaat. De pijlen geven witte bloedcellen aan die positief voor SARS-CoV-2 zijn in (b) en (c). In (d) zijn alle witte bloedcellen in het veld positief getest. De inzet in (b,c,d) laat een positieve witte bloedcel in een grotere magnificatie zien.

Ad (f): Uit de eerdergenoemde validatiestudie waarin het gebruik van SARS-CoV-2-FISH in bloed centraal stond, is duidelijk geworden dat FISH in die matrix vooral geschikt is voor de diagnose van het virus in de latere infectie-fasen. In de huidige validatie staat de analyse in speeksel centraal. De verwachting is dat (bij goede correlatie tussen swab-PCR en speeksel-FISH) een positief testresultaat van de FISH in speeksel dezelfde voorspellende waarde in de vroegere infectie-fase zal hebben als RT-PCR in een keel-neus swab. Mocht dit zo zijn, dan zal dit een indicatie met betrekking tot besmettelijkheid leveren: speeksel (al dan niet geladen met viruspartikels) kan in de vorm van druppels (grotere druppels of aerosolen) door de patiënt worden verspreid in zijn/haar omgeving, bijvoorbeeld door hoesten, niezen of schreeuwen. Personen in de omgeving kunnen besmet raken door het inademen van deze druppels of doordat de druppels, via de handen, in de mond, neus of ogen terecht komen (rivm.nl/coronavirus-covid-19/verspreiden; lci.rivm.nl/aerogene-verspreiding-sars-cov-2-en-ventilatiesystemen-onderbouwing).

De SARS-CoV-2 applicatie van de BioTrack-MED analyzer detecteert het messenger RNA (mRNA) van het Nucleocapside gen van SARS-CoV-2. mRNA is de tussenvorm van het genomisch RNA, de detectievorm van de RT-PCR. Het genomisch RNA detecteert het uiteindelijke genproduct en dus enkel de hoeveelheid viruspartikels (virale load). Naast de RT-PCR worden SARS-CoV-2 sneltesten gebruikt, die zijn gebaseerd op de detectie van virale antigenen van het virale eiwit. Detectie van de tussenvorm van het virale genomische RNA en het virale eiwit, het virale mRNA, zit er precies tussenin en vormt daarmee een 'best of both worlds' benadering (Figuur 3 en 4). De moleculaire detectie van het intermediaire genexpressie product is immers indicatief voor de virale replicatie (virale activiteit).

Test	Doelwit	Resultaat	Snelheid	Gevoeligheid
RT-PCR	 RNA	 Ct-waarde		
BioTrack-MED	 mRNA	 3D beeld		
Sneltest	 eiwit	 precipitatie		

Figuur 3: Informatie over de RT-PCR en Ag sneltest ter vergelijking met de BioTrack-MED SARS-CoV-2 applicatie.



Figuur 4: De aangrijpingspunten van de verschillende SARS-CoV-2 testen. De RT-PCR is gebaseerd op de detectie van het virale RNA, het beginproduct. De BioTrack-MED is gebaseerd op de detectie van het virale mRNA, het tussenproduct. De sneltesten zijn gebaseerd op de detectie van de virale eiwitten, het eindproduct.

5. Resultaten

In totaal zijn 130 positieve en 361 negatieve samples geanalyseerd (bijlage III). Van de 130 positieve samples waren er 4 vals negatief en van de 361 negatieve samples waren er 5 vals positief. Uit deze data is de sensitiviteit en specificiteit berekend ten opzichte van de RT-PCR (referentie) (Tabel 1).

Tabel 1: Sensitiviteit en specificiteit ten opzichte van de RT-PCR.

Parameter	%	95% CI
Sensitiviteit	96,9	92,3-99,2
Specificiteit	98,6	96,8-99,6

6. Conclusie

Op grond van de bovenstaande resultaten, kunnen de volgende conclusies getrokken worden:

- De sensitiviteit (96,9%) en specificiteit (98,6%) van deze studie zijn ruim boven de WHO standaard (sensitiviteit $\geq 90\%$ en een specificiteit $\geq 97\%$ ten opzichte van RT-PCR).
- Er zijn voldoende positieve (130) en negatieve (361) monsters geanalyseerd (richtlijn: minimaal 100 positieve en 300 negatieve monsters).
- De prestatie van de BioTrack-MED SARS-CoV-2 FISH in speeksel is goed voor de doelpopulatie, als gebruikt in deze validatiestudie.
- De te valideren test in dit rapport in een mild- tot ernstig-symptomatische populatie geven gemiddeld 2,3% fout-negatieve en 1,4% fout-positieve uitslagen ten opzichte van de RT-PCR. Het risico om besmette personen te missen met de BioTrack-MED SARS-CoV-2 FISH is erg klein.
- De correlatie tussen de swab RT-PCR en speeksel BioTrack-MED SARS-CoV-2 FISH is zeer goed. Daaruit kan worden vastgesteld dat BioTrack-MED SARS-CoV-2 FISH in speeksel een voorspellende waarde heeft in de vroege infectie-fase. Daarbij zou het ook iets kunnen zeggen over de besmettelijkheid van de persoon, aangezien virus-geladen speeksel in de vorm van druppels door de patiënt kan worden verspreid in zijn/haar omgeving.

Bijlage I: Samenvatting van de resultaten van de validatie van de BioTrack-MED SARS-CoV-2 applicatie in bloed

De validatiestudie van de BioTrack-MED SARS-CoV-2 applicatie in bloed is uitgevoerd in samenwerking met het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM) en bestond uit 2 groepen monsters: een negatieve en een positieve controlegroep. De negatieve controlegroep bestond uit witte bloedcelconcentraten, afkomstig van proefpersonen die blootgesteld waren aan het vogelgriepvirus in de eerste helft van 2018. Hierdoor zijn deze monsters per definitie negatief voor SARS-CoV-2. De positieve controlegroep bestond uit veneus EDTA-bloed van personen die RT-PCR en Wantai (totaal IgG en IgM) SARS-CoV-2 positief waren. De specificiteit en sensitiviteit van de BioTrack-MED SARS-CoV-2 applicatie in bloed versus de RT-PCR waren 100% en 85%, respectievelijk, en versus de Wantai 89% en 100%, respectievelijk. Er is dus sprake van een goede score voor de specificiteit en sensitiviteit van de BioTrack-MED SARS-CoV-2 applicatie in bloed, waardoor deze applicatie inzetbaar is voor het diagnosticeren van SARS-CoV-2 in bloed.

Bijlage II: Specificaties BioTrack-MED analyzer

Onderstaande informatie is in Engels opgesteld conform de CE-IVD registratie.



The BioTrack-MED analyzer (Version BTMED20.x.xx) is a powerful platform for use inside and outside labs for applications requiring superior performance and maximum versatility. This analyzer is a sophisticated platform for users who require a wide range of applications and maximum versatility. The 2nd generation platform features a robust fieldable design and innovative optical system that enhances sensitivity and let you process a broad range of matrices and pathogens. The BioTrack-MED analyzer comes with easy-to-use one-step software available for both the V2.xx and the BTMED20.x.xx and includes v2.x upgrade. The software v2.x incorporates some practical tools including simple to use interface protocol selection, image requisition and reporting tools, including email notifications and data reporting. Applications include pathogen analysis, pathogen quantitation, pathogen qualification and/or pathogen load information, +/- assays utilizing internal positive/negative controls. To facilitate many of these applications, BioTrack provides preformulated, ready-to-use, quality-tested, assays for use with the BioTrack-MED analyzer.

BioTrack features	
Analysis	Automatic Determination of bacteria, viruses, yeasts and/or fungi 30 – 180 minutes per 18 analysis. Multi sample, Multiplex, simultaneous analysis.
Operating modes	Autonomous or semi-autonomous operation. Applicable in and outside a laboratory environment.
Communication	Control and reporting through web enabled interface. On screen and/or remote wired or wireless communication

BioTrack-MED specifications		
Detection and analysis		
Target micro-organisms	Pathogens such as bacteria, viruses, yeasts and or fungi	
Sample type	Fluids such as EDTA blood (capillary or venous), urine, stool, saliva, swab, csf	
Specificity	99.5% or more, dependent on target and matrix	
Sensitivity	Can detect 1 target per volume of 1 µl (single particle, single cell level)	
Dynamic range	3 – 9 orders of magnitude	
Capacity	18 analyses per analysis disk (simultaneous analysis)	
Technology / methodology		
Identification	DNA/RNA-based fluorescent labelling	
Analysis	UV optical imaging system	
Autonomy	Several operating modes possible	
Sample processing		
Type	EDTA blood (capillary or venous), urine, stool, saliva, swab, csf or other fluids	
Speed	5 – 50 minutes or 20 – 180 minutes	
Sample Volume	10 µl – 1000 µl or 1 ml – 500 ml	
Format	BioTrack analysis disk with 18 positions	
Throughput	1 to 16 disks, 18 positions/disk, per 8 hours	
Throughput compatibility	Multiplexing, Multisampling (user defined)	
Operation and maintenance		
Enclosure materials	Ventilated housing, painted SST	
Electrical requirements	100 - 240 V and 50 - 60 Hz	
Max. power	350 Watt	
Ambient temperature	4 - 50°C	
Pressure	Internally 1 - 2 bara	
Temperature Range	Internally 4 - 80°C	
Temperature accuracy	1°C	
Operating mode	Autonomous and semi-autonomous mode	
Consumables	DNA/RNA fluorescent probe, filter disk.	
Waste	Waste category 3 (low halogen organics)	
Safety	Conform CE, alarms, emergency stop, automatic shut down	
Control system		
Type	Industrial computer, Windows® OS	
Display	17-inch LCD, touch sensitive	
Communications	Web enabled control and reporting (WLAN network, USB port, GPRS)	
Consumables		
Filter disk	Contains 18 filter cups. One-time use	
Fluids	1 – 4 x 1 liter containers with fluids for rinsing, cleaning and flushing	
Assays	8 positions. Contains specific or generic assays. Based on user demands.	
Dimensions / weight		
Equipment	Biotrack device	Consumables
Weight	85 kg	Max 2 kg
Dimensions (W x D x H)	92 x 54 x 72 cm	Various box sizes

Bijlage III: Informatie omtrent de validatiestudie

Het hieronder gebruikte format is door RIVM opgesteld voor antigeen SARS-CoV-2 testen. Omdat er geen format beschikbaar was ten tijde van de validatie van de moleculaire test zoals in dit validatie rapport beschreven is gebruik gemaakt van onderstaand format.

Inventarisatie en status antigeen sneltesten SARS-CoV-2	
Vul de groene velden in	
Laboratorium:	<input type="text" value="Biotrack, Leeuwarden"/>
Contactpersoon:	<input type="text" value="5.1.2e"/>
E-mail:	<input type="text" value="5.1.2e"/>
Telefoon:	<input type="text" value="5.1.2e"/>
Materialen tbv validatie	
1. Heeft u een eigen monsterbank voor validatie?	<input type="text" value="Nee"/>
2. Bent u bereid monsters te delen voor validatie	<input type="text" value="Nee"/>
! Vul per te valideren test een tabblad in, zie volgende tabs !	

